

Avaliação da Ecotoxicidade e Genotoxicidade do Carbendazim em *Daphnia magna*

Carbendazim Ecotoxicity and Genotoxicity evaluation in *Daphnia magna*

RESUMO

O Carbendazim é um fungicida sistêmico pertencente ao grupo dos benzimidazóis. Pode ser considerado um poluente persistente em solos e águas, dependendo das características destes ambientes. Já foi detectada a presença do Carbendazim em águas superficiais com concentrações que variavam de 0,2 a 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Estudos comprovam os efeitos tóxicos do Carbendazim nos estágios iniciais de desenvolvimento de peixes, sendo que alguns evidenciam danos no DNA das células e problemas na reprodução da *D. magna*. O objetivo deste estudo é avaliar a ecotoxicidade e a genotoxicidade do Carbendazim no organismo representativo *Daphnia magna* através do teste de ecotoxicidade aguda e do biomarcador de genotoxicidade ensaio cometa. A ecotoxicidade foi avaliada de acordo com a Norma Brasileira NBR 12713 (2016) em que se determinou a CE_{50} $259,88 \pm 19,79 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e as concentrações subletais. Posteriormente realizou-se a análise do biomarcador ensaio cometa com a média de concentrações encontradas em ambientes aquáticos ($11,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e a concentração permitida para consumo humano ($120 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). Observou-se que os danos no material genético encontrados na concentração de $120 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ foram estatisticamente diferentes do grupo controle. Portanto, foi verificado que o composto possui elevada ecotoxicidade e também genotoxicidade para *Daphnia magna*.

PALAVRAS-CHAVE: Ensaio cometa. Ecotoxicidade aguda. Carbendazim.

ABSTRACT

Carbendazim is a systemic fungicide that belongs to the benzimidazole group. It can be considered a persistent pollutant in soils and waters, depending on the characteristics of these environments. Carbendazim has already been detected in surface waters with concentrations ranging from 0.2 to 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Studies prove the toxic effects of carbendazim in the beginning stages of fish development, some showing damage to cell DNA and reproduction problems of *D. magna*. The aim of this study is to evaluate the ecotoxicity and genotoxicity of carbendazim in the representative organism *Daphnia magna* through the acute ecotoxicity test and comet assay biomarker. Ecotoxicity was evaluated according to Brazilian Standard NBR 12713 (2016) wherein determined the EC_{50} $259.88 \pm 19.79 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and sublethal concentrations. Subsequently, the analysis of the biomarker comet assay was performed with the average concentrations found in aquatic environments ($11.4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and the allowed concentration for human consumption ($120 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). No genetic material at the concentration of $120 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ was statistically different from the control group. Therefore, it was found that the compound has high

Yorrannys Mannes

yorrannysmannes@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

Wanessa Algarte Ramsdorf

wanessa6@yahoo.com.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

Adriane Martins Freitas

Afreitas_27@yahoo.com.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

Marcus Vinicius de Liz

marcusliz@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



ecotoxicity and also genotoxicity to *Daphnia magna*.

KEYWORDS: Comet assay. Acute ecotoxicity. Carbendazim.

INTRODUÇÃO

A utilização de agrotóxicos tem sido indispensável para atender a demanda dos alimentos com qualidade, sendo difícil a erradicação dos mesmos. O uso de agrotóxicos pode estar relacionado com os crescentes índices de pessoas desenvolvendo câncer, assim como a queda da qualidade da água em corpos hídricos (JOBIM, et al., 2010).

O Carbendazim é um fungicida sistêmico pertencente ao grupo dos Benzimidazóis, altamente eficiente no controle de doenças em plantas, principalmente no tratamento de solos, sementes e folhas. É considerado seletivo devido à atuação em poucos processos do metabolismo do patógeno. Os Benzimidazóis possuem aplicações em culturas de algodão, feijão, soja, trigo, citros, frutas e verduras. O Carbendazim atua contra uma grande variedade de doenças causadas por fungos *Ascomycetos spp.*, *Basidiomycetos* e *Deuteromycetos spp.* (COUTINHO et al., 2006).

