



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

MARIANA BORTHOLAZZI ALMEIDA

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE CONTAMINANTES  
EM AMOSTRAS DE ÁGUA E EFEITOS TÓXICOS DE  
PESTICIDAS UTILIZANDO O MODELO *ZEBRAFISH***

---

Londrina  
2019

MARIANA BORTHOLAZZI ALMEIDA

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE CONTAMINANTES  
EM AMOSTRAS DE ÁGUA E EFEITOS TÓXICOS DE  
PESTICIDAS UTILIZANDO O MODELO *ZEBRAFISH***

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química – Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Suzana Lucy Nixdorf

Londrina  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Almeida, Mariana Bortholazzi.

Determinação multirresíduo de contaminantes em amostras de água e efeitos tóxicos de pesticidas utilizando o modelo *zebrafish* / Mariana Bortholazzi Almeida. - Londrina, 2019.

148 f. : il.

Orientador: Suzana Lucy Nixdorf.

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2019.

Inclui bibliografia.

1 . Cromatografia líquida - Tese. 2. Espectrometria de massas - Tese. 3. Meio ambiente - Tese. 4. Toxicologia - Tese. I. Nixdorf, Suzana Lucy. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

MARIANA BORTHOLAZZI ALMEIDA

**DETERMINAÇÃO MULTIRRESÍDUO DE CONTAMINANTES EM  
AMOSTRAS DE ÁGUA E EFEITOS TÓXICOS DE PESTICIDAS  
UTILIZANDO O MODELO *ZEBRAFISH***

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química, Curso de Doutorado em Química – Associação Ampla UEL/UEPG/UNICENTRO, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Química.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Suzana Lucy Nixdorf  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Eduardo Jorge Pilau  
Universidade Estadual de Maringá – UEM

---

Prof. Dr. Paulo Cesar Meletti  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Carlos Alberto Paulineti da Camara  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Maria Luiza Zeraik  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 26 de abril de 2019.

*Dedico este trabalho aos meus pais, que me apoiaram durante toda minha trajetória acadêmica, e à todos os moradores da região estudada e que são afetados com a contaminação das águas.*

## AGRADECIMENTOS

É com imensa alegria e gratidão que concluo essa etapa. Uma tese não se faz sozinha, e eu não poderia de deixar de tentar agradecer a todos que de alguma forma fizeram parte desses anos de caminhada me incentivando e não me deixando esmorecer.

Primeiramente gostaria de agradecer à minha família, em especial aos meus pais Humberto e Salete, pelo apoio e amor incondicional. Por me garantirem as condições necessárias para estudar durante todos esses anos e pelas palavras de apoio sempre que necessárias. Ao meu irmão Humberto Lucas, pelo companheirismo e apoio de sempre. O incentivo e amor de vocês foi fundamental. Obrigada!

Agradeço imensamente à minha querida orientadora Profa. Dra. Suzana, pela acolhida desde o mestrado e por toda a caminhada que construimos juntas. Este trabalho, e muitos outros, não existiria sem você. Obrigada pela confiança, pela oportunidade, pelos ensinamentos, pelo apoio e torcida incondicional, pelas viagens e momentos de descontração. Você se tornou muito mais do que uma orientadora e meu carinho por você será eterno!

Agradeço aos integrantes do Grupo DIA por todos os momentos de descontração que tivemos juntos, e que certamente fizeram a jornada ficar mais leve! Após tantos anos fica difícil nomear todos que passaram pelo grupo, mas gostaria de fazer um agradecimento especial ao Tiago, pela parceria e ajuda de anos, e às minhas queridas florzinhas Ana, Carol, Dani, Fran, Leticia, Mayara e Rhye. Vocês meninas, foram as minhas alegrias diárias no último ano! Agradeço também à Bárbara e a Cecília.

Sou grata à equipe do Ministério Público do Trabalho do Paraná, por todo o auxílio durante as coletas, em especial à Ellery e ao Paulo, e também a todos os moradores que permitiram que as coletas fossem realizadas em suas propriedades. Agradeço ao pessoal do laboratório LIM pela estrutura durante a realização das análises de massas; à Profa. Emília pelos equipamentos para a realização das análises físico-químicas e à Laura pela ajuda; ao laboratório LEFA durante todo o período de testes com os animais, em especial ao Professor Paulo por todos os ensinamentos e colaboração no trabalho. Um agradecimento especial à Caísa pela ajuda e parceria durante todos os testes realizados, sem você parte deste trabalho não teria sido realizado, e à Isabela pelo auxílio com as análises morfométricas.

Não poderia deixar de agradecer também aos amigos que sempre me trouxeram um sorriso no rosto e boas risadas, em especial às amigas Lohanna, Dálgima, Idianara, Alessandra

e Fernanda que me apoiaram com paciência durante todo esse tempo, e que ajudaram os dias a serem mais suaves e a me manter firme.

Sou grata à Universidade Estadual de Londrina e ao Departamento de Química por toda a infraestrutura disponibilizada, aos docentes do Programa de Pós Graduação pelos conhecimentos adquiridos, e à CAPES pela bolsa concedida.

Agradeço especialmente os membros da banca pelo aceite do convite, pela disponibilidade e por toda a dedicação e atenção para com o meu trabalho.

À todos que de alguma forma contribuíram para a realização e conclusão deste trabalho, meu muito obrigada!

*A arte de viver consiste em tirar o maior bem do maior mal.*

*Machado de Assis*

## RESUMO

O impacto de contaminantes no ambiente e na saúde humana tem sido alvo de constantes estudos. O fato de o Brasil ser o maior consumidor de pesticidas do mundo gera preocupação adicional. O contínuo crescimento do agronegócio brasileiro leva à perspectivas e projeções de elevação em seu uso, com conseqüente poluição do meio ambiente. Em contraposição, ainda são poucos os estudos que avaliam os pesticidas em corpos aquáticos reais empregando métodos de multiresíduos e ecotoxicidade. Esta falta de subsídios científicos tem contribuído para a carência de monitoramento dos agrotóxicos em águas, o que é dificultado pelos poucos limites máximos de resíduos prescritos na legislação brasileira. Constata-se que a fonte de poluição desta matriz complexa não se restringe à atividade agrícola, e pode apresentar interferentes distintos, como os contaminantes emergentes. Desta forma, se faz necessário o uso de técnicas analíticas avançadas em investigações ambientais, a fim de verificar a contaminação por xenobióticos e seus efeitos nocivos em organismos vivos. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar a presença e os níveis de resíduos de contaminantes em águas superficiais, subterrâneas e potável da bacia do rio Tibagi de Araongas (Paraná) e sua toxicidade. As amostras foram avaliadas ao longo de um ano por parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, cor e turbidez). A presença de diferentes contaminantes foi analisada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) empregando *screening* multiresíduos não direcionado (*untargeted*) e determinação da concentração de compostos alvos (*target*). Os efeitos tóxicos das amostras, e de herbicidas e fungicidas em concentrações de relevância ambiental (0,01 a 10,00 µg L<sup>-1</sup>) foram avaliados por meio do teste de toxicidade aguda (*Fish Embryo acute toxicity test* - FET) empregando embriões de Zebrafish (*Danio rerio*). Todas as amostras apresentaram pelo menos 6 pesticidas confirmados, incluindo a água de abastecimento público. Concentrações alarmantes de diuron e imazetapir foram encontradas na área de preservação permanente e em águas subterrâneas. Observou-se ainda, indícios de contaminação por efluentes domésticos pela presença de fármacos e/ou marcadores antropogênicos, como a cafeína. Não foi possível estabelecer um padrão de contaminação. No entanto, houve indicativos de sazonalidade ao se analisar o perfil completo das amostras, com destaque para a coleta de dezembro, que apresentou comportamento distinto. Todas as amostras apresentaram alterações sub-letais nos testes toxicológicos, mesmo em baixas concentrações, indicando uma provável alteração metabólica, durante o desenvolvimento dos embriões e larvas. Os resultados subsidiam a necessidade de um monitoramento nas áreas afetadas e de novas pesquisas com determinados contaminantes em concentrações ambientalmente relevantes e em amostras reais e indicam a necessidade de discussões e um maior engajamento em torno dos regulamentos sobre pesticidas e demais contaminantes emergentes.

**Palavras-chave:** Águas rio Tibagi. Cromatografia líquida. Espectrometria de massas. Meio ambiente. Toxicologia.

ALMEIDA, Mariana Bortholazzi. **Multi-residue determination of contaminants in water and toxic effects of pesticides on the Zebrafish Model**. 2019. 148 p. Thesis (Doctoral Degree in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

## ABSTRACT

The impact of contaminants on the environment and human health has been subject of constant studies. Taking into account that Brazil is the largest consumer of pesticides worldwide, this creates additional concern. By the growth of the Brazilian agribusiness, an even greater increase in the use of pesticides is prospected, having consequently environment pollution. In contrast, the evaluation of pesticides in real aquatic ‘bodies’ samples by multiresidue and ecotoxicity methods is still scarce. Lack of scientific subsidies in this area has contributed to the shortage of agrochemicals monitoring in waters, hampers even more their control through the few levels of maximum residue limits predicted by Brazilian legislation. Furthermore, it must be considered that the pollution source of this complex matrix is not restricted to the agricultural activity, nevertheless may include different interferers, such as emerging contaminants. Hence, advanced analytical techniques must be applied to investigate the contamination by several hazardous compounds in the environment and their xenobiotics effects on living organisms. In this context, the objective of this study was to investigate the presence and levels of residual contaminants in surface, groundwater and drinking water of the Tibagi River in Arapongas region (Paraná State) and its toxicity. Water samples were evaluated over a year by physical-chemical parameters (pH, conductivity, color and turbidity). The presence of different contaminants was analyzed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS) employing untargeted multiresidual screening and concentrations of target compounds. The toxic effects of the samples and of herbicides and fungicides at significant environmental relevance levels (0.01 to 10.00  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) were evaluated thru the Fish Embryo acute toxicity test (FET) performed with Zebrafish (*Danio rerio*) embryos. All samples showed at least 6 confirmed pesticides, including public water supply. Alarming concentrations of diuron and imazethapyr were found in the permanent preservation area and in groundwater. Evidence of contamination by domestic effluents was likewise observed by incidence of pharmaceutical drugs and/or anthropogenic markers, such as caffeine. A contamination pattern could not be established. However, as a full profile of samples was analyzed it indicates influence of the seasonality, giving different behavior for December collection. All samples showed sub-lethal endpoints by toxicological tests, even at low concentrations, showing a metabolic changing during the development of embryos and larvae. Results support the need for monitoring the affected areas and perform further assessment of real samples whereas and environmentally relevant concentrations concern certain contaminants. It requires moreover an increase in discussions and engagement around pesticides and other emerging pollutants regulations.

**Keywords:** Tibagi River waters. Liquid chromatography. Mass spectrometry. Environment. toxicology.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo I

- Figura 1.** Comportamento dos pesticidas no ambiente ..... 27
- Figura 2.** Relação entre comercialização e consumo de agrotóxicos e afins por área plantada (kg/ha) e incidência de intoxicação por agrotóxicos no Brasil. Dados de 2007 a 2013..... 31
- Figura 3.** Etapas da extração em fase sólida ..... 34
- Figura 4.** Exemplo de composto ausente e composto presente durante análise do modo *SRM* ..... 36
- Figura 5.** Exemplar adulto de *Danio rerio* ..... 37
- Figura 6.-** Desenvolvimento do *Danio rerio* ..... 38
- Figura 7.** Desenvolvimento embrionário do Zebrafish para o período de 24 a 96 horas pós fertilização do grupo controle negativo (normal) e do grupo controle positivo (exposto à substância tóxica)..... 39

### Capítulo II

- GA.** *LC-MS/MS multi-target screening and quantitation indicated alarming pesticide contamination in all waters sources analyzed from a rural area* ..... 48
- Figure 1.** *Map location of the area under study at Paraná state (a) and an aerial view of the 9 points of water sampling collections (b)* ..... 54
- Figure 2.** *Total ion chromatogram at the screening of pesticides acquired in SRM mode for SP5*..... 63
- Figure 3.** *3D view of PCA analysis of water samples collected in 4 different months (March, June, September and December) of a year in 9 sampling points* ..... 68

### Capítulo III

- Figura 1.** Gráficos obtidos pelo número de compostos alvos “*targets*” detectados por amostra durante a etapa de *screening* direcionado para os quatro meses de coleta nos 9 pontos amostrados *P1* a *P9* ..... 89
- Figura 2.** Perfil molecular obtido para amostras a partir da aquisição de dados em modo *full scan* na faixa de 100 a 900 *m/z* no modo positivo (a) e *Scores plot* do modelo *PCA* (b)..... 91
- Figura 3.** *Scores plot* do modelo *OPLS-DA* para as amostras de água analisadas no modo positivo ..... 93

<b>Figura 4.</b>	<i>OPLS-DA/S-plot</i> obtido para 36 amostras de água analisadas no modo positivo .....	94
<b>Figura 5.</b>	Determinação de cafeína e paraxantina nas amostras de água por LC-MS/MS.....	97
<b>Capítulo IV</b>		
<b>Figura 1.</b>	Montagem do experimento de teste de toxicidade de substâncias utilizando embriões de <i>Danio rerio</i> . a) Aquário contendo 20 animais e coletor submerso. b) coletor retirado após fertilização dos ovos. c) ovos fecundados após seleção e limpeza. d) montagem da placa para o teste .....	105
<b>Figura 2.</b>	Embriões expostos por 96 horas à amostras de águas superficiais, poço e abastecimento público .....	106
<b>Figura 3.</b>	Taxa de sobrevivência durante 96 horas de exposição à amostras de águas superficiais, poço e abastecimento público .....	107
<b>Figura 4.</b>	Índice <i>iFET</i> calculado para amostras de águas superficiais, poço e abastecimento público após 96 hpf.....	108
<b>Capítulo V</b>		
<b>GA</b>		115
<b>Figure 1.</b>	<i>Morphometric parameters assessed at a 168 hours post-fertilization larvae</i> .....	121
<b>Figure 2.</b>	<i>a) Survival, b) Hatching, c) Swim bladder development rate in Zefrafish after pesticides exposure</i> .....	124
<b>Figure 3.</b>	<i>iFET scores at a) 96 and b) 168 hours post fertilization</i> .....	127
<b>Figure 4.</b>	<i>Morphometric parameters evaluated after 168 hpf of exposure to pesticides: a) head/body length, b) head height/length ratio, c) eye area, d) body length and e) tortuosity</i> .....	129

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

<b>Tabela 1.</b> Pesticidas, suas classificações e culturas utilizadas.....	25
<b>Tabela 2.</b> Índice de GUS.....	28

### Capítulo II

<b>Table 1.</b> <i>Mass spectrometry parameter of the quantified pesticides in water bodies.....</i>	58
<b>Table 2.</b> <i>Data from 9 different water sources in 4 sample collections during a year by month (M, J, S and D) regarding the colour (mg Pt L<sup>-1</sup>), conductivity (μS cm<sup>-1</sup> at 25 °C), pH, and turbidity (NTU).....</i>	61
<b>Table 3.</b> <i>Total concentration of the 12 pesticides quantified by LC-MS/MS in water bodies of a rural area studied at north Paraná state.....</i>	65
<b>SI 1.</b> <i>UTM coordinates from the sampling points.....</i>	76
<b>SI 2.</b> <i>Validation parameters of the quantitation method of pesticides in water samples.....</i>	77
<b>SI 3.</b> <i>Pesticides concentration in water bodies quantified by LC-MS/MS in different sampling points collected in March.....</i>	78
<b>SI 4.</b> <i>Pesticides concentration in water bodies quantified by LC-MS/MS in different sampling points collected in June.....</i>	79
<b>SI 5.</b> <i>Pesticides concentration in water bodies quantified by LC-MS/MS in different sampling points collected in September.....</i>	80
<b>SI 6.</b> <i>Pesticides concentration in water bodies quantified by LC-MS/MS in different sampling points collected in December.....</i>	81

### Capítulo III

<b>Tabela 1.</b> Parâmetros de aquisição no modo SRM para cafeína e paraxantina.....	88
<b>Tabela 2.</b> Tentativa de identificação de compostos significativos entre as amostras de água estudadas .....	94

### Capítulo IV

<b>Tabela 1.</b> Informações sobre localização e característica dos pontos de coleta .....	103
<b>Tabela 2.</b> Concentração total dos pesticidas avaliados nas amostras de águas superficiais, poço e abastecimento público. Quantificação realizada por LC-MS/MS .....	109

**ANEXO**

**Tabela A1.** Parâmetros orgânicos e seus valores máximos permitidos para Água doces de classe 1 e 2 de acordo com a resolução CONAMA 357/2005 ..... 146

**Tabela A2.** Parâmetros orgânicos e seus valores máximos permitidos para Água doces de classe 1 e 2 de acordo com a resolução CONAMA 357/2005 onde possa ocorrer pesca ou cultivo de organismos para fins de consumo ..... 148

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DAD	Detector com arranjo de diodos
EPA	Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana, do inglês <i>Environmental Protection Agency</i>
ESI	Ionização por elétron spray, do inglês <i>electrospray ionization</i>
EU	European Union
FET	Teste toxicológico com embriões, do inglês <i>fish embryo acute test</i>
GUS	Índice de Vulnerabilidade de Águas Subterrâneas, do inglês, <i>Groundwater Ubiquity Score</i>
hpf	Horas após fertilização
ID	Identificação
iFET	Índice de toxicidade sub-letal
K <sub>a</sub>	Constante de equilíbrio de ionização de ácido
K <sub>OC</sub>	Coefficiente de partição normalizado pelo carbono orgânico
LC	Cromatografia líquida, do inglês <i>Liquid Chromatography</i>
LC-MS/MS	<i>Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry</i>
LLE	Extração líquido-líquido, do inglês <i>Liquid-Liquid Extraction</i>
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
LQT	<i>Linear ion-trap</i>
m/z	Relação massa/carga, do inglês <i>mass/charge ratio</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MPT-PR	Ministério Público do Trabalho do Paraná
MRL	Resíduo máximo de pesticidas, do inglês <i>Maximum residue limit</i>
MRM	Monitoramento de reações múltiplas, do inglês <i>Multiple reaction Monitoring</i> , também denominado por <i>SRM</i>
MS	Espectrômetro de massas, do inglês, <i>Mass spectrometer</i>
NTE	<i>Neuropathytargetesterase</i>
NTU	<i>Nephelometric turbidity units</i>

OCPs	Pesticidas organoclorados, do inglês <i>organochlorine pesticides</i>
ONPs	Pesticidas organonitrogenados, do inglês <i>organochlorine pesticides</i>
OPLS-DA	Análise discriminante ortogonal por mínimos quadrados parciais
OPPs	Pesticidas organofosforados, do inglês <i>organophosphate pesticides</i>
PC	Componente principal, do inglês <i>Principal component</i>
PCA	Análise de componentes principais, do inglês <i>Principal Component Analysis</i>
QLIT	Triplo-quadrupolo -“ion-trap” linear
QqQ	Triplo quadrupolo
QqTOF	Quadrupolo com tempo de voo
QTOF	Quadrupolo com tempo de voo
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
RSD	Desvio padrão relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
SBSE	Extração por sorção em barra de agitação, do inglês <i>Stir bar sorptive extraction</i>
SISAGUA	Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano
SNC	Sistema nervoso central
SP	Ponto de amostragem, do inglês <i>Sampling point</i>
SPE	Extração em fase sólida, do inglês <i>Solid phase extraction</i>
SPME	Micro extração em fase sólida, do inglês <i>Solid phase micro extraction</i>
SRM	Monitoramento de reações selecionadas, do inglês <i>Selective reaction monitoring</i>
TIC	Cromatograma do íon total, do inglês <i>Total ion chromatogram</i>
TQD	Espectrometro de massa sequencial, do inglês <i>Tandem quadrupole mass spectrometer</i>
t <sub>R</sub>	Tempo de retenção
UPLC	Cromatografia de ultra desempenho (CLUE), do inglês <i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
VIGIAGUA	Programa Nacional de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano
VIP	Influência da projeção de variáveis
VMP	Valor máximo permitido

## SUMÁRIO

<b>Capítulo I</b> .....	19
<b>1 Introdução</b> .....	20
<b>2 Revisão bibliográfica</b> .....	23
2.1 Pesticidas: Definição, classes e uso.....	23
2.2 Contaminação dos Recursos Hídricos e Comportamento Ambiental dos Pesticidas.....	26
2.3 Saúde <i>versus</i> Pesticidas.....	30
2.4 Métodos de análise para matrizes ambientais.....	32
2.4.1 Preparo de amostra.....	32
2.4.2 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.....	34
2.5 Ensaio toxicológicos - zebrafish.....	37
<b>3 Objetivo</b> .....	41
<b>4 Referências</b> .....	42
<b>Capítulo II -Pesticide Determination in Water Samples from a Rural Area by Multi-Target Method Applying Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry</b> .....	47
<b>Abstract</b> .....	49
<b>Introduction</b> .....	50
<b>Experimental</b> .....	53
<i>Study area and samples</i> .....	53
<i>Physico-chemical parameters</i> .....	55
<i>Sample preparation for pesticides analysis</i> .....	55
<i>Standards</i> .....	56
<i>Liquid Chromatography conditions</i> .....	56
<i>Mass spectrometry conditions</i> .....	57
<i>Validation process</i> .....	58
<i>Statistical Analysis</i> .....	59
<i>Results and Discussion</i> .....	59
<i>Physico-Chemical Analysis</i> .....	60
<i>Pesticides Screening</i> .....	62
<i>Quantitative Method Validation</i> .....	63
<i>Pesticides Quantification in Samples</i> .....	64

<i>Overall Results and Final Considerations</i> .....	67
<b>Conclusion</b> .....	69
<b>Supplementary Information</b> .....	70
<b>Acknowledgment</b> .....	70
<b>References</b> .....	71
<b>Supplementary Information</b> .....	75

**Capítulo III- Identificação de contaminantes em amostras de água por abordagem de *screening* não direcionado(*untargeted*) e direcionado (*target*)** .....82

<b>1</b>	<b>Introdução</b> .....	83
<b>2</b>	<b>Material e Métodos</b> .....	85
2.1	Amostras .....	85
2.2	Equipamento .....	85
2.3	<i>Screening</i> direcionado para compostos suspeitos .....	85
2.4	Análise não direcionada – Método <i>Untargeted</i> .....	87
2.5	Análise confirmatória de Cafeína e Paraxantina .....	87
<b>3</b>	<b>Resultados e Discussão</b> .....	89
3.1	<i>Screening</i> direcionado .....	89
3.2	Método <i>Untargeted</i> .....	90
3.3	Determinação de Cafeína e Paraxantina .....	95
<b>4</b>	<b>Conclusão</b> .....	98
<b>5</b>	<b>Referências</b> .....	99

**Capítulo IV- Avaliação dos efeitos tóxicos das amostras de água superficial, poço e abastecimento municipal no desenvolvimento do *Danio rerio*** ..... 101

<b>1</b>	<b>Introdução</b> .....	102
<b>2</b>	<b>Material e Métodos</b> .....	103
2.1	Amostras .....	103
2.2	Soluções e reagentes .....	103
2.3	Animais .....	104
2.4	Observações letais e sub-letais (FET e iFET).....	105
<b>3</b>	<b>Resultados e Discussão</b> .....	106
<b>4</b>	<b>Conclusão</b> .....	111
<b>5</b>	<b>Referências</b> .....	112

	<b>Capítulo V- Effects of residue levels of herbicides and fungicides on the early development of Zebrafish (<i>Danio rerio</i>)</b> .....	114
<b>1</b>	<b>Introduction</b> .....	117
<b>2</b>	<b>Material and Methods</b> .....	118
2.1	<i>Chemical and reagents</i> .....	118
2.2	<i>Danio rerio cultivation and embryo exposure</i> .....	119
2.3	<i>Lethal and sub-lethal observations (FET and iFET)</i> .....	120
2.4	<i>Morphometric analysis</i> .....	121
2.5	<i>Statistical Analysis</i> .....	121
<b>3</b>	<b>Results</b> .....	123
3.1	<i>Survival rate of zebrafish after pesticides exposure</i> .....	123
3.2	<i>Hatching rate</i> .....	124
3.3	<i>Development of swim bladder</i> .....	125
3.4	<i>Lethal and sub-lethal observations (FET and iFET)</i> .....	126
3.5	<i>Morphometric analysis</i> .....	128
<b>4</b>	<b>Discussion</b> .....	131
<b>5</b>	<b>Conclusion</b> .....	137
<b>6</b>	<b>Acknowledgment</b> .....	138
<b>7</b>	<b>References</b> .....	139
	 <b>Considerações finais</b> .....	 143
	 <b>Anexo</b> .....	 145
	<b>Anexo A – Padrões de Qualidade de Água para Classe I e II/Água Doce</b> .....	146

# Capítulo I

## 1. Introdução

De acordo com a Lei nº 9.433/1997, conhecida como Lei das Águas, a água é considerada um bem de domínio público e um recurso natural limitado, dotado de valor econômico, sendo um dos objetivos da lei assegurar a sua qualidade para futuras gerações (BRASIL, 1997). O monitoramento e a determinação da qualidade de água em regiões agrícolas advêm da preocupação crescente com a preservação do meio ambiente e a saúde humana.

As classificações dos corpos hídricos e as diretrizes para seu enquadramento são previstas pela legislação brasileira pela Resolução CONAMA 357/2005, alterada pela Resolução 410/2009 e pela Resolução 430/2011, bem como, nestas são previstas as condições para manutenção de sua qualidade (BRASIL, 2005). Já, em relação à água de consumo e abastecimento, a Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011 é que dispõe sobre a qualidade e o padrão de potabilidade, exigidos para o consumo humano, independente da sua origem (BRASIL, 2011).

No Brasil, a agricultura é uma das atividades que mais consomem água, cerca de 70% do volume disponível (FAO, 2014). Estima-se que com o intenso aumento populacional, em 2050 será necessário elevar a produção de alimentos em 70%. Porém, para o mesmo período já é previsto que 2/3 da população irá sofrer com a escassez da água (FAO, 2016 a, b). Desta forma, a preocupação em relação ao mau uso da água e à sua contaminação por agrotóxicos são temas recorrentes de discussões e programas de monitoramento como o VIGIAGUA (Programa Nacional de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano) e o SISAGUA (Sistema de Informação de Vigilância da Qualidade da Água para Consumo Humano), que vem ganhando força para garantir o acesso à água de consumo humano com qualidade e segurança no Brasil (BAROBOSA et al., 2015).

A agricultura, além de consumir uma grande parcela da água disponível, também utiliza uma elevada quantidade de insumos agrícolas, com o intuito de produzir alimentos com alta produtividade. Os compostos químicos utilizados, comumente chamados de agrotóxicos ou pesticidas, se dividem em diversas classes de acordo com os grupos funcionais e modos de ação, biotransformação e eliminação. Parte destes compostos após aplicados nas lavouras também atingem rios, lagos e aquíferos devido a sua mobilidade no ambiente e também em decorrência do descarte inapropriado do produto não utilizado, ou ainda, pela lavagem do maquinário utilizado durante sua aplicação (PRIMEL et al., 2007).

De acordo com relatório do Ministério da Saúde sobre a vigilância em saúde de populações expostas a agrotóxicos (2016), a produção destes produtos vem crescendo ao longo dos anos sem o aumento proporcional da área plantada, o que indica que essa quantidade nem sempre equivale à produtividade. Entre os estados brasileiros, o Paraná classificou-se em 3º lugar na comercialização em 2013, perdendo apenas para os estados do Mato Grosso e São Paulo. Entretanto, o Paraná não se enquadra como um dos estados que mais utilizam agrotóxicos, ocupando apenas a oitava posição. Esta discrepância pode estar relacionada às 36 indústrias agroquímicas presentes no estado, número que está abaixo apenas de São Paulo, que contém 98 indústrias (BRASIL, 2016). Este número consideravelmente elevado de indústrias indica a necessidade de acompanhamento mais cauteloso das áreas próximas à cadeia produtiva, tanto em relação a possíveis contaminações ambientais, principalmente dos recursos hídricos, quanto à exposição contínua da população a essas substâncias.

Ao longo de 7 anos, só no Paraná foram registrados 10.967 casos de intoxicação. Em relação ao número absoluto de notificações por intoxicação, as cidades de Curitiba, Londrina e Cascavel ficaram na 6ª, 11ª e 21ª posição dentre os municípios brasileiros com 725, 377 e

253 casos respectivamente, entre o período de 2011 a 2014, sendo que somente Cascavel e Londrina são consideradas grandes produtoras agrícolas (BRASIL, 2016).

A intoxicação crônica por agrotóxicos caracteriza-se pelo aparecimento tardio de patologias, sendo algumas delas: neoplasias, como mielomas múltiplos e leucemias; anemia aplástica; transtornos mentais, como alterações cognitivas e episódios depressivos; doenças do sistema nervoso como distúrbios do movimento, polineuropatias e encefalopatia tóxica; oculares, como neurite óptica e distúrbios da visão, e ainda auditivos, circulatórios, respiratórios, digestivos e dermatológicos (PARANÁ, 2013). Tendo em vista a dificuldade de se realizar estudos toxicológicos em humanos, modelos animais que apresentam grande similaridade genética, como o zebrafish (SANT'ANNA, 2009), são alternativas viáveis para se testar os efeitos tóxicos de contaminantes ambientais, não somente em níveis sabidamente tóxicos, mas também em concentrações ambientalmente relevantes.

Neste contexto, após o conhecimento de denúncias feitas pela população ao Ministério Público do Trabalho do Paraná (MPT-PR) em relação à qualidade da água proveniente dos rios das propriedades próximas a uma indústria de agrotóxicos, o centro de apoio do MPT-PR em parceria com o Grupo DIA – UEL (Desenvolvimento de Instrumentação, Automação e Metodologia Analítica – CNPq), realizou-se o presente trabalho que propôs estudar a contaminação das águas de rios, de poço e de abastecimento público de uma área rural entre os municípios de Araongas e Apucarana, região metropolitana de Londrina, e abordar os possíveis efeitos tóxicos dessa contaminação utilizando o modelo zebrafish. Até o presente momento não haviam sido realizados estudos envolvendo a determinação de pesticidas presentes nas águas superficiais e subterrâneas da região, que faz parte da bacia do rio Tibagi.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1 Pesticidas: Definição, classes e uso

De acordo com a ANVISA, agrotóxico é o termo legal e definido pela Lei 7802/89, chamada Lei de Agrotóxicos, sendo também aceito e utilizados os termos pesticidas, praguicidas e defensivos agrícolas, como sinônimos (BRASIL, 1989). Em citação à Lei 7802/89:

“Agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos. São substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.”

Os pesticidas também se caracterizam por serem substâncias altamente tóxicas, bioacumulativas, estáveis ambientalmente, porém com grande mobilidade, podendo contaminar o solo, a água e o ar (FENIK et al., 2011).

São classificados de acordo com o modo de ação e de acordo com o tipo de organismo a combater: herbicidas, inseticidas, fungicidas entre outros. São também diferenciados estruturalmente por grupos químicos, entre inorgânicos e orgânicos (BARBOSA, 2012). Os grupos inorgânicos incluem inseticidas arsênicos, fluoretos, herbicidas e fungicidas inorgânicos. Já os orgânicos, se dividem em pesticidas organoclorados, organofosforados e organonitrogenados.

Os pesticidas organofosforados (OPPs) são o principal grupo para proteção das culturas agrícolas. Todos apresentam fósforo em sua estrutura, bem como um grupo éster. Seu modo de ação é através da inativação de enzimas que atuam no sistema nervoso, principalmente a acetilcolinesterase, não apresentam especificidade, podendo afetar também a

saúde humana e animal. Os organonitrogenados (ONPs) incluem os compostos da família das feniluréias, carbamatos e triazinas. São muito utilizados para o combate de pragas e são menos estáveis no ambiente do que os organoclorados (OCPs) e podem atingir o sistema digestivo ocasionando intoxicações. Os OCPs são os mais estáveis no ambiente, podendo durar até 30 anos e são considerados como altamente tóxicos aos humanos (FENIK et al., 2011).

Além da classe química, os pesticidas também podem ser indicados para tipos de culturas e controles de pragas específicas. No Brasil, de acordo com levantamento realizado por Pignati e colaboradores (2017), 42% da área plantada é destinada a cultura de soja, seguido de 21% para milho e 13% para cana-de-açúcar. Já em relação ao consumo de pesticidas no Brasil, há uma prevalência para o uso de herbicidas (57,99%), seguidos dos inseticidas (12,30%) e fungicidas (10,62%) (IBGE, 2019). Na Tabela 1 é possível observar os pesticidas a serem abordados no presente trabalho, na qual a grande maioria são herbicidas, e todos são destinada para os tipos de lavouras mencionadas.

A cada ano o número de compostos permitidos para o uso nas lavouras aumenta. Somente no ano de 2018, por exemplo, de acordo com o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), foram registrados no Brasil 450 novos ingredientes ativos, sendo 52 destes considerados de baixa toxicidade (defensivos biológicos). Assim, considerando que para uma única área de cultivo podem ser utilizados diversos pesticidas, a preocupação com a sua presença e consequência no ambiente é ainda maior.

