

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS**

**Avaliação do potencial tóxico do inseticida Clorantraniliprole e do
herbicida Ametrina, isolados e em mistura, em diferentes
temperaturas para uma espécie zooplanctônica**

Gisele Maria de Lucca

São Carlos - SP

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS

**Avaliação do potencial tóxico do inseticida Clorantraniliprole e do
herbicida Ametrina, isolados e em mistura, em diferentes
temperaturas para uma espécie zooplanctônica**

Gisele Maria de Lucca

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências, área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Graça Gama Melão

Coorientadora: Dra. Emanuela Cristina de Freitas

São Carlos - SP

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Gisele Maria de Lucca, realizada em 14/12/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Maria da Graça Gama Melão (UFSCar)

Profa. Dra. Odete Rocha (UFSCar)

Profa. Dra. Fernanda Cristina Massaro (BIOTOX)

Profa. Dra. Denise Tieme Okumura (BIOTOX)

Profa. Dra. Mariana Miguel (CAQ)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais.

Dedico

Aos meus pais Lourdes e José de Lucca, que mesmo com pouco conhecimento acadêmico, mas com uma imensurável vivência e conhecimento da vida, sacrificando seus próprios sonhos em favor dos meus, nunca me deixaram desistir. Sou tudo, graças a eles e por eles. Ao meu companheiro de longa data e marido, Bruno P. Escher, que diante dos obstáculos difíceis da vida que junto passamos nos últimos anos, chorando e aprendendo junto comigo, nunca me deixou perder a fé e sempre acreditou na minha capacidade. Esse trabalho também é um pouco seu. À minha doce filha Maria Emanuela de Lucca Escher, por alegrar meus dias e ter aumentado ainda mais a minha fé na vida, você nasceu de mim e eu renasci para você. A Deus e a Nossa Senhora Aparecida, meus Pais do céu, pelas oportunidades concedidas e por me colocar no caminho terreno pessoas de valor imensurável. A vocês, todo o amor do mundo!!!! Obrigada...Obrigada...Obrigada!!!

À Prof^a Dra. Maria da Graça Gama Melão, pela grande amizade e oportunidades concedidas, pelo carinho, preocupação, compreensão e paciência diante das dificuldades que a vida foi me colocando ao longo desses anos, sempre acreditando no nosso trabalho. Muito Obrigada!!!

À Coorientadora Dra. Emanuela Cristina de Freitas, pelos anos de convivência, exemplo profissional, ensinamentos, paciência e incentivos, lapidando meu crescimento profissional na área acadêmica. Muito Obrigada!!!

AGRADECIMENTOS

E ainda que eu tivesse o dom da profecia e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e tivesse toda a fé...e não tivesse amor, nada seria (I Coríntios 13:2).

A Deus e todos os intercessores pela minha vida e por tudo que nela vivencio.

À minha orientadora Profa Dra Maria da Graça Gama Melão por todo apoio e orientação ao longo desses anos de estudo, além de todo conhecimento acadêmico que me foi passado, ensinando-me a ultrapassar barreiras, encarar desafios e controlar angústia e ansiedade, exemplo de ser humano e amizade. Obrigada!!!

À minha Coorientadora Dra Emanuela Cristina de Freitas por todas as vivências e aprendizados partilhados ao longo desses anos. Obrigada por tanto!!!!

Um agradecimento especial a Profa Dra Odete Rocha, pelo carinho, preocupação, ensinamentos, amizade e todo acolhimento dado no Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (DEBE) ao longo desses anos. Obrigada!!!

Um agradecimento especial à Profa Dra Adrislaine da Silva Mansano Dornfeld, exemplo de profissional, pela paciência e prontidão em nos atender, passando seu conhecimento de forma clara e simples!!! Obrigada!!!

Ao meu querido e amado marido Bruno Pacanhela Escher, por todo incentivo, confiança, carinho, paciência, dedicação e ajuda em todos os momentos que enfrentamos nesses últimos anos, principalmente para a realização deste trabalho. Obrigado por você existir e ser a base da minha vida. Te amo!!!

À minha filha Maria Emanuela de Lucca Escher, meu amor e carrapicho, que desde cedo na minha barriga, lutou pela vida, compartilhando das minhas angústias e ansiedade,

por me trazer alegrias, serenidade e calma com seus olhinhos brilhantes, o presente mais lindo que poderia ter recebido nessa vida é o de ser sua mamãe!!! Obrigada!!!