O Carbendazim está entre os 10 princípios ativos mais utilizados no Brasil, sendo que o consumo do mesmo no Brasil foi superior a 5 mil toneladas em 2014 (IBGE, 2016) e de aproximadamente 4,5 mil toneladas em 2017 (Global Crop Protection, 2018). Em 2012 os Estados Unidos deixaram de importar o suco de laranja brasileiro por conter Carbendazim. No Brasil, este fungicida é legalizado e utilizado para o combate de fungos, como a *Guinardia citricarpa* e *Colletotrichum acutatum*, que são comuns em cultivo de laranjas (SILVA; BARROS; PAVÃO, 2014).

A substância que será avaliada é o padrão analítico Carbendazim - Pestanal®, Sigma-Aldrich (99,5%). O objetivo desta pesquisa é investigar a ecotoxicidade e genotoxicidade do composto Carbendazim em *Daphnia magna*.

METODOLOGIA

ECOTOXICIDADE AGUDA

O teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna* consiste na exposição dos neonatos em concentrações distintas da amostra de forma crescente, resultando em uma faixa de concentrações (de 140 a 560 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) que causa a imobilidade e mobilidade de 100% dos organismos. Deste modo determina-se a concentração em que se observa a imobilidade de 50% dos organismos (CE_{50}). Para a validação dos testes é realizado um controle negativo contendo apenas água de diluição e o controle do solvente, contendo o mesmo teor de solvente da maior

concentração teste. Para o cálculo da CE_{50} utiliza-se o programa estatístico BioStat®. Página | 3

Para a determinação da CE_{50} do Carbendazim em *D. magna* foi preparada uma solução estoque de $146 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de Carbendazim utilizando álcool etílico padrão analítico Alphatec (99,5%) como solvente. Foram realizadas diluições a partir da solução estoque de 140, 210, 280, 350, 420, 490 e $560 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Os testes foram realizados de acordo com a norma NBR 12713 (2016) em triplicata. Para cada concentração testada, dez neonatos foram expostos a 20mL de solução teste contendo água de diluição e Carbendazim. O bioensaio foi armazenado em incubadora B.O.D. por 48 horas na ausência de luz, com temperatura próxima de 20°C . Após a exposição foi analisado o número de organismos imóveis por concentração.

BIOMARCADOR ENSAIO COMETA

Foram selecionadas duas concentrações subletais, 120 e $11,4 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, juntamente com o controle negativo e controle de solvente. A primeira referente à concentração máxima permitida para consumo humano segundo a portaria MS 2914 (Brasil, 2011) e a segunda é a média das concentrações encontradas em águas superficiais no Brasil (SOUZA, 2016; RIBEIRO, DORES, 2013). A exposição foi feita do mesmo modo que o a exposição de toxicidade aguda, porém posteriormente foram avaliados os danos ao material genético dos organismos. O ensaio cometa com *D. magna* foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Knapik (2017), com uma exceção, a eletroforese foi realizada a tenção de 48 V e corrente 300 A, sendo que a metodologia usual é realizada com 25 V e 300 A. As etapas para a realização do ensaio cometa consistem na montagem das lâminas, imersão em lise, desnaturação do DNA, corrida eletroforética, coloração, análise e atribuição dos escores.