**Tabela 1.** Pesticidas e suas classificações e culturas utilizadas

Pesticida	Fórmula Molecular	Classe Química	Cultura utilizada	Estrutura
Ametrina	$C_9H_{17}N_5S$	Herbicida	Cana-de-açúcar	
Atrazina	$C_8H_{14}ClN_5$	Herbicida	Cana-de-açúcar, milho e sorgo	
Azoxistrobina	$C_{22}H_{17}N_3O_5$	Fungicida	Alface, amendoim, beterraba, batata, café, cebola, cenoura, citros, feijão, goiaba, mamão, melancia, melão, morango, pêssago, pimentão, tomate e uva	
Carbendazim	$C_9H_9N_3O_2$	Fungicida	Algodão, citros, feijão, soja e trigo e também no tratamento de sementes de algodão, feijão e soja	
Diuron	$C_9H_{10}Cl_2N_2O$	Herbicida	Cana-de-açúcar, citros, café, algodão, abacaxi, videira, cacau, banana, alfafa e seringueira	
Hexazinona	$C_{12}H_{20}N_4O_2$	Herbicida	Cana-de-açúcar	
Imazaquim	$C_{17}H_{17}N_3O_3$	Herbicida	Soja	
Imazetapir	$C_{15}H_{19}N_3O_3$	Herbicida	Soja e arroz irrigado	
Imidacloprid	$C_9H_{10}ClN_5O_2$	Inseticida	Algodão, arroz, arroz irrigado, batata, cana-de-açúcar, citros, feijão, fumo, milho, soja, tomate e trigo	
Propiconazol	$C_{15}H_{17}Cl_2N_3O_2$	Fungicida	Arroz irrigado, banana, cevada, milho e trigo	
Tebuconazol	$C_{16}H_{22}ClN_3O$	Fungicida	Alho, aveia, batata, cebola, cevada, soja e trigo	
Tebutiuron	$C_9H_{16}N_5OS$	Herbicida	Cana-de-açúcar	

Fonte: <http://www.adapar.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=387> (2019)

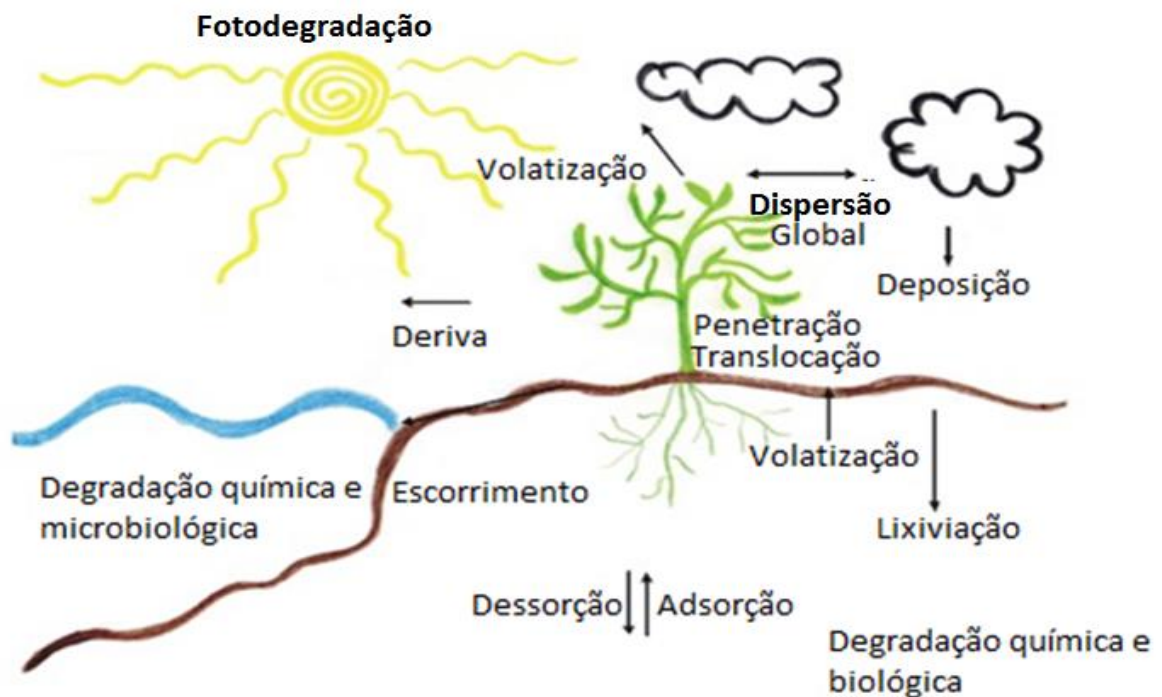
## 2.2 Contaminação dos Recursos Hídricos e Comportamento Ambiental dos Pesticidas

A poluição dos recursos hídricos vem sendo tema de diversos estudos nas últimas décadas, sendo as fontes poluidoras mais comuns: os efluentes industriais, o esgoto urbano e a atividade agrícola. O escoamento superficial de áreas agrícolas é um dos principais modos de contaminação dos rios por pesticidas. Estes podem ocorrer: por aplicação direta destes compostos para controle de plantas aquáticas e insetos; pela sua permeação através do solo; por resíduos de produção de indústrias de pesticidas; além dos próprios resíduos municipais que apresentam fungicidas e bactericidas (BIZIUK et al., 1996; KÖCK-SCHULMEYER et al., 2013).

No campo, os pesticidas podem ser aplicados também através de pulverizadores, bombas e aviões, na forma de *spray*. A influência dos ventos nesse tipo de aplicação não pode ser evitada, auxiliando na sua dispersão no ambiente, possibilitando a sua chegada às águas superficiais (VEIGA et al., 2016).

Com o avanço tecnológico os pesticidas que eram estáticos, possuíam baixa solubilidade e tinham um forte poder de adesão ao solo, passaram a ser mais solúveis em água, possuir baixa capacidade de adesão, ser mais voláteis, persistentes e eficientes para combater as pragas (VEIGA et al., 2006), mas também passaram a ser mais tóxicos para organismos não alvos. Na Figura 1 é possível observar o comportamento dos pesticidas no ambiente e as diversas formas com que eles podem atingir os recursos hídricos.

**Figura 1.** Comportamento dos pesticidas no ambiente



Fonte: [http://www.infobibos.com/Artigos/2010\\_2/Agrotoxicos/Index.htm](http://www.infobibos.com/Artigos/2010_2/Agrotoxicos/Index.htm), 2019.

Visto que cada pesticida possui uma característica química particular, pouco se sabe sobre comportamento nos solos. Fatores como população microbiana do solo, temperatura, incidência de luz, solubilidade em água, umidade do solo, pH do solo, tempo de meia-vida, constante de equilíbrio de ionização de ácido ( $K_a$ ) entre outros, são fatores que afetam diretamente a sua permanência e ou transporte do produto químico (GONÇALVES, 2007; SPADOTTO et al., 2009). Algumas das características físico-químicas dos pesticidas, entretanto, podem ser utilizadas para se calcular índices de particionamento conhecido como Índice de Vulnerabilidade de Águas Subterrâneas, do inglês, *Groundwater Ubiquity Score* (GUS) (Equação 1), que auxiliam na compreensão da mobilidade iônica dos compostos para os corpos hídricos, através da percolação do solo (ARMAS et al., 2007), em que,  $K_{oc}$  é coeficiente de partição normalizado pelo carbono orgânico ( $L\ kg^{-1}$  substância orgânica).

$$GUS = \log_{10} (MeiaVida) \times [4 - \log_{10}(K_{OC})] \quad \text{Eq. 1}$$

A Tabela 2 traz as informações sobre os índices calculados para cada pesticidas a ser avaliado no presente trabalho por meio da Equação 1. De acordo com o GUS, valores abaixo de 0,1 são considerados extremamente baixos, 1,0 a 2,0 de baixo potencial de mobilidade, 3,0 a 4,0 altos e acima de 4,0 de extrema mobilidade, podendo se mover em direção aos lençóis freáticos.

**Tabela 2.** Índice de GUS

<b>Pesticida</b>	<b>Meia-Vida no Solo (dias)</b>	<b>Solubilidade em Água (mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>K<sub>OC</sub></b>	<b>Índice GUS</b>	<b>Mobilidade</b>
Ametrina	60	185	300	2,71	Moderada
Atrazina	60	33	100	3,56	Alta
Azoxistrobina	84,5	6,7	440	2,61	Moderada
Carbendazim	120	8	400	2,91	Moderada
Diuron	90	42	480	2,58	Moderada
Hexazinona	90	33	54	4,43	Extremamente alta
Imazaquim	60	60	20	4,80	Extremamente alta
Imazetapir	90	200	10	5,86	Extremamente alta
Imidacloprid	191	610	225	3,76	Alta
Propiconazol	110	110	650	2,42	Moderada
Tebuconazol	365	36	769	2,85	Alta
Tebutiuron	360	2500	80	5,36	Extremamente alta

**Fonte:** <http://npic.orst.edu/ingred/ppdmove.htm> e <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm> (2019)

O índice GUS, apesar de classificar os pesticidas em extremamente baixa a extremamente alta mobilidade, tem a desvantagem de não levar em consideração as condições ambientais e o tipo de solo a que eles se encontram expostos, podendo, portanto, haver algumas alterações na estimativa do comportamento real, quando expostos ao meio. Além do

GUS, há também o método de Goss e os critérios adotados pela Agência de Proteção Ambiental Norte-Americana (EPA, do inglês *Environmental Protection Agency*) que avaliam o potencial de contaminação das águas superficiais. Esses critérios avaliam as propriedades físico-químicas de cada princípio ativo, mas de forma geral, se o coeficiente de sorção à matéria orgânica do pesticida indicar uma baixa retenção ao solo ( $K_{OC} < 500$ ) este pode ser considerado como potencial contaminante de águas, sendo que maiores tempos de meia-vida indicam um maior acúmulo do pesticida do ambiente (PEIXOTO, 2007; SOARES et al., 2017).

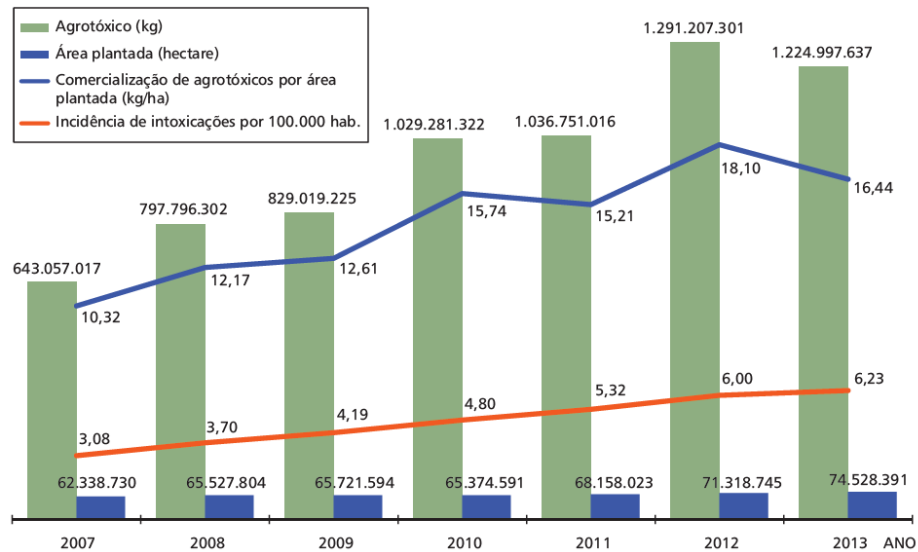
Sabe-se que, devido à intercomunicabilidade dos sistemas hídricos, a contaminação em um determinado local pode afetar também áreas distantes, o que acarreta na contaminação de toda a população abastecida pelas áreas da rede fluvial (VEIGA et al., 2006). Devido ao uso indiscriminado dos pesticidas é possível realizar a detecção dos níveis residuais dos compostos no ambiente quando empregadas técnicas analíticas adequadas (KURZ et al., 2009). A fim de se realizar um controle de resíduos tóxicos no ambiente, diretrizes e resoluções foram criadas com valores máximos permitidos (VMP) para alguns pesticidas, tais como a resolução CONAMA 357/2005 (Anexo A) e a Portaria nº 2914/2011 do Ministério da Saúde. Contudo, o número de compostos listados, ainda é muito baixo, quando comparado aos disponíveis comercialmente e em uso na agricultura, o que não garante um controle efetivo da contaminação ambiental.

### 2.3 Saúde *versus* Pesticidas

Os agrotóxicos abrangem muitas substâncias químicas e produtos biológicos, desenvolvidos para potencializar uma ação biocida. Representam, assim, um risco em potencial para todos os organismos vivos e principalmente para a saúde pública. Muitos desses compostos estão na formulação dos defensivos agrícolas. Estes podem permanecer no ambiente por muitos anos, tornando inevitável a exposição dos agricultores e de toda população local a estes resíduos e aos seus produtos de degradação, não só pelo contato com o solo, mas também pela água, pelo ar e por alimentos (GARCIA, 2001; BOLOGNESI, 2003; RANGEL, ROSA e SARCINELLI, 2011). Dentre os indivíduos considerados como grupo de risco, enquadram-se além dos trabalhadores rurais, crianças, grávidas, lactantes, idosos e pessoas debilitadas (BRASIL, 2017).

A exposição crônica dos agrotóxicos por longos períodos, mesmo que em baixas concentrações, pode desencadear ao desenvolvimento do câncer, da malformação e a danos no sistema nervoso e funcionamento do sistema endócrino, bem como, problemas respiratórios, neurológicos, gastrointestinais, dermatológicos e até mesmo a morte (ARYA, 2005; LI et al., 2014; RANGEL, ROSA, SARCINELLI, 2011; SILVÉRIO et al., 2017, LOPES, ALBUQUERQUE, 2018). Segundo Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos o aumento na incidência de intoxicações vem aumentando ao longo dos anos, bem como o consumo de agrotóxicos (Figura 2) (BRASIL, 2016).

**Figura 2.** Relação entre comercialização e consumo de agrotóxicos e afins por área plantada (kg/ha) e incidência de intoxicação por agrotóxicos no Brasil. Dados de 2007 a 2013.



**Fonte:** Brasil (2016).

Na literatura há poucos estudos relatando os diferentes tipos de exposição aos pesticidas e em relação aos fatores genéticos associados. Entretanto, sabe-se que a toxicidade está relacionada à dose e ao princípio ativo absorvido, e que agravantes na saúde são correlacionados positivamente ao uso intenso de pesticidas (PIGNATI et al., 2017). De acordo com Bolognesi (2003) casos de leucemia e mielomas múltiplos são muito frequentes em agricultores.

Segundo a Secretaria de Estado da Saúde do Paraná, no Brasil há uma enorme carência de instrumentos clínicos que auxiliam no diagnóstico de intoxicações crônicas por agrotóxicos, bem como, que possam relacioná-los ao trabalho e/ou ambiente (PARANÁ, 2013). O Ministério da Saúde entretanto, vem buscando através das estratégias propostas pelas Diretrizes para Vigilância de Saúde Populações Expostas a Agrotóxicos, realizar monitoramento da água de consumo levando em conta os resíduos de agrotóxicos visando relacionar à situações de exposição de risco de intoxicações (BRASIL, 2017).

Um aspecto importante a ser considerado é que a maioria dos estudos toxicológicos avaliam os efeitos potencialmente tóxicos, mutagênicos e teratogênicos dos pesticidas individualmente, entretanto, no ambiente a exposição ocorre em misturas complexas, com diferentes concentrações e grupos químicos, o que dificulta a identificação dos potenciais causadores dos efeitos tóxicos observados clinicamente (PEDLOWSKI et al., 2012; SILVÉRIO et al. 2017).

## 2.4 Métodos de análise para matrizes ambientais

### 2.4.1 Preparo de amostra

Tendo em vista a complexidade na composição das matrizes de amostras ambientais e a baixa concentração dos analitos, o uso de técnicas de extração e pré-concentração tornam-se indispensáveis para viabilizar e facilitar a detecção e quantificação de analitos nessas matrizes. Inúmeras estratégias, desde adição de padrão interno até etapas de *clean-up* das amostras, são elaboradas para minimizar a detecção de interferentes de modo a proporcionar a realização das análises (DAVID, 2007; CHAVES et al., 2007; MELO et al., 2007; PRIMEL, 2011).

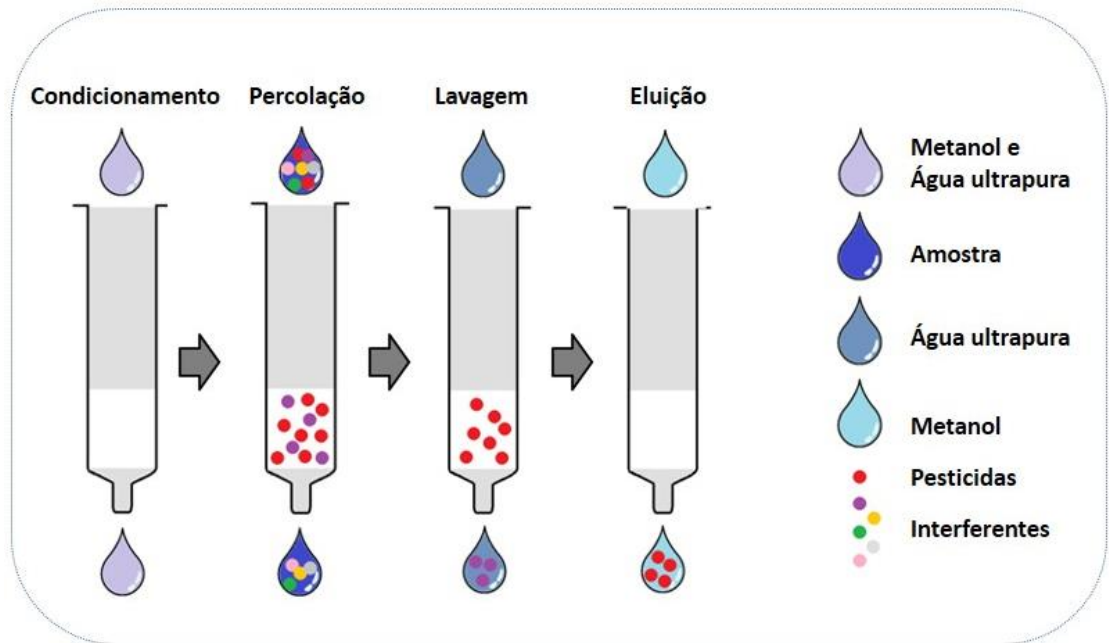
A matriz das amostras pode conter espécies interferentes que apresentam alguma similaridade química ao analito, sendo que os interferentes são capazes de promover uma resposta instrumental semelhante, dificultando, ou até mesmo impossibilitando, a distinção e determinação do analito. Este efeito, conhecido como efeito de matriz, representa uma dificuldade para a análise de amostras *in natura*, impondo a necessidade da etapa de preparo de amostras, a fim de extrair e concentrar o analito, minimizando os efeitos de matriz da amostra, garantindo resultados precisos e mais sensíveis (VALENTE, AUGUSTO, 2000; DAVID, SANDRA, 2007; CALDAS et al., 2011).

Dentre as diversas possibilidades de pré-tratamento, a extração em fase sólida (SPE) e a extração líquido-líquido (LLE), embora sejam consagradas para o preparo de amostras complexas, são métodos mais laboriosos, além de dispenderem um volume maior de solvente, no caso da LLE. Seguindo a tendência de miniaturização e automação de métodos analíticos, a micro extração em fase sólida (SPME) e a extração por sorção em barra de agitação (SBSE) ganharam espaço nos últimos anos, e inúmeros trabalhos utilizando essas técnicas tem sido descritos para análise de contaminantes e aromas em alimentos, amostras de ar, poluentes em amostras de água, fármacos e seus respectivos metabólitos em fluídos biológicos (DAVID, SANDRA, 2007; LEANDRO, 2010; MELO, 2007; SILVA, 2011).

Apesar das diversas metodologias disponíveis, para a análises multirresíduos de pesticidas em matrizes aquosas por cromatografia, a literatura vem demonstrando uma grande preferência pelo preparo de amostra por SPE, devido a possibilidade de se utilizar um volume maior de amostra, baixo volume de solvente de eluição, com consequente alto fator de concentração, bom fator de recuperação e precisão, e pela ampla seletividade de compostos, visto que os pesticidas possuem características químicas diferenciadas (SABIM et al., 2009; CALDAS et al., 2011). As etapas do processo SPE estão descritas na Figura 3.

A escolha do sorvente, volume de amostra, pH da amostra, solvente de eluição e velocidade de percolação são variáveis que devem ser consideradas durante o desenvolvimento do método. Entretanto, para a extração de pesticidas, os sorventes mais comuns são os de  $C_{18}$  e poliméricos (CALDAS et al, 2011).

**Figura 3.** Etapas da extração em fase sólida



**Fonte:** Próprio autor

Uma vantagem da técnica é que em rotinas de análises cujo o número de amostras a serem preparadas é muito grande, ainda há a possibilidade de postergar a eluição dos analitos extraídos, congelando-se os cartuchos após a etapa de percolação da amostra (-18 °C) (KURZ, 2007). Outra vantagem de se utilizar a técnica SPE em relação as demais técnicas de extração é a sua capacidade de automação (SPE *on-line*), no qual o sistema de extração é acoplado diretamente ao sistema cromatográfico (CALDAS et al, 2011).

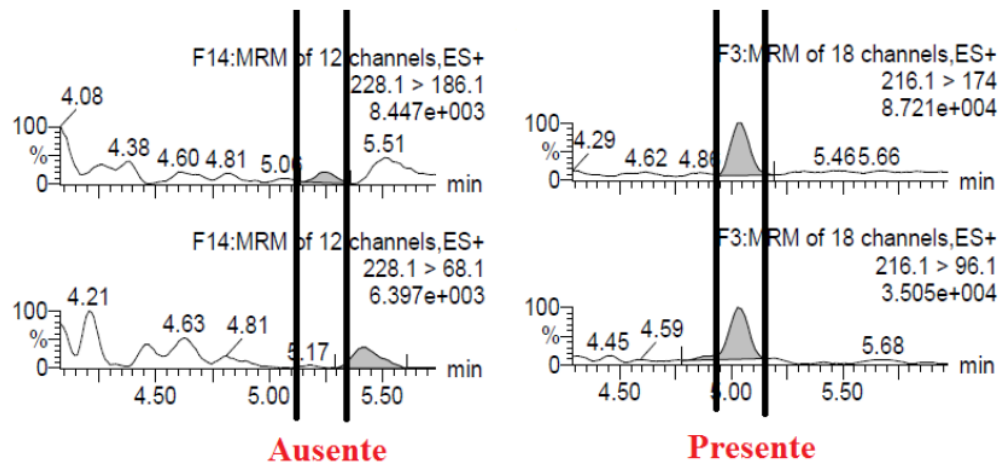
#### 2.4.2 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

O monitoramento de compostos em baixas concentrações em amostras ambientais, na presença de interferentes, requer algumas etapas de preparação da amostra e uma análise com alta sensibilidade (ALBUQUERQUE et al., 2016). Tradicionalmente, o método utilizado para a análise de pesticidas em níveis traço utiliza a cromatografia líquida (LC), uma vez que a

técnica permite a separação, identificação e quantificação de compostos, quando aplicado um detector adequado, como o arranjo de diodos (DAD) e/ou espectrômetro de massas (MS). A fim de detectar baixas concentrações, o espectrômetro de massas é uma ferramenta valiosa com alta seletividade e sensibilidade, especialmente quando utilizando o monitoramento de reações múltiplas (MRM ou SRM do inglês, *selective reaction monitoring*) (CALDAS et al., 2011; GLAUNER et al., 2012; ROUSIS et al., 2017; SABIN et al., 2011).

Diferentes tipos de análises podem ser realizadas de acordo com o analisador de massas disponível. Entretanto, para análises com fins quantitativos a utilização de instrumentos do tipo triplo-quadrupolo é a mais indicada, desde que haja padrões analíticos disponíveis durante as análises. A utilização de duas transições no modo *SRM* visa garantir maior seletividade e confiabilidade do método, e caracteriza o método *target*, no qual se sabe qual o composto é o alvo (FARRÉ et al., 2012; GLAUNER et al. 2012; ROUSIS et al., 2017). O modo *target* é muito utilizado durante etapas de *screening* quando se busca determinados compostos já conhecidos ou esperados em determinadas amostras, como o caso de pesticidas e seus produtos de degradação, com transições conhecidas em matrizes ambientais. Contudo, normalmente há um limite de 150 compostos por método desenvolvido dependendo da separação cromatográfica, devido a possível perda de sensibilidade (FARRÉ et al., 2012). Os critérios de detecção e identificação para os compostos são normalmente avaliados com auxílio de um *software*, no qual o composto é tido como detectado quando há concordância com a massa da molécula alvo (erro < 5ppm) e o tempo de retenção apresenta uma variação menor que 0,2 minutos (Figura 4) (ROUSIS et al., 2017).

**Figura 4.** Exemplo de composto ausente e composto presente durante análise do modo *SRM*



**Fonte:** Próprio autor

Apesar da diversidade de compostos que podem ser considerados como alvos no método *target*, deve-se levar em conta que, em amostras ambientais, há a possibilidade de existir compostos tidos como desconhecidos, pela ausência de padrão analítico no momento da análise, ou por pertencer à outras classes de contaminantes também presentes nessas matrizes. Para estes tipos de compostos, cuja análise pode ser denominada *untarget*, o modo de aquisição em *full-spectrum*, é uma alternativa interessante, no entanto, necessita equipamentos com alta resolução de massa, tais como quadrupolo com tempo de voo (*time-of-flight* – QTOF) e o *linear ion-trap* (LTQ). Este modo de análise pode fornecer informações interessantes do ponto de vista ambiental em relação à contaminação das amostras estudadas, desde que empregadas técnicas estatísticas de tratamento de dados adequadas, visto que não há uma pré-seleção de busca. Todavia, em matrizes complexas, a comparação dos dados de massas obtidos com bancos de dados se torna complicada, dificultando a identificação dos compostos (ROUSIS et al., 2012; SOULIER et al., 2016).

## 2.5 Ensaaios toxicológicos - zebrafish

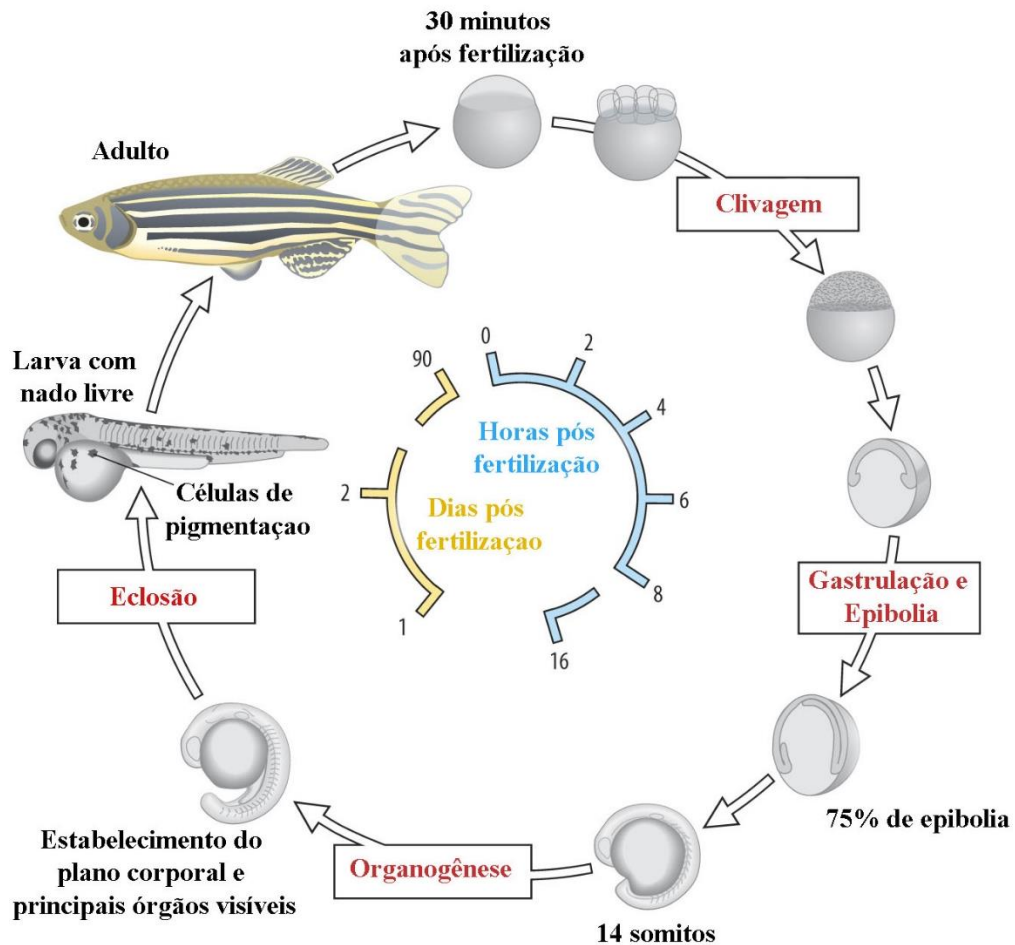
Estima-se que 95% dos estudos sobre efeitos de determinadas substâncias em organismos vivos são realizados em roedores. Recentemente o modelo zebrafish, tem ganhando destaque na comunidade científica. O Zebrafish, conhecido no Brasil como paulistinha (*Danio rerio*) (Figura 5) é um peixe de água doce de pequeno porte, fácil manutenção e com alta taxa de reprodução e de rápido desenvolvimento. Em um período de 24 horas já é possível observar o estabelecimento do plano corporal e o desenvolvimento de alguns órgãos, e a partir de 72 horas após a fertilização as larvas eclodem, atingindo o estágio adulto em 90 dias (Figura 6).

**Figura 5.** Exemplar adulto de *Danio rerio*



**Fonte:** <https://www.zebrafishfilm.org>, 2019

**Figura 6.** Desenvolvimento do *Danio rerio*



Fonte: Adaptado de [http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO\\_03/ch03f09.jpg](http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DEVO_03/ch03f09.jpg) (2019)

Pelo fato deste apresentar um genoma já sequenciado, com grande semelhança ao dos mamíferos, torna-o um modelo viável para estudos comportamentais, genéticos, toxicológicos e de mecanismos patológicos (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012; LIESCHKE, CURRIE, 2007). O modelo zebrafish foi proposto por George Streisinger em 1981 e possui um banco de dados genéticos disponível no site *zfin.org*, onde é possível encontrar diversos trabalhos, inclusive um guia laboratorial para se trabalhar com o animal.

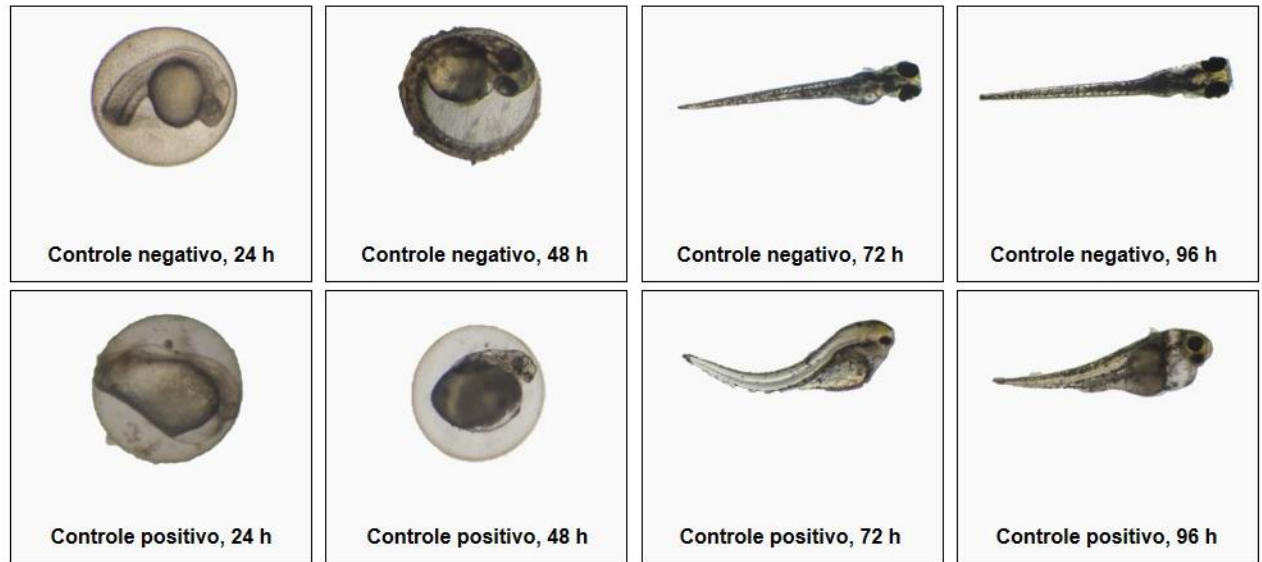
O modelo zebrafish é de grande interesse em estudos quanto à qualidade de água, visto que como outros peixes, ele é capaz de absorver de forma rápida substâncias adicionadas ou presentes na água na qual está inserido, acumulando essas substâncias em diferentes tecidos,

principalmente no sistema nervoso central, que pode ser diretamente afetado por pesticidas (SANT'ANNA, 2009, DAI et al., 2014).

Os compostos organofosforados, por exemplo, atuam na fosforilação da enzima acetilcolinesterase (AChE), que quando bloqueada, gera um acúmulo da acetilcolina (ACh) nas sinapses, que gera um estímulo aumentado, resultando em sinais e sintomas de ação muscarínica (em músculos lisos, fibras cardíacas e glândulas exócrinas) e nicotínica (em músculos esqueléticos e gânglios autônomos). Além da AChE, esses compostos inibem também uma esterase chamada *neuropathytargetesterase* (NTE), presente no sistema nervoso central (SNC), quanto no sistema periférico e em outros tecidos, como músculos e linfócitos (VASCONCELLOS; LEITE; NASCIMENTO, 2002). Estudos realizados por Bretaud e colaboradores (2007) observaram que o Zebrafish apresenta o gene que codifica a síntese de AChE, o que garante o uso desse animal para estudos sobre a influência colinérgica no organismo (SANT'ANNA, 2009).

Além das alterações bioquímicas, é possível realizar observações visuais, que representam indicativos de efeitos tóxicos, após a fertilização dos ovos, tais como: a coagulação dos ovos; a má formação dos embriões; a ausência de deslocamento da cauda do saco vitelínico; e a falta de batimentos cardíacos (Figura 7). A toxicidade é determinada com base no resultado positivo de pelo menos uma observação (OECD, 2013).

**Figura 7.** Desenvolvimento embrionário do Zebrafish para o período de 24 a 96 horas pós fertilização do grupo controle negativo (normal) e do grupo controle positivo (exposto à substância tóxica).



**Fonte:** Próprio autor

A utilização de embriões de peixes em testes toxicológicos (FET – *fish embryo test*) é considerada uma alternativa promissora ao uso de peixes adultos, porém, ainda é mais comum a realização de estudos com compostos individuais, do que com misturas complexas. O FET segue um protocolo padronizado descrito pela OECD 236, em que parâmetros letais e sub-letais são avaliados em um período que pode variar de 24 a 96 horas. Contudo, estudos tem demonstrado que a sensibilidade do teste é maior quando este atinge períodos maiores de exposição (OECD, 2013; STELZER et al., 2018; MEIRELES et al., 2018).