Ao meu fiel e companheiro Pingo, por viajar comigo para São Carlos toda semana e ser durante muitos anos e, por muitas vezes, meu único companheiro de casa, caminhadas, viagens e estudo, acompanhando-me nas emoções ao elaborar esse trabalho, além de me chamar para dormir nas madrugadas. Obrigada, filho!

Aos meus pais Lourdes de Lucca e José de Lucca, por sempre me protegerem com carinho e amor. Exemplos de luta e honestidade e pelo orgulho que sentem em me ver adquirindo conhecimento. Eu os amo muito e devo tudo o que sou. Obrigada!!!

À minha sobrinha Gabriela Aparecida Prearo, por toda ajuda, apoio físico e psicológico, principalmente, durante a pós-gravidez, sendo parte da minha recuperação. Obrigada!

Certamente, assim como em outras, mais essa etapa da minha vida não seria tão gratificante e digna se não fossem vocês, meus queridos irmãos, Joana D'Arc Ap. de Lucca Prearo, Valdir Antônio de Lucca e José Valdecir de Lucca. Obrigada por tanto!!!

À minha prima Tania Cristina Jacinto pelo carinho e preocupações diárias com a minha saúde, torcendo e aplaudindo minhas conquistas! Obrigada!!!

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN) pela minha formação acadêmica em nível de doutorado, à coordenação do curso e à secretaria do programa por todo apoio e incentivo concedido. Obrigada!!!!

Aos secretários do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN), pela disponibilidade, prontidão e amizade conquistada ao longo desses anos. Em especial, ao secretário João Augusto da Silva Affonso e Roseli Aparecida Gonçalves. Obrigada!!!

Aos docentes que participaram da minha banca de qualificação Dra Denise Tiemi Okumura e Dra Fernanda Massaro pela disponibilidade e contribuição valiosa nesse trabalho. Obrigada!!!

Aos docentes que participaram da minha banca de defesa do Doutorado, Profa Dra Odete Rocha, Dra Fernanda Massaro, Dra Mariana Miguel e Dra Denise Tiemi Okumura, pela disponibilidade, aprendizado e sugestões valiosas. Obrigada!!!

Aos suplentes que participaram da minha banca na defesa de Doutorado, Dra Adislaine da Silva Mansano Dornfeld e Dra Raquel Moreira pelo incentivo, sugestões e disponibilidade. Obrigada!!!

Aos funcionários e amigos do Departamento de Hidrobiologia (DHB) pelas conversas diárias, em especial, ao Renan Castelhana Gebara e à Lays Alho, amiga de bancada pelo apoio dado com os testes da mistura, passando seu conhecimento e sugestões. Obrigada!!!

Aos funcionários e amigos do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (DEBE) pela simpatia e leveza com que me recebiam todos os dias tornando possível a realização de parte desse trabalho, em especial a Dra Mariana Miguel, pelas madrugadas, rindo e chorando comigo muitas vezes. Obrigada pelo apoio!!!!

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida, pois tanto os recursos financeiros voltados para a como as bolsas de pós-graduação são imprescindíveis para o avanço científico no Brasil.

A todas as pessoas que de maneira mais ou menos próxima colaboraram para a finalização desse trabalho, tornando meu sonho possível. Não conseguiria sem vocês. Muito obrigada!!!

“Desistir?! eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço das minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça.”