As lâminas foram analisadas em um microscópio de epifluorescência, com aumento de 400 vezes. Realizou-se a quantificação dos danos visualmente analisando 100 nucleóides por lâmina. São atribuídos 4 tipos de classe de danos, de acordo com o tamanho da fragmentação do nucleóide.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

ECOTOXICIDADE AGUDA

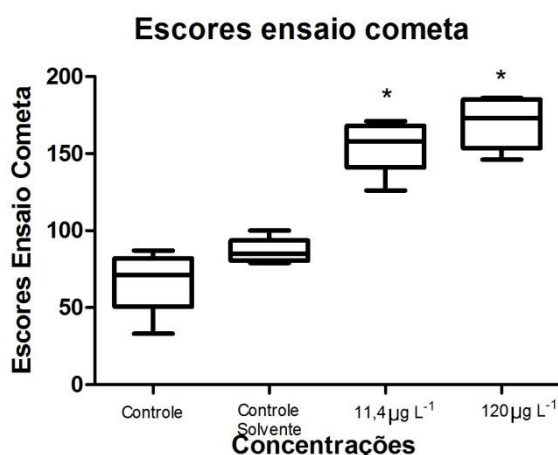
Para as concentrações de Carbendazim aplicadas no teste de toxicidade aguda obteve-se uma CE_{50} média de $259,88 \pm 19,79 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, indicativo de que a substância tem toxidade significativa. Este valor de CE_{50} está dentro da faixa de valores que era esperado, pois na literatura encontra-se CE_{50} (48h) para *D. magna*, de 88, 110 e $350 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (SILVA et al. 2014), 157 e $513 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (FERREIRA et al., 2008) e $460 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (CUPPEN et al., 2000). Esta variabilidade de valores pode ser influenciada por fatores físico-químicos como pH, oxigênio dissolvido, dureza da água e temperatura (ZAGATTO, 2006). Em todos os testes realizados não foi observado nenhuma influência do solvente sobre os neonatos nos controles de solvente, assim como nos controles negativos contendo apenas água de diluição.

O teste foi realizado 8 vezes para maior confiabilidade do resultado e redução do erro estatístico. O resultado do teste foi analisado pelo programa estatístico BioStat® que calcula CE_{50} com base na dose-resposta, ou seja, concentrações da exposição por porcentagem de imobilidade, resultando em uma curva de efeito.

BIOMARCADOR ENSAIO COMETA

O biomarcador ensaio cometa é capaz de detectar danos e quebras na molécula de DNA causados pela substância teste, posteriormente foi analisado a intensidade em que o material fragmentado migrou durante a eletroforese (KNAPIK, 2017). Após a análise dos danos, atribuiu-se um escore para cada lâmina e através da média de escores para cada concentração de exposição foi construído o gráfico que relaciona os escores médios encontrados nas lâminas com as concentrações. Os resultados de danos genéticos observados em *D. magna* estão apresentados na figura 1.

Figura 1 – Escores de danos genéticos causados pelo Carbendazim em *D. magna*



Fonte: Autoria própria.

Através do teste estatístico Kruskal-Wallis observou-se que há diferença estatística entre o controle negativo e as concentrações de Carbendazim e não há diferença estatística entre o controle negativo e o controle de solvente, porém não há diferença estatística entre o controle de solvente e as concentrações de Carbendazim.

As diferenças estatísticas mostram que o solvente etanol causou danos no material genético mascarando o efeito do Carbendazim para a concentração mais baixa de $11,4 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Porém, a análise estatística mostrou que houve diferença estatística entre os danos do grupo controle com solvente e a amostra de $120 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, evidenciando o potencial genotóxico do Carbendazim. No estudo de Silva et al. (2014), foi observado que o Carbendazim é genotóxico e tem um efeito de concentração dependente para *D. magna*, porém o solvente utilizado foi acetona e a menor concentração testada foi de $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Acredita-se que a variação da metodologia do ensaio cometa realizada neste trabalho, não influenciou nos resultados. Na literatura encontra-se variações destas metodologias que diferem na intensidade de corrente, número de

neonatos, tempo de eletroforese, número de células analisadas por lâmina e até mesmo a classificação dos danos (KNAPIK, 2017).