### 3. Objetivo

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar a presença e os níveis de resíduos de contaminantes em águas superficiais, de poço e potável de uma região agrícola e industrial próxima a Araçatuba, pertencente à bacia do rio Tibagi, empregando a cromatografia líquida e o modelo Zebrafish para avaliar seus efeitos tóxicos.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Verificar a influência da sazonalidade de culturas agrícolas ao longo de um ano.
- Avaliar parâmetros físico-químicos de potabilidade das águas: pH, cor, turbidez e condutividade;
- Verificar a contaminação pela determinação de pesticidas e marcadores por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, aplicando a abordagem qualitativa de *screening* multiresíduos não direcionada (*untarget*) e quantitativa direcionada por padrões (*target*);
- Avaliar a toxicidade de herbicidas e fungicidas nas amostras das águas, em concentrações de relevância ambiental, por meio do teste *Fish Embryo Acute Toxicity* (FET) com embriões de Zebrafish (*Danio rerio*).

#### 4. Referências

ARMAS, E. D.; MONTEIRO, R. T. R.; ANTUNES, P. M.; SANTOS, M. A. P. F.; CAMARGO, P. B.; ABAKERLI, R. B. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1119–1127, out. 2007.

ARYA, N. Pesticides and human health: why public health officials should support a ban on non-essential residential use. **Canadian Journal of Public Health**, v. 96, p. 89-92, 2005.

BARBOSA, S. C. B. **Determinação de Resíduos de Pesticidas em Produtos de Origem Vegetal por GC-ECD**. 2012. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente) - Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2012.

BARBOSA, A. M. C.; SOLANO, M. DE L. M.; UMBUZEIRO, G. DE A. Pesticides in Drinking Water – The Brazilian Monitoring Program. **Frontiers in Public Health**, v. 3, 4 nov. 2015.

BIZIUK, M., PRZYJAZNY, A. Occurrence and determination of pesticides in natural and treated waters. **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 103-123, 1996.

BOLOGNESI, C. Genotoxicity of pesticides: a review of human biomonitoring studies. **Mutation Research**, v. 543, p. 251-272, 2003.

BRASIL. Decreto nº 98.816, de 11 de janeiro de 1990. Regulamenta a Lei 7.802, de 11 de julho de 1989: Legislação federal de agrotóxicos e afins. Brasília (DF): **Ministério da Agricultura e do Abastecimento**; 1989.

\_\_\_\_\_. Ministério do Meio Ambiente dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. Lei n. 9.433: Política Nacional de Recursos Hídricos. Brasília: **Secretaria de Recursos Hídricos**, 1997.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Resolução CONAMA n.357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 mar., 2005.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde, Portaria n. 2914 de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos para controle e de vigilância da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial de União**, Brasília, DF, 2011.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde, **Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**, 2016. Disponível em <  
[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/agrotoxicos\\_otica\\_sistema\\_unico\\_saude\\_v1\\_t1.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/agrotoxicos_otica_sistema_unico_saude_v1_t1.pdf)  
f> Acesso em: Março 2019.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde, **Diretrizes Nacionais para a Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos** 2017. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes\\_vigilancia\\_populacoes\\_expostas\\_agrototoxicos.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes_vigilancia_populacoes_expostas_agrototoxicos.pdf)> Acesso em: Março 2019.

BRETAUD, S., LI, Q., LOCKWOOD, B. L., KOBAYASHI, K., LIN, E., GUO, S. A choice behavior for morphine reveals experience-dependent drug preference and underlying neural substrates in developing larval zebrafish. **Neuroscience**. 146, 1109-1116, 2007.

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

CHAVES, A. R.; SILVA, S. M.; QUEIROZ, R. H.; LANÇAS, F. M.; QUEIROZ, M. E. Stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with UV detection for determination of antidepressants in plasma samples. **Journal of Chromatography B**, v.850, 2007, p. 295-302.

DAI, Y.-J.; JIA, Y.-F.; CHEN, N.; BIAN, W.-P.; LI, Q.-K.; MA, Y.-B.; CHEN, Y.-L.; PEI, D.-S. Zebrafish as a model system to study toxicology. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 33, n. 1, p. 11–7, 2014.

DAVID, F.; SANDRA, P. Stir bar sorptive extraction for trace analysis. **Journal of Chromatography A**, v.1152, p. 54-59, 2007.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura. Dia mundial da água: cuidar da água é fundamental para a segurança energética e a luta contra a fome, 2014. Disponível em <<https://www.fao.org.br/DMAcafpself.asp>> Acesso em Março 2019.

\_\_\_\_\_. Food and Agriculture Organization of the United Nations – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura. 2050: a escassez de água em várias partes do mundo ameaça a segurança alimentar e os meios de subsistência, 2016a. Disponível em: <<https://www.fao.org.br/2050eavpmasams.asp>> Acesso em Março 2019.

\_\_\_\_\_. Food and Agriculture Organization of the United Nations – Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura. Brasil será um dos maiores exportadores de alimentos, prevê FAO, 2016b. Disponível em <<https://www.fao.org.br/2050eavpmasams.asp>> Acesso em Março 2019.

FARRÉ, M.; KANTIANI, L.; PETROVIC, M.; PÉREZ, S.; BARCELÓ, D. Achievements and future trends in the analysis of emerging organic contaminants in environmental samples by mass spectrometry and bioanalytical techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1259, p. 86–99, 2012.

FENIK, J.; TANKIEWICZ, M.; BIZIUK, M. Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, n. 6, p. 814–826, 2011.

GARCIA, E.G. **Segurança e saúde no trabalho rural: a questão dos agrotóxicos**. 1ª.Edição, São Paulo: Ed. Fundacentro, 2001.

GLAUNER, T.; SCHUHN, B.; KEMPE, G. **Application of a Triggered MRM Database and Library for the Quantitation and Identification of**. Disponível em: <<https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-1183EN.pdf>>.

GONÇALVES, F. F. **Estudo de métodos empregando HPLC-DAD e LC-MS/MS para determinação de resíduos de herbicidas em água e solo do cultivo de arroz irrigado**. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2007.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores de Desenvolvimento Sustentável - Tabela 5802 - Comercialização de ingredientes ativos de agrotóxicos e afins, por classe de uso. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/5802>. Acesso em: Março 2019.

KÖCK-SCHULMEYER, M; VILLAGRASA, M.; ALDA, M. L.; CÉSPEDES-SÁNCHEZ, R.; VENTURA, F.; BARCELÓ, D. Occurrence and behavior of pesticides in wastewater treatment plants and their environmental impact. **Science of the Total Environment**, v. 458–460, p. 466–476, 2013.

KURZ, M. H. S. **Estudo de Métodos Empregando Extração em Fase Sólida e Análise por HPLC-DAD e GC-ECD para a Determinação de Resíduos de Pesticidas Estudo de Métodos Empregando Extração em Fase Sólida e Análise Por HPLC-DAD e GC-ECD**. Tese (Doutorado em Química). Universidade de Santa Maria. Santa Maria, 2007.

KURZ, M. H. S; GONÇALVES, F. F.; MARTEL, S.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R.; MACHADO, S. L; PRIMEL, E. G.. Rapid and accurate hplc-dad method for the determination of the herbicide bispyribac-sodium in surface water, and its validation. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1457–1460, 2009.

LEANDRO, F. Z. **Desenvolvimento das barras imunosorventes de agitação e avaliação das técnicas extração sortiva em barra de agitação, microextração em sorvente empacotado e cromatografia líquida para análise de antidepressivos em amostras de plasma**. Tese (Doutorado em Química) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2010.

LI, H.; MA, H.; LYDY, M. J.; YOU, J. Occurrence, seasonal variation and inhalation exposure of atmospheric organophosphate and pyrethroid pesticides in an urban community in South China. **Chemosphere**, v. 95, p. 363–369, 2014.

LIESCHKE, G. J.; CURRIE, P. D. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. **Nature reviews. Genetics**, v. 8, n. 5, p. 353–367, 2007.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. DE. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, n. 117, p. 518–534, jun. 2018.

SANCHES, A. L. M.; DAAM, M. A.; FREITAS, E. C.; GODO, A. A.; MEIRELES, G.; ALMEIDA, A. R.; DOMINGUES I. Lethal and sublethal toxicity of abamectin and difenoconazole (individually and in mixture) to early life stages of zebrafish. **Chemosphere**, v. 210, p. 531–538, nov. 2018.

MELO, L. P. **Avaliação da fase extratora de polidimetilsiloxano/polipirrol nas análises de antidepressivos em amostras de plasma, através de técnicas extração sortiva em barra de agitação e cromatografia líquida.** Dissertação (Mestrado em Química). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2007.

OECD. Test No. 236: **Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test.** OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, n. July, p. 1–22, 2013.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. **Protocolo de avaliação das intoxicações crônicas por agrotóxicos,** 2013. Disponível em: <  
[http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/CEST/Protocolo\\_AvaliacaoIntoxicacaoAgrotoxicos.pdf](http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/CEST/Protocolo_AvaliacaoIntoxicacaoAgrotoxicos.pdf)>. Acesso em: Março 2019.

PEIXOTO, S. C. **ÁGUA DE LAVOURA DE ARROZ IRRIGADO EMPREGANDO SPE E HPLC-DAD** **ÁGUA DE LAVOURA DE ARROZ IRRIGADO EMPREGANDO SPE E HPLC-DAD.** [s.l.] Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

PIGNATI, W. A.; SOUZA e LIMA, F. A. N.; LARA, S. S.; CORREA, M. L. M.; BARBOSA, J. R.; LEÃO, L. H. C.; PIGNATTI, M. G. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, n. 10, p. 3281–3293, 2017.

PRIMEL, E. G.; ZANELLA, R.; KURZ, M. H. S.; GONÇALVES, F. F.; MARTINS, M. L.; MACHADO, S. L. O; MARCHESAN, E. Risk assessment of surface water contamination by herbicide residues: monitoring of propanil degradation in irrigated rice field waters using HPLC-UV and confirmation by GC-MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 3, p. 585–589, 2007.

RANGEL, C. F., ROSA, A. C. S., SARCINELLI, P. N. Uso de agrotóxicos e suas implicações na exposição ocupacional e contaminação ambiental. **Cad.SaúdeColetiva**, v.19, n.4, p.435-442, 2011.

ROUSIS, N. I.; BADE, R.; BIJLSMA, L.; ZUCCATO, E.; SANCHO, J. V.; HERNANDEZ, F.; CASTIGLIONI, S. Monitoring a large number of pesticides and transformation products in water samples from Spain and Italy. **Environmental Research**, v. 156, n. March, p. 31–38, 2017.

SABIN, G. P.; PRESTES, O. S.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Multiresidue determination of pesticides in drinking water by gas chromatography-mass spectrometry after solid-phase extraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 5, p. 918–925, 2009.

SABIN, G. P.; PRESTES, O. D.; MARTINS, M. L.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. Aumento da resposta analítica por meio da otimização do sistema de injeção sem divisão de fluxo em cromatografia gasosa empregando a lei dos gases ideais. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 414–418, 2011.

SANT'ANNA, M. C. B. **Zebrafish (*Danio rerio*) como modelo para estudo da toxicidade induzida pelo ferro.** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular). Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2010.

SOARES, D. F.; FARIA, A. M.; ROSA, A. H. Análise de risco de contaminação de águas subterrâneas por resíduos de agrotóxicos no município de Campo Novo do Parecis (MT), Brasil. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 22, n. 2, p. 277–284, 27 out. 2016.

SOULIER, C.; COUREAU, C.; TOGOLA, A. Environmental forensics in groundwater coupling passive sampling and high resolution mass spectrometry for screening. **Science of the Total Environment**, v. 563–564, p. 845–854, 2016.

SILVA, B. J. G. **Desenvolvimento de métodos cromatográficos hifenados (*in-tube* SPME/LC-FLD e GCxGC/qMS) para análises de fármacos e agrotóxicos em amostras complexas**. Tese (Doutorado em Química). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2011.

SILVEIRA, T. R. DA; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 2, p. 4–5, 2012.

SILVÉRIO, A. C. P.; MACHADO, S. C.; AZEVEDO, L.; NOGUEIRA, D. A.; GRACIANO, M. M. C.; SIMÕES, J. S.; VIANA, A. L. M.; MARTINS, I. Assessment of exposure to pesticides in rural workers in southern of Minas Gerais, Brazil. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.55, p. 99–106, 2017.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A.; LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. Monitoramento do Risco Ambiental de Agrotóxicos: princípios e recomendações. Jaguariúna, 2004.

STELZER, J. A. A.; ROSIN, C. K.; BAUER, L. H.; HARTMANN, M.; PULGATI, F. H.; ARENZON, A. Is fish embryo test (FET) according to OECD 236 sensible enough for delivering quality data for effluent risk assessment? **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n.11, p. 2925–2932, 2018.

STREISINGER, G., WALKER, C., DOWER, N., KNAUBER, D. & SINGER, F., 1981. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*). **Nature**. 291, 293–296.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por Fase Sólida. **Química Nova**, 23, 2000.

VASCONCELLOS, L. F. R; LEITE, A. C; NASCIMENTO, O. J. M. Organophosphate-induced delayed neuropathy: case report. **Arq Neuropsiquiatr**, São Paulo, v. 60, n. 4, p. 1003-1007, 2002.

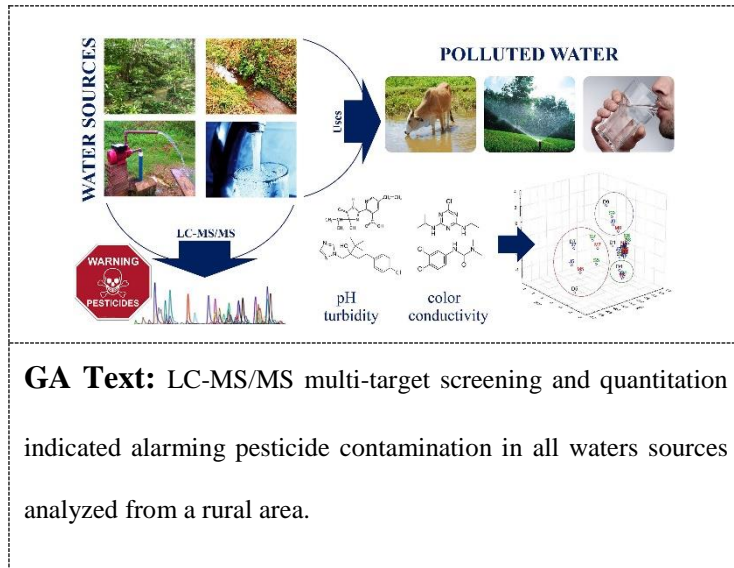
VEIGA, M. M.; SILVA, D. M.; VEIGA, L. B. E.; FARIA, M. V. C.. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 11, p. 2391–2399, 2006.

**Capítulo II -Pesticide Determination in  
Water Samples from a Rural Area by  
Multi-Target Method Applying Liquid  
Chromatography Tandem Mass  
Spectrometry<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup> Artigo publicado e formatado conforme as normas do periódico *Journal of the Brazilian Chemical Society*.

## Graphical Abstract (GA)



**Abstract**

The rises of toxic effects caused by pesticides are of concern. However, Brazilian legislation still needs scientific subsidies to improve the water quality requirements. This can be attributed in part to the few existing studies showing the occurrence and levels of multi-residue pesticides. Therefore, the objective of this study was to investigate the presence and the residue-levels of pesticides in surface, ground and drinking water of Tibagi micro-basin in Paraná state, Brazil. Data obtained over a year for the physical-chemical parameters, screening and quantification, made by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, confirmed the contamination by several pesticides. Alarming concentrations of diuron and imazethapyr in a permanent preservation area and in groundwater were observed. The absence of legislation for most pesticides under study makes difficult the prohibition of their use and the control of their residue-levels on the environment. The results draw attention to further discussion and engagement around the pesticides regulations.

**Keywords:** residue levels, environmental regulation, water quality requirements, diuron, imazethapyr.

## Introduction

Brazilian agriculture in the past few years has been growing and using an indiscriminate amount of pesticides to increase the crop yield becoming the main world's market.<sup>1-5</sup> During 2013, the most commercialized pesticides were glyphosate and atrazine, both herbicides. However, fungicides, insecticides, acaricides, nematicides, growth regulators, repellents, and biocides are also commonly used.<sup>6</sup>

It is recognized that the agronomic intensification associated with the use of pesticides increase the environmental impacts, usually observed through physico-chemical and microbiological parameters in water samples for example. Consequently, the toxic effects on animals and humans exposed occupationally and to the environment also increase.<sup>4,7</sup> Beyond the intensive use of different classes of pesticides, the lack of information and technical assistance in rural areas also contribute to soil and water contamination by the rural workers, as a result of the incorrect discharge of residues during the clean-up of equipment and plastic containers on the environment.<sup>8</sup>

The pesticides disseminated throughout the environment have complex behavior, going through a variety of physics, chemistry and biological process that generates metabolites and degradation products.<sup>9</sup> Regardless of the concentrations, these products can present higher toxicity than the original compounds and may have a straight correlation with the increasing number of diseases, like cancer.<sup>10-14</sup>

Besides pesticides, the presence of other emerging contaminants in the environment, such as industrial compounds, pharmaceuticals, personal care products and disinfection by-products, result in negative effects in living organisms due to the non-target effect and contribute to increase surface and groundwater pollution.<sup>15,16</sup> Recent studies have shown that

the exposure of parents before a child's birth increase the risk of infant leukemia and Parkinson's disease to 70%.<sup>17, 18</sup>

At the south of Brazil, the state of Paraná is known for the intensive production and commercialization of pesticides, occupying the third position according to the report made by the Ministry of Health in 2016 and Ministry of Agriculture in 2018.<sup>19</sup> The discrepancy might be related to the presence of 36 industries of pesticides in the state. These large numbers of industries associated with agricultural activities indicate the need for severe environmental monitoring. The concern is related to the possibility of surface and groundwater contamination due to the presence of agrochemicals and the incorrect discharge of wastewater, which might affect the drinking water quality. Although many countries treat and distribute water to the population, in rural areas the water might come directly from natural sources, such as mines or wells without adequate treatment.

The water quality requirements are not a consensus and can follow national and international guidelines. In general, all the guidelines evaluate odor, taste, color, turbidity, conductivity, pH and concentration of organic and inorganic compounds, although compounds of interest and their maximum allowed values may vary for each country according to their use.<sup>2, 20-22</sup>

Currently, Brazil has monitoring programs of pesticides such as the National Monitoring Water Quality for Human Consumption Program (VIGIAGUA), available on the Monitoring Information on Water Quality for Human Consumption System (SISAGUA). However, according to the legislation, less than 10% of the pesticides in use are monitored.<sup>2,</sup>  
<sup>21, 23</sup> Recently, the "Pesticides law" (Law 7802/1989) is undergoing several changes, which is causing many divergences between businessmen, environmentalists and medical entities.<sup>24</sup>  
One of the most controversial items includes permission for products classified as "acceptable risk", prohibiting only those classified as "unacceptable risk".

The Brazilian legislation already has several flaws regarding known toxic compounds without allowed limit of concentration for drinking water. On the other hand, the European Union has no target pesticides, but is more restricted regarding the total concentration that should be less than  $0.50 \mu\text{g L}^{-1}$  for drinking water. This fact emphasizes the need to review the matter of pesticide monitoring in the national legislation.<sup>25,26</sup> Despite the discrepancy between national and international regulations, accordingly to Avelhana and Zylbersztajn (2018), Brazil has the most advanced and restricted law concerning environmental protection, but its enforcement has several loopholes.<sup>27</sup>

Regardless of the law and its application, some areas are well known by the suspect of pesticides contamination, as the case of a rural area in the northern region of the state of Paraná. During the years of 2002 and 2006, the Public Ministry realized some investigations after suspecting poor water quality due the non-natural taste and smell and the high fish mortality.<sup>28</sup> However, several years later the problem persists, and little has been done to protect this area. Thus, considering the lack of scientific evidence and scarce data of pesticide multi-residue contamination in this region, the aim of the present study was to evaluate physico-chemical parameters and pesticides of the Tibagi River micro-basin water over a year. We hope this study will contribute providing scientific subsidies to promote the protection needed to this area by regulatory agencies. It is further expected that the data generated will serve as a basis for broadening the range of monitored pesticides besides reducing their residue levels in the environment.

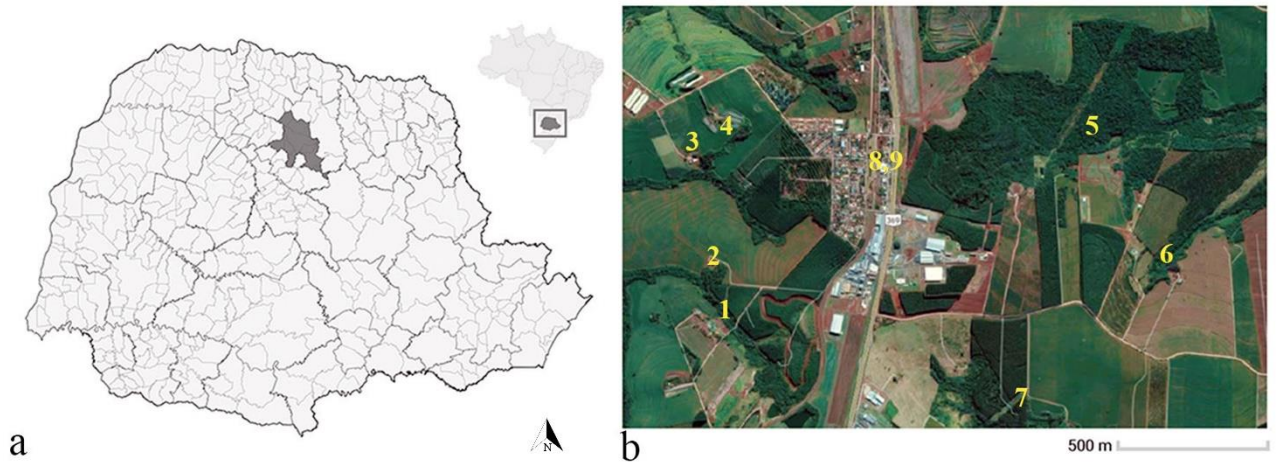
## **Experimental**

### *Study area and samples*

The studied rural area is located in the city of Araçuaia at the north of Pará state (10°49S, 51°42W). The study area is recognized for its intense agricultural activity (mainly soy, wheat and corn) and to be close to an agrochemical industry. The water bodies present in this region are part of micro-basins, which constitute the basin of the Tibagi River. According to CONAMA 357 this river is classified as Class 2.<sup>21</sup> Its tributaries and springs, although not cataloged, must belong to the same class, or to a more protected class (class 1, or special class, the latter one designated for water mines). These water sources have been used by the population in plant cultivation, for animal breeding and for human consumption.

This region has a humid subtropical climate, and although there is no defined dry season, rains are more intense in the warmer months. Thus, considering the possibility of rainy periods and also the seasonal agricultural activity and pesticides uses, four collection campaigns were carried out in 9 sampling points during the year 2015: March (M), June (J), September (S) and December (D).

The nine sampling sites were chosen taking into account the relevance and the presence of crops, proximity to the agrochemical industry, presence of water well, proximity to populated area, and the ease of access to streams potentially receiving runoff and effluents (Figure 1, Table SI 1).



**Fig. 1** - Map location of the area under study at Paraná state (a) and an aerial view of the 9 points of water sampling collections (b).

The sources of water at each sampling point (SP) were collected as follows: 1, 3, 4, 5, 6 and 7, from stream or river; 2 from a mine; 8 from public supply and 9 from groundwater (water well). Although the major crops in this area are soy, wheat and corn, crops of tomatoes and eucalyptus were also noticed around the sampling points (SP) 2 and 5 respectively (Figure 1). Most samples were collected from surface water bodies, being the sampling point SP 5 the only one under a permanent preservation area. The tap water sample (SP 8) has been treated according to the Brazilian requirements of sanitation and potability with limits established by the Ministry of Health Ordinance No. 2914 of 2011.<sup>23</sup>

One liter of water sample was collected in each sampling point in a clean amber glass bottle. Samples were kept under refrigeration (4 ° C) until further processing.

### *Physico-chemical parameters*

Water quality based on the physico-chemical parameters was evaluated according to The National Environment Council – CONAMA Resolution 357/05).<sup>21</sup> *In natura* samples were characterized in terms of: color at  $\lambda = 455$  nm (Nano color Vis MN, Macherey–Nagel, Düren, Germany), conductivity (Digimed DM-3P, Campo Grande, Brazil), pH (Ion Meter 781, Metrohm, Switzerland) and turbidity (HACH 2100Q, Hach Corporation, United States).

### *Sample preparation for pesticides analysis*

*In natura* water samples were vacuum filtered through a 0.22  $\mu\text{m}$  cellulose ester membrane (Millipore, USA) before solid phase extraction (SPE). The SPE procedure was done using C18 Sep-Pak cartridges (500 mg) (Waters, Milford, MA, USA) previously conditioned with 4 mL of methanol (HPLC grade, J. T. Baker, Center Valley, PA, USA) and equilibrated with 4 mL of ultrapure water (Milli-Q®, Millipore, USA). 250 mL of the water sample were passed through the cartridges using a vacuum manifold system. After washing with 2 mL of ultrapure water, the cartridges were dried under a vacuum and kept frozen (-12 °C) until further analysis.<sup>29</sup> The elution was performed with 2 mL of methanol, and the eluate was diluted 10 times in ultrapure water before liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis. Preconcentration factor reached 12.5 times.

### *Standards*

Considering the agricultural activity and the use of the pesticides due the crop areas, analytical standards of ametryn, atrazine, azoxystrobin, carbendazim, diuron, hexazinone, imazaquin, imazethapyr, imidacloprid, propiconazole, tebuconazole and tebuthiuron (purity between 96.5 and 99.9 %, Sigma Aldrich, Madrid, Spain) were used to prepare a stock solution of each pesticide at a concentration of 400.00 mg L<sup>-1</sup> using methanol as solvent. Mixed standard solutions were prepared in methanol-water (10:90, v/v) in concentration range of 0.10 - 375.00 µg L<sup>-1</sup> and used to obtain analytical curves and further analysis of validation steps.

### *Liquid Chromatography conditions*

The LC-MS/MS method was performed by an ACQUITY UPLC I-Class system (Waters, Manchester, UK) consisting of a binary pump with solvent manager, mobile phase degasser, autosampler with flow-through needle containing sample manager and column heater. Mobile phase was composed of solvent A (water) and solvent B (methanol) both with 0.1% formic acid. A linear gradient elution was employed: 5% B (0 – 0.24 min), 5 – 95 % B (0.25 – 7.74 min), 95 % B (7.75 – 8.50 min), 5 % B (8.51 – 10.00 min). The injection volume for each sample was 1.0 µL in “Full loop” injection mode and the sample manager was kept at 4 °C. Chromatographic separation was achieved at 0.45 mL min<sup>-1</sup> flow rate using a UPLC BEH C18 column (2.1 mm×50 mm, 1.7 µm, Waters, Milford, MA, USA) maintained at 40°C.

### *Mass spectrometry conditions*

Mass detection was performed using a tandem quadrupole mass spectrometer, ACQUITY TQD (Waters, Manchester, UK), equipped with an electrospray ionization interface (ESI). The method for the screening of 402 pesticides was performed based on Morphet and Hancock (2008).<sup>30</sup> The presence or absence of the analyte defined was made by checking the existence of 2 transitions in the selective reaction monitoring (SRM) mode, where the first transition is used for quantitation while the second transition is applied to confirm the presence of the pesticide in the sample. Ion ratio was also performed. According to the compounds found during the screening step, 12 pesticides were evaluated due to relevance and availability of the analytical standards. The parameters used for external quantitation method were optimized individually for each one of the 12 pesticides under study (Table 1).

For both methods (screening and quantitation) the ion source was operated at 120 °C with a capillary voltage of 1.0 kV and extraction cone voltage of 3.0 V. Nitrogen was employed for both the dissolvent (800 L h<sup>-1</sup>) and cone (5 L h<sup>-1</sup>) kept at 400 °C. Acquisition mode chosen was SRM at an argon collision gas pressure of 3.5×10<sup>-3</sup> mBar.

Data acquisition and processing were achieved by using MassLynx 4.1 (Waters, Manchester, UK).

**Table 1.** Mass spectrometry parameter of the quantified pesticides in water bodies

$t_R$ /min	Pesticide	Molecular Formule	Precursor ion/ $m/z$	Product ion/ $m/z$	Cone/V	Collision energy/eV
2.50	Carbendazim	$C_9H_9N_3O_2$	192.1	132.10	33	28
				160.10	33	18
3.27	Imidacloprid	$C_9H_{10}ClN_5O_2$	256.1	175.10	34	20
				209.10	34	15
4.65	Imazethapyr	$C_{15}H_{19}N_3O_3$	290.11	69.05	42	28
				86.08	42	26
4.97	Hexazinone	$C_{12}H_{20}N_4O_2$	253.1	71.00	35	30
				171.10	35	16
5.05	Imazaquim	$C_{17}H_{17}N_3O_3$	312.2	86.20	40	28
				267.20	40	20
5.11	Tebuthiuron	$C_9H_{16}N_5OS$	229	116.00	36	26
				172.00	36	18
5.42	Azoxystrobin	$C_{22}H_{17}N_3O_5$	404	329.00	28	30
				372.00	28	15
5.48	Ametryn	$C_9H_{17}N_5S$	228.1	68.10	38	36
				186.10	38	18
5.62	Atrazine	$C_8H_{14}ClN_5$	216.1	96.10	39	23
				174.10	39	18
5.81	Diuron	$C_9H_{10}Cl_2N_2O$	233	46.30	34	14
				72.10	34	18
6.36	Propiconazole	$C_{15}H_{17}Cl_2N_3O_2$	342	69.00	46	22
				159.00	46	34
7.24	Tebuconazole	$C_{16}H_{22}ClN_3O$	308	70.10	40	22
				125.00	40	40

**Rt:** Retention time;  **$m/z$ :** mass-to-charge ratio.

### Validation process

Before the analysis of the pesticides on the samples, the method was validated with respect to accuracy, precision, linearity and limits of detection and quantitation following the EU Guidelines.<sup>31</sup> The analytical range evaluated was from 0.01 to 50.00  $\mu\text{g L}^{-1}$ . The accuracy of the method was accomplished by recovery studies, performed by spiking known amounts of the standard mixture (n=3) with low (0.25  $\mu\text{g L}^{-1}$ ), medium (1.00  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) and high (50.00  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) concentration levels of pesticides in ultrapure water. Accuracy was calculated as the

percent ratio between the found and known concentrations. The precision measurement of three different levels of concentration (0.01, 1.00 and 10.00  $\mu\text{g L}^{-1}$ ,  $n=6$ ) was also performed and has been determined as percent coefficient of variation based on relative standard deviation (% RSD). The limit of detection (LOD) and the limit of quantitation (LOQ) were also determined by the signal to noise (S/N) ratio.

### *Statistical Analysis*

A multivariate statistical technique was chosen to evaluate the large number of data obtained by quantitation of pesticides and physico-chemical analysis. The Principal Component Analysis (PCA) allowed the reduction of the data set size, supporting the interpretation without loss of information. A 3D plot with factors scores were used to obtain a better view of principal component (PC) 1, 2 and 3. All the statistical analysis was accomplished through STATISTICA 8.0.

### **Results and Discussion**

The Brazilian National Council for the Environment, CONAMA, establishes in Resolution 357 (CONAMA, 2005), characteristics and concentrations of substances for water bodies according to the destination of these resources. In addition to appearance, organoleptic characteristics and microbiological parameters, this resolution specifies values for physico-chemical parameters and also maximum concentration limits for various substances, such as oil and its derivate, nutrients, metals and some pesticides, among other compounds.<sup>21</sup> Unfortunately, only a few agrochemicals are listed in the resolution, which does not represent the most frequently used and detected pesticides in that area.

### *Physico-Chemical Analysis*

Class 2 rivers and streams, as the water bodies under study, may be used without water treatment for irrigation and livestock, but for human consumption, adequate treatment is required. However, some of the physico-chemical parameters analyzed showed values above the legal limits, highlighting conductivity, which was the parameter with more outliers according to the preconized standards (Tab. 2).

Conductivity is a physico-chemical parameter that may be used as an indirect measurement of pollutants concentration, since it depends on the dissolved ions in water, such as phosphate, nitrate and chloride ions, and common contaminants from crop areas.<sup>32,33</sup> Despite its importance, no limit is described in the legislation. Nevertheless, it is known that natural water receiving domestic or industrial effluent, on the other hand, can present conductivity above than 1000.00  $\mu\text{S cm}^{-1}$ .<sup>32</sup> A study performed in two rivers at the Rio Grande do Sul state showed conductivity values lower than 90  $\mu\text{S cm}^{-1}$  for samples considered as natural waters.<sup>34</sup> Values  $> 100.00 \mu\text{S cm}^{-1}$  as in cases of SP 3, SP 4 and SP 9, which presented results in the range of 120.30 to 421.00  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , may indicate environmental impact in natural water. SP 5 conductivity stands out due to the raised levels observed in the samplings of September and December (Tab. 2) with an increase more than 600 times the value of 1200.00  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , which may point out pollution.

All December samplings showed color values higher than 75.00 mg Pt L<sup>-1</sup>, probably due to the rainy period (59.8 mm of precipitation) that increases the amount of available organic matter and suspended solids.

**Table 2.** Data from 9 different water sources in 4 sample collections during a year by month (M, J, S and D) regarding the color (mg Pt L<sup>-1</sup>), conductivity (μS cm<sup>-1</sup> at 25 °C), pH, and turbidity (NTU).

		Sampling point (SP)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Color	M	39.82	13.55	39.82	25.49	39.82	18.32	20.71	11.16	13.55
	J	56.53	25.49	30.26	35.04	54.14	30.26	30.26	23.10	25.49
	S	104.20 <sup>a</sup>	37.43	32.65	56.53	99.52 <sup>a</sup>	30.26	42.20	32.65	37.43
	D	226.09 <sup>a</sup>	130.56 <sup>a</sup>	111.46 <sup>a</sup>	230.86 <sup>a</sup>	467.28 <sup>a</sup>	123.40 <sup>a</sup>	123.40 <sup>a</sup>	101.91 <sup>a</sup>	187.88 <sup>a</sup>
Conductivity	M	93.90	82.10	146.80 <sup>b</sup>	325.00 <sup>b</sup>	2.90	28.80	4.20	138.50 <sup>b</sup>	421.00 <sup>b</sup>
	J	98.00	85.00	150.50 <sup>b</sup>	296.00 <sup>b</sup>	2.50	28.10	4.10	134.50 <sup>b</sup>	409.00 <sup>b</sup>
	S	76.40	72.60	133.20 <sup>b</sup>	269.00 <sup>b</sup>	1375.00 <sup>b</sup>	31.00	3.50	120.30 <sup>b</sup>	344.00 <sup>b</sup>
	D	81.60	73.20	96.90	219.00 <sup>b</sup>	1286.00 <sup>b</sup>	30.50	3.40	131.20 <sup>b</sup>	360.00 <sup>b</sup>
pH	M	6.04	6.19	5.91 <sup>a</sup>	6.30	6.92	6.38	6.43	7.08	6.84
	J	5.96 <sup>a</sup>	6.28	5.87 <sup>a</sup>	6.32	6.65	7.02	6.45	7.00	6.70
	S	6.10	5.60 <sup>a</sup>	6.53	6.67	6.83	7.44	6.81	7.36	7.29
	D	6.86	5.73 <sup>a</sup>	5.78 <sup>a</sup>	6.90	6.89	6.82	6.45	7.03	6.93
Turbidity	M	5.69	3.78	0.46	4.52	6.66	2.15	1.04	0.18	1.90
	J	3.63	0.54	0.39	1.59	5.49	0.57	0.67	0.22	0.30
	S	6.72	1.35	0.43	4.48	8.90	0.76	0.54	0.27	0.65
	D	20.20	2.02	0.55	19.40	93.20	1.76	1.05	0.17	4.11

M: march, J: june; S: september; D: december.