Geraldo Eustáquio de Souza

RESUMO

O objetivo dessa pesquisa foi avaliar os efeitos dos agrotóxicos Clorantraniliprole e Ametrina, isolados e em mistura, sobre a espécie *Ceriodaphnia silvestrii* e em diferentes temperaturas, e assim realizar uma avaliação de risco preliminar desses agrotóxicos para os corpos d'água brasileiros. Para isso, testes comparativos dos efeitos agudos e crônicos dos compostos isolados e em mistura foram realizados em sua forma padrão. Os resultados dos testes de toxicidade aguda evidenciaram um aumento da mortalidade com o aumento do tempo de exposição aos compostos selecionados. Com relação aos testes de toxicidade crônica, o herbicida Ametrina reduziu significativamente a fertilidade das fêmeas de *Ceriodaphnia silvestrii* em concentrações a partir de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ e o inseticida Clorantraniliprole causou efeitos horméticos sobre a fertilidade das fêmeas nas duas menores concentrações testadas ($0,02$ e $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$) e reduziu significativamente a reprodução na concentração de $0,14 \mu\text{g L}^{-1}$. Nos experimentos combinando a metodologia de testes padronizados utilizando três temperaturas (17 , 23 e 30°C), os testes foram realizados com o cladóceros *C. silvestrii* após o período de aclimação. Nos testes de toxicidade aguda para o inseticida Clorantraniliprole, efeitos significativos na imobilidade dos organismos foram observados em baixas concentrações testadas. Nos testes crônicos, ocorreu efeito de hormésis na temperatura de 23°C para a concentração de $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$ e redução significativa na fertilidade das fêmeas foram encontrados para o comprimento corpóreo e número de ovos e descendentes a partir da concentração de $0,07 \mu\text{g L}^{-1}$ nas três temperaturas testadas. Para o herbicida Ametrina os resultados dos testes de toxicidade aguda demonstraram um efeito significativo na maior temperatura testada (30°C). Nos testes de toxicidade crônica, foi observada redução significativa nos parâmetros: comprimento corporal, número de ovos e de neonatos, na temperatura de 17°C , onde os organismos de *C. silvestrii* foram mais sensíveis do que nas temperaturas de 23 e 30°C . Assim, nossos resultados mostram que a aclimação pode gerar diferenças significativas na toxicidade e na sensibilidade do cladóceros *C. silvestrii*, indicando a necessidade da incorporação do fator termal nos ensaios de ecotoxicidade com organismos aquáticos tropicais já que essa variável ambiental influencia nos processos biológicos dessa espécie. Nos ensaios com a mistura, nos testes de toxicidade aguda dos ingredientes ativos, os dados apresentaram interação dependente do nível da dose a partir do modelo de Adição de concentração (CA), sendo que em baixas doses ocorreu antagonismo e em altas doses o que se observou foi o sinergismo entre seus componentes.

A exposição crônica também resultou em uma toxicidade dose-dependente, sendo que em baixas doses ocorre antagonismo e em altas doses sinergismo com mudança na interação ocorrendo em nível igual à CE₅₀. Diante do exposto, conclui-se que os agrotóxicos estudados, isolados, em mistura e com a aclimação em diferentes temperaturas causou toxicidade no organismo-teste, representando riscos em potencial para os ambientes aquáticos. São, portanto, sugeridas medidas mais restritivas de uso desses compostos para garantir maior proteção da biota de água doce dos corpos d'água de ambientes tropicais.

Palavras-chave: Ecotoxicologia; misturas; Temperatura; *Ceriodaphnia silvestrii*; Chlorantraniliprole; Ametryn.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the effects of the pesticides Chlorantraniliprole and Ametryn, isolated and mixed, on the species *Ceriodaphnia silvestrii* at two different temperatures and thus, carry out a preliminary risk assessment of these pesticides to Brazilian water bodies. However, comparative tests of the acute and chronic effects of isolated and mixed compounds were carried out with their standard formulation. The results demonstrated that the acute toxicity tests pointed an increase in mortality with increasing exposure time according to the selected compounds. Concerning to the chronic toxicity tests, the herbicide Ametryn significantly reduced the fertility of *C. silvestrii* females at concentrations from 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ and the insecticide Chlorantraniliprole caused hormetic effects on female fertility in the two lowest concentrations tested (0,02 and 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$) and significantly reduced reproduction at the concentration of 0,14 $\mu\text{g L}^{-1}$. In the experiments, combining the methodology of standardized tests using three temperatures (17, 23 and 30°C), the tests were carried out with the cladoceran *C. silvestrii* after the acclimation period. In acute toxicity tests for the insecticide Chlorantraniliprole, significant effects on the immobility of organisms were observed at low concentrations tested. In chronic tests, there was a hormesis effect at the temperature of 23°C for the concentration of 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$ and significant reduction in female fertility were found for body length, number of eggs and offspring from the concentration of 0,07 $\mu\text{g L}^{-1}$ at the three temperatures tested. For the herbicide Ametryn, the results of the acute tests showed a significant effect of temperature on the toxicity of the herbicide Ametryn, at the highest temperature tested (30°C), the average mortality occurred at lower concentrations than when compared to the mean mortality of the lower temperatures (17 and 23°C). In chronic tests, significant reductions were observed in the following parameters: body length, number of eggs and newborns, with emphasis on the temperature of 17°C, where the organisms of *C. silvestrii* were more sensitive than at the temperatures of 23 and 30°C. Thus, our results show that acclimation can generate significant differences in the toxicity and distribution of the sensitivity of the cladoceran *C. silvestrii*, indicating the need to incorporate the thermal factor in ecotoxicity tests with tropical aquatic organisms, as well as this environment variable influences biological processes of that species. In the tests with the mixture, in the acute toxicity tests of the active ingredients, the data showed dependent interaction on the dose level from the