CONCLUSÃO

O Carbendazim possui toxicidade significativa para *D. magna*, pois apresentou uma CE_{50} (48h) de $259,88 \pm 19,79 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, que está dentro da faixa de valores encontrados na literatura. Na análise do biomarcador de genotoxicidade ensaio cometa foi possível visualizar os danos genéticos promovidos pelo Carbendazim, porém só foram estatisticamente significativos os danos provocados pela maior concentração testada ($120 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) em comparação com o controle de solvente, remetendo a revisão da concentração permitida para água de consumo humano.

AGRADECIMENTOS

À orientação das professoras Wanessa Algarte Ramsdorf e Adriane Martins Freitas. O auxílio dos integrantes do Laboratório de Ecotoxicologia da UTFPR. À Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Fundação Araucária, Capes e CNPQ pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT. NBR 12713. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera).** Rio de Janeiro, 2016.
- BRASIL. 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.
- COUTINHO, C. F. B.; GALLI, A.; MAZO, L. H.; MACHADO, S. A. S., Carbendazim e o meio ambiente: Degradação e toxidez, **Pesticidas: ecotoxicol. e meio ambiente**, **16:63, 2006.**
- CUPPEN, J.G.M., VAN D. B. P.J., CAMPS, E., UIL, K.F., BROCK, T.C.M., 2000. Impact of the fungicide carbendazim in freshwater microcosms. I. Water quality, breakdown of particulate organic matter and responses of macroinvertebrates. **Aquatic Toxicology** 48, 233–250.
- FERREIRA, A.L.G., LOUREIRO, S., SOARES, A.M.V.M., 2008. Toxicity prediction of binary combinations of cadmium, carbendazim and low dissolved oxygen on *Daphnia magna*. **Aquat. Toxicol.** (89), 28–39.

Global Crop Protection. **Brasil importou 4,5 mil toneladas de Carbendazim em 2017**. Disponível em: < <http://globalcropprotection.com/2018/04/12/brasil-importa-4-5-mil-toneladas-de-carbendazim-em-2017/> > acesso em: 01 Junho, 2019.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/listabl.asp?z=t&o=1&i=P&e=l&c=774>> acesso em: 12 ago. 2019.

JOBIM, P. F. C.; NUNES, L. N.; GIUGLIANI, R.; CRUZ, I. B. M. Existe uma associação entre mortalidade por câncer e uso de agrotóxicos? Uma contribuição ao debate. **Ciência e Saúde Coletiva**, Porto Alegre (RS), v.15, n.1, p. 277-288, 2010.

KNAPIK, L. F. O. **Ecotoxicidade do inseticida malathion e seus efeitos sobre os biomarcadores ensaio cometa e acetilcolinesterase em *Daphnia magna***. 2018. 61f. Dissertação (Mestrado em ciências) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

RIBEIRO, A. C. A.; DORES, E. F. G. C.; AMORIN, R. S. S.; LOURENCETTI, C. Resíduos de pesticidas em águas superficiais de área de nascente do Rio São Lourenço-MT: Validação de método por extração em fase sólida e Cromatografia Líquida. **Química Nova**, São Paulo, v.36, n.2, p.284-290, 2013.

SILVA, A. R. R.; CARDOSO, D. N.; CRUZ, A.; LOURENÇO, J.; MENDO, S.; SOARES, A. V. M.; LOUREIRO, S. Ecotoxicity and genotoxicity of a binary combination of triclosan and carbendazim to *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. V. 115. P. 279-290. 2014.

SILVA, R. C.; BARROS, K. A.; PAVÃO, A. C. Carcinogenicidade do carbendazim e seus metabólitos. **Química nova**. UFPE, vol. 37, 1329-1334. 2014.

SOUZA, L. F. C. B. **Determinação de agrotóxicos em amostras de água de manancial e de abastecimento público do município de Londrina, Paraná, Brasil**. 2016. f. 84. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2016.

ZAGATTO, Pedro A.; BERTOLETTI, Eduardo. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 2. ed. São Carlos, SP: RiMa, 2008.