<sup>a</sup>Data values higher than the legislation limit (CONAMA 357/2005).

Limits according to the CONAMA 357: color < 75.00 mg Pt L<sup>-1</sup>; pH 6.00 to 9.00; turbidity < 40.00 NTU for Class 1 and < 100 NTU for Class 2 and 3.

<sup>b</sup>Limits preconized by FUNASA (2014): conductivity < 100.00 μS cm<sup>-1</sup>

The pH is one of the most important physico-chemical parameters evaluated in this work since the persistence and the partitioning of the pesticides molecules in the aqueous media is directly related to it.<sup>35</sup> The pH range observed was 5.6 to 7.44, of which six samples were considered outliers accordingly to the limit range (6.00 - 9.00).<sup>21</sup> In this pH range, several compounds still persist on their non-ionized form due to the pKa value, promoting their association with the organic matter available.<sup>35</sup>

Regarding the turbidity, a water of natural source usually ranges from 3.00 to 500.00 nephelometric turbidity units (NTU), while in drinking water turbidity should be lower than

1.00 NTU. The turbidity of the samples ranged from 0.17 to 93.20 NTU. Since the classification the rivers are Class 2, all the samples can be considered as in accordance with the quality standards for this parameter. However, SP 5 (D) presented a worrisome value of 93.20 NTU, higher than all the other samples and close to the allowed limit.

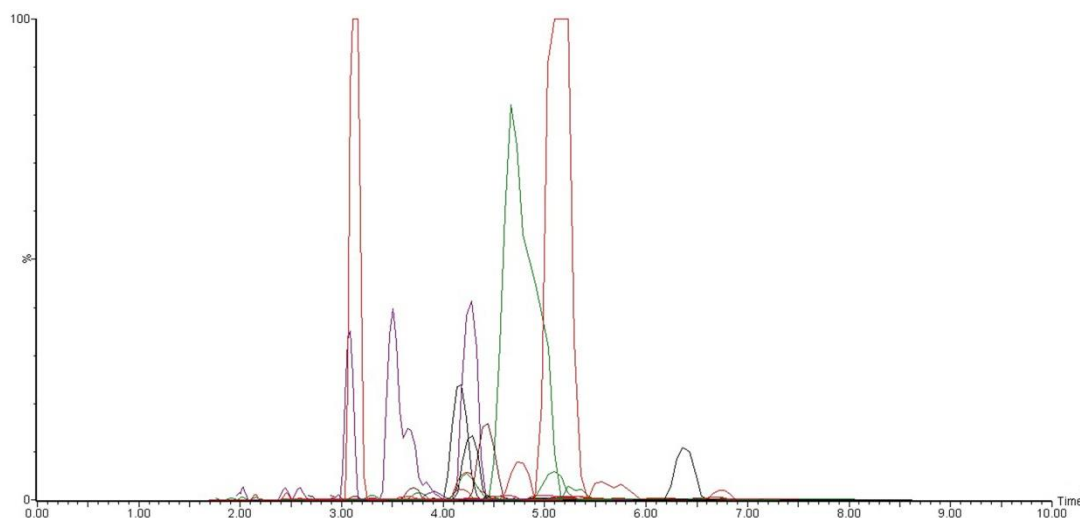
Another requirement for Class 2 is the virtual absence of substances that provide taste or odor. All the samples collected, except the SP 8 (tap water), had a non-natural smell, a fact that could be used to classify the sampling points as unfit for use. However, these waters have been continuously used by the local population for vegetables, fruit and grains irrigation, for breeding animals, and also for human consumption.

### *Pesticides Screening*

Most of the standard water and wastewater treatments do not eliminate certain substances, such as pesticides. For this reason, if the drinking water is obtained from surface and groundwater, the pesticides residues presented in the sources can also reach and expose humans.<sup>2</sup>

Due to the strong agricultural activity, the evaluation of the presence of pesticides as main contaminants was performed firstly by a qualitative screening method for 402 different pesticides.<sup>30</sup> Despite the selectivity of SRM mode, it is common to get false positive or negative results due to matrix interferents and slight changes in retention time.<sup>36</sup> After a meticulous data analysis, only the compounds that presented both transitions in the duplicate analysis were considered as a positive result. Therefore, the presence of at least 26 different pesticides in the samples was confirmed. Samples SP 4, SP 5, SP 7 and SP 9 were the most contaminated points in all the samplings (data not shown). SP 5 showed more than 15 different compounds by sampling. The total ion chromatogram (TIC) of SP 5 for the four

collections (Fig. 2) shows also the different profile of each month and the different intensity of compounds presents in this sample at the screening stage.



**Fig. 2** Total ion chromatogram at the screening of pesticides acquired in SRM mode for SP5.

### *Quantitative Method Validation*

Among the pesticides confirmed during the screening step, was developed and optimized a quantitative method to evaluate 12 pesticides (Tab. 1). The results are present in the Supplementary Information (SI 2). Linearity was achieved presenting coefficients of determination ( $R^2$ ) higher than 0.99 for all studied pesticides in a concentration range of 0.01 to 50.00  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Precision was assessed based on values found in the real water samples, and for all the studied compounds presented relative standard deviations (RSD)  $< 20\%$ . The accuracy of the method calculated through the 3-level recovery on low, medium and high standards concentrations (0.25, 1.00 and 50.00  $\mu\text{g L}^{-1}$  respectively) were within the acceptable levels of 70 to 120 %. Limit of quantitation (LOQ) was considered as the lowest

concentration point on a calibration curve,<sup>37</sup> at  $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$  for all pesticides, except for the imazethapyr (LOQ =  $0.05 \mu\text{g L}^{-1}$ ) and azoxystrobin (LOQ =  $0.10 \mu\text{g L}^{-1}$ ).

The method was considered feasible and reliable for the target pesticides and the values obtained were in accordance with the EU Guidelines.<sup>31</sup>

### *Pesticides Quantification in Samples*

Pesticide quantification was performed after the method validation in the 36 samples, which were analyzed in triplicate with RSDs under 20% for each pesticide. The total concentration obtained of pesticides per sample is summarized in Table 3, which values ranged from  $0.28$  to  $20.63 \mu\text{g L}^{-1}$ . For individual results of pesticide per sample and collection period (M, J, S and D) presented as Mean  $\pm$  Standard Deviation, please see Supplementary Information Tables SI 3 to SI 6.

**Table 3.** Total concentration of the 12 pesticides quantified by LC-MS/MS in water bodies of a rural area studied at north Paraná state.

Collection Month	[Total Pesticides] ( $\mu\text{g L}^{-1}$ , n=3)								
	SP 1	SP 2	SP 3	SP 4	SP 5	SP 6	SP 7	SP 8	SP 9
March(M)	0.29	0.44	0.31	1.62*	12.54*	0.28	11.26*	0.28	2.14*
June(J)	0.45	1.04*	0.41	1.59*	12.95*	0.28	19.29*	0.31	2.72*
September(S)	0.50*	0.64*	0.40	1.57*	6.33*	0.45	15.70*	0.33	2.52*
December(D)	1.55*	0.85*	0.38	1.30*	8.52*	0.28	20.63*	0.28	3.55*

\* Total concentration of pesticides that exceeds the allowed limit established by European Union  $< 0.50 \mu\text{g L}^{-1}$ ,<sup>25</sup> data summarized from the sum of the individual detailed results (Supplementary Information, Tables SI 3-SI 6).

The presence or absence of a pesticide in water can be related to its persistence or movement throughout the soil. The physico-chemical properties of each pesticide (half-life,  $K_{oc}$  - sorption potential, and solubility in water) can be used to calculate the partitioning index known by Groundwater Ubiquity Score (GUS). The GUS index can indicate the trend of mobility to water bodies and groundwater in extremely low, low, moderate and high displacement, although it does not take into account the local environmental conditions.<sup>35,38,39</sup> Accordingly, to the GUS index, the compounds under study presented moderate (propiconazole  $<$  diuron  $<$  azoxystrobin  $<$  ametryn  $<$  tebuconazole) and high (carbendazim  $<$  atrazine  $<$  imidacloprid  $<$  hexazinone  $<$  imazaquim  $<$  tebuthiuron  $<$  imazethapyr) potential for movement.<sup>38,39</sup> Nevertheless, the concentrations obtained during the sample analysis showed a behavior different than expected for some compounds, such as diuron.

Within the legislated organic compounds, atrazine is the only pesticide which was evaluated in this study, with a maximum limit level of  $2.00 \mu\text{g L}^{-1}$ .<sup>21</sup> The SP 9 (J) sample presented the highest concentration of atrazine concentration ( $1.40 \mu\text{g L}^{-1}$ ). At the same time, imazethapyr was present in a concentration of  $6.54 \mu\text{g L}^{-1}$  in SP 7 (J) and diuron at  $12.59 \mu\text{g L}^{-1}$  in SP 7 (D). Diuron is one of the most widely used herbicides in Brazil, and although it is persistent in soil due to its low solubility in water, several studies have been made to measure

its concentration in water bodies and to evaluate its toxicity in different organisms.<sup>9,40</sup> A study performed with samples collected from two rivers from Mato Grosso do Sul, an area with a strong agricultural activity obtained concentrations of diuron  $< 0.01 \mu\text{g L}^{-1}$ .<sup>15</sup> The lowest concentration of diuron in the present work was  $0.16 \mu\text{g L}^{-1}$ . The presence of atrazine, carbendazim, imidacloprid, hexazinone, and tebuthiuron, were also evaluated by the researchers in Mato Grosso do Sul, with concentrations lower than  $0.1 \mu\text{g L}^{-1}$ .<sup>15</sup> Effective concentrations (EC, 50%) of Diuron were reported in the literature at the same range of those found in SP 5, 7 and 9 ( $1.03 - 12.59 \mu\text{g L}^{-1}$ ).<sup>41</sup>

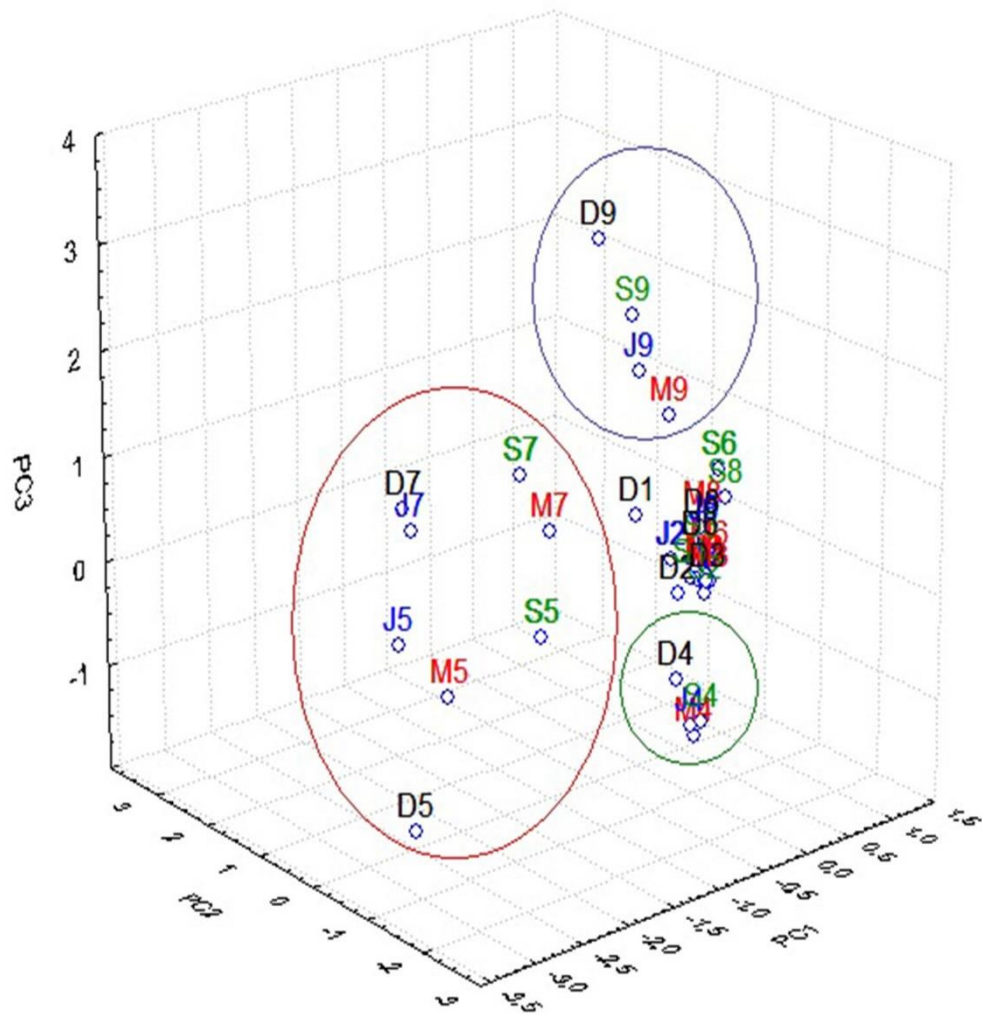
Researchers also have been studying imazethapyr and tebuconazole concentration in surface water surrounded by rice crop areas, where the maximum concentration reported for these compounds were  $0.326$  and  $0.015 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectively.<sup>42</sup> Those concentrations were lower than the observed in our study, that reached  $6.54 \mu\text{g L}^{-1}$  for imazethapyr (SP 7 in June) and  $0.80 \mu\text{g L}^{-1}$  for tebuconazole (SP 4 in September). Comparing the results reported in the literature with those obtained in the present paper, several samples had higher concentrations of pesticides, endorsing the contamination suspect.

Considering the EU guidelines for water quality standards for consumption, the maximum residue limit (MRL) for the total active ingredients is of  $0.50 \mu\text{g L}^{-1}$  of pesticides, including metabolites degradation and reaction products.<sup>25,26</sup> With regards to this, at least 58% of the samples analyzed in our study have a total concentration of pesticides higher than the recommended. However, is important to highlight that only 12 pesticides of those 26 confirmed compounds in the screening stage were quantified, which means that the total concentration of pesticides can be even higher.

### *Overall Results and Final Considerations*

PCA analysis (Figure 3) was carried out in order to evaluate the contribution of all the variables under study (pH, conductivity, color, turbidity and pesticides concentrations) taking into account the SP location and the period of collection (M, J, S and D), allowing a reduction of the data matrix size.<sup>43</sup> The variables with high importance in the multivariate analysis model were diuron, imazaquim, imazethapyr and color, while tebuthiuron, hexazinone and azoxystrobim presented less importance.

More similarities were expected within the collection period, due to the crop season, rain activity and runoff, than for SP. However, in the 3D PCA plot the opposite behavior was observed, with groups formed by specific samples like SP 4, SP 5 and 7, SP 9, whereas the other SP (1, 2, 3, 6 and 8) remained in the same group. This association indicates that the contamination of these areas may have been influenced by factors beyond the mere seasonal agricultural activities of the area. SP 5 (M, J, S, D) and SP 7 (M, J, S, D) for example, presented high concentrations of diuron and imazethapyr in all the collections, compared to others and remained as a single group. According to the GUS index, imazethapyr has a higher potential of leachability than diuron.<sup>38</sup> Taken into account that the main use of diuron is for the weed control in sugarcane or citrus cultivation areas,<sup>9</sup> crops not cultivated in the study area, the high incidence of this herbicide on the water over all the year is alarming.



**Fig. 3** 3D view of PCA analysis of water samples collected in 4 different months (March, June, September and December) of a year in 9 sampling points.

In the screening step, the samples SP 4 and 9 were considered as highly contaminated, due the presence of several pesticides. After the multivariate analysis (Fig. 3) was observed that the same sampling points for the four collection campaigns were separated in some isolated groups. This behavior showed to be consistent with that observed previously, however, if consider the total amount of the pesticides quantified per samples, SP 5 and 7 are more contaminated than SP 4 and 9. It is important to consider that SP 5 is under a permanent preserved area, which ideally should have less environmental impacts. In the same way, SP 9

was collected from a groundwater well, which is the source of water commonly used in many cities and rural properties, almost without prior treatment before consumption.

The only sample recommended for human consumption that attends the EU guideline criteria, considering the parameter evaluated, was SP 8 in all campaigns. However, it is important to highlight that the current quality standards from drinking water, surface and groundwater proclaimed by Brazilian legislation, could be easier to meet if the water sources and springs area are clean and preserved. On the other hand, the current legislation still does not guarantee the water quality regarding the absence of all pesticides in use and in non-hazardous amounts to human health. Accordingly to the article 11 of CONAMA 357/05,<sup>21</sup> “The public powers may, at any moment, add other conditions and quality standards for a specific water body or make them more restrictive due to local conditions or based on scientific evidence”. In this way, this study is expected to be a warning, contributing in the direction of public policies changing, which need to be more concerned about the environmental monitoring. In addition, this work also shows the requirement of future studies in the area using biological indicators through ecotoxicological and toxicological tests, targets of our next studies.

## **Conclusion**

Evidences of ‘water bodies’ contaminations in the area were observed by the high conductivity values obtained and the presence of pesticides, confirmed by the screening and the quantitation of 12 pesticides in all the samples studied, including drinking water (SP 8). High concentration of diuron and imazethapyr in surface and groundwater drew more attention when compared to other regions. However, the absence of legislation for these

compounds, like many others, makes prohibition or control of the use and the residue levels difficult.

The high levels of contamination in a permanent preserved area, water bodies and groundwater are concerning, encourage further assessment and monitoring of this area and bring subsidies for discussions on changes in the parameters evaluated by the legislation and for the management of natural resources by the competent authorities.

### **Supplementary Information**

Supplementary information (Table SI 1-SI 6) is available free of charge at <http://jbcs.sbq.org.br> as PDF file.

### **Acknowledgment**

The authors are thankful to Ministério Público do Trabalho do Paraná for their help in the area selection and sampling and Waters Technologies of Brazil for the analysis support. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 for doctoral fellowships in Chemistry-UEL. We would like to thank also CAPES (Project n. 88881.068504/2014-01, PROCAD/2013, Edital 071/2013, Process n. 3007/2014) for financial support providing the chromatographic column and (Project n. AUX-PE-NANOBIOTEC-710/2009 - Process Nanobio 23/2008 n.23038.019085/2009-14) for the LC-MS/MS. Our gratitude also to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- Brazil (CNPq) by the fellowships - Bolsa Produtividade DT-2 Química (Processo no. 309762/2017) and PIBIC.

## References

1. Pedlowski, M. A.; Canela, M. C.; Terra, M. A. C.; de Faria, R. M. R.; *Crop Protection*, **2012**, *31*, 113.
2. Barbosa, A. M. C.; Solano, M. L. M.; Umbuzeiro, G. A.; *Frontiers in Public Health*, **2015**, *3*, 246.
3. Piccoli, C.; Cremonese, C.; Koifman, R. J.; Koifman, S.; Freire, C.; *Environ. Res.*, **2017**, *151*, 389.
4. Silvério, A. C. P.; Machado, S.C.; Azevedo, L.; Nogueira, D. A.; Graciano, M. M. C.; Simões, J. S.; Viana, A. L.M.; Martins, I.; *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **2017**, *55*, 99.
5. Cattelan, M. D. P.; Maurer, P.; Garcia, F.; Berro, L. F.; Machado, M. M.; Manfredini, V.; Piccoli, J. C. E.; *Life Sciences*, **2018**, *203*, 177.
6. Ministry of Health/Ministério da Saúde. *Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos*. Available at [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/agrotoxicos\\_otica\\_sistema\\_unico\\_saude\\_v1\\_t.1.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/agrotoxicos_otica_sistema_unico_saude_v1_t.1.pdf) accessed in January 2019.
7. Sparovek, G.; Barreto, A. G. O. P.; Matsumoto, M.; Berndes, G.; *Environ. Sci. Technol.*, **2015**, *17*, 10285.
8. Felsot, A. S.; Racke, K. D.; Hamilton, D.J.; *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, **2003**, *177*, 123.
9. Felício, A. L. S. M.; Monteiro, A. M.; Almeida, M. B.; Madeira, T.B.; Nixdorf, S.L.; Yabe, M. J. S.; *An. Acad. Bras. Ciênc.*, **2016**, *88*, 1235.
10. Bolognesi, C.; *Mutat. Res.*, **2003**, *543*, 251.
11. Campos, E.; dos Santos, V. P. S.; Sarpa, M. C. M.; Barros, U. O.; *Neurotoxicology*, **2016**, *56*, 7.

12. Landau-Ossondo, M.; Rabia, N.; Jos-Pelage, J.; Marquet, L.M.; Isidore, Y.; Saint-Aimé, C.; Martin, M.; Irigaray, P.; Belpomme, D.; *Biomed. Pharmacother.*, **2009**, *63*, 383.
13. Rousis, N. I.; Bade, R.; Bijlsma, L.; Zuccato, E.; Sancho, J. V.; Hernandez, F.; Castiglioni, S.; *Environ. Res.*, **2017**, *156*, 31.
14. Salvia, M.V.; Jrad, A.B.; Raviglione, D.; Zhou, Y.; Bertrand, C.; *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **2017**, *1*,7.
15. Sposito, J. C. V.; Montagner, C. C.; Casado, M.; Navarro-Martín, L.; Jut Solórzano, J. C.; Piña, B.; Grisolia, A. B.; *Chemosphere*, 2018, 209, 696.
16. Kim, K. H.; Kabir, E.; Jahan, S. A.; *Science of the total Environ.*, 2017, 575, 525.
17. Brouwer, M.; Huss, A.; Van der Mark, M.; Nijssen, P. C. G.; Mulleners, W. M.; Sas, A. M. G.; Van Laar, T.; de Snoo, G. R.; Kromhout, H.; Vermeulen, R. C. H.; *Environ. Int.*, **2017**, *107*,100.
18. Gunier, R. B.; Kang, A.; Hammond, S. K.; Reinier, K.; Lea, C. S.; Chang, J. S.; Does, M.; Scelo, G.; Kirsch, J.; Crouse, V.; Cooper, R.; Quinlan, P.; Metayer, C.; *Environ. Res.*, **2017**, *156*, 57.
19. Ministério da Agricultura, available at <http://www.agricultura.gov.br/noticias/valor-da-producao-agropecuaria-de-2018-e-de-r-516-6-bilhoes> accessed in October 2018.
20. Mekonen, S.; Argaw, R.; Simanesev, A.; Houbraken, M.; Senaeve, D.; Ambelu, A.; Spanoghe, P.; *Chemosphere* **2016**, *162*, 252.
21. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Dispõe sobre *A Classificação dos Corpos de Água e Diretrizes Ambientais para o seu Enquadramento, bem como Estabelece as Condições e Padrões de Lançamento de Efluentes, e Dá outras Providências* - Resolução No. 357 de 17 de março de 2005, Brasil

22. World Health Organization (WHO); *Protecting Surface Water for Health*, Geneva, 2016.
23. Ministry of Health/Ministério da Saúde. Dispõe sobre *Os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade*. Portaria MS nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011, Brasil.
24. Brasil. Lei dos Agrotóxicos No 7802/1989. Available at [www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/LEIS/L7802.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L7802.htm), accessed in January 2019.
25. Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC. OJ L 70, 16.3.2005, p. 1–16.
26. Narita, K.; Matsui, Y.; Iwao, K.; Kamata, M.; Matsushita, T.; Shirasaki, N.; *Environ. Int.*, **2014**, *63*, 114.
27. Avelhan, B. L.; Zylbersztajn, D.; *RAUSP Management Journal*, **2018**, *53*, 178.
28. Ministério Público do Paraná, available at <https://mp-pr.jusbrasil.com.br/noticias/360765/mp-retoma-investigacao-no-ribeirao-dos-apertados-mp-retoma-investigacao-em-araongas>, accessed in January 2019.
29. Lopes, M. N. T.; Netto, P. T.; Lourencetti, C.; Marchi, M. R. R.; Ribeiro, M. L.; *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, **2011**, *21*, 103.
30. Morphet, J.; Hancock, P.; Waters Application Note, no. 720002628en, **2008**.
31. European Commission (E.C). *Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed*, SANCO/12571/2013, European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General and Safety of the food chain chemicals, contaminants, and pesticides.

32. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA); *Manual de controle da qualidade da água para técnicos que trabalham em ETAS*. Brasília: Ministério da Saúde; **2014**.
33. Alam, M. J. B.; Islam, M. R.; Muyen, Z.; Mamun, M.; Islam, S.; *Int. J. Environ. Sci. Technol*, **2007**, *4*, 159.
34. Chagas, F. B.; Rutkoski, C. F.; Bieniek, G. B.; Vargas, G. D. L. P.; Hartmann, P. A.; Hartmann, M. T.; *Acta Limnologica Brasiliensia*, **2017**, *29*, e14.
35. Armas, E. D.; Monteiro, R. T. R.; Antunes, P. M.; Santos, M. A. P. F.; Camargo, P. B.; Abakerli, R. B.; *Quim Nova*, **2007**, *30*, 1127.
36. <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5991-1183EN.pdf>, accessed in January 2019
37. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova*, **2004**, *27*, 771.
38. <http://npic.orst.edu/ingred/ppdmmove.htm>, accessed in January 2019
39. <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>, accessed in January 2019
40. Mansano, A. S.; Moreira, R. A.; Dornfeld, H. C.; Diniz, L. G. R.; Vieira, E. M.; Daam, M. A.; Rocha, O.; Selegim, M. H. R.; *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **2016**, *1*, 12.
41. Howe, P. L.; Reichelt-Brushett, A. J.; Clark, M. W.; Seery, C. R.; *J. Photochem. Photob.*, **2017**, *171*, 125.
42. Silva, D. R. O.; Avila, L. A.; Agostinetto, D.; Dal Magro, T.; Oliveira, E.; Zanella, R.; Noldin, J. A.; *Ciência Rural*, **2009**, *39*, 2383.
43. Palma, P.; Kuster, M.; Alvarenga, P.; Palma, V. L.; Fernandes, R. M.; Soares, A. M. V. M.; López de Alda, M. J.; Barcel, D.; Barbosa, I. R.; *Environ. Int.*, **2009**, *35*, 545.

**Supplementary Information**

*Pesticide Determination in Water Samples from a Rural Area by Multi-Target  
Method Applying Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*

**Table SI 1.** UTM coordinates from the sampling points

<b>Sampling Points</b>	<b>UTM Coordinates</b>
SP 1	22k;0455828; 7400659; Elev 792 m
SP 2	22k;0455759; 7401017; Elev 769 m
SP 3	22k; 0455623;7401677; Elev 753 m
SP 4	22k;0455844; 7401849; Elev 786 m
SP 5	22k;0458133; 7401759; Elev 755 m
SP 6	22k;0458494; 7401044; Elev 786 m
SP 7	22k;0457348; 7400402; Elev 804 m
SP 8	22k;0456752; 7401541; Elev 845 m
SP 9	22k;0456752; 7401541; Elev 845 m

UTM: Universal Transverse Mercator conformal projection. Elev: Elevation or altitude.

**Table SI 2.** Validation parameters of the quantitation method of pesticides in water samples

Compound	Slope	Intercept	R <sup>2</sup>	Linear range (n=9)	LOD	LOQ	Accuracy (Recovery %, n=3)			Precision (RSD %, n=6)		
							0.25	1.00	50.00	0.01	1.00	10.00
Carbendazim	1297.10	-575.42	0.9741	0.01 to 50.00	0.003	0.010	55.58	86.84	92.79	1.37	4.88	4.48
Imidacloprid	53.53	-83.78	0.9995	0.01 to 50.00	0.003	0.010	94.05	115.67	103.84	5.97	13.62	5.24
Imazethapyr	155.22	-219.22	0.9978	0.05 to 50.00	0.010	0.050	112.91	110.06	98.03	7.60	8.32	3.19
Hexazinone	1905.40	1827.20	0.9998	0.01 to 50.00	0.003	0.010	108.08	80.46	91.72	1.96	18.62	5.03
Ametryn	4445.30	16895.00	0.9942	0.01 to 50.00	0.003	0.010	103.67	107.92	99.50	10.10	4.33	3.16
Atrazine	2390.30	6234.80	0.9974	0.01 to 50.00	0.003	0.010	112.87	91.88	97.68	2.08	4.74	3.65
Imazaquin	352.19	305.24	0.9980	0.01 to 50.00	0.003	0.010	77.03	98.58	91.04	4.96	11.49	6.75
Tebuthiuron	2284.80	6812.10	0.9927	0.01 to 50.00	0.003	0.010	106.31	73.98	89.56	10.89	11.26	4.80
Diuron	174.89	-434.96	0.9985	0.01 to 50.00	0.003	0.010	88.25	106.74	94.83	14.53	10.66	6.30
Azoxystrobin	1009.30	-1141.00	0.9981	0.10 to 50.00	0.010	0.100	97.36	102.49	109.83	2.92	13.57	2.79
Propiconazole	2039.10	-335.29	0.9926	0.01 to 50.00	0.003	0.010	103.60	92.59	106.38	7.74	3.44	4.74
Tebuconazole	1585.70	-8867.70	0.9920	0.01 to 50.00	0.003	0.010	103.86	108.43	103.78	8.04	8.63	9.32

R<sup>2</sup>: coefficient of determination. LOD: limit of detection. LOQ: limit of quantitation. RSD: Relative standard deviation.

**Table SI 3.** Pesticides concentration in water bodies quantified by LC-MS/MS in different sampling points collected in March

Pesticide	Sampling points (Mean (n=3) $\pm$ SD, $\mu\text{g L}^{-1}$ )								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Carbendazim	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00				0.01 $\pm$ 0.00
Imidacloprid	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00		0.01 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.00		0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.01
Imazethapyr		<LQ	<LQ	0.31 $\pm$ 0.05	6.18 $\pm$ 0.91	<LQ	3.85 $\pm$ 0.55		<LQ
Hexazinone									
Ametryn	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00
Atrazine	0.02 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.08 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.02	0.01 $\pm$ 0.00	0.50 $\pm$ 0.04	0.02 $\pm$ 0.00	0.90 $\pm$ 0.04
Imazaquin	0.01 $\pm$ 0.00	0.04 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.16 $\pm$ 0.03	0.50 $\pm$ 0.06	0.01 $\pm$ 0.00	0.57 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00
Tebuthiuron				0.18 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.01		0.01 $\pm$ 0.07		0.01 $\pm$ 0.00
Diuron	0.16 $\pm$ 0.01	0.26 $\pm$ 0.04	0.18 $\pm$ 0.03	0.29 $\pm$ 0.03	5.29 $\pm$ 0.46	0.16 $\pm$ 0.00	6.25 $\pm$ 0.85	0.16 $\pm$ 0.00	1.03 $\pm$ 0.19
Azoxystrobin									
Propiconazole	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.11 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00
Tebuconazole	0.06 $\pm$ 0.00	0.07 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.00	0.56 $\pm$ 0.10	0.13 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.00	0.11 $\pm$ 0.01
<b>Total</b>	0.29 $\pm$ 0.02	0.44 $\pm$ 0.06	0.31 $\pm$ 0.03	1.62 $\pm$ 0.24	12.54 $\pm$ 1.49	0.28 $\pm$ 0.01	11.26 $\pm$ 1.51	0.28 $\pm$ 0.00	2.14 $\pm$ 0.26

SD: Standard deviation. <LQ: values are lower than limit of quantitation.

**Table SI 4.** Pesticides concentration in water bodies quantified by LC-MS/MS in different sampling points collected in June

Pesticide	Sampling points (Mean (n=3) $\pm$ SD, $\mu\text{g L}^{-1}$ )								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Carbendazim	0.16 $\pm$ 0.01	0.43 $\pm$ 0.03	0.08 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.01	0.22 $\pm$ 0.02	0.01 $\pm$ 0.00	0.49 $\pm$ 0.04	0.01 $\pm$ 0.00	0.22 $\pm$ 0.03
Imidacloprid		0.01 $\pm$ 0.00		0.01 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.01				0.07 $\pm$ 0.01
Imazethapyr		<LQ		0.13 $\pm$ 0.00	5.34 $\pm$ 0.54		6.54 $\pm$ 0.72	<LQ	<LQ
Hexazinone				0.03 $\pm$ 0.00	0.14 $\pm$ 0.02				0.04 $\pm$ 0.01
Ametryn	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.04 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00
Atrazine	0.03 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.07 $\pm$ 0.00	0.13 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.00	0.58 $\pm$ 0.02	0.02 $\pm$ 0.00	1.02 $\pm$ 0.14
Imazaquin	0.01 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.02	0.63 $\pm$ 0.11	0.01 $\pm$ 0.00	0.96 $\pm$ 0.15	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00
Tebuthiuron			0.01 $\pm$ 0.00	0.16 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.01		0.01 $\pm$ 0.00		0.01 $\pm$ 0.00
Diuron	0.17 $\pm$ 0.02	0.39 $\pm$ 0.06	0.20 $\pm$ 0.04	0.27 $\pm$ 0.04	6.05 $\pm$ 0.22	0.16 $\pm$ 0.01	10.63 $\pm$ 0.04	0.17 $\pm$ 0.01	1.22 $\pm$ 0.21
Azoxystrobin									
Propiconazole	0.01 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.15 $\pm$ 0.02	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00
Tebuconazole	0.06 $\pm$ 0.00	0.09 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.00	0.66 $\pm$ 0.12	0.12 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.02
<b>Total</b>	0.45 $\pm$ 0.04	1.04 $\pm$ 0.12	0.41 $\pm$ 0.05	1.59 $\pm$ 0.23	12.95 $\pm$ 0.98	0.28 $\pm$ 0.02	19.29 $\pm$ 0.98	0.31 $\pm$ 0.02	2.72 $\pm$ 0.43

SD: Standard deviation. <LQ: values are lower than limit of quantitation.