Addition of Concentration model (CA), with antagonism occurring at low doses and at high doses what was observed was synergism between its components. Chronic exposure also resulted in a dose-dependent toxicity, with antagonism occurring at low doses and synergism at high doses with a change in interaction occurring at a level equal to EC50. Given the above, it is concluded that the pesticides studied, isolated, in mixture and with acclimation at different temperatures caused toxicity in the test organism, representing potential risks to aquatic environments, suggesting more restrictive measures for the use of these compounds to ensure greater protection of freshwater bodies in tropical environments.

Keywords: Ecotoxicology; mixtures; Temperature; *Ceriodaphnia silvestrii*; Chlorantraniliprole; Ametryn

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Apresentação do organismo-teste, cladóceros de água doce *Ceriodaphnia silvestrii*. Fêmea adulta, com tamanho de 1 mm. Vista sob Microscópio estereoscópio, aumento de 50x..... 33
- Figura 2 - Exemplo de Isoblograma representando diferentes tipos de efeito com a combinação dos compostos. A curva 1 representa a aditividade (sem interação), a curva 2 representa o antagonismo e a curva 3 representa o sinergismo..... 37
- Figura 3 - Exemplos de algumas áreas de estudo da Ecotoxicologia (Costa et al., 2008).
..... 38
- Figura 4 - Estrutura química da molécula de Ametrina (ANVISA, 2003)..... 40
- Figura 5 - Estrutura química da molécula de Clorantraniliprole (Sigma Aldrich, (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/FLUKA/32510>)). 43
- Capítulo 1 – Efeitos dos agrotóxicos Clorantraniliprole e Ametrina em suas formas analíticas padrão sobre o cladóceros de água doce *Ceriodaphnia silvestrii*.**
- Figura 1 - Faixa de sensibilidade de *Ceriodaphnia silvestrii* (CE50-48h) à substância de referência cloreto de sódio com base nos resultados de 14 testes de toxicidade aguda. Os limite superior (LS) e o limite inferior (LI) foram de 1,32 e 1,62 g L⁻¹, respectivamente, com uma tendência central (TC) de 1,47 g L⁻¹ 65
- Figura 2 - Média das porcentagens (± desvio-padrão) dos organismos imóveis do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* durante os dez testes de toxicidade aguda nas diferentes concentrações testadas do herbicida Ametrina (A) e do inseticida Clorantraniliprole (B).
..... 67
- Figura 3 - Comprimento corpóreo médio de *Ceriodaphnia silvestrii* (mm) antes e depois da exposição ao herbicida Ametrina (A) e ao inseticida Clorantraniliprole (B) para as cinco concentrações testadas nos testes de toxicidade crônica. Os asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação ao controle..... 68

Figura 4 - Porcentagem de sobrevivência (%) das fêmeas de *Ceriodaphnia silvestrii* após 7 dias de exposição a diferentes concentrações do herbicida Ametrina (A) e do inseticida Clorantraniliprol (B) nos testes de toxicidade crônica. O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle ($p < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis). 69

Figura 5 - Número de ovos e neonatos produzidos por fêmea (média \pm DP) do cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostos por 7 dias a várias concentrações do herbicida Ametrina (A e B) e do inseticida Clorantraniliprol (C e D) em testes de toxicidade crônica. O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle (Teste de Tukey; $p < 0,001$). 70

Capítulo 2 – A Influência da temperatura no potencial tóxico do agrotóxico Clorantraniliprole em sua forma analítica padrão, na história de vida do cladócero de água doce *Ceriodaphnia silvestrii*.