**Table SI 5.** Pesticides concentration in water bodies quantified by LC-MS/MS in different sampling points collected in September

Pesticide	Sampling points (Mean (n=3) $\pm$ SD, $\mu\text{g L}^{-1}$ )								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Carbendazim	0.15 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.01		0.17 $\pm$ 0.02
Imidacloprid	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.02	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.01
Imazethapyr		0.05 $\pm$ 0.01	<LQ	0.07 $\pm$ 0.01	1.77 $\pm$ 0.33	0.14 $\pm$ 0.00	4.28 $\pm$ 0.47	<LQ	<LQ
Hexazinone	0.01 $\pm$ 0.00			0.03 $\pm$ 0.00	0.07 $\pm$ 0.01				0.05 $\pm$ 0.00
Ametryn	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00
Atrazine	0.03 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.00	0.08 $\pm$ 0.00	0.11 $\pm$ 0.01	0.03 $\pm$ 0.00	0.59 $\pm$ 0.02	0.03 $\pm$ 0.00	1.02 $\pm$ 0.04
Imazaquin	0.01 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.01	0.14 $\pm$ 0.03	0.01 $\pm$ 0.00	0.36 $\pm$ 0.07	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00
Tebuthiuron				0.18 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.01		0.01 $\pm$ 0.00		0.01 $\pm$ 0.00
Diuron	0.21 $\pm$ 0.02	0.36 $\pm$ 0.00	0.20 $\pm$ 0.03	0.26 $\pm$ 0.05	3.80 $\pm$ 0.42	0.16 $\pm$ 0.00	10.33 $\pm$ 0.28	0.17 $\pm$ 0.02	1.04 $\pm$ 0.18
Azoxystrobin						<LQ		<LQ	
Propiconazole	0.01 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.16 $\pm$ 0.03	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00
Tebuconazole	0.06 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.05	0.06 $\pm$ 0.00	0.80 $\pm$ 0.13	0.11 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.00	0.10 $\pm$ 0.01
<b>Total</b>	0.50 $\pm$ 0.05	0.64 $\pm$ 0.05	0.40 $\pm$ 0.04	1.57 $\pm$ 0.24	6.33 $\pm$ 0.87	0.45 $\pm$ 0.01	15.70 $\pm$ 0.85	0.33 $\pm$ 0.02	2.52 $\pm$ 0.27

SD: Standard deviation. <LQ: values are lower than limit of quantitation.

**Table SI 6.** Pesticides concentration in water bodies quantified by LC-MS/MS in different sampling points collected in December

Pesticide	Sampling points (Mean (n=3) $\pm$ SD, $\mu\text{g L}^{-1}$ )								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Carbendazim	0.43 $\pm$ 0.03	0.35 $\pm$ 0.02	0.02 $\pm$ 0.00	0.11 $\pm$ 0.01	0.15 $\pm$ 0.01	0.01 $\pm$ 0.00	0.97 $\pm$ 0.07		0.08 $\pm$ 0.01
Imidacloprid	0.02 $\pm$ 0.00		0.01 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00		0.01 $\pm$ 0.00	0.16 $\pm$ 0.02
Imazethapyr		<LQ		<LQ	2.69 $\pm$ 0.34		5.75 $\pm$ 0.67		<LQ
Hexazinone	0.09 $\pm$ 0.02			0.03 $\pm$ 0.00	0.11 $\pm$ 0.02				0.11 $\pm$ 0.02
Ametryn	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00		0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00
Atrazine	0.04 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.03 $\pm$ 0.00	0.05 $\pm$ 0.00	0.11 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.57 $\pm$ 0.04	0.02 $\pm$ 0.00	1.40 $\pm$ 0.07
Imazaquin	0.01 $\pm$ 0.00	0.04 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.01	0.36 $\pm$ 0.05	0.01 $\pm$ 0.00	0.66 $\pm$ 0.09	0.01 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00
Tebuthiuron				0.11 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.01		0.01 $\pm$ 0.00		0.02 $\pm$ 0.00
Diuron	0.86 $\pm$ 0.17	0.31 $\pm$ 0.06	0.23 $\pm$ 0.04	0.24 $\pm$ 0.05	4.66 $\pm$ 0.18	0.16 $\pm$ 0.00	12.59 $\pm$ 0.64	0.16 $\pm$ 0.00	1.56 $\pm$ 0.29
Azoxystrobin	<LQ								
Propiconazole	0.01 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.02 $\pm$ 0.00	0.19 $\pm$ 0.03	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00	0.01 $\pm$ 0.00
Tebuconazole	0.06 $\pm$ 0.00	0.08 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.00	0.61 $\pm$ 0.08	0.12 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.00	0.18 $\pm$ 0.03
<b>Total</b>	1.55 $\pm$ 0.23	0.85 $\pm$ 0.00	0.38 $\pm$ 0.05	1.30 $\pm$ 0.16	8.52 $\pm$ 0.66	0.28 $\pm$ 0.01	20.63 $\pm$ 1.61	0.28 $\pm$ 0.01	3.55 $\pm$ 0.44

SD: Standard deviation. <LQ: values are lower than limit of quantitation.

**Capítulo III- Identificação de  
contaminantes em amostras de água  
por abordagem de *screening* não  
direcionado(*untargeted*) e direcionado  
(*target*)**

## 1. Introdução

De acordo com a legislação brasileira, as condições de qualidade de água para água doce, de forma geral, exigem ausência de toxicidade a organismos, materiais flutuantes, inclusive de espumas não naturais e gosto ou odor (BRASIL, 2005). A resolução ainda apresenta valores máximos permitidos (VMP) para diversos parâmetros inorgânicos e orgânicos, dentre eles alguns agrotóxicos, mas não abordam diversos contaminantes emergentes como fármacos, produtos de uso pessoal, hormônios e esteroides que também podem afetar negativamente a saúde humana e o ambiente (MONTAGNER et al., 2017). Entretanto, o monitoramento de todas essas classes de poluentes é dificultada devido às possíveis flutuações de suas concentrações, além da variabilidade da composição da amostra a ser estudada (SOULIER et al., 2016).

Um fator importante a ser considerado ao se realizar análises ambientais é o tipo de metodologia a ser empregada, desde a coleta e preparo de amostra até a detecção, a fim de minimizar a variabilidade dos dados, visto que a amostragem realizada é apenas uma demonstração da realidade (SOULIER et al., 2016; BARAZZETTI et al., 2018). Sabe-se que as etapas de aquisição, processamento de dados e sua interpretação são etapas laboriosas, porém, fundamentais no processo de avaliação de diversos compostos, como por exemplo, na avaliação de perfis metabólicos. Essa avaliação pode ser dividida em duas etapas, *targeted* e *untargeted*. Na abordagem *targeted* são obtidas informações quantitativas sobre compostos de interesse previamente definidos, enquanto a abordagem *untargeted* consiste em uma análise exploratória visando à identificação de novos compostos, que possam ser futuros alvos (MISRA et al., 2016).

A abordagem *untargeted*, utilizada normalmente apenas para fins biológicos, também se mostra aplicável em investigações ambientais, visto a diversidade de compostos presentes a serem identificados nessas matrizes, cujo método *targeted* não é capaz de abranger (IEDA et al., 2019).

Ao se realizar investigações utilizando os princípios *untargeted* também é possível obter perfis de contaminação, que auxiliam a compreender a sua incidência, efeitos de sazonalidade, áreas mais afetadas e a determinar compostos marcadores de contaminação para auxiliar na identificação das fontes contaminadoras. Alguns autores consideram esta abordagem útil em investigação forense (MEGSON et al., 2016; LARSEN et al., 2019).

Na abordagem *untargeted* é imprescindível utilizar técnicas analíticas adequadas, iniciando pelo processo de extração da amostra, que é considerado como uma etapa crítica do processo. Para amostras líquidas a extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) vem sendo a técnica mais amplamente aplicada para a análise de contaminantes emergentes. Já em relação à análise em si, há uma preferência por técnicas rápidas e robustas, que apresentem alta sensibilidade e seletividade, como a cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) com ionização por *electrospray* (ESI), contanto que, os analitos não sejam voláteis. A vantagem em se utilizar os detectores de massas está na sua versatilidade, sensibilidade, ampla faixa de trabalho e precisão. Entretanto, existem diversos analisadores de massas no mercado, capazes de fazer medições nominais ou de alta resolução. Para análise quantitativa de contaminantes em níveis traço é recomendado a utilização de analisadores de massa do tipo triplo-quadrupolo (QqQ) ou triplo-quadrupolo -“ion-trap” linear (QLIT). Contudo, para análises mais precisas, capazes de analisar padrões de fragmentação e obtenção precisa de massas de compostos, são indicados o Orbitrap e o analisador quadrupolo com tempo de voo (QqTOF) (FARRÉ et al., 2012; MEGSON et al., 2016; KIND et al., 2017).

A última etapa da análise é a de processamento e tratamento de dados, na qual se utilizam ferramentas estatísticas uni e multivariadas, para se extrair informações relevantes dos dados obtidos, para posterior identificação com auxílio de base de dados espectrais tais como MassBank [<http://www.massbank.jp>], ou NIST [<http://www.nist.gov/mml/bmd/data/tandemmass-speclib.cfm>] quando o padrão analítico de determinado composto é indisponível (MISRA et al., 2016; KIND et al., 2017).

Neste contexto, o objetivo deste capítulo foi utilizar a abordagem *untargeted* para obter um perfil molecular e identificar novos contaminantes, bem como possíveis marcadores de poluição, presentes nas amostras de água provenientes de córregos, abastecimento municipal e poço.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Amostras

A obtenção, descrição e preparo das amostras utilizadas para a realização deste estudo estão descritas no Capítulo II (ALMEIDA et al., 2019).

### 2.2 Equipamento

Para a realização das análises de LC-MS/MS foram utilizados um sistema cromatográfico de ultra performance (UPLC® I-Class, Acquity, Waters) com bomba binária, sistema de gerenciamento de solventes e desgaseificador; acoplado a um detector tipo triplo-quadrupolo (Acquity TQD, Waters), equipado com interface de ionização por *electrospray* (ESI), operando no modo de ionização positivo. A coluna utilizada na separação foi uma Acquity UPLC® BEH C18 (2,1 x 50 mm; 1,7 µm; Waters).

O método cromatográfico utilizado foi o mesmo descrito no Capítulo II (ALMEIDA et al., 2019).

### 2.3 Screening direcionado para compostos suspeitos

Assim como já descrito brevemente no Capítulo II, foi realizado um método de *screening* direcionado de multiresíduos, no qual buscou-se a presença de 402 compostos, sendo estes pesticidas, seus metabólitos e produtos de degradação a partir do método proposto por Morphet e Hancock (2008).

O método utilizado buscou a presença ou ausência de diversos compostos a partir da verificação da presença ou ausência de 2 transições no modo de monitoramento seletivo de reações (SRM, do inglês *selected reaction monitoring*). Neste, a primeira transição é usada para quantificação, enquanto a segunda é utilizada para confirmar a presença do composto na amostra. O tratamento dos dados foi realizado através do software MassLynx™ 4.1 (Waters, Manchester, Reino Unido), sendo processado pelo TargetLynx™ Application Manager (Waters, Manchester, Reino Unido).

Para esta etapa a fonte de íons foi operada a 120 °C com uma tensão de 1,0 kV aplicada no capilar e de 3,0 V no cone de extração. O gás nitrogênio foi empregado tanto para

a dessolvatação ( $800 \text{ L h}^{-1}$ ) quanto para o cone ( $5 \text{ L h}^{-1}$ ) mantido a  $400 \text{ }^\circ\text{C}$ . O gás argônio foi utilizado como gás de colisão à uma pressão de  $3,5 \times 10^{-3} \text{ mBar}$ . O volume de amostra injetado foi de  $1,0 \text{ } \mu\text{L}$  no modo “*Full loop*”.

## 2.4 Análise não direcionada – Método *Untargeted*

A fim de se tentar identificar compostos não avaliados durante a etapa de *screening* direcionado, o método *Untargeted* foi empregado através da análise no modo *full scan* no modo positivo na faixa de varredura de 100 a 900 *m/z*. As condições cromatográficas permaneceram as mesmas, enquanto os parâmetros do espectrômetro de massas foram: fonte de íons operada a 120 °C com uma tensão capilar de 1,0 kV e tensão de cone de extração de 3,0 V; gás nitrogênio para dessolvatação (1000 L h<sup>-1</sup>) e no cone (5 L h<sup>-1</sup>), mantido a 500 °C; gás argônio à pressão de 3,5 × 10<sup>-3</sup> mBar. O volume de amostra injetado foi de 1,0 µL no modo “*Full loop*”.

Para a aquisição e processamento dos dados foi utilizado o software MarkerLynx® software (Waters, Manchester, Reino Unido). Os parâmetros foram definidos da seguinte forma: tempo de retenção: 0 a 10 minutos; faixa de varredura de massa de 100 a 900 *Da* e tolerância de massa de 0,1 *Da*. Para integração, a largura do pico a 5% da altura foi de 1s, e o ruído de linha de base aplicada pico-a-pico foi zero. O nível de eliminação de ruído foi definido como dez e o *threshold* para os marcadores foi de 20000. Não foi excluída nenhuma massa ou aduto.

Após o processamento, o *software* gera uma lista de picos detectados de acordo com o tempo de retenção (*t<sub>r</sub>*) e relação massa-carga (*m/z*). Cada par recebeu uma identificação (ID) por ordem de eluição. Visando normalizar as intensidades dos picos, a ausência de um pico foi rotulada como zero na Tabela. A fim de obter alguma identificação, bancos de dados como *ChemSpider* [<http://www.chemspider.com>] e o *MASSBANK* [<https://massbank.eu/MassBank/Search>] foram utilizados. A matriz de dados foi analisada por análise de componentes principais (PCA) e análise discriminante ortogonal por mínimos quadrados parciais (OPLS-DA) pelo *software EZinfo 2.0* (Waters, Milford, MA, EUA).

## 2.5 Análise confirmatória de Cafeína e Paraxantina

Sendo a cafeína um dos marcadores de ação antrópica, sua detecção e de seu metabólito paraxantina, foi realizada utilizando as mesmas condições cromatográficas previamente descritas, com detecção pelo modo *SRM* de acordo com os parâmetros otimizados para cada analito (Tabela 1).

A fonte de íons foi operada a 150 °C com uma tensão capilar de 3,0 kV e tensão no cone de extração de 2,0 V. O nitrogênio foi utilizado na dessolvatação (900 L h<sup>-1</sup>) e no cone (25 L h<sup>-1</sup>) mantido a 400 °C. O argônio foi utilizado na câmara de colisão à 3,5 × 10<sup>-3</sup> mBar. O volume de amostra injetado foi de 5,00 µL no modo “*Full loop*”.

**Tabela 1.** Parâmetros de aquisição no modo *SRM* para cafeína e paraxantina

Analito	Fórmula	Tempo de retenção (min)	Íon precursor ( <i>m/z</i> )	Íon produto ( <i>m/z</i> )	Voltagem do Cone (V)	Energia de colisão (eV)
Cafeína	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	1,59	194,73	110,15	38	24
				138,17		18
Paraxantina	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	1,32	180,65	124,17	34	18
				149,07		6

**Fonte:** Próprio autor

Padrões analíticos de cafeína e paraxantina (1,7-dimetilxantina) (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) foram utilizados para a quantificação das amostras, avaliadas na faixa dinâmica de trabalho de 0,5 – 200,0 µg L<sup>-1</sup>.

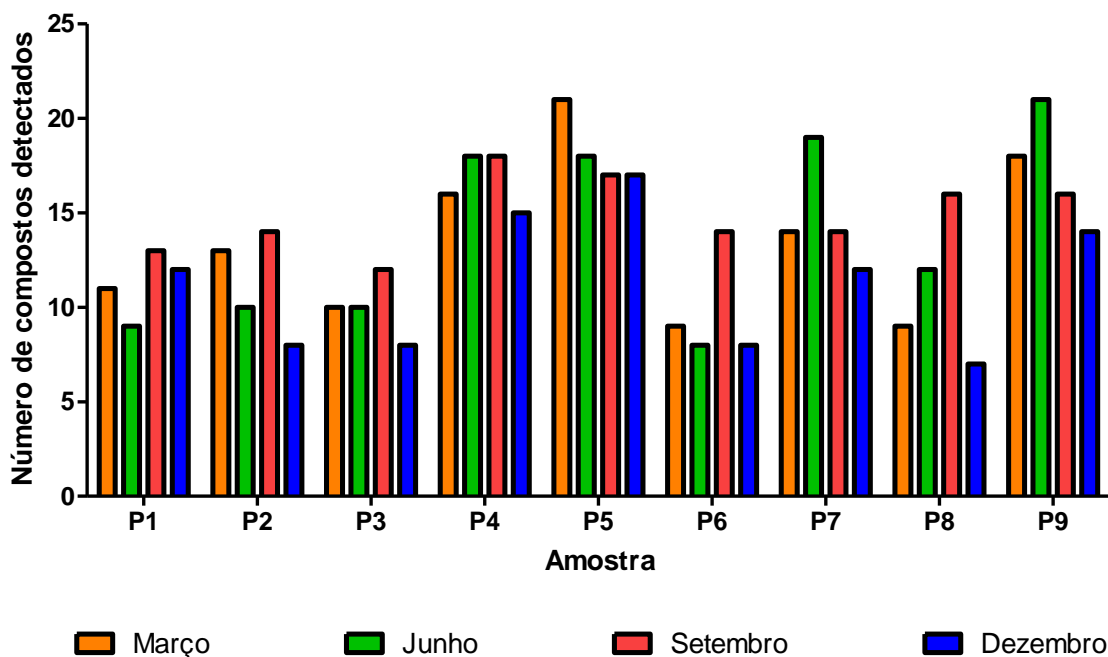
### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 *Screening* direcionado

Devido a atividade econômica da região estudada ser voltada basicamente para a agricultura, considera-se que a maior parte dos contaminantes presentes nas amostras sejam decorrentes desta atividade. Por esse motivo, buscou-se utilizar um método de *screening* que pudesse avaliar um grande número de pesticidas, bem como, seus produtos de degradação. O método escolhido foi capaz de avaliar 402 compostos (*targets*) diferentes, e por este motivo foi denominado de *screening* direcionado. Apesar do número elevado de *targets* presentes no método, na somatória de todas as amostras foram encontrados apenas 26 deles. A Figura 1 traz a discriminação do número de *targets* encontrados por amostra e coleta.

De acordo com os dados obtidos, houve uma predominância de contaminação para as amostras P4, P5 e P9. Já em relação aos meses de coleta, Dezembro foi mês com menor incidência de contaminação.

**Figura 1.** Gráficos obtidos pelo número de compostos alvos “*targets*” detectados por amostra durante a etapa de *screening* direcionado para os quatro meses de coleta nos 9 pontos amostrados P1 a P9



Amostras P1 a P7 provenientes de água de rio, P8 de abastecimento público e P9 de água subterrânea.

Fonte: Próprio autor.

Um dos objetivos de se utilizar métodos de *screening* é avaliar e eleger possíveis marcadores para estudos de monitoramento ambiental em dadas regiões e auxiliar na identificação das possíveis fontes de contaminação (MEGSON et al., 2016; SOULIER et al., 2016). Dentre os compostos identificados, além dos já quantificados e amplamente discutidos no Capítulo II (ALMEIDA et al., 2019), alguns apresentaram destaque por serem específicos por local de coleta, e não por mês avaliado. Os compostos foram: bromacil para o ponto amostral *P4*, propiconazol para o *P5* e propazina para o *P9*. Entretanto, é importante ressaltar que apesar da alta seletividade da técnica ao se utilizar o modo *SRM*, o método não garante a confirmação e a quantificação do composto, visto que essas só podem ser realizadas com a utilização de padrão analítico (LLORCA, 2013; SOULIER et al., 2016).

O bromacil é um herbicida usualmente utilizado em culturas de abacaxi e frutas cítricas, podendo também ser utilizado em associação com o diuron (ANVISA, 2019). Apesar do diuron ter sido relatado em todos os pontos amostrais (ALMEIDA et al., 2019) o bromacil foi apenas identificado no *P4*, sendo um potencial marcador para este ponto amostral. Seguindo o mesmo princípio, temos o propiconazol, que é um fungicida empregado no controle de alvos biológicos das culturas de arroz irrigado, banana, cevada, milho e trigo (ADAPAR, 2019). Durante a realização das coletas observou-se o cultivo de milho e trigo na região, contudo, o fato deste fungicida ter sido detectado apenas no *P5* também o torna um potencial marcador de poluição para futuras investigações.

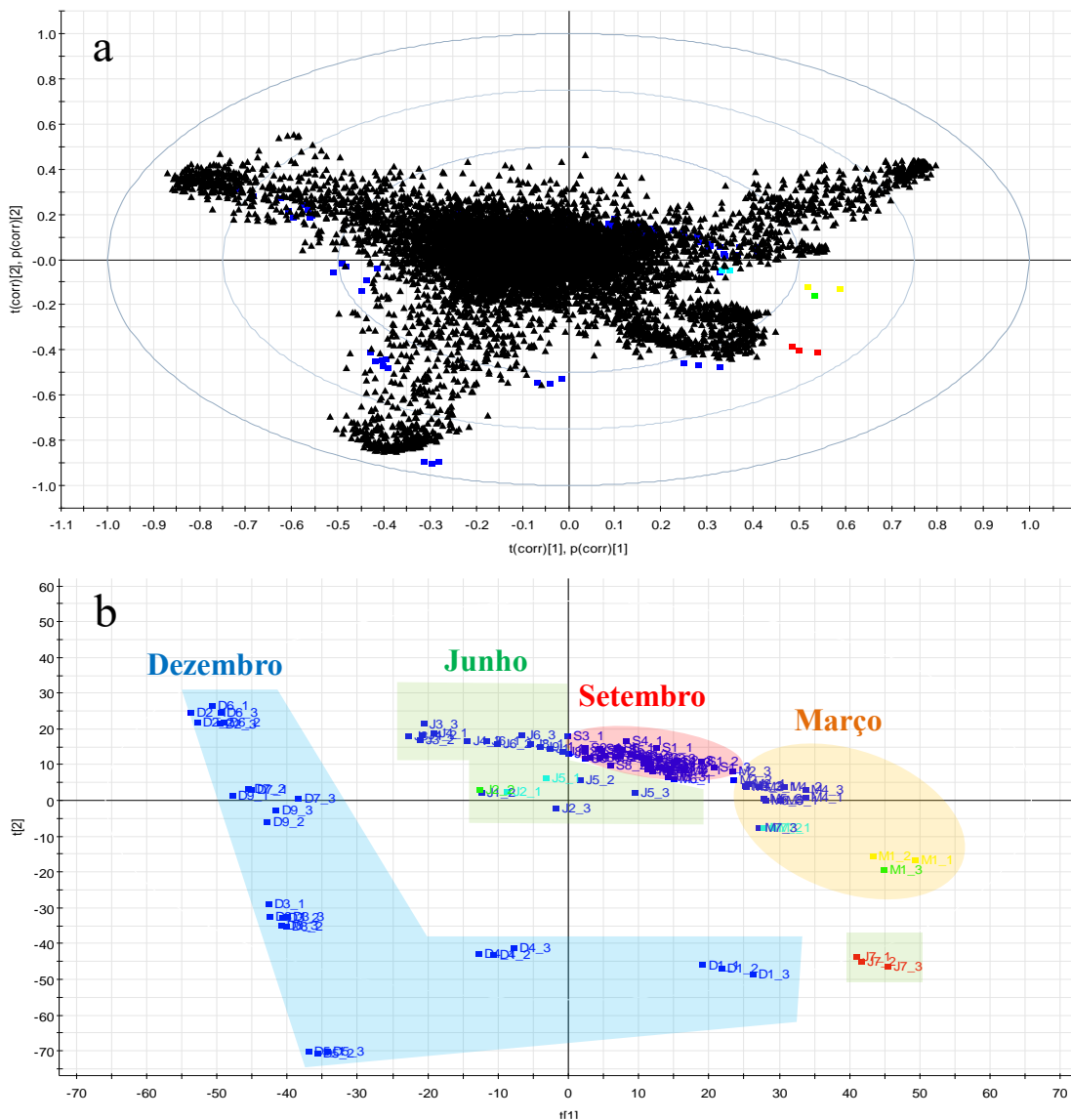
### 3.2 Método *Untargeted*

Ao contrário do método *targeted*, que negligencia diversos contaminantes presentes nas amostras, pois busca grupos e compostos pré-determinados, o método *untargeted* pode ser considerado como uma hipótese livre em relação a identificação de moléculas, visto que não tem alvos específicos (SIBIYA et al., 2019). Contudo, devido à alta complexidade dos dados obtidos, e também devido à inconstância da composição durante diferentes coletas, no caso de estudos de monitoramento ambiental, a análise de dados e a sua correlação, ainda podem ser considerados como um desafio analítico.

A partir da análise e processamento de dados das 36 amostras foi possível detectar 9.172 compostos (Figura 2 a). Os compostos identificados foram distribuídos de forma não supervisionada, de acordo com sua similaridade através da análise de componentes principais

(PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) (Figura 2 b). Esse perfil pode ser chamado de perfil molecular das amostras, que contém todas as moléculas já analisadas nos métodos *targeted* e *screening* direcionado, bem como, diversos compostos naturais, e que, portanto, não devem ser consideradas como discriminantes (SOULIER et al., 2016).

**Figura 2.** Perfil molecular obtido para amostras a partir da aquisição de dados em modo *full scan* na faixa de 100 a 900  $m/z$  no modo positivo (a) e *Scores plot* do modelo PCA (b)



Fonte: Próprio autor.

A abordagem *untarget* aliada à análise por PCA permitiu visualizar uma melhor separação por mês de coleta comparada às abordagens anteriores. A distinção do mês de

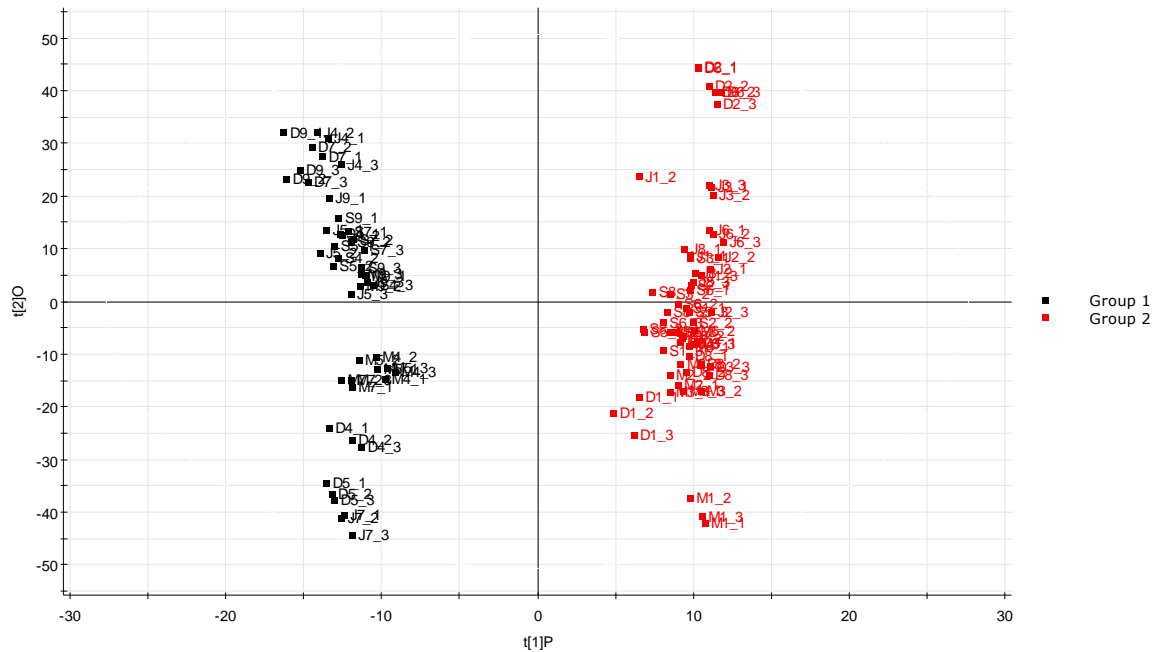
Dezembro foi evidenciada em relação aos demais meses avaliados, mas também é possível observar uma tendência de separação para os meses de Julho, Setembro e Março. Os meses de Julho e Dezembro, por sua vez, permitiram uma melhor visualização da separação das amostras. Um fato alarmante, é que não houve distinção da amostra *P8* em relação às demais, em nenhum mês de coleta. Essa amostra por ser de abastecimento público, seria esperado que tivesse um comportamento diferente das demais.

Quando um grande número de compostos é identificado, torna-se difícil a compreensão e interpretação dos dados, no entanto, técnicas estatísticas como a análise multivariada e pesquisa de banco de dados de metabólitos, possibilitam a sua melhor visualização (GRAHAM et al., 2015). Por outro lado, mesmo com a melhoria dos dados usando essas ferramentas, a definição de qual composto deve ser considerado de interesse é empírico, representando uma desvantagem da abordagem *untargeted*. No entanto, é importante destacar que uma medição não direcionada pode se tornar um composto alvo, após todas as etapas da análise de dados, que inclui extração, alinhamento, anotação, análise estatística, pesquisa em banco de dados e interpretação (GARDINASSI et al., 2017).

De acordo com as análises do Capítulo II e de *screening* direcionado, foi constatado que os pontos amostrais 4, 5, 7 e 9 apresentaram maiores índices de contaminação em relação aos demais. A partir desta informação foi proposta uma nova separação de grupos, sendo estas amostras nomeadas como Grupo 1, e as demais (*P 1, 2, 3, 6 e 8*) como Grupo 2. Esse agrupamento supervisionado foi utilizado para a realização da análise discriminante de projeções ortogonais para estruturas latentes (OPLS-DA, do inglês *Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis*) (Figura 3).

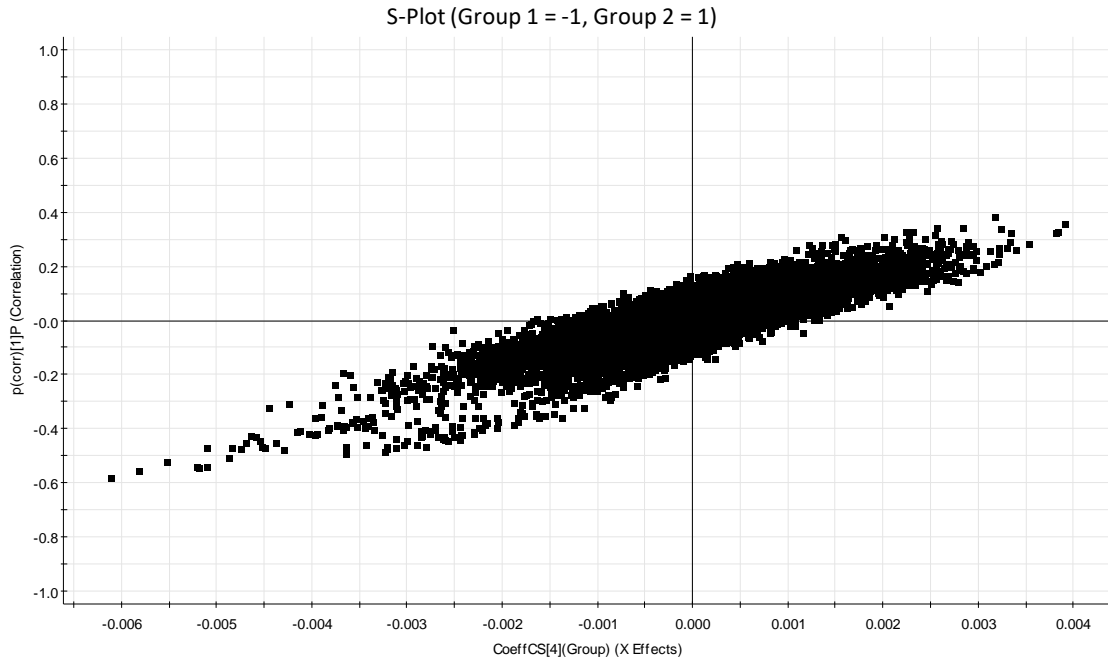
Para se verificar quais componentes contribuíram significativamente para a divisão dos Grupos foi gerado o gráfico *S-plot*, que auxilia na redução do número dos íons de interesse, mas que permite ainda explicar a máxima variação das amostras (GRAHAM et al., 2014). No gráfico *S-plot* (Figura 4) cada ponto representa um par de  $t_R$ - $m/z$ , e quanto maior é a sua distância de 0 no eixo *X*, maior é a contribuição do par em diferenciar os dois grupos avaliados (SHANG et al., 2016).

**Figura 3.** Scores plot do modelo OPLS-DA para as amostras de água analisadas no modo positivo.



**Fonte:** Próprio autor.

De acordo com a Figura 4 é possível observar que o Grupo 1 (valores negativos do eixo X) apresentou uma maior contribuição de diferenciação do que o Grupo 2. Para auxiliar na seleção das variáveis, a suas significâncias foram avaliadas através dos valores de influência da projeção das variáveis (VIP), no qual foi considerado que quanto maior o valor de VIP mais significativa é a variável para a distinção dos grupos (TUGUZIMANA et al., 2016). Para o presente estudo foram selecionadas apenas variáveis com valor de  $VIP > 1$ . Após a seleção de alguns possíveis marcadores, as informações de  $m/z$  foram então submetidas à base de dados *online* como o *ChemSpider* e *MassBank*, a fim de se realizar a identificação de novos compostos, ainda não contemplados pelas análises anteriores. Dentre os compostos identificados observou-se a presença de fármacos e cafeína, além de outros pesticidas (Tabela 2).

**Figura 4.** OPLS-DA/S-plot obtido para 36 amostras de água analisadas no modo positivo.

Fonte: Próprio autor.

**Tabela 2.** Tentativa de identificação de compostos significativos entre as amostras de água estudadas

VIP	<i>m/z</i>	Identificação	Diferença de Massa ( <i>Da</i> )	Fórmula	Utilização
1,01	261,21	Flumequina	0,04	C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> FNO <sub>3</sub>	Antibiótico
1,09	173,19	Atrazina-Desisopropil	0,14	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>5</sub>	Metabólito Atrazina
1,12	304,15	Diazinon	0,05	C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> PS	Inseticida
1,15	321,36	Clopidogrel	0,30	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> ClNO <sub>2</sub> S	Fármaco
1,16	320,65	Clorpirifos-metil	0,24	C <sub>7</sub> H <sub>7</sub> Cl <sub>3</sub> NO <sub>3</sub> PS	Inseticida
1,27	388,14	Fipronil-dessulfinil	0,17	C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>6</sub> N <sub>4</sub>	Metabólito Fipronil
1,34	315,34	Alaclor ESA	0,04	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>5</sub> S	Metabólito Alaclor
1,52	353,04	Aceclofenaco	0,01	C <sub>16</sub> H <sub>13</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>4</sub>	Antiinflamatório
1,89	822,56	Rifampicina	0,15	C <sub>43</sub> H <sub>58</sub> N <sub>4</sub> O <sub>12</sub>	Antibiótico
1,95	194,65	Cafeína	0,46	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Estimulante
2,15	305,37	Imazamox	0,24	C <sub>15</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Herbicida
2,45	151,02	Acetaminofem	0,05	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub>	Analgésico
2,96	217,33	Pimetrozina	0,10	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub> O	Inseticida
3,36	180,61	Paraxantina	0,45	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Metabólito Cafeína
4,95	320,81	Dimetenamida-ESA	0,26	C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>5</sub> S <sub>2</sub>	Metabólito Dimetanamida

Fonte: Próprio autor.

A presença de fármacos e cafeína em todas as amostras analisadas indicam que além da já comprovada contaminação por pesticidas devido à atividade agrícola da região, há também uma grande influência de atividade antrópica, ocasionada pelo provável descarte de efluentes domésticos nas águas analisadas. Fato semelhante foi observado por diversos pesquisadores ao avaliarem a qualidade da água potável e de rios brasileiros (MONTAGNER et al., 2017; GONÇALVES et al., 2017; SPOSITO et al., 2018; STARLING et al., 2018) e também de diversos países (FAWEL, NIEUWENHUIJSEN, 2003; SOULIER et al., 2016; MEGSON et al., 2016).

Apesar da obtenção do perfil das amostras e da identificação de potenciais marcadores, não foi possível inferir pelo método *untargeted* qual a real origem da contaminação, visto a necessidade de se avaliar também as fontes poluidoras, no caso de efluentes, bem como realizar análises confirmatórias e quantitativas dos compostos identificados. Dentre os compostos identificados até o momento, o composto atribuído a  $m/z$  388,14 Fipronil-dessulfinil foi o único a apresentar uma predominância sazonal, sendo mais comum no mês de Dezembro. Sendo assim, é imprescindível a continuidade da busca por novos marcadores de relevância ambiental, bem como, um monitoramento mais frequente das áreas afetadas.

Um ponto importante a ser discutido é que o equipamento utilizado para a realização do experimento é um espectrômetro de massa nominal de baixa resolução, ou seja, um triplo-quadrupolo trabalhando em modo *full scan* sem fragmentação. A utilização desse equipamento permite a detecção de picos e de alguns fragmentos, entretanto, uma identificação indubitável só seria possível com um espectrômetro de alta resolução. Contudo, este pode ser considerado um primeiro passo para a identificação de compostos para incentivar futuras confirmações e a continuidade da investigação. A cafeína por exemplo, por ser considerado um importante marcador de atividade antrópica, e também pela disponibilidade de padrão analítico para sua confirmação, tornou-se um composto *target*, possibilitando a sua confirmação e quantificação.

### 3.3 Determinação de Cafeína e Paraxantina

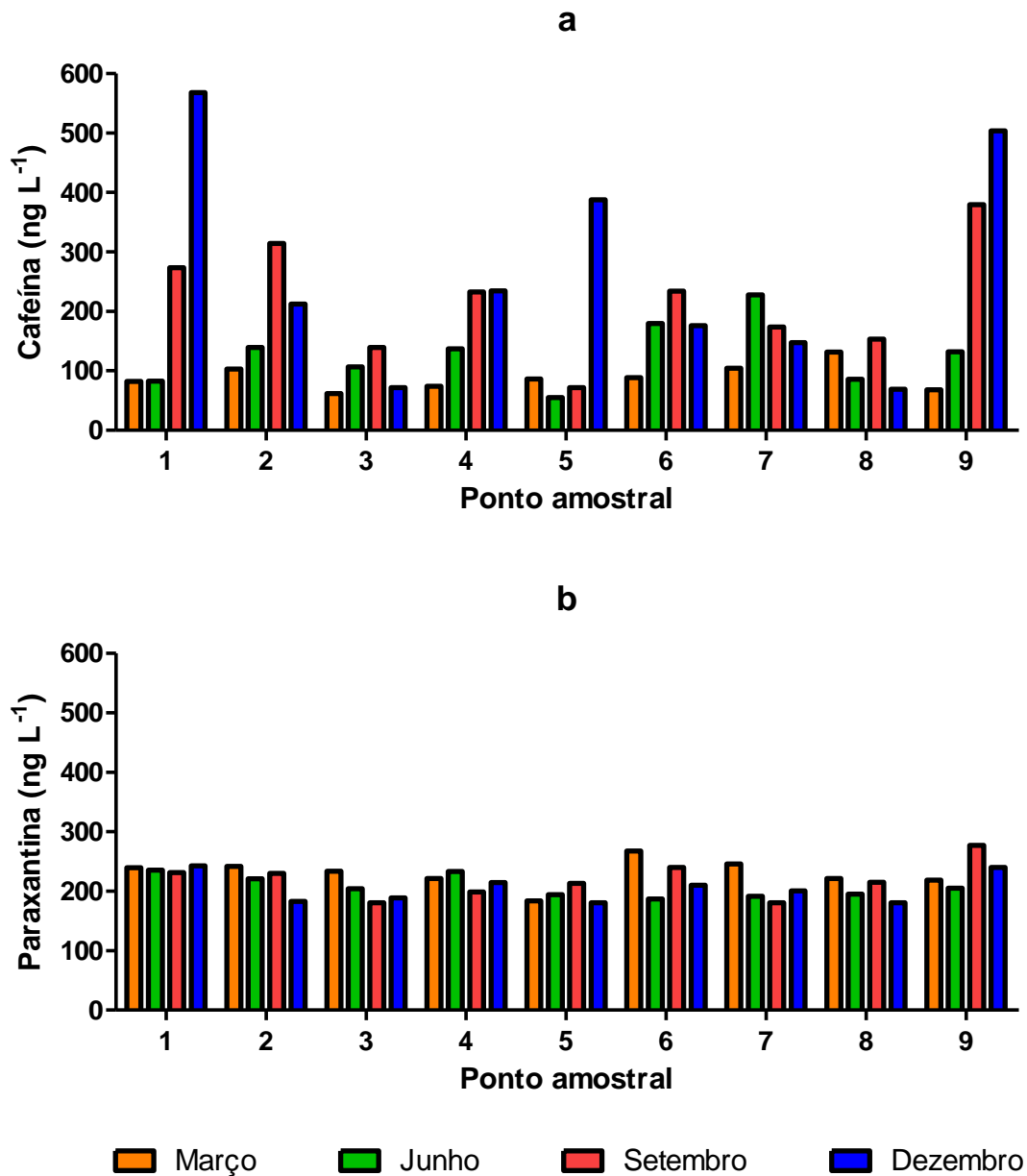
A cafeína é uma substância da classe das metilxantinas que apresenta efeito estimulante no sistema nervoso central, e por esse motivo é normalmente consumida através da ingestão de cafés, chás, bebidas energéticas, guaraná, cacau, entre outros alimentos, além

de medicamentos, pois está normalmente associado à analgésicos. Em efluentes domésticos pode atingir altas concentrações devido ao seu alto consumo ( $70$  a  $171$  mg pessoa<sup>-1</sup> dia<sup>-1</sup>), e apesar do tratamento de esgoto ser capaz de removê-la parcialmente, ainda é possível detectar resíduos de cafeína, após o tratamento e estes podem atingir águas superficiais e subterrâneas. No ambiente, a meia vida da cafeína é de 30 dias, o que permite a sua detecção e possível correlação com uma contaminação ambiental oriunda de efluentes domésticos, com um intervalo de tempo consideravelmente amplo (GONÇALVES, et al., 2017; MONTAGNER et al., 2017).

Sabe-se que a cafeína é metabolizada no organismo após ser consumida e que seu produto majoritário é a paraxantina. Sendo assim, o monitoramento de ambas moléculas se faz interessante na avaliação de descartes de efluentes sanitários em águas superficiais (TAVARES, SAKATA, et al., 2002; HE et al., 2018). A análise dos compostos foi realizada no modo *SRM*, e os resultados obtidos podem ser observados na Figura 5. Para fins de comparação com dados da literatura os resultados serão reportados em ng L<sup>-1</sup>. Foi detectado cafeína em todas as 36 amostras avaliadas, com uma concentração variando de 68,01 a 568,38 ng L<sup>-1</sup>, bem como paraxantina com uma faixa de variação de 180,5 a 277,3 ng L<sup>-1</sup>.

De acordo com a Figura 5, é possível observar que concentrações mais elevadas de cafeína foram obtidas para os meses de Setembro e Dezembro. Dentre essas destacam-se a amostra *P1*, *P5* e *P9* coletadas no mês de dezembro como as maiores concentrações de cafeína (387,73 a 568,38 ng L<sup>-1</sup>). Estes pontos amostrais são provenientes de córrego, área de preservação permanente e de poço, respectivamente. Seria esperado que a área de preservação permanente apresentasse concentração virtualmente ausente de cafeína, ou em nível considerado basal (14 ng L<sup>-1</sup>) devido à presença do composto na vegetação local (GONÇALVES et al., 2017).

**Figura 5.** Determinação de cafeína e paraxantina nas amostras de água por LC-MS/MS



**Fonte:** Próprio autor.

Muitos estudos utilizando a cafeína como marcador de poluição vem sendo realizados, e o nível de contaminação dos recursos hídricos por este composto está diretamente relacionado à ocupação do solo de cada região, ao saneamento básico, à densidade demográfica e às atividades econômicas da região estudada. De forma geral, os níveis de cafeína encontrados em corpos de água variam de 40 a 19.000 ng L<sup>-1</sup>, e sempre são relatados concomitantemente a pesticidas e fármacos (MONTAGNER et al., 2017). Apesar dos níveis

encontrados no presente estudo não serem tão elevados, estes são maiores do que os esperados para uma contaminação natural. Em relação aos níveis de paraxantina, estes não apresentaram grandes flutuações, mas se encontram na mesma faixa de concentração (12,2 a 415,7 ng L<sup>-1</sup>) de estudos que indicam contaminação dos recursos hídricos devido à atividades industriais e população urbana (FERNÁNDEZ et. al., 2009). Sendo assim, os resultados indicam uma possível contaminação por efluentes domésticos devido a presença de cafeína e paraxantina nas amostras de água.

#### 4. Conclusão

A análise de *PCA* demonstrou uma tendência de separação das variáveis por mês, indicando que as amostras podem ser afetadas pela sazonalidade. Entretanto, não foi possível atribuir marcadores específicos para cada período devido à diversidade das amostras. A presença de substâncias chaves como bromacil e propiconazol foram considerados como possíveis marcadores de poluição para futuros estudos de monitoramento, visto que a sua presença foram relatadas em pontos amostrais específicos. As análises propostas evidenciaram uma contaminação das amostras estudadas, devido à presença de fármacos e cafeína, compostos considerados emergentes e que não são oriundos da atividade agrícola, mas sim pelo possível descarte de efluentes domésticos nos corpos hídricos. Também observou-se a presença de diversos inseticidas pelo método *untargeted* que não haviam sido previamente relatados nas etapas anteriores. Não obstante, análises confirmatórias de alta precisão e com a utilização de padrões analíticos se fazem necessárias.

## 5. Referências

- ANVISA. Bula Bromacil. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/b11.pdf/793b2c3d-d101-4b21-be04-212f309017bb>>. Acesso em Março 2019.
- ADAPAR. Bula Propiconazole. Disponível em <[http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Fungicidas/propiconazole\\_nortox.pdf](http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Fungicidas/propiconazole_nortox.pdf)> Acesso em: 02 mar. 2019.
- BARAZZETTI, B. C.; DE SOUZA, S, J. E. Estimating the uncertainty from sampling in pollution crime investigation: The importance of metrology in the forensic interpretation of environmental data. **Forensic Science International**, v. 288, p. 14–22, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução CONAMA n.357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 18 mar., 2005.
- FARRÉ, M.; KANTIANIA, L.; PETROVICB, M.; PÉREZA, S.; BARCELÓ, D. Achievements and future trends in the analysis of emerging organic contaminants in environmental samples by mass spectrometry and bioanalytical techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1259, p. 86–99, 2012.
- FAWELL, J.; NIEUWENHUIJSEN, M. J. Contaminants in drinking water. **British Medical Bulletin**, v. 68, n. 1, p. 199–208, 1 dez. 2003.
- FERNÁNDEZ, C., GONZÁLEZ-DONCEL, M., PRO, J., CARBONELL, G., & TARAZONA, J. V. Occurrence of pharmaceutically active compounds in surface waters of the Henares-Jarama-Tajo river system (Madrid, Spain) and a potential risk characterization. **Science of the Total Environment**, v 408, n. 3, p. 543–551, 2010
- GARDINASSI, L. G.; XIA, J.; SAFO, S. E.; LI, S. Bioinformatics Tools for the Interpretation of Metabolomics Data. **Current Pharmacology Reports**, v. 3, n. 6, p. 374–383, 25 dez. 2017.
- GRAHAM, S. F.; CHEVALLIER, O. P.; ELLIOTT, C. T.; HÖLSCHER, C.; JOHNSTON, J.; MCGUINNESS, B.; KEHOE, P. G.; PASSMORE, A. P.; GREEN, B. D. Untargeted Metabolomic Analysis of Human Plasma Indicates Differentially Affected Polyamine and L-Arginine Metabolism in Mild Cognitive Impairment Subjects Converting to Alzheimer’s Disease. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0119452, 24 mar. 2015.
- HE, K.; ECHIGO, S; ASADA, Y.; ITOH, S. Determination of Caffeine and Its Metabolites in Wastewater Treatment Plants Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **Analytical Sciences**, v. 34, p. 349 -354, 2018.
- IEDA, T.; HASHIMOTO, S.; ISOBE, T.; KUNISUE, T.; TANABE, S. Evaluation of a data-processing method for target and non-target screening using comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with high-resolution time-of-flight mass spectrometry for environmental samples. **Talanta**, v. 194, p. 461–468, mar. 2019.

KIND, T.; TSUGAWA, H.; CAJKA, T.; MA, Y.; LAI, Z.; MEHTA, S. S.; WOHLGEMUTH, G.; BARUPAL, D. K.; SHOWALTER, M. R.; ARITA, M.; FIEHN, O. Identification of small molecules using accurate mass MS/MS search. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 37, n. 4, p. 513–532, jul. 2018.

LLORCA, M.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S. **State-of-the-art of screening methods for the rapid identification of chemicals in drinking water**. Institute for the Protection and Security of the Citizen. Luxemburgo: União Européia, 2013.

MEGSON, D.; REINER, E. J.; JOBST, K. J.; DORMAN, F. L.; ROBSON, M.; FOCANT, J. F. A review of the determination of persistent organic pollutants for environmental forensics investigations. **Analytica Chimica Acta**, v. 941, p. 10–25, out. 2016.

MISRA, B. B.; VAN DER HOOFT, J. J. J. Updates in metabolomics tools and resources: 2014-2015. **ELECTROPHORESIS**, v. 37, n. 1, p. 86–110, jan. 2016.

MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1094–1110, 11 jul. 2017.

SHANG, E.; ZHU, Z.; LIU, L.; TANG, Y.; DUAN, J. UPLC-QTOF-MS with chemical profiling approach for rapidly evaluating chemical consistency between traditional and dispensing granule decoctions of Tao-Hong-Si-Wu decoction. **Chemistry Central Journal**, v. 6, n. 1, p. 495, 24 dez. 2012.

SIBIYA, I.; POMA, G.; CUYKX, M.; COVACI, A.; DASO, A. P.; OKONKWO, J. Targeted and non-target screening of persistent organic pollutants and organophosphorus flame retardants in leachate and sediment from landfill sites in Gauteng Province, South Africa. **Science of The Total Environment**, v. 653, p. 1231–1239, fev. 2019.

SOULIER, C.; COUREAU, C.; TOGOLA, A. Environmental forensics in groundwater coupling passive sampling and high resolution mass spectrometry for screening. **Science of The Total Environment**, v. 563–564, p. 845–854, set. 2016.

SPOSITO, J.C.V., MONTAGNER, C.C., CASADO, M., NAVARRO-MARTÍN, L., JUT SOLÓRZANO, J.C., PIÑA, B., GRISOLIA, A.B. Emerging contaminants in Brazilian rivers: Occurrence and effects on gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Chemosphere**, v. 209, n. 3, p. 696–704, out. 2018.

STARLING, M. C. V. M.; AMORIM, C. C.; LEÃO, M. M. D. Occurrence, control and fate of contaminants of emerging concern in environmental compartments in Brazil. **Journal of Hazardous Materials**, 2018.

TAVARES, C; SAKATA, R. K. Cafeína para Tratamento de Dor. **Rev Bras Anestesiol**, v.62, p. 387-401, 2002.

TUGIZIMANA, F. et al. A Conversation on Data Mining Strategies in LC-MS Untargeted Metabolomics: Pre-Processing and Pre-Treatment Steps. **Metabolites**, v. 6, n. 4, p. 40, 3 nov. 2016.

**Capítulo IV- Avaliação dos efeitos  
tóxicos das amostras de água  
superficial, poço e abastecimento  
municipal no desenvolvimento do *Danio  
rerio***

## 1. Introdução

A poluição das águas naturais por agentes antrópicos tais como pesticidas, hormônios, medicamentos, entre outros, apresentam um risco à saúde humana e também ao meio ambiente. Entretanto, a análise qualitativa e quantitativa destes contaminantes em amostras reais não demonstram os reais efeitos que esses compostos podem causar aos organismos vivos (SHAO et al., 2019).

Estudos ecotoxicológicos, por sua vez, buscam a relação entre o poluente químico e o ambiente no qual se encontra, e a consequência destes aos organismos vivos (SILVA et al., 2015). Dentre os ensaios ecotoxicológicos disponíveis os com a espécie de peixe *Danio rerio* (zebrafish) é uma das utilizadas para a avaliação de efeitos crônicos, devido a sua sensibilidade a diversos contaminantes, e por ter um método padronizado pela ABNT-NBR 15499 e pela OECD 236 (BERTOLETTI, 2009; OECD, 2013; DAI et al., 2014).

Apesar dos inúmeros estudos descritos na literatura utilizando embriões de Zebrafish, a maioria dos trabalhos avalia a toxicidade de compostos usualmente encontrados no ambiente, mas poucos utilizam amostras reais, por estas serem consideradas complexas e seus resultados de difícil interpretação. Dentre os testes com amostras reais, são mais comuns estudos com efluentes, do que amostras de águas de rios para avaliar os efeitos tóxicos de contaminantes, havendo ainda dúvidas quanto a sensibilidade de teste de toxicidade aguda utilizando embriões de peixes (*FET - Fish Embryo Acute Toxicity test*) visto a baixa concentração dos poluentes e ao curto período de exposição (ALVES et al., 2017; SANCHES et al., 2017; STELZER et al., 2018).

O protocolo *FET* segue critérios de avaliação quanto à taxa de mortalidade e de parâmetros considerados sub-letais, mas que causam anomalias e má formação durante o desenvolvimento dos embriões em períodos que podem variar de 72 a 96 horas após a fertilização dos ovos (WIGH et al., 2018).

Neste contexto, buscou-se avaliar a toxicidade das amostras reais de água provenientes de uma região agrícola, previamente caracterizadas quanto a sua contaminação por diversos pesticidas (ALMEIDA et al., 2019), utilizando embriões de Zebrafish, através da avaliação dos parâmetros letais e sub-letais observados durante o *FET*.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Amostras

A coleta e caracterização das amostras quanto a concentração de pesticidas, pH e condutividade foram realizadas conforme descrito por ALMEIDA e colaboradores (2019). As amostras estudadas foram provenientes de mina e rios, coletadas em propriedades rurais, além de um poço e a água de abastecimento municipal (Tabela 1).

**Tabela 1.** Informações sobre localização e característica dos pontos de coleta

Ponto	Coordenada UTM	Tipo de amostra	Observação
1	22k;0455828; 7400659; Elev 792 m	Córrego	-
2	22k;0455759; 7401017; Elev 769 m	Mina	Nascente
3	22k; 0455623; 7401677; Elev 753 m	Córrego	-
4	22k;0455844; 7401849; Elev 786 m	Córrego	
5	22k;0458133; 7401759; Elev 755 m	Rio	Área de preservação permanente (APP)
6	22k;0458494; 7401044; Elev 786 m	Captação do córrego	
7	22k;0457348; 7400402; Elev 804 m	Rio	Manilhado
8	22k;0456752; 7401541; Elev 845 m	Abastecimento Municipal	
9	22k;0456752; 7401541; Elev 845 m	Poço	

UTM: Universal Transversa de Mercator

**Fonte:** Adaptado de Almeida et al. (2019).

Previamente ao bioensaio, 100 mL de cada amostra foram mantidos a temperatura ambiente e filtrados em membrana de nylon 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore, Billerica, MA, EUA).

### 2.2 Soluções e reagentes

Água reconstituída, também utilizada como controle negativo, foi preparada em laboratório segundo ISO-7346-3 (ISO, 1996), contendo 2 mmol L<sup>-1</sup> de Ca<sup>2+</sup>, 0,5 mmol L<sup>-1</sup> de Mg<sup>2+</sup>, 0,75 mmol L<sup>-1</sup> de Na<sup>+</sup> e 0,074 mmol L<sup>-1</sup> de K<sup>+</sup>. O controle positivo foi preparado a

partir da diluição de 3,4-dicloroanilina a uma concentração fixa de 4 mg L<sup>-1</sup> em água reconstituída.

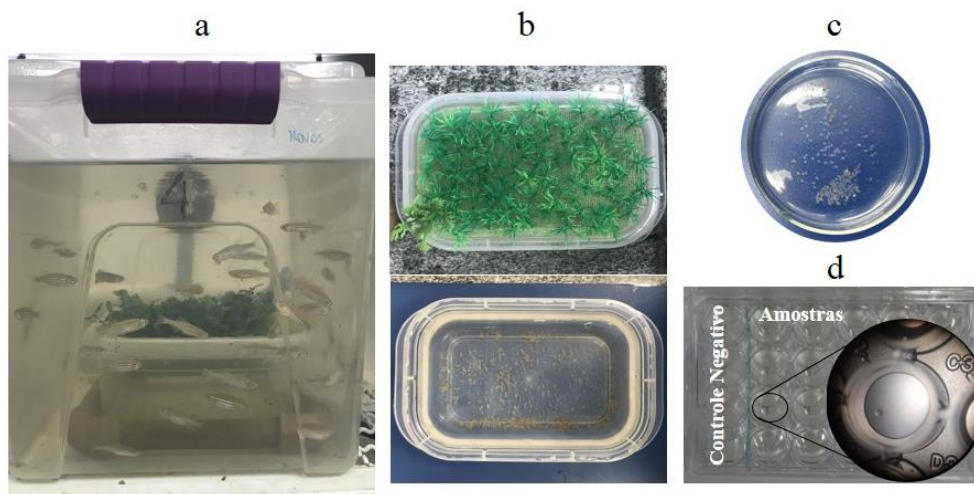
### 2.3 Animais

A experimentação animal foi realizada conforme protocolo aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (UEL) sob protocolo CEUA nº 22196.2017.12.

Todos os testes foram realizados no Laboratório de Ecofisiologia Animal (LEFA/CCB) conforme o protocolo do Teste de Toxicidade em Embriões de Peixes (FET) (OECD 236, 2013). Dez casais de animais adultos foram mantidos em aquário de 18 L com sistema de circulação e filtragem de água a  $26 \pm 1,0$  ° C com fotoperíodo de 14,0 h de luz e 10,0 h de ciclo escuro, alimentados diariamente com ração seca contendo 40% de proteína total. Na noite anterior à reprodução, um coletor contendo vegetação artificial na superfície foi instalado no fundo do aquário para proteger os ovos da predação por peixes adultos e garantir sua fácil obtenção após a fertilização (Figura 1 a, b).

Os casais foram mantidos no escuro até o início da manhã e após uma hora de acasalamento natural, os ovos fertilizados foram coletados e lavados em água reconstituída (Figura 1c). A viabilidade foi verificada por observação direta em estereomicroscópio com aumento de 40x (DMI Motic SMZ-140), e os embriões selecionados foram expostos a 10 mL de cada amostra (n = 30 embriões) em placas de petri. Os embriões expostos foram distribuídos individualmente na placa de 24 poços contendo um embrião por poço e 2 mL de amostra, sendo 20 embriões expostos às amostras e 4 ao controle interno negativo (Figura 1 d). As placas foram mantidas em incubadora B.O.D. a  $26,0 \pm 1,0$  ° C.

**Figura 1.** Montagem do experimento de teste de toxicidade de substâncias utilizando embriões de *Danio rerio*. a) Aquário contendo 20 animais e coletor submerso. b) coletor retirado após fertilização dos ovos. c) ovos fecundados após seleção e limpeza. d) montagem da placa para o teste.



**Fonte:** Próprio autor

#### 2.4 Observações letais e sub-letais (FET e iFET)

Os embriões foram observados em estereomicroscópio (DMI Motoc SMZ-140) e microscópio invertido (Olympus CKX41SF, Kyoto, Japão) a cada 24 horas até 96 horas pós-fertilização (hpf) para anormalidades letais e sub-letais, a fim de avaliar a toxicidade das amostras pelo FET. Além disso, um método semi-quantitativo (iFET) foi avaliado, a fim de considerar os parâmetros sub-letais não cobertos pela OCDE 236/2013 (OCDE, 2013; Wigh et al., 2018; Zhu et al., 2015).

Coagulação de ovos fertilizados, ausência de somito, não separação da cauda, e ausência de batimento cardíaco foram considerados como parâmetros letais. Os parâmetros sub-letais observados foram edema no pericárdio, edema no saco, falta de pigmentação, hemocoagulação, desenvolvimento anormal cabeça e cauda, anormalidades do saco vitelino e atraso no desenvolvimento.

Pontuações 0 e 1 foram atribuídas para cada embrião com pelo menos um registro de observação letal ou sub-letal, sendo estes não acumulativos. Na presença de um observação letal, nenhuma sub-letal foi registrada. O índice de toxicidade sub-letal (iFET) foi calculado individualmente para cada placa de acordo com a Equação 1, adaptada de Zhu et al. (2015), em que:  $n$  = número de parâmetros avaliados,  $N$  = número total de embriões,  $ND$  = número

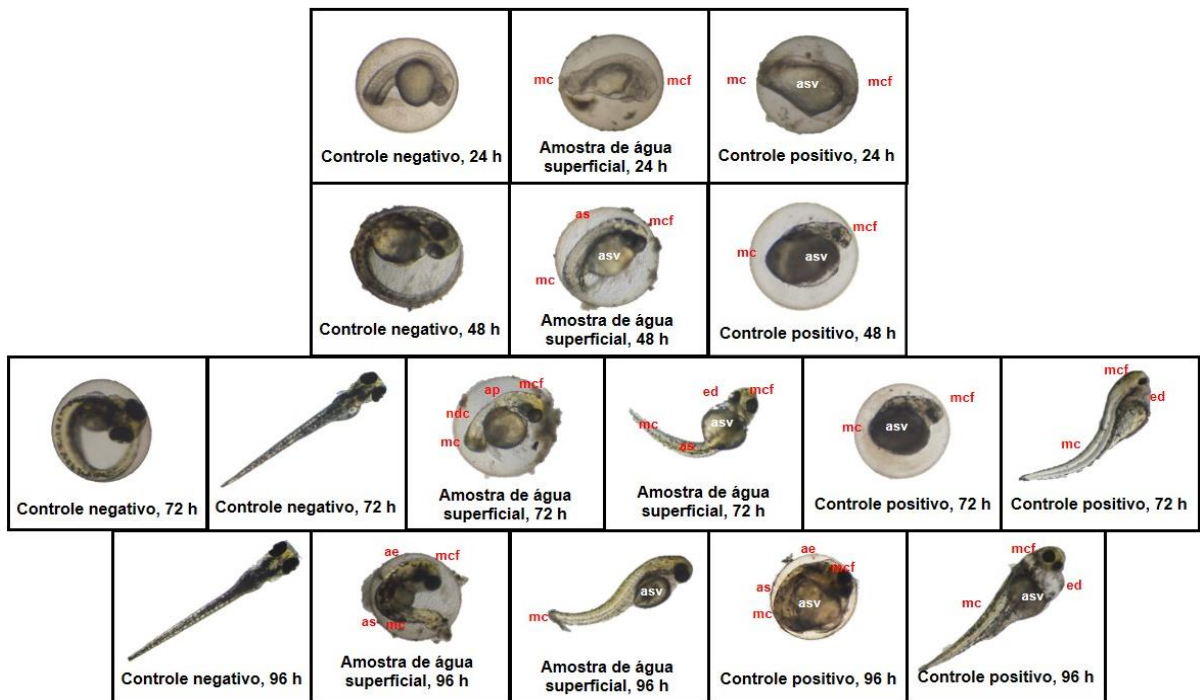
total de parâmetros letais observados (embriões mortos) e  $NSL$  = número total de parâmetros sub-letais observados.

$$iFET = \frac{(n \times N_D) + N_{SL}}{n \times N} \times 100\% \quad (\text{Eq. 1})$$

### 3. Resultados e Discussão

A exposição dos embriões de Zebrafish as amostras reais sem nenhum tipo de tratamento ou diluição objetivaram a avaliação dos potenciais efeitos tóxicos dessas amostras devido a presença de diversos contaminantes, na sua maioria pesticidas. Dentre as anomalias observadas durante o teste foram relatados com maior frequência a ausência de pigmentação, defeitos na cauda, inchaço no saco vitelino e presença de diversos edemas. Na Figura 2 é possível observar a descrição das teratologias relatadas, bem como, os estágios de desenvolvimento para o período de exposição de 96 horas.

**Figura 2.** Embriões expostos por 96 horas à amostras de águas superficiais, poço e abastecimento público.

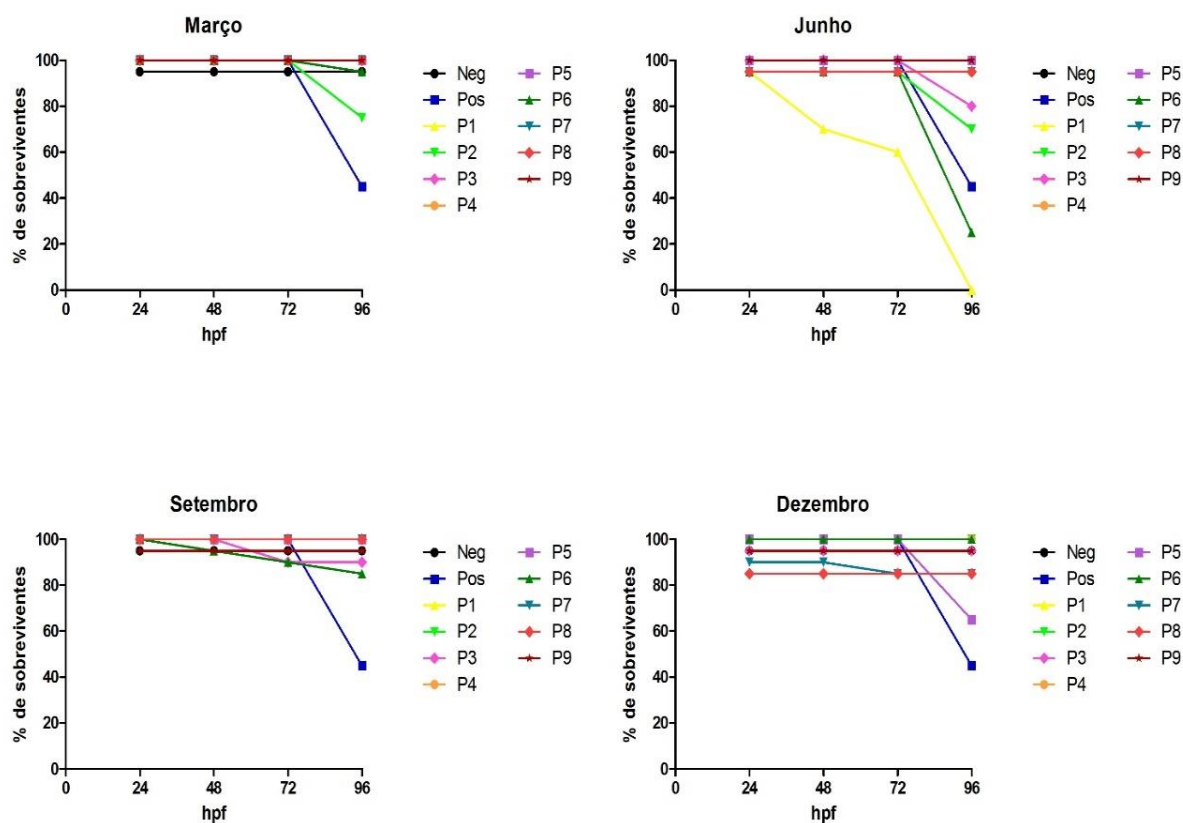


Teratologias encontradas: malformação da cauda (mc); malformação cefálica (mcf); alterações nos somitos (as); não absorção do saco vitelínico (asv); não destacamento da cauda (adc); edema (ed); atraso na eclosão (ae); alteração na pigmentação (ap). Embriões do controle positivo foram expostos à 3,4-dicloroanilina (4 mg L<sup>-1</sup>).

Fonte: Próprio autor

Apesar das anomalias observadas durante o desenvolvimento embrionário, a taxa de sobrevivência dos embriões foi considerada alta (Figura 3).

**Figura 3.** Taxa de sobrevivência durante 96 horas de exposição à amostras de águas superficiais, poço e abastecimento público.