Figura 1 - Faixa de sensibilidade de *Ceriodaphnia silvestrii* (CE50-48h) a substância de referência cloreto de sódio com base nos resultados de 14 testes de toxicidade com cloreto de sódio (NaCl) nas temperaturas testadas 17°C (A), 23°C (B) e 30°C (C). Os limites superior e inferior correspondendo a intervalos de confiança de 95% respectivamente. 89

Figura 2 - Média das porcentagens (\pm desvio-padrão) dos organismos imóveis do cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* durante os três testes de toxicidade aguda nas diferentes concentrações testadas do inseticida Clorantraniliprole nas temperaturas de 17, 23 e 30°C 92

Figura 3 - Comprimento corpóreo médio de *Ceriodaphnia silvestrii* (mm) antes (A) e depois (B) da exposição ao inseticida Clorantraniliprole nas temperaturas de 17°C, 23°C e 30°C para as cinco concentrações testadas nos testes de toxicidade crônica. Os asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação ao controle. 93

Figura 4 - Porcentagem de sobrevivência (%) das fêmeas de *Ceriodaphnia silvestrii* após 7 dias de exposição a diferentes concentrações do inseticida Clorantraniliprole, nas temperaturas de 17°C, 23°C e 30°C, nos testes de toxicidade crônica ($p < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis). 94

Figura 5 - Número de ovos produzidos por fêmea (média \pm DP) do cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostos por 7 dias a várias concentrações do inseticida Clorantraniliprole nas temperaturas de 17, 23 e 30°C O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle (Teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,001$; Teste de Tukey; $p < 0,001$). 95

Figura 6 - Número de neonatos produzidos por fêmea (média \pm DP) do cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostos por 7 dias a várias concentrações do inseticida Clorantraniliprole nas temperaturas de 17, 23 e 30°C O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle (Teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,001$). 96

Capítulo 3 – Implicações do herbicida Ametrina em sua forma analítica padrão para a história de vida do cladócero de água doce *Ceriodaphnia silvestrii* quando em diferentes temperaturas.

Figura 1 - Faixa de sensibilidade de *Ceriodaphnia silvestrii* (CE50-48h) a substância de referência Cloreto de Sódio (NaCl) com base nos resultados de 14 testes de toxicidade nas temperaturas testadas 17°C (A), 23°C (B) e 30°C (C). Os limites superior e inferior correspondendo a intervalos de confiança de 95% respectivamente. 114

Figura 2 - Média das porcentagens (\pm desvio-padrão) dos organismos imóveis do cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* durante os três testes de toxicidade aguda nas diferentes concentrações testadas do herbicida Ametrina nas temperaturas de 17, 23 e 30°C. 116

Figura 3 - Comprimento corpóreo médio de *Ceriodaphnia silvestrii* (mm) antes (A) e depois (B) da exposição ao herbicida Ametrina nas temperaturas de 17°C, 23°C e 30°C para as cinco concentrações testadas nos testes de toxicidade crônica. Os asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação ao controle. 117

Figura 4 - Porcentagem de sobrevivência (%) das fêmeas de *Ceriodaphnia silvestrii* após 7 dias de exposição a diferentes concentrações do inseticida Clorantraniliprole, nas temperaturas de 17°C, 23°C e 30°C, nos testes de toxicidade crônica (Teste de Kruskal-Wallis. 118

Figura 5 - Número de ovos produzidos por fêmea (média ± DP) do cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostos por 7 dias a várias concentrações do herbicida Ametrina nas temperaturas de 17, 23 e 30°C O asterisco (*) indica valor significativamente diferente d do controle (Teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,001$; Teste de Tukey; $p < 0,001$). 119

Figura 6 - Número de neonatos produzidos por fêmea (média ± DP) do cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostos por 7 dias a várias concentrações do herbicida Ametrina nas temperaturas de 17, 23 e 30°C O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle (Teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,001$; Teste de Tukey; $p < 0,001$). 120

Capítulo 4 – Efeitos da mistura dos agrotóxicos Clorantraniliprole e Ametrina em suas formas analíticas padrão sobre os organismos de *Ceriodaphnia silvestrii*.

Figura 1 - Design experimental esquemático para as misturas do herbicida ametrina e do inseticida clorantraniliprole utilizados nos testes de toxicidade aguda (A) e nos testes de toxicidade crônica (B): design fatorial completo. 137

Figura 2 - Faixa de sensibilidade de *Ceriodaphnia silvestrii* (CE50-48h) à substância de referência cloreto de sódio, com base nos resultados de 14 testes de toxicidade aguda. Os limites superior (LS) e inferior (LI) foram de 1,32 e 1,62 g L⁻¹, respectivamente, c com uma tendência central (TC) de 1,47 g L⁻¹. 140

Figura 3 - Isobogramas para os resultados do teste de toxicidade aguda da mistura do herbicida ametrina e do inseticida clorantraniliprole sobre a mobilidade do cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* após 48h, seguindo o modelo de referência de Adição de Concentração com desvio dependente do nível da dose (A) e o modelo de Ação Independente (B). 143

Figura 4 - Isoblograma para os resultados do teste de toxicidade crônica da mistura do herbicida ametrina e do inseticida clorantraniliprole sobre o número relativo médio de neonatos acumulados por fêmea do cladócero *Ceriodaphnia silvestrii*, após 8 dias de exposição, seguindo o modelo de referência de Ação Independente (IA). Nenhum dos desvios foi significativo. 145

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Exemplos de classificação de agrotóxicos de acordo com seu modo de ação específico. Fonte: Modificado de Gavrilescu (2005). 7

Tabela 2 - Ingredientes Ativos permitidos nas monoculturas de cana-de-açúcar e suas respectivas classes de acordo com o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (AGROFIT, 2014). 9

Tabela 3 - Exemplos de algumas marcas registradas que contém Ametrina como princípio ativo (Rodrigues e Almeida, 2005)..... 42

Capítulo 1 – Efeitos dos agrotóxicos Clorantraniliprole e Ametrina em suas formas analíticas padrão sobre o cladóceros de água doce *Ceriodaphnia silvestrii*.

Tabela 1 - Valores de CE50-48h do herbicida Ametrina e do inseticida Clorantraniliprole e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) obtidos nos testes de toxicidade aguda realizados com o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*.....66

Capítulo 2 – A Influência da temperatura no potencial tóxico do agrotóxico Clorantraniliprole em sua forma analítica padrão, na história de vida do cladóceros de água doce *Ceriodaphnia silvestrii*.

Tabela 1 - Valores de CE50 - 48 h do padrão Clorantraniliprole combinado com o fator de estresse nas respectivas temperaturas de 17, 23 e 30°C, e seus respectivos intervalos de confiança, para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* nos testes de toxicidade aguda.....91

Capítulo 3 – Implicações do herbicida Ametrina em sua forma analítica padrão para a história de vida do cladóceros de água doce *Ceriodaphnia silvestrii* quando em diferentes temperaturas.

Tabela 1 - Valores de CE50 - 48 h do padrão Ametrina combinado com o fator de estresse nas respectivas temperaturas de 17, 23 e 30°C, e seus respectivos intervalos de confiança, para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* nos testes de toxicidade aguda. 115

Capítulo 4 – Efeitos da mistura dos agrotóxicos Clorantraniliprole e Ametrina em suas formas analíticas padrão sobre os organismos de *Ceriodaphnia silvestrii*.

Tabela 1 - Interpretação dos parâmetros adicionais (“a” e “b”) que definem a forma funcional do padrão dos desvios a partir da Adição de Concentração (CA) e da Ação Independente (IA). Adaptado de Jonker et al. (2005). 138

Tabela 2 - Resumo dos parâmetros e testes de ajuste dos modelos de referência Adição de Concentração e Ação Independente aplicados à mobilidade do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* exposto à mistura do herbicida ametrina e do inseticida clorantraniliprole, durante 48 h. 142

Tabela 3 - Resumo dos parâmetros e testes de ajuste do modelo de referência Ação Independente (IA) aplicado ao número relativo médio de neonatas acumuladas por fêmea do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* exposto à mistura do herbicida ametrina e do inseticida clorantraniliprole, por 8 dias. 144

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	25
1.1. Agrotóxicos: Definições e classificações	25
2. OBJETIVOS E HIPÓTESES	45
2.1. Objetivo Geral	45
2.4. Referências Bibliográficas	47
CAPÍTULO 1	56
RESUMO.....	56
1.INTRODUÇÃO	57
REFERÊNCIAS.....	75
CAPÍTULO 2	82
RESUMO.....	82
1. INTRODUÇÃO	83
REFERÊNCIAS.....	100
CAPÍTULO 3	105
RESUMO.....	105
1. INTRODUÇÃO	106
REFERÊNCIAS.....	124
CAPÍTULO 4.....	129
RESUMO.....	129
1. INTRODUÇÃO	130
REFERÊNCIAS.....	149