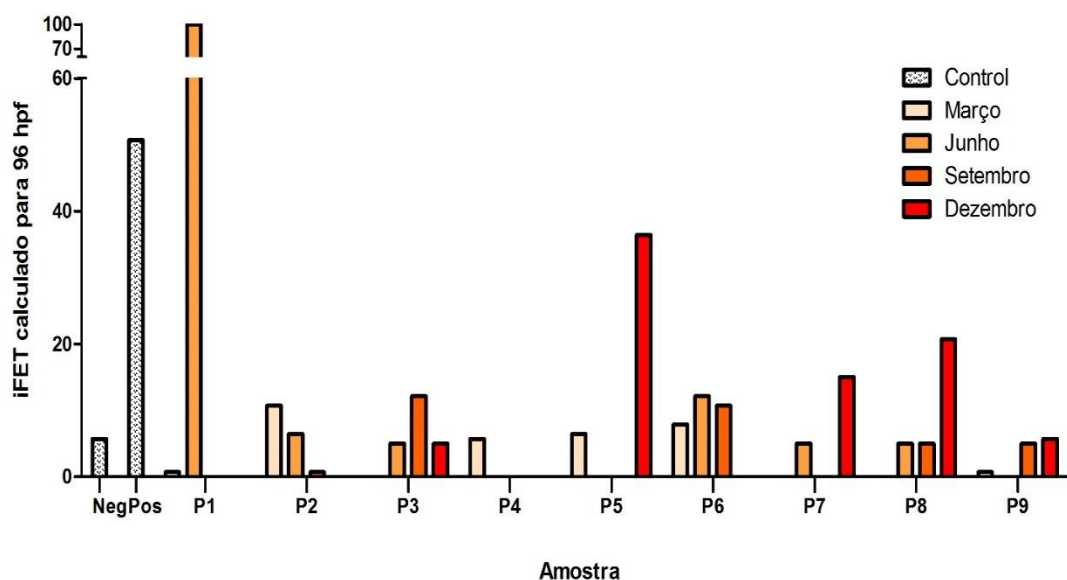
Fonte: Próprio autor

Dentre os meses de coleta, os que mais se destacaram foram Junho e Dezembro, visto o maior índice de mortalidade observado, quando comparado com as demais amostras. Entretanto, se levarmos em consideração as análises químicas realizadas anteriormente, pode-se considerar que as amostras *P1* e *P6* da coleta de Junho apresentaram resultados atípicos.

A partir da atribuição de valores 0 e 1 para as teratologias avaliadas, o cálculo do índice de Toxicidade em Embriões de Peixe (iFET) buscou expandir o convencional teste de mortalidade sem a necessidade de experimentos adicionais, pois foram considerados também parâmetros sub-letais durante a mesma avaliação do *FET* (ZHU et al., 2015; WIGH et al., 2018). Dentre os parâmetros sub-letais observados o defeito de cauda e a presença de edemas

foram os mais comuns. Após o período de 96 *hpf* os resultados obtidos para *iFET* foram expressos em porcentagem (Figura 4).

**Figura 4.** Índice *iFET* calculado para amostras de águas superficiais, poço e abastecimento público após 96 *hpf*



*iFET*: índice de Toxicidade em Embriões de Peixe; *hpf*: horas pós fertilização

**Fonte:** Próprio autor.

Os índices calculados apresentaram valores, na maioria das amostras e coletas, abaixo de 15%. Contudo, o mês de Dezembro se mostrou atípico com índices de 36,43% para a amostra *P5* e 20,71% para a *P8*. Assim como já mencionado, a amostra *P1* da coleta de Julho, apresentou uma mortalidade acima da média, e conseqüentemente um elevado índice de toxicidade.

Durante as análises químicas foi constatado que as amostras mais contaminadas por pesticidas foram *P4*, *P5*, *P7* e *P9* (Tabela 2) (ALMEIDA et al. 2019). Entretanto, os valores de *iFET* obtidos, para as mesmas amostras, não apresentaram indícios de seguir um padrão dose-dependência. Stelzer e colaboradores (2018) durante análises de efluentes levantaram a hipótese sobre a sensibilidade do teste dos embriões ser inferior ao dos peixes juvenis, entretanto, quando adicionaram parâmetros sub-letais à avaliação perceberam que o estágio larval foi o mais sensível de todos. É importante ressaltar que em estudos com amostras reais as concentrações dos contaminantes podem ser consideradas baixas, e que a utilização de parâmetros sub-letais de avaliação são de grande valia (SANCHES et al., 2018).

**Tabela 2.** Concentração total dos pesticidas avaliados nas amostras de águas superficiais, poço e abastecimento público. Quantificação realizada por LC-MS/MS.

Coleta (mês)	[Pesticidas] ( $\mu\text{g L}^{-1}$ , n=3)								
	SP 1	SP 2	SP 3	SP 4	SP 5	SP 6	SP 7	SP 8	SP 9
Março	0,29	0,44	0,31	1,62	12,54	0,28	11,26	0,28	2,14
Junho	0,45	1,04	0,41	1,59	12,95	0,28	19,29	0,31	2,72
Setembro	0,50	0,64	0,40	1,57	6,33	0,45	15,70	0,33	2,52
Dezembro	1,55	0,85	0,38	1,30	8,52	0,28	20,63	0,28	3,55

Fonte: Almeida et al., (2019)

Nas condições experimentais do presente estudo, foi observado que poucos embriões iniciaram a eclosão no período de 72 *hpf*, e a que a grande maioria eclodiu em 96 *hpf*. Visto que o experimento foi interrompido ao final das 96 horas de exposição, as larvas não tiveram tempo suficiente de exposição, e portanto, não atingiram o ápice de sensibilidade do teste, uma vez que o ovo pode ter papel fundamental na proteção do embrião em relação ao meio (KAO et al., 2019).

Em estudos sobre os potenciais efeitos nocivos de pesticidas, utilizando o modelo Zebrafish, pesquisadores relataram também anomalias no desenvolvimento da bexiga natatória das larvas (GODFREY et al., 2017; DONG et al., 2018, QUIAN et al., 2019). Entretanto, este é um parâmetro que só poderia ser observado a partir de 96 *hpf*, o que indica a necessidade de um teste estendido.

Estudos com misturas complexas, como amostras reais, podem apresentar resultados imprevisíveis, visto a possibilidade de formação de novos compostos e do sinergismo de todos os presentes (STELZER et al., 2018). Estas informações ainda são escassas na literatura, o que dificulta a comparação e discussão de resultados.

Deve ser considerado também que ao se trabalhar com amostras de rios, esta variação pode ser ainda maior, quando os mesmos locais são avaliados por longos períodos de tempo, visto as diversas influências que eles podem sofrer, tais como chuvas, escoamento superficial, recebimento de efluentes industriais e domésticos, entre outros. Um estudo realizado próximo à uma região industrial com possível contaminação dos rios por efluentes não obteve resultados positivos, quando realizados testes de toxicidade aguda, entretanto, ao se avaliar a expressão gênica do Zebrafish, foram observados indicadores de toxicidade devido a contaminação (ZHOU et al., 2018). Diferentemente do observado por estes pesquisadores, as

amostras estudadas apresentaram indícios de toxicidade pelas anomalias observadas durante o *FET* e pelos índices do *iFET* obtidos.

A maioria dos trabalhos disponíveis que visam relacionar dados ambientalmente relevantes com estudos *in vivo*, utilizam apenas as concentrações dos pesticidas de interesse encontrados no ambiente, nos testes de toxicidade (VIEIRA et al., 2016; SPOSITO et al., 2018). Neste contexto, ainda se faz necessário estudos adicionais para se entender o comportamento de contaminantes específicos e de suas misturas, visando ter um maior respaldo, ao se realizar estudos com amostras reais. Adicionalmente, a inclusão de mais parâmetros e análises que possam ser realizadas a partir do *FET*, também se apresenta como uma alternativa interessante para agregar sensibilidade ao teste.

#### 4. Conclusão

A utilização de amostras reais em estudos toxicológicos ainda não é uma prática comum, mas vem ganhando espaço nas pesquisas relacionadas à impactos ambientais. Os resultados das amostras estudadas indicaram efeitos tóxicos durante o desenvolvimento embrionário e no início do estágio larval. Entretanto, estudos de toxicidade, utilizando embriões de Zebrafish, ainda precisam ser mais bem explorados quanto aos parâmetros que podem ser avaliados durante o teste, visando elucidar possíveis efeitos tóxicos das amostras. O aumento no tempo de exposição também pode se mostrar um fator fundamental considerando um ganho de sensibilidade.

Devido à impossibilidade em se repetir as análises, considerando o volume limitado de algumas amostras, algumas melhorias propostas foram efetuadas utilizando os pesticidas selecionados e suas misturas, objeto de estudo do próximo Capítulo.

## 5. Referências

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), 2007. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica de curta duração – método de ensaio com peixes. Norma ABNT-NBR 15499, Rio de Janeiro, 21p.
- ALMEIDA, M. B.; MADEIRA, T. B.; WATANABE, L. S.; MELETTI, P. C.; NIXDORF, S. L. Pesticide Determination in Water Samples from a Rural Area by Multi-Target Method Applying Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2019 (*in press*).
- ALVES, R. N.; MARIZ Jr. C. F.; PAULO, D. V.; CARVALHO, P. S. M. Toxicity of effluents from gasoline stations oil-water separators to early life stages of zebrafish *Danio rerio*, **Chemosphere**, v.178, p. 224–230, jul, 2017.
- BERTOLETTI, E. Determinação da Ecotoxicidade Crônica para *Danio rerio*. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**. v.4, n.1994, p.1–7, 2009.
- DAI, Y. J.; JIA, Y. F.; CHEN, N.; BIAN, W. P.; LI, Q. K.; MA, Y. B.; CHEN, Y. L.; PEI, D. S. Zebrafish as a model system to study toxicology, **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.33, n.1, p. 11–17, jan, 2014.
- DONG, X.; XU, H.; WU, X.; YANG, L. Chemosphere Multiple bioanalytical method to reveal developmental biological responses in zebra fish embryos exposed to triclocarban. **Chemosphere**, v.193, p. 251–258, 2018.
- GODFREY, A.; HOOSER, B.; ABDELMONEIM, A.; HORZMANN, K. A.; FREEMAN, J. L.; SEPÚLVEDA, M. S. Thyroid disrupting effects of halogenated and next generation chemicals on the swim bladder development of zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v.193, n.1, p. 228–235, dez, 2017.
- KAO, C. M.; OU, W.; LIN, H.; EVA, A. W.; WANG, T.; CHEN, S. C. Toxicity of diuron in HepG2 cells and zebrafish embryos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.172, n1, p. 432–438, 2019.
- OECD, Test No. 236: **Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test**. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, n1, p.1–22, 2013.
- QIAN, L.; QI, S.; CAO, F.; ZHANG, J.; LI, C.; SONG, M.; WANG, C. Effects of penthiopyrad on the development and behaviour of zebrafish in early-life stages. **Chemosphere**, v. 214, n. 2, p. 184–194, jan, 2019.
- SANCHES, A. L. M.; VIEIRA, B. H. V.; REGHINI, M. V.; MOREIRA, R. A.; FREITAS, E. C.; ESPINDOLA, E. L. G.; DAAM, M. A. Single and mixture toxicity of abamectin and difenoconazole to adult zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v.188, p. 582–587, 2017.

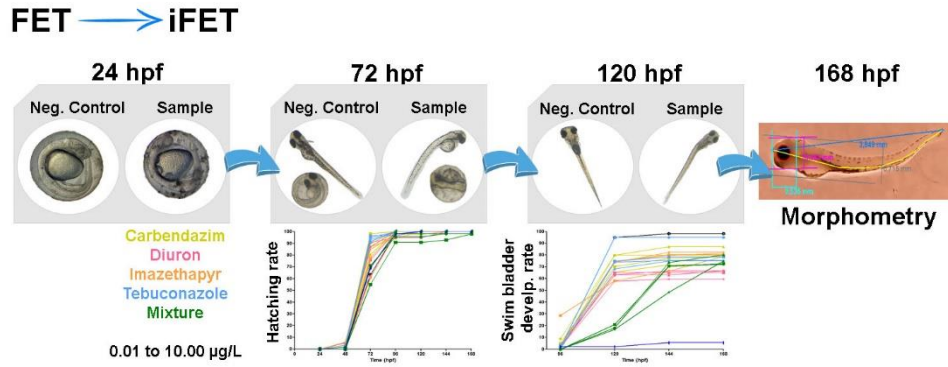
- SANCHES, A. L. M.; DAAM, M. A.; FREITAS, E. C.; GODO, A. A.; MEIRELES, G.; ALMEIDA, A. R.; DOMINGUES I. Lethal and sublethal toxicity of abamectin and difenoconazole (individually and in mixture) to early life stages of zebrafish. **Chemosphere**, v.210, p. 531–538, nov, 2018.
- SHAO, Y.; XIAO, H.; PAOLO, C. D.; DEUTSCHMANN, B.; BRACK, W.; HOLLERT, H.; SEILER, T. B. Integrated zebrafish-based tests as an investigation strategy for water quality assessment. **Water Research**, p. 252–260, 2019.
- SILVA, J.; DOS S.; ROCHA, I. K. B. S.; FREITAS, L. C.; PEREIRA, N. J.; CARVALHO, R. N. F. Princípios bioéticos aplicados aos estudos ecotoxicológicos aquáticos. **Revista Bioética**, v.23, n. 2, p.409–418, ago, 2015.
- SPOSITO, J. C. V.; MONTAGNER, C. C.; CASADO, M.; NAVARRO-MARTÍN, L.; JUT SOLÓRZANO, J. C.; PIÑA, B.; GRISOLIA, A. B. Emerging contaminants in Brazilian rivers: Occurrence and effects on gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Chemosphere**, v.209, n.3, p. 696–704, out, 2018.
- STELZER, J. A. A.; ROSIN, C. K.; BAUER, L. H.; HARTMANN, M.; PULGATI, F. H.; ARENZON, A. Is fish embryo test (FET) according to OECD 236 sensible enough for delivering quality data for effluent risk assessment? **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.37, n.11, p.2925–2932, 2018.
- VIEIRA, D. C.; NOLDIN, J. A.; DESCHAMPS, F. C.; RESGALLA Jr. C. Ecological risk analysis of pesticides used on irrigated rice crops in southern Brazil. **Chemosphere**, v.162, p. 48–54, 2016.
- WIGH, A.; AÏT-AÏSSA, S.; CREUSOT, N.; TERRISSE, H.; DELIGNETTE-MULLER, M.L.; BERGÉ, A.; VULLIET, E.; DOMENJOUR, B.; GONZALEZ-OSPINA, A.; BROSELIN, V.; DEVAUX, A.; BONY, S. Assessment of Ozone or Not-Treated Wastewater Ecotoxicity Using Mechanism-Based and Zebrafish Embryo Bioassays. **Journal of Environmental Protection**, v.9, n. 4, p. 325–346, 2018.
- ZHOU, S.; WEI, Z.; CHU, T.; YU, H.; LI, H.; ZHANG, W.; GUI, W. Transcriptomic analysis of zebrafish (*Danio rerio*) embryos to assess integrated biotoxicity of Xitiaoxi River waters. **Environmental Pollution**, v.242, p. 42–53, 2018.
- ZHU, F.; WIGH, A.; FRIEDRICH, T.; DEVAUX, A.; BONY, S.; NUGEGODA, D.; KASLIN, J.; WLODKOWIC, D. Automated Lab-on-a-Chip Technology for Fish Embryo Toxicity Tests Performed under Continuous Microperfusion ( $\mu$ FET). **Environmental Science & Technology**, v.49, n. 24, p. 14570–14578, 2015.

# **Capítulo V- Effects of residue levels of herbicides and fungicides on the early development of Zebrafish (*Danio rerio*)<sup>2</sup>**

---

<sup>2</sup> Artigo formatado conforme as normas do periódico Chemosphere

### Graphical Abstract (GA)



## Abstract

Brazil is currently the world's largest consumer of pesticides and many studies have already proven the harmful effects of these xenobiotics in aquatic environments, such as carbendazim, diuron, imazethapyr and tebuconazole. The objective of this paper was to analyze the toxic effects of these herbicides and fungicides, as well their association in concentrations of environmental relevance (0.01 to 10.00  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) throughout the Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test using embryos of *Danio rerio*. The tests were performed in accordance with the OECD 236 guideline. However, in order to increase the sensitivity, the exposition time was extended to 168 hours. Lethal and sub-lethal endpoints were recorded daily, and a semi-quantitative parameter was employed (iFET). After 168 hours post fertilization (hpf), the larvae were fixed in Dietrich's solution for morphometric evaluation. Even in low concentrations, the pesticides evaluated showed toxic effects, although, a dose-response was not clearly established. The results showed that despite the larvae survival rate was above 70%, there was a significative incidence of early hatching after the exposition to isolated pesticides, and inhibition of the swim bladder development, especially in treatments with diuron and mixture. Regarding the morphometric measurements, the head and eye size reduction were more prominent than the body length and tortuosity. All the parameter assesses presented more abnormalities when the larvae were exposed to diuron. The findings suggest that even in residue levels different pesticides affect the development of Zebrafish, probably due to the metabolism alteration, which encourages further investigations.

**Keywords:** zebrafish, FET, morphology, pesticides, diuron

## 1. Introduction

World agriculture is known for the intense use of pesticides. Although the definition of pesticides as chemical compounds used to kill pests (WHO), a large number of pesticides might not have a high specificity action, affecting also non-target insects, plants, animals and humans. The continuous directly and indirectly exposure to several compounds can be correlated to the increasing incidence and the possible cause of dysfunctions on the immunological, endocrine, reproductive and respiratory system, among others health problems in humans (Ilboudo et al., 2014; Jiang et al., 2018; Li et al., 2018; Pedlowski et al., 2012; Silvério et al., 2017).

Since 2008 Brazil has been the leader of the agrochemical consumption and due to the intensive use of these compounds, the agricultural developing has been raising (Guida et al., 2018). The pesticides are divided mainly into herbicides, fungicides and insecticides, and according to a survey, Brazil has been using insecticides excessively, while other countries are decreasing the use progressively (dos Santos et al., 2018). Nowadays, many compounds allowed for use in Brazil are already banned from European Union and United States, for example, which shows the need for constant updating in the national restrictions regarding the pesticides use (Guida et al., 2018; Starling et al., 2018).

It is widely known that pesticides can be found in air, soil, surface and ground water, as many other compounds disposed on the environment, which affects the health of living organism by different mechanism of actions causing many adverse effects. The long-term exposures not always present clinical manifestation. However the chronic exposure might be irreversible (Ilboudo et al., 2014; Pedlowski et al., 2012; Silvério et al., 2017; Sposito et al., 2018).

Among the available models to perform water quality assessment, Zebrafish (*Danio rerio*) is been widely used since it is susceptible to intoxication by toxic agents, has a small size, easy cultivation, rapid development and transparent embryo (Altenhofen et al., 2017; Shao et al., 2019). Another advantage of this model is its great homology to the human genome (Dai et al., 2014; Lieschke and Currie, 2007).

In previous studies conducted in an agricultural region, was observed a considerable environmental contamination by several pesticides, among them diuron, carbendazim, imazethapyr and tebuconazole in surface waters (Almeida et al., 2019). In order to evaluate the toxic effects of these compounds, the present study aimed to evaluate the toxic effects of the individual compounds and mixtures in the environmentally relevant concentrations through Fish Embryo Toxicity test using Zebrafish model.

## **2. Material and Methods**

### *2.1 Chemical and reagents*

Reconstituted water containing 2.0 mmol L<sup>-1</sup> Ca<sup>2+</sup>, 0.5 mmol L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup>, 0.75 mmol L<sup>-1</sup> Na<sup>+</sup>, and 0.074 mmol L<sup>-1</sup> K<sup>+</sup> was prepared in the laboratory according to ISO-7346-3 (ISO, 1996) and it was used as negative control and diluent.

Carbendazim, diuron, imazethapyr and tebuconazole (purity between 96.5 and 99.9 %) were purchased from Sigma Aldrich (Madrid, Spain). An individual stock solution of 100.00 µg L<sup>-1</sup> was prepared in reconstituted water. Then, individual test solutions were diluted at the following concentrations: 0.01, 0.10, 1.00 and 10.00 µg L<sup>-1</sup>. A mixture of those compounds was also performed at the same concentrations.

A positive control of 3,4-dichloroaniline was prepared at a fixed concentration of 4.00 mg L<sup>-1</sup> in reconstituted water.

## 2.2 *Danio rerio* cultivation and embryo exposure

Animal handling and embryo exposures were performed at Animal Ecophysiology Laboratory of the Londrina State University, UEL) in accordance with the Ethics Committee for Animal Experiments (CEUA/UEL) under approved protocol number 22196.2017.12.

Bioassays were performed according to the OECD 236 guidelines for Fish Embryo Acute Toxicity Test (FET) (OECD, 2013). Adult animals were kept in 18 L aquarium with water circulating system at  $26 \pm 1.0$  °C with 14.0 h light and 10.0 h dark cycle. Each aquarium contained 10 mates of *D. rerio*, which were fed twice a day with dry fish food containing 40% total protein. The night before the reproduction, a collector was installed in the bottom of the aquarium to protect the eggs from predation by adult fish and allow their easy obtaining after the fertilization. The fish were kept in darkness until early morning when the laboratory lights were turned on in order to stimulate mating behavior. After one hour of natural mating, the fertilized eggs were collected, rinsed in reconstituted water and pre-exposed to solutions in Petri dishes (n=40 embryos) in order to check the viability by direct observation in a stereomicroscope at 40x magnification (DMI Motic SMZ-140). The selected embryos were exposed to each test solution individually in 24 well plate (2 mL of test solution per well), being 20 embryos exposed to test solutions and 4 to negative internal control. The plates were kept at B.O.D. incubator  $26.0 \pm 1.0$  °C and the solution test was renewed after 72 h. Experiments were repeated three times independently.

### 2.3 Lethal and sub-lethal observations (FET and iFET)

The embryos were observed under a stereomicroscope (DMI Motic SMZ-140) and inverted microscope (Olympus CKX41SF, Kyoto, Japan) every 24 hours until 168 h post-fertilization (hpf) for lethal and sub-lethal abnormalities in order to evaluate the Fish Embryo Toxicity test (FET). In addition, a semi-quantitative method (iFET score) was evaluated, in order to consider the sub-lethal parameters not covered by the OECD 236/2013. (OECD, 2013; Wigh et al., 2018; Zhu et al., 2015)

Coagulation of fertilized eggs, lack of somite formation, lack of detachment of the tail-bud from the yolk sac, lack of heartbeat and incomplete development or absence of swim bladder were considered as lethal endpoint. The mainly sub-lethal parameters observed were edemas, lack of pigmentation and heartbeat, defect in blood circulation, abnormal development of eye, head and tail, yolk sac abnormalities and development delay.

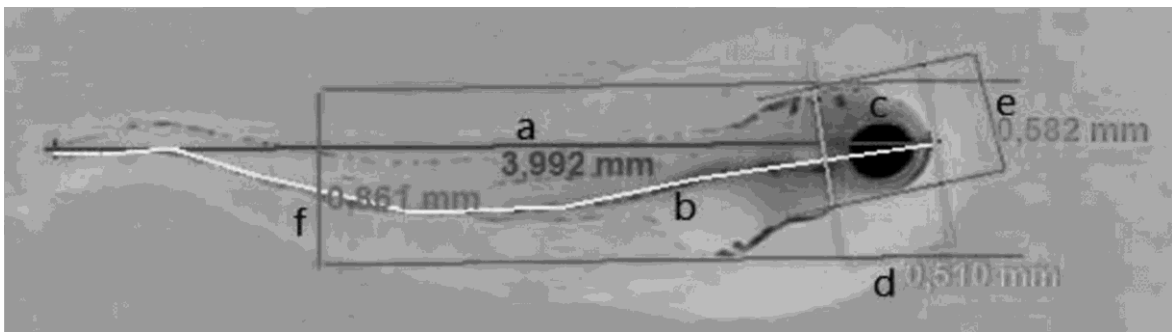
Scores of 0 and 1 were attributed to each embryo with at least one lethal or sub-lethal endpoints. At the presence of a lethal endpoint, no sub-lethal endpoint was recorded. Then, for each plate sub-lethal toxicity index (iFET) was calculated according to the Equation 1.

$$iFET = \frac{(n \times N_D) + N_{SL}}{n \times N} \times 100\% \text{ (Eq. 1)}$$

Where: n= number of parameters assessed, N=total number of embryos, N<sub>D</sub>= total number of lethal parameters observed (dead embryos) and N<sub>SL</sub>= total number of sub-lethal parameters observed. This formula was adapted from Zhu et al. (2015) in order to attend the sub-lethal parameters observed during the periods of 96 and 168 hpf.

## 2.4 Morphometric analysis

After 168 hpf the alive larvae were euthanized and fixed using Dietrich solution for 1 hour. Photographs of each larvae in lateral decubitus were taken under a digital microscope (ElectronicMagnifier<sup>®</sup>). Using the software Measurements<sup>®</sup> the potential teratogenicity was evaluated by the measurement of straight (a) and curved (b) body length (mm), eye area (mm<sup>2</sup>), head length (mm) (d), head (e) and body (f) height (mm) (Figure 1).



**Figure 1.** Morphometric parameters assessed at a 168 hours post-fertilization larvae

A relation between the head and body length, head height and head length, and tortuosity (relation between the total distance, following the curvature of the body, and the distance from the rostral region to the tip of the tail) were also calculated.

## 2.5 Statistical Analysis

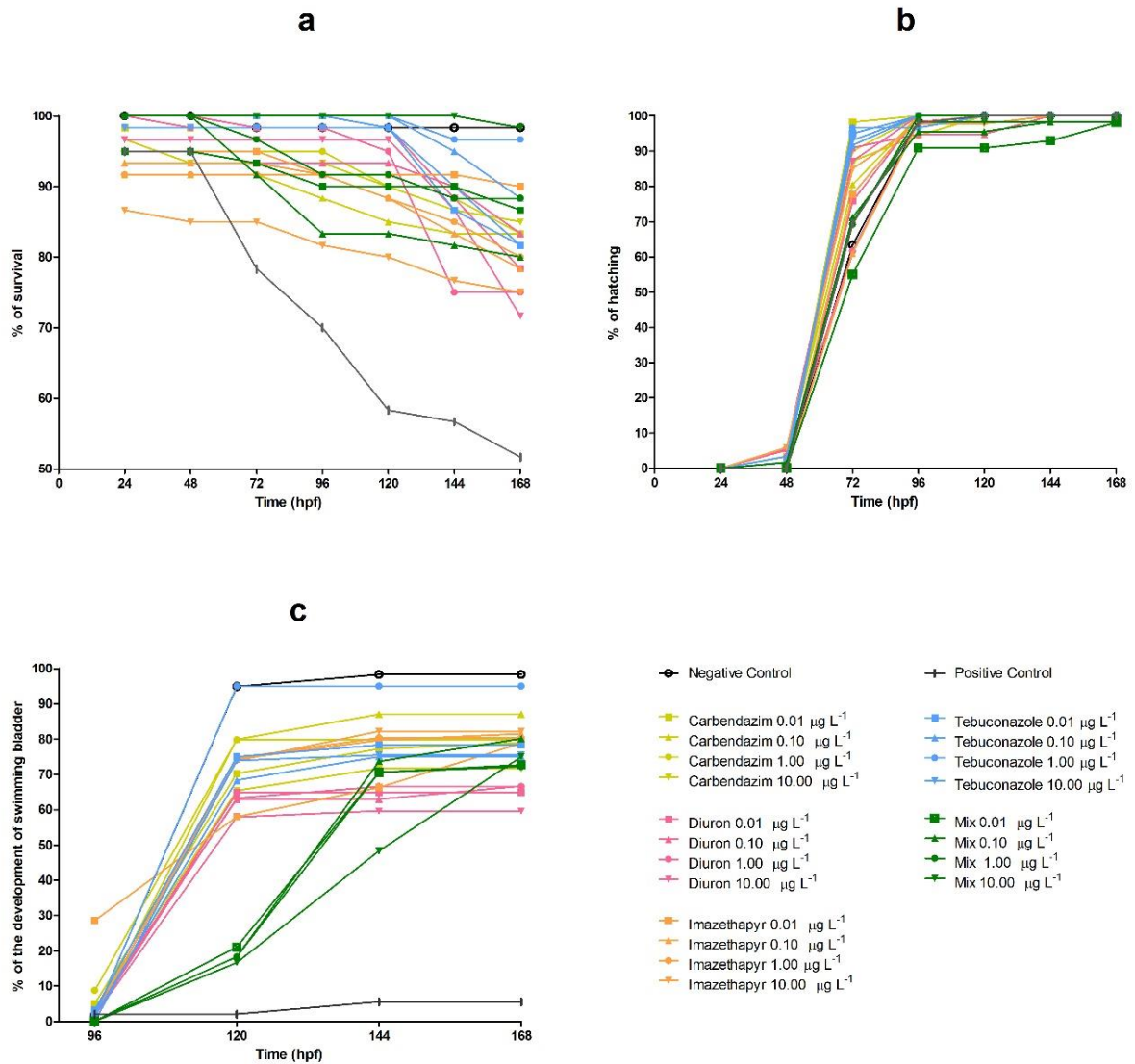
Results obtained from the FET, iFET and morphological analysis are expressed as the Mean  $\pm$  S.E.M. Data analysis and presentation were performed using GraphPad Prism 5.0 (La Jolla, CA, USA, 2008) software. One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey was used to test differences in the treatments. In case of non-normality, non-parametric

Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's post-hoc test was applied. Levels of significance were:  $p < 0.05$  (significant),  $p < 0.01$  (very significant) and  $p < 0.001$  (highly significant).

### 3. Results

#### *3.1 Survival rate of zebrafish after pesticides exposure*

The survival rate was observed for 168 hpf, and recorded at the indicated time point (Figure 2a). The survival rates expected for negative (>90%) and positive control (<70%) after 96 hpf were in accordance to the FET protocol. For all the test solutions, except by imazethapyr 10.00  $\mu\text{g L}^{-1}$  the survival rate was above 90% until 48 hpf. At 120 hpf is possible to observe a significant decline for diuron and imazethapyr, but among the compounds under study, diuron presented the lowest survival rate with a decrease of ~20% until 168 hpf. A concentration-decrease relationship was not observed in the zebrafish survival.



**Figure 2.** a) Survival, b) Hatching, c) Swim bladder development rate in Zefrafish after pesticides exposure

### 3.2 Hatching rate

Hatching rate (Figure 2b) in the control was successfully accomplished for the test criteria (OECD 236), reaching 98.33 %  $\pm$  2.83 (n=3) at 96 hpf. For the present experimental conditions, it was observed that the control group started to hatch at 72 hpf in all replicates. However, the groups exposed to carbendazim (0.01, 0.01, 1.00 and 10.00  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) and diuron

(0.01, 1.00 and 10.00  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) started to hatch earlier, at 48 hpf. The same was observed for imazethapyr and tebuconazole in high concentrations, but the exposure to the association of pesticides did not affect the hatch rate. For the period of 72 hpf the hatching rate vary from ~98% for carbendazim 0.01  $\mu\text{g L}^{-1}$  to 55.07% to mix 0.01  $\mu\text{g L}^{-1}$  while the negative control presented a rate of ~63%, showing that the exposition to the pesticides may cause and acceleration to the hatching. Only the lowest concentration of diuron, imazethapyr and the mixture (0.01  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) showed rates below the negative control. It was also observed eggs being hatched at 120 and 144 hpf.

### *3.3 Development of swim bladder*

For early stage development, is described that the posterior swim bladder start to be developed during embryogenesis and its inflation occurs after 120 hpf (Godfrey et al., 2017; Yue et al., 2015). However, it was observed that some larvae already had the swim bladder completely formed and inflated at 96 hpf (Figure 2c). For this reason, this parameter started to be evaluated from 96 hpf in this study. The observed rate was below 10%, expect by imazethapyr 0.01  $\mu\text{g L}^{-1}$ , which the incidence of swim bladder was ~30%. The association of pesticides in all concentrations showed a development delay of the swim bladder. Its incidence reached only 21 % at 120 hpf, while for the individual compounds, the rate ranged from 58 to 95% for the same period.

Diuron presented the lowest rate of swim bladder incidence (~66-59%) followed by the mixture of compounds (above 70%). The lack of dose-response relationship was also observed, although the highest concentrations indicates to cause more abnormalities.

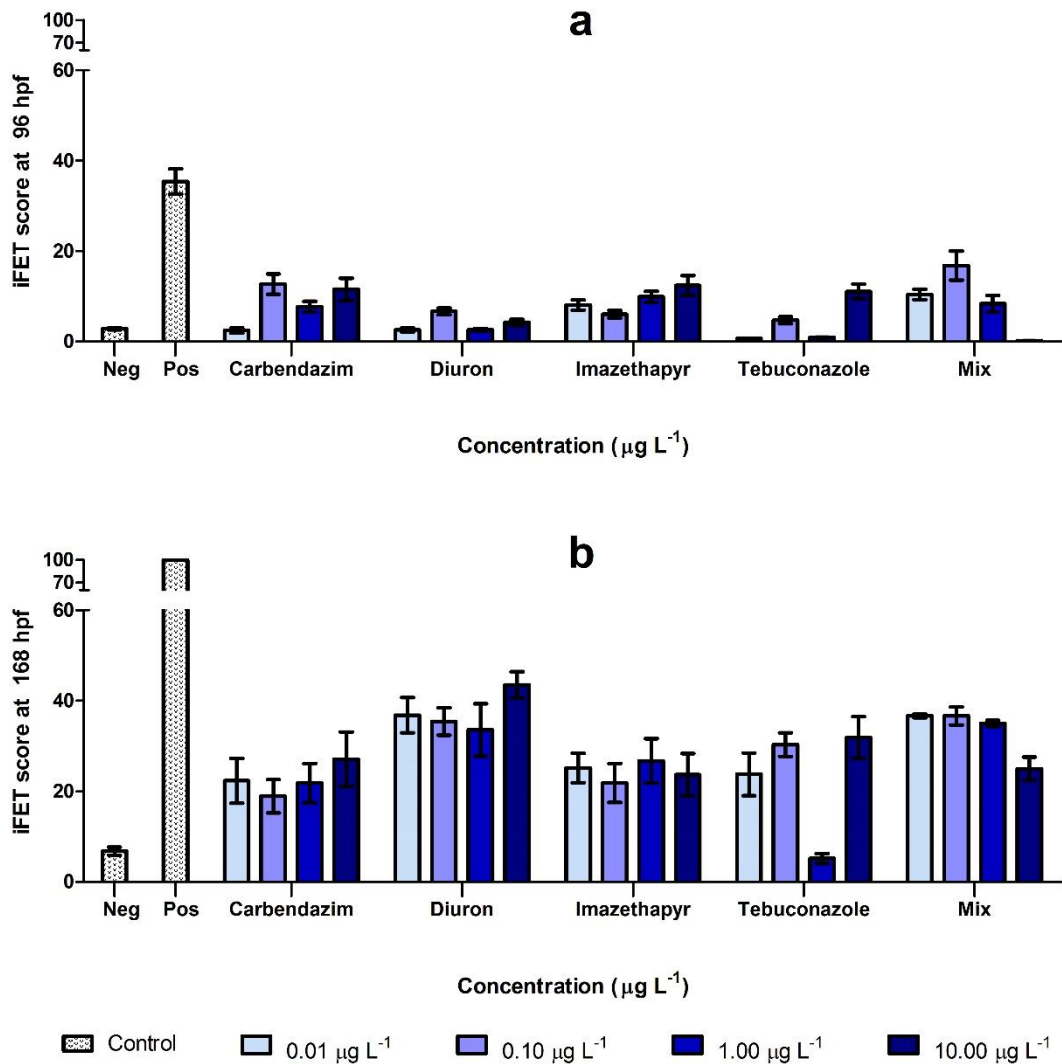
### 3.4 Lethal and sub-lethal observations (FET and iFET)

The OECD protocol recommends to expose the fertilized eggs for a period of 96 hours to the substances of interesting. However, considering the hatching rate (Figure 2b) the exposure time of the larvae to the pesticides would be very short, 24 hours or less. The exposition time extended to 168 hpf allowed the observation of parameters that were important to differentiate the toxic effects caused by the pesticides.