ESTRUTURA DA TESE

Essa tese foi escrita de maneira a facilitar a publicação dos resultados e estruturada na forma de capítulos, os quais foram escritos contemplando os itens Resumo, Introdução, Materiais e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões e Referências Bibliográficas. Os apêndices foram inseridos quando necessários de modo a oferecer maior detalhamento dos resultados de cada experimento, sendo assim incluídos como elementos pós-textuais ao final de cada capítulo. Um capítulo inicial foi escrito com informações gerais para contextualizar a pesquisa, discorrendo de forma abrangente sobre os agrotóxicos com os elementos: definição, processos, interações biológicas e efeitos tóxicos, misturas, diferentes temperaturas e Ecotoxicologia. Além do mais, foram ordenados quatro capítulos de acordo com o decorrer das etapas desenvolvidas da pesquisa, conforme descrito abaixo:

Capítulo 1 – Efeitos dos agrotóxicos Clorantroliprole e Ametrina em suas formas analíticas padrão sobre o cladóceros de água doce *Ceriodaphnia silvestrii*.

Neste capítulo foi analisada isoladamente a toxicidade de cada agrotóxico (Clorantroliprole e Ametrina) na sua forma padrão para a espécie nativa *Ceriodaphnia silvestrii* através de ensaios ecotoxicológicos, comparando a sensibilidade da espécie testada a uma substância de referência, tendo em vista uma maior utilização de espécies nativas de água doce em testes rotineiros de laboratório. A sensibilidade dos organismos foi avaliada através de testes de toxicidade aguda e crônica de modo a obter os valores de CE₅₀ - 48h e os valores de CENO - 7 a 8 dias para a reprodução. Os parâmetros observados foram: imobilidade, comprimento corporal, sobrevivência e fertilidade.

Capítulo 2 – A Influência da temperatura no potencial tóxico do agrotóxico Clorantroliprole em sua forma analítica padrão, na história de vida do cladóceros de água doce *Ceriodaphnia silvestrii*.

Neste capítulo foi avaliada a hipótese de que o inseticida Clorantroliprole, na sua formulação padrão, poderia ter seu efeito potencializado para a espécie escolhida quando combinado a um fator de estresse, como a temperatura, fora do ideal para o organismo-teste. A sensibilidade dos organismos foi avaliada através de testes de toxicidade aguda e crônica de modo a obter os valores de CE₅₀ - 48h e os valores de CENO – para a idade de

primeira reprodução (7 a 8 dias). As variáveis-resposta observadas foram: imobilidade, comprimento corporal, sobrevivência e fertilidade.

Capítulo 3 – Implicações do herbicida Ametrina em sua forma analítica padrão para a história de vida do cladócero de água doce *Ceriodaphnia silvestrii* quando em diferentes temperaturas.

Este capítulo teve o propósito de verificar a hipótese de que herbicida Ametrina, na sua formulação padrão, poderia ter seu efeito potencializado para a espécie escolhida quando combinado a um fator de estresse, como a temperatura, fora do ideal para o organismo-teste. A sensibilidade dos organismos foi avaliada através de testes de toxicidade aguda e crônica de modo a obter os valores de CE_{50} - 48h e os valores de CENO - 7 a 8 dias para a reprodução. Os parâmetros observados foram: imobilidade, comprimento corporal, sobrevivência e fertilidade.

Capítulo 4 – Efeitos da mistura dos agrotóxicos Clorantraniliprole e Ametrina em suas formas analíticas padrão sobre os organismos de *Ceriodaphnia silvestrii*.

De acordo com os estudos realizados nos dois capítulos anteriores, onde foram realizados testes ecotoxicológicos com cada agrotóxico isoladamente combinados a um fator de estresse provocado pela temperatura, neste capítulo foi possível avaliar os efeitos tóxicos letais e subletais provocados pela mistura de um inseticida e um herbicida em suas formas padrão no organismo-teste *Ceriodaphnia silvestrii*. A sensibilidade dos organismos foi avaliada através de testes de toxicidade aguda e crônica de modo a obter os valores de CE_{50} - 48h e os valores de CENO - 8 dias para a reprodução. Os parâmetros observados foram: comprimento corporal e fertilidade.

Assim, com base nesses quatro capítulos, as conclusões gerais da tese e as considerações finais puderam ser elaboradas.

CONTEXTUALIZAÇÃO E JUSTIFICATIVA

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1. Agrotóxicos: Definições e classificações

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), os agrotóxicos eram considerados antigamente como um marco na evolução agrícola, sendo um produto da ciência desenvolvido para garantir um aumento da produtividade no campo através do controle de pragas. Hoje, estão entre os principais modelos de desenvolvimento atual da agricultura brasileira, centrados em ganho de melhora na produtividade (IBGE, 2015).

As pragas agrícolas e demais patógenos prejudicam aproximadamente de 10 a 40% da produção agrícola bruta no mundo, o que acarreta em uma elevação dos preços dos alimentos e uma diminuição na qualidade dos produtos, resultando em uma dependência maior de produtos importados para suprir a demanda (GODOY; OLIVEIRA, 2003).

Em nível mundial, a história dos agrotóxicos pode ser compreendida em três fases. A primeira, compreende o período que antecede a década de 1870, na Grécia Antiga, onde para o controle de pragas, em geral, era comum o uso de produtos naturais como, por exemplo, o enxofre. Já para o período compreendido entre 1870 a 1945, além dos produtos orgânicos naturais, ocorreu a inserção dos produtos sintéticos inorgânicos. A partir de 1945, teve fim o uso dos produtos orgânicos naturais e sintéticos inorgânicos, para dar entrada à utilização dos agrotóxicos sintéticos, por exemplo, os organoclorados, que apresentam em sua estrutura átomos de carbono e cloro, como o DDT, o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e, mais tarde, o hexaclorociclohexano (HCH), sendo considerado um marco significativo na civilização humana, pois a partir deste avanço os agrotóxicos foram sintetizados por humanos e nomeados de pesticidas químicos, sendo considerados facilitadores e mantenedores da atividade agrícola (CAVALHEIROS, 1993; SANCHES et al., 2003) (ZHANG et al., 2012). Durante a Segunda Guerra Mundial, era comum a utilização do DDT pelos soldados como forma de proteção contra as epidemias de tifo transmitido por piolhos (SANCHES et al., 2003).

Tais agrotóxicos organoclorados são considerados substâncias químicas potencialmente tóxicas devido, principalmente, à estabilidade física e química que os

tornam persistentes no meio ambiente e à bioacumulação em seres humanos, podendo ser acumulados nos tecidos adiposos dos organismos vivos (SACHIN et al., 2013; SANCHES et al., 2003; VELASCO et al., 2014). No mundo, anualmente, cerca de 4,6 milhões de toneladas de agrotóxicos são lançados no meio ambiente (ZHANG et al., 2012) e o setor agropecuário pode ser considerado o maior responsável pela poluição das águas por agrotóxicos (FAO, 2006; PÉREZ et al., 2012; SHORTLE e ABLER, 2001). Os efeitos toxicológicos desses agrotóxicos organoclorados em combinação com fatores genéticos e ambientais podem explicar algumas causas de mutagenicidade, carcinogenicidade e desregulação endócrina no processo de doenças humanas (RODRIGUÉZ ET AL., 2018; EEA, 2012; TABREZ et al., 2014; WALISZEWSKI, et al. 2013)

No Brasil, a indústria de agrotóxicos surgiu em meados da década de 1940, porém a consolidação de um parque industrial desses produtos químicos ocorreu por volta de 1970 e, principalmente, em 1975 com a instituição do Programa Nacional dos Defensivos Agrícolas que tinha como objetivo internalizar a produção no país em um momento de ascensão da agricultura nacional com a construção dos chamados Complexos Agroindustriais (TERRA; PELAEZ, 2008). Com os avanços desse setor, o Brasil se tornou um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo, com seu uso destinado à produção agrícola nacional (TERRA; PELAEZ, 2008).

O Brasil apresenta um esboço legal para tratar das questões referentes aos agrotóxicos como, por exemplo, a Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto nº 4.074 de 04 de janeiro de 2002, onde, em geral, os agrotóxicos são definidos como 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 plantadas, e de outros ecossistemas, e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora, fauna ou da microbiota, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos. Também são considerados agrotóxicos, substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento. (Lei nº 7802 de 11 de julho de 1989). Assim, tais defensivos são produzidos e comercializados para causar prejuízos aos organismos vivos quando lançados no meio ambiente.

Os agrotóxicos possuem denominações variadas como, defensivos agrícolas, praguicidas, pesticidas, biocidas que traduzem o potencial de matar, controlar ou combater de algum modo as pragas, em um sentido amplo, tudo aquilo que ataca, lesa ou

transmite enfermidades às plantas, aos animais e ao homem (ZAMBRONE, 1986), sendo classificados também de acordo com sua base de produção como, por exemplo, os inorgânicos que possuem mercúrio, bário, enxofre e cobre em sua composição; os orgânicos com átomos de carbono em sua estrutura; e os bactericidas, fungicidas ou de origem vegetal, sendo um exemplo destes os antibióticos