The pesticides exposures in individually or in association presented a series of abnormalities during the development stages of the zebrafish embryo and larvae. There were observed lack of pigmentation, deformations in the yolk sac and tail, sac and pericardial edema, abnormal accumulation of red blood cells, and absence of swim bladder. It was observed the absence of the eye as well (*data not shown*).

For semi-quantitative purpose, the score 1 was designated to the presence of at least one lethal and sub-lethal parameter per embryo/larvae and the summary obtained for the 20 embryo/larvae was used to calculate the iFET score accordingly to the Equation 1. The iFET was calculated for 96 and 168 hpf, aiming to compare the sensitivity of the extended test (Figure 3).

Negative control presented iFET score of 2.82 for 96 hpf and 6.89 for 168 hpf. As mentioned previously, a dose-response was not clearly established. However, accordingly, to the graph, for the period of 96 hpf Carbendazim and imazethapyr showed to be more toxic than the other compounds. The mixture of compounds with concentrations of 0.01 and 0.10  $\mu\text{g L}^{-1}$  indicate more toxic effects than the individual pesticides, however, for the concentrations of 1.00 and 10.00  $\mu\text{g L}^{-1}$  the iFET score decreased significantly, indicating lower toxicity (Figure 3a).



**Figure 3.** iFET scores at a) 96 and b) 168 hours post fertilization

As expected, the sensibility of the FET test increased due to the extension of the exposition time to 168 hpf. More toxic effects were reported, as well as scores above 40 (Figure 3 b). Among the four compounds evaluated, diuron presented more abnormalities than the other pesticides under study. The iFET scores obtained for the tested concentrations of diuron presented low variation among them, nevertheless, the minimum score obtained (~33,

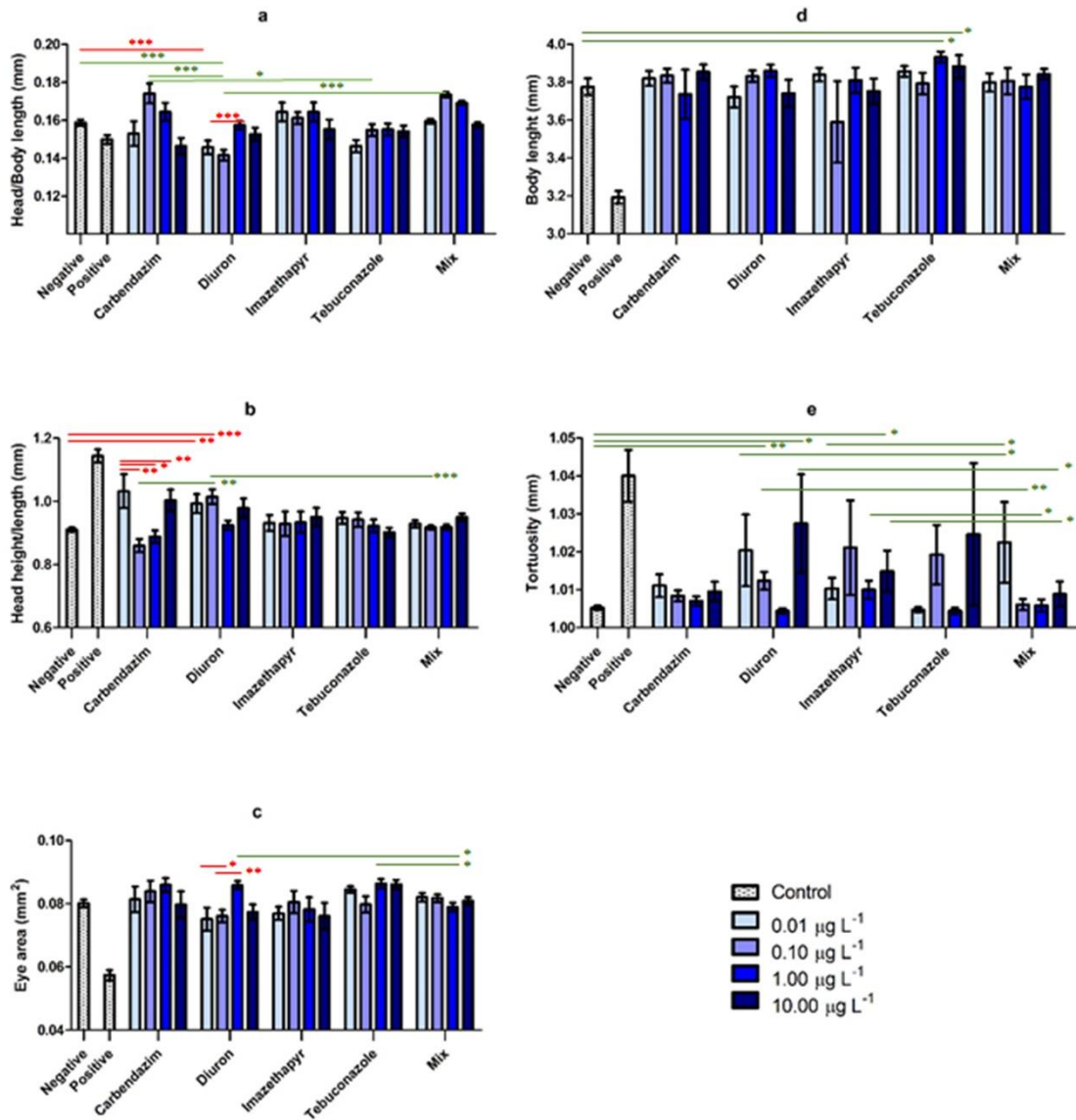
1.00  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) was higher than all others, considering only the individual pesticides. The mixture of pesticides showed similar results of diuron, except for the 10.00  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Although the test was conducted in the same way and in accordance with the OECD protocol during the three independent replicas, the standard deviation obtained was large. Due to this variation, no significant difference was observed among the groups ( $p=0.638$  and  $p=0.352$  for 96 and 168 hpf respectively), even comparing the control group and the embryos exposed to the compounds at 168 hpf, which presented differences that could be visually observed.

### *3.5 Morphometric analysis*

The relation of head/body length, head height/length, eye area, body length and tortuosity (Figure 4) verified the discreet morphological effects caused by the pesticides exposure on the zebrafish larvae in environmental concentrations.

The results indicate an absence of a monotonic response, although it is possible to observe trends of reduction in the ratio of head/body length for diuron and tebuconazole (Figure 4a); increase in the metrics obtained for the head height/length ratio after diuron exposition (Figure 4b); eye area reduction for embryos exposed to diuron (Figure 4 c); increase of the body length to those exposed to tebuconazole (Figure 4 d), and slight changes in tortuosity in high concentrations of diuron and tebuconazole (Figure 4 e), for example.



**Figure 4.** Morphometric parameters evaluated after 168 hpf of exposure to pesticides: a) head/body length, b) head height/length ratio, c) eye area, d) body length and e) tortuosity

Green lines are for comparison between same concentration

Red lines are for comparison between same compounds

\*p < 0.05 (significant), \*\*p < 0.01 (very significant) and \*\*\*p < 0.001 (highly significant).

The relation head height/length (Figure 4b) presented more variability between the pesticides carbendazim and diuron at 0.01 and 0.10  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Imazethapyr did not promote

noteworthy morphometric alterations, but a trend of brachycephaly was observed at the highest concentrations.

The mean of the body length (Figure 4 d) from all the groups exposed remained similar to the negative control, but a slight tendency for increased length was observed for exposed embryos to carbendazim and tebuconazole. However, only the concentration of 1.00 and 10.00  $\mu\text{g L}^{-1}$  presented significant difference ( $p < 0.05$ ). Tortuosity (Figure 4e) showed slight deviations on the spine curvature, although during the FET test vertebral spine defects were observed in larvae exposed to carbendazim and tebuconazole, mainly. Comparing the tested pesticides and mixture, diuron and imazethapyr were the only compounds considered different from the mixture.

#### 4. Discussion

Fertilized eggs of zebrafish were exposed to environmental concentration of two classes of pesticides commonly found in Brazilian rivers, being them carbendazim, diuron, imazethapyr and tebuconazole, as well their combination. Based on a data of previous studied and the literature, the concentration range evaluated were from 0.01 to 10.00  $\mu\text{g L}^{-1}$  (Mansano et al., 2016; Silva et al., 2009; Sposito et al., 2018; Starling et al., 2018; Almeida et al., 2019). Those concentrations could be considered relevant to human exposure.

During the development of the embryos and larvae, the occurrence of toxic effects caused by those agents was noticed even in low concentrations. Sposito et al. (2018) during gene expression analysis did not observe teratogenic effects on embryos when diuron, among other pesticides, was tested in concentrations found in rivers (0.01  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Thus, to reach measurable toxic effects the pesticides concentration were increased by the authors. In the present paper, the proposed concentration range was maintained even though a dose-response was not observed during the tests. The choice of pesticides concentration were of environmental relevance in an attempt to demonstrate the effects of these contaminants as a real water quality assessment.

At the concentration range of 0.01 to 10.00  $\mu\text{g L}^{-1}$  was not expect a great sensitivity regarding the mortality, since most studies in the literature evaluate the mortality caused by the same compounds in a concentration higher than 1  $\text{mg L}^{-1}$  (Andrade et al., 2016; Velki et al., 2017). At the end of 168 hpf the survival rate was above 70% (Figure 2a) with a tendency of higher lethality to the larvae exposed to diuron and imazethapyr. When the data was compared to the negative control, there was no statistical difference ( $p < 0.05$ ) between them, except by the mixture of pesticides in all concentrations at 24 and 48 hpf (data not shown). After this period any difference was observed probably due to the high standard deviation

obtained during the replicas. This lack of significant difference was also observed in different studies using Zebrafish model, however, is important to highlight that this variation did not compromise the results (Batel et al., 2018).

Another important endpoint evaluated during the development of Zebrafish was the hatching rate of embryos, since it might reflect directly the toxic effects caused by different compounds (Cao et al., 2016; Ren et al., 2018). Usually, the hatch starts at 72 hpf, however, at 48 hpf was observed that carbendazim, diuron, imazethapyr, and tebuconazole stimulated the hatching (Figure 2b). This fact was more clearly observed at 72 hpf where most of the compounds presented a hatching rate above 70%. Although was not observed statistical difference ( $p < 0.05$ ) this rate was higher than the negative control (~63%), once the OECD 236 recommends that the negative control should present a hatching rate  $> 80\%$  at the end of 96 hpf. Is well known that the hatching is caused by two pathway, enzymes that digest the chorion and by the spontaneous movement of the embryo. An unbalance caused in one of those pathways can result in the acceleration or the decrease of the hatching (Cao et al., 2016). Although the early hatching was standout, retardation was also observed, mainly for the diuron ( $0.10 \mu\text{g L}^{-1}$ ), imazethapyr ( $0.01 \mu\text{g L}^{-1}$ ), and mixture ( $0.01$  and  $0.10 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Spontaneous movement was not evaluated in this work but would be an important parameter to assess in future studies in order to complete understand the effects caused by each toxic agent and their association.

Notwithstanding the teratogen effects observed on embryos (lack of pigmentation and edema) and the early hatching, the chorion can be considered as a protective barrier, which absorbs compounds, such as the pesticides (Kao et al., 2019; Stelzer et al., 2018). Originally, the FET test was performed with an exposure time of 48 h. However, since the post-hatch, the larvae were completely exposed to the contaminants and consequently, additional adverse effects were observed, when the exposition was extended to 96 hpf (Stelzer et al., 2018). But,

the short time of exposition of the larvae to the medium was considered as insufficient to improve the sensibility of the test. In this present study, we evaluate the exposition until 168 hpf. The semi-quantitative analysis (iFET score) performed allows affirming that the extension of the exposition time is crucial to verify and reveal residual toxicity (Wigh et al., 2018).

The larvae can be considered the most sensitive life stage evaluated on Zebrafish model (Stelzer et al., 2018). During the FET test, the iFET scores obtained for the negative control presented low variability between the replicas compared to the exposed larvae (Figure 3a and 3b), showing to be consistent with normal development. Regarding the exposure of the larvae to teratogenic agents for 168 h, high variability of the data between the repetitions was observed, a fact that corroborates the lack of sensitivity of the test since more time is necessary to guarantee a better understanding of the effects caused by each agent and their mixtures. However, the discrepancy among the scores obtained for 96 and 168 hpf are sufficient to prove that even though a dose-response is not clear in concentrations of environmental relevance, the toxic effects at 168 hpf tended to increase in proportion to the increase in concentration (Figure 3b).

Another interesting fact is at 96 hpf the toxicity pointed by the scores among the compounds are different from those indicated at 168 hpf. Diuron was visually less toxic than imazethapyr at 96 hpf, e.g., however, at 168 hpf, it showed to be the most toxic pesticide evaluated. The mixture of those four pesticides was expected to present higher toxicity than all the individual compounds, however, was observed that the individual compounds cannot predict the effect of the mixture.

Each compound has a particular mode of action and, in an association, they can act in synergism (Ilboudo et al., 2014), however, the mechanism of action usually are described by biochemical markers, not evaluated in this work. Due the high variability obtained during the

replicas of FET no difference was observed for iFET scores ( $p < 0.05$ ), however, as mentioned previously, the mixture group was the only group statically different from control regarding the survival and hatching rate ( $p < 0.05$ ). This behavior indicates that the mixture of pesticides induces a disturbance in the development of the Zebrafish with data more consistent than the individual compounds.

Another discrepant behavior of the Mixture in relation to the individual compounds was clearly observed during the evaluation of the development of swim bladder (Figure 2c). Comparing to the negative control is possible to observe a decrease in the incidence of swim bladder development due to the exposition to the pesticides at 120 hpf. Although the effect of the mixture on the initial development stand out, in the course of the last 48 hours evaluated was observed a progression, with an incidence higher than diuron, e. g. which maintained the initial rate constant (~60%).

The absence or the incomplete insufflation of the swim bladder was associated to the incidence of death of the zebrafish larvae as well. Thus, this parameter was considered as lethal if absence and sub-lethal if the not completely inflated until 168 hpf. The larvae that did not develop the swim bladder during the expected period (120-168 hpf) did not present balance, showing a preference for the bottom of the plate, even when stimulated to swim. They also presented a curvature of the spine at rest (*data not shown*). This observations are in accordance with the abnormal development of the thyroid (Dong et al., 2018; Godfrey et al., 2017). Many studies have been reporting abnormalities in the swim bladder development caused by several contaminants, and for this reason, it started to treated as an environmental risk assessment (Qian et al., 2019).

Small morphological alterations in Zebrafish larvae caused by the pesticides exposures were verified after 168 hpf. In summary, it was observed changes in the head size (Figure 4 a, b) with emphasis on diuron, which indicates a flattening of the head, an also signs of

brachycephaly for Imazethapyr in high concentrations. Diuron and tebuconazole also affected the eye area, showing a tendency of reduction for diuron and an increase for tebuconazole. Tebuconazole affected the body length increasing the size discreetly, in contrast to results described in the literature (Altenhofen et al., 2017). Considering that only live larvae were fixed for morphometric analysis, the deformities observed regarding tortuosity were not prominent and diuron, imazethapyr and tebuconazole caused slight changes (Figure 4e).

In general, herbicides are considered less toxic to aquatic organisms than other classes of pesticides (Velki et al., 2017). But among the four pesticides evaluated in this work, is possible to affirm that Diuron can be considered the most toxic compound to the tested model, and also the most widely studied (Behrens et al., 2016; EPA, 2019; Howe et al., 2017; Kao et al., 2019; Sposito et al., 2018; Velki et al., 2017). Imazethapyr, on the other hand, presents a lack of data in the literature, being only described during a ToxCast assay (Padilla et al., 2012), and in this present study. The fungicides carbendazim and tebuconazole, despite to be less toxic of diuron, also presented teratogenic effects. In the literature, fungicides are described as toxic to fish and mammals affecting the metabolisms, and consequently causing malformations as the observed during the FET, but especially after long expositions, which would also affect the reproductive system (Altenhofen et al., 2017; Andrade et al., 2016; Li et al., 2018). As well, the combination of all these effects still need to be better understand in the mixture, since the results were unclear. The complexity of mixtures of different classes and mechanism of actions such as the observed in real samples is a challenge.

The Zebrafish model has been extensively used to assess the toxicity of many compounds over years. However, the discrepancy of concentration used and target endpoints in each work makes difficult the comparison of data, especially when the main goal is to attend residues levels on the environment. Our findings suggest that even in low

concentrations the pesticides evaluated shows toxic effects, only reported in the literature in higher concentrations. Although in the present work biochemical analysis was not performed, the data obtained indicate metabolic alterations, which encourage further assessment in future studies.

## 5. Conclusion

The pesticides evaluated in this work are commonly found in the environment, mainly rivers, in residue levels, and is crucial to assess toxic effects in concentrations that present in the environment. Our findings suggest that even in low concentrations all the pesticides contribute to malformation on Zebrafish, affecting also the hatching rate and the development of swim bladder, an important parameter that is considered an environmental risk assessment factor. Among them, Diuron presented higher toxicity, with considerable effects in all the parameter analyzed. The mixture of compounds still need to be better understand, as well the metabolic alterations involved in the process.

## 6. Acknowledgment

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001 for doctoral fellowships in Chemistry-UEL. We would like to thank also CAPES (Project n. 88881.068504/2014-01, PROCAD/2013, Edital 071/2013, Process n. 3007/2014) for financial support providing the chromatographic column and (Project n. AUX-PE-NANOBIOTEC-710/2009 - Process Nanobio 23/2008 n.23038.019085/2009-14) for the LC-MS/MS. Our gratitude also to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- Brazil (CNPq) by the fellowships - Bolsa Produtividade DT-2 Química (Processo no. 309762/2017) and PIBIC.

## 7. References

- Almeida, M. B., Madeira, T. B., Watanabe, L. S., Meletti, P. C., Nixdorf, S. L., 2019 Pesticide Determination in Water Samples from a Rural Area by Multi-Target Method Applying Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society in press*. <http://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20190066>
- Altenhofen, S., Nabinger, D.D., Wiprich, M.T., Pereira, T.C.B., Bogo, M.R., Bonan, C.D., 2017. Tebuconazole alters morphological, behavioral and neurochemical parameters in larvae and adult zebrafish (*Danio rerio*). *Chemosphere* 180, 483–490. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.029>
- Andrade, T.S., Henriques, J.F., Almeida, A.R., Machado, A.L., Koba, O., Giang, P.T., Soares, A.M.V.M., Domingues, I., 2016. Carbendazim exposure induces developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos. *Aquat. Toxicol.* 170, 390–399. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.11.017>
- Batel, A., Borchert, F., Reinwald, H., Erdinger, L., Braunbeck, T., 2018. Microplastic accumulation patterns and transfer of benzo[a]pyrene to adult zebrafish (*Danio rerio*) gills and zebrafish embryos. *Environ. Pollut.* 235, 918–930. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.028>
- Behrens, D., Rouxel, J., Burgeot, T., Akcha, F., 2016. Comparative embryotoxicity and genotoxicity of the herbicide diuron and its metabolites in early life stages of *Crassostrea gigas*: Implication of reactive oxygen species production. *Aquat. Toxicol.* 175, 249–259. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.04.003>
- Cao, F., Liu, X., Wang, C., Zheng, M., Li, X., Qiu, L., 2016. Acute and short-term developmental toxicity of cyhalofop-butyl to zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 10080–10089. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6236-x>
- Dai, Y.-J., Jia, Y.-F., Chen, N., Bian, W.-P., Li, Q.-K., Ma, Y.-B., Chen, Y.-L., Pei, D.-S., 2014. Zebrafish as a model system to study toxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 11–17. <https://doi.org/10.1002/etc.2406>
- Dong, X., Xu, H., Wu, X., Yang, L., 2018. Multiple bioanalytical method to reveal developmental biological responses in zebrafish embryos exposed to triclocarban. *Chemosphere* 193, 251–258. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.033>
- dos Santos, C.F., Otesbelgue, A., Blochtein, B., 2018. The dilemma of agricultural pollination in Brazil: Beekeeping growth and insecticide use. *PLoS One* 13, e0200286. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200286>
- EPA, 2019. ECOTOX Knowledgebase [WWW Document]. URL <https://cfpub.epa.gov/ecotox/>

- Godfrey, A., Hooser, B., Abdelmoneim, A., Horzmann, K.A., Freeman, J.L., Sepúlveda, M.S., 2017. Thyroid disrupting effects of halogenated and next generation chemicals on the swim bladder development of zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 193, 228–235. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.10.024>
- Guida, Y. de S., Meire, R.O., Torres, J.P.M., Malm, O., 2018. Air contamination by legacy and current-use pesticides in Brazilian mountains: An overview of national regulations by monitoring pollutant presence in pristine areas. *Environ. Pollut.* 242, 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.061>
- Howe, P.L., Reichelt-Brushett, A.J., Clark, M.W., Seery, C.R., 2017. Toxicity estimates for diuron and atrazine for the tropical marine cnidarian *Exaiptasia pallida* and in- hospite *Symbiodinium* spp. using PAM chlorophyll- a fluorometry. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 171, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.05.006>
- Ilboudo, S., Fouche, E., Rizzati, V., Toé, A.M., Gamet-Payraastre, L., Guissou, P.I., 2014. In vitro impact of five pesticides alone or in combination on human intestinal cell line Caco-2. *Toxicol. Reports* 1, 474–489. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2014.07.008>
- Jiang, J., Shi, Y., Yu, R., Chen, L., Zhao, X., 2018. Biological response of zebrafish after short-term exposure to azoxystrobin. *Chemosphere* 202, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.055>
- Kao, C.M., Ou, W., Lin, H., Eva, A.W., Wang, T., Chen, S.C., 2019. Toxicity of diuron in HepG2 cells and zebrafish embryos. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 172, 432–438. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.01.036>
- Li, H., Yu, S., Cao, F., Wang, C., Zheng, M., Li, X., Qiu, L., 2018. Developmental toxicity and potential mechanisms of pyraoxystrobin to zebrafish ( *Danio rerio* ). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 151, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.12.061>
- Lieschke, G.J., Currie, P.D., 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.* 8, 353–367. <https://doi.org/10.1038/nrg2091>
- Mansano, A.S., Moreira, R.A., Dornfeld, H.C., Diniz, L.G.R., Vieira, E.M., Daam, M.A., Rocha, O., Selegim, M.H.R., 2016. Acute and chronic toxicity of diuron and carbofuran to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 1–12. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8274-9>
- OECD, 2013. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidel. Test. Chem. Sect. 2, OECD Publ. 1–22. <https://doi.org/10.1787/9789264203709-en>
- Padilla, S., Corum, D., Padnos, B., Hunter, D.L., Beam, A., Houck, K.A., Sipes, N., Kleinstreuer, N., Knudsen, T., Dix, D.J., Reif, D.M., 2012. Zebrafish developmental screening of the ToxCast™ Phase I chemical library. *Reprod. Toxicol.* 33, 174–187. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2011.10.018>
- Pedlowski, M.A., Canela, M.C., da Costa Terra, M.A., Ramos de Faria, R.M., 2012. Modes of pesticides utilization by Brazilian smallholders and their implications for human health and the environment. *Crop Prot.* 31, 113–118. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.10.002>

- Qian, L., Qi, S., Cao, F., Zhang, J., Li, C., Song, M., Wang, C., 2019. Effects of penthiopyrad on the development and behaviour of zebrafish in early-life stages. *Chemosphere* 214, 184–194. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.117>
- Ren, X., Zhang, H., Geng, N., Xing, L., Zhao, Y., Wang, F., Chen, J., 2018. Developmental and metabolic responses of zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae to short-chain chlorinated paraffins (SCCPs) exposure. *Sci. Total Environ.* 622–623, 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.304>
- Shao, Y., Xiao, H., Di Paolo, C., Deutschmann, B., Brack, W., Hollert, H., Seiler, T.B., 2019. Integrated zebrafish-based tests as an investigation strategy for water quality assessment. *Water Res.* 252–260. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.11.039>
- Silva, D.R.O. da, Avila, L.A. de, Agostinetto, D., Dal Magro, T., Oliveira, E. de, Zanella, R., Noldin, J.A., 2009. Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil. *Ciência Rural* 39, 2383–2389. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782009000900001>
- Silvério, A.C.P., Machado, S.C., Azevedo, L., Nogueira, D.A., de Castro Graciano, M.M., Simões, J.S., Viana, A.L.M., Martins, I., 2017. Assessment of exposure to pesticides in rural workers in southern of Minas Gerais, Brazil. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 55, 99–106. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2017.08.013>
- Sposito, J.C.V., Montagner, C.C., Casado, M., Navarro-Martín, L., Jut Solórzano, J.C., Piña, B., Grisolia, A.B., 2018. Emerging contaminants in Brazilian rivers: Occurrence and effects on gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Chemosphere* 209, 696–704. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.06.046>
- Starling, M.C.V.M., Amorim, C.C., Leão, M.M.D., 2018. Occurrence, control and fate of contaminants of emerging concern in environmental compartments in Brazil. *J. Hazard. Mater.* 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.04.043>
- Stelzer, J.A.A., Rosin, C.K., Bauer, L.H., Hartmann, M., Pulgati, F.H., Arenzon, A., 2018. Is fish embryo test (FET) according to OECD 236 sensible enough for delivering quality data for effluent risk assessment? *Environ. Toxicol. Chem.* 37, 2925–2932. <https://doi.org/10.1002/etc.4215>
- Velki, M., Di Paolo, C., Nelles, J., Seiler, T.-B., Hollert, H., 2017. Diuron and diazinon alter the behavior of zebrafish embryos and larvae in the absence of acute toxicity. *Chemosphere* 180, 65–76. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.04.017>
- Wigh, A., Ait-Aïssa, S., Creusot, N., Terrisse, H., Delignette-Muller, M.-L., Bergé, A., Vulliet, E., Domenjoud, B., Gonzalez-Ospina, A., Brosselin, V., Devaux, A., Bony, S., 2018. Assessment of Ozone or Not-Treated Wastewater Ecotoxicity Using Mechanism-Based and Zebrafish Embryo Bioassays. *J. Environ. Prot. (Irvine, Calif.)* 9, 325–346. <https://doi.org/10.4236/jep.2018.94022>
- Yue, M.S., Peterson, R.E., Heideman, W., 2015. Dioxin inhibition of swim bladder development in zebrafish: Is it secondary to heart failure? *Aquat. Toxicol.* 162, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.02.016>

Zhu, F., Wigh, A., Friedrich, T., Devaux, A., Bony, S., Nugegoda, D., Kaslin, J., Wlodkovic, D., 2015. Automated Lab-on-a-Chip Technology for Fish Embryo Toxicity Tests Performed under Continuous Microperfusion ( $\mu$ FET). *Environ. Sci. Technol.* 49, 14570–14578. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03838>

## Considerações finais

A contaminação das águas da microbacia do Tibagi nos 9 pontos amostrados foi comprovada pelas análises físico-químicas e cromatográficas. A determinação multirresíduos por LC-MS/MS não direcionada constatou a presença de 26 pesticidas, indicando predomínio da atividade agrícola como fonte poluidora. No entanto, não se rejeita ainda a possibilidade de descartes de efluentes domésticos, ponderando que também foram encontrados marcadores antrópicos, como drogas farmacêuticas e cafeína.

Doze pesticidas foram quantificados, tendo sido 6 encontrados em águas de abastecimento público. Dentre esses, o diuron merece destaque pelas concentrações alarmantes que apresentou, tanto na área de preservação permanente, como em água subterrânea. Entretanto, o controle ambiental desse e de outros compostos analisados e identificados neste estudo ainda é precário, em parte pela falta de limites máximos de resíduos legislados, o que desperta a atenção sobre a importância das discussões tratando do tema.

Testes toxicológicos, empregando as amostras de águas previamente caracterizadas quimicamente, demonstraram efeitos nocivos perceptíveis dos poluentes nos embriões e larvas do Zebrafish, mesmo em baixas concentrações no ambiente. A avaliação de parâmetros sub-letais, como a taxa de eclosão, desenvolvimento da bexiga natatória e parâmetros morfométricos, auxiliaram na diferenciação da extensão do dano causado.

Dentre os 4 pesticidas selecionados para o estudo, o diuron foi considerado o mais tóxico, aumentando a preocupação relacionada à saúde dos que consomem essas águas, levando em conta a frequência com que este pesticida aparece nas amostras analisadas. Já em relação à mistura de pesticidas e amostras reais observa-se que não houve relação direta entre dose-resposta, contudo, o sinergismo dos compostos contribuiu para o desenvolvimento de anormalidades, encorajando estudos mais aprofundados utilizando misturas complexas, uma abordagem não muito discutida até o momento na literatura.

Englobando os resultados físico-químicos, químicos e toxicológicos, apesar de não ter sido possível estabelecer um padrão definitivo, traçando um perfil de poluição para todas as amostras, o estudo constitui um marco inicial, já que mapeia marcadores característicos à serem monitorados em determinados pontos amostrais, e indica sazonalidade, diferenciada na coleta de dezembro.

Desta forma, a utilização de técnicas analíticas adequadas, desde o preparo de amostra até a análise e processamento de dados, visa colaborar com o estudo de amostras reais em concentrações ambientalmente relevantes, almejando contribuir através de subsídios científicos para um controle mais efetivo da poluição ambiental.

**ANEXOS**

## Anexo A – Padrões de Qualidade de Água para Classe I e II/Água Doce

**Tabela A1.** Parâmetros orgânicos e seus valores máximos permitidos para Água doces de classe 1 e 2 de acordo com a resolução CONAMA 357/2005

(continua)

Composto	Valor máximo permitido	
	$\mu\text{g L}^{-1}$	$\text{mg L}^{-1}$
Acrilamida	0,5	
Alacloro	20	
Aldrin + Dieldrin	0,005	
Atrazina	2	
Benzeno		0,005
Benzidina	0,001	
Benzo(a)antraceno	0,05	
Benzo(a)pireno	0,05	
Benzo(b)fluoranteno	0,05	
Benzo(k)fluoranteno	0,05	
Carbaril	0,02	
Clordano (cis + trans)	0,04	
2-Clorofenol	0,1	
Criseno	0,05	
2,4-D	4	
Demeton (Demeton-O + Demeton-S)	0,1	
Dibenzo(a,h)antraceno	0,05	
1,2-Dicloroetano		0,01
1,1-Dicloroetano		0,003
1,1-Dicloroetano		0,003
2,4-Diclorofenol	0,3	
Diclorometano		0,02
DDT (p,p'-DDT + p,p'-DDE + p,p'-DDD)	0,002	
Dodecacloro pentaciclodecano	0,001	
Endossulfan (a + b + sulfato)	0,056	
Endrin	0,004	
Estireno		0,02
Etilbenzeno	90	
Fenóis totais (substâncias que reagem com 4-aminoantipirina)		0,003
Glifosato	65	
Gution	0,005	
Heptacloro epóxido + Heptacloro	0,01	
Hexaclorobenzeno	0,0065	

**Tabela A1.** Parâmetros orgânicos e seus valores máximos permitidos para Água doces de classe 1 e 2 de acordo com a resolução CONAMA 357/2005

(conclusão)

Composto	Valor máximo permitido	
	$\mu\text{g L}^{-1}$	$\text{mg L}^{-1}$
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,05	
Lindano	0,02	
Malation	0,1	
Metolacloro	10	
Metoxicloro	0,03	
Paration	0,04	
PCBs - Bifenilas policloradas	0,001	
Pentaclorofenol		0,009
Simazina	2	
Substâncias tensoativas que reagem com o azul de metileno		0,5
2,4,5-T 2,0	2	
Tetracloroeto de carbono		0,002
Tetracloroeteno		0,01
Tolueno	2	
Toxafeno	0,01	
2,4,5-TP	10	
Tributilestanho	0,063	
Triclorobenzeno (1,2,3-TCB + 1,2,4-TCB)		0,02
Tricloroeteno		0,03
2,4,6-Triclorofenol		0,01
Trifluralina	0,2	
Xileno	300	

**Fonte:** Adaptado de CONAMA 357/2005

**Tabela A2.** Parâmetros orgânicos e seus valores máximos permitidos para Água doces de classe 1 e 2 de acordo com a resolução CONAMA 357/2005 onde possa ocorrer pesca ou cultivo de organismos para fins de consumo.

Composto	Valor máximo permitido
	$\mu\text{g L}^{-1}$
Benzidina	0,0002
Benzo(a)antraceno	0,018
Benzo(a)pireno	0,018
Benzo(b)fluoranteno	0,018
Benzo(k)fluoranteno	0,018
Criseno	0,018
Dibenzo(a,h)antraceno	0,018
3,3-Diclorobenzidina	0,028
Heptacloro epóxido + Heptacloro	0,000039
Hexaclorobenzeno	0,00029
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,018
PCBs - Bifenilas policloradas	0,000064
Pentaclorofenol	3
Tetracloroeto de carbono	1,6
Tetracloroeteno	3,3
Toxafeno	0,00028
2,4,6-triclorofenol	2,4

**Fonte:** Adaptado de CONAMA 357/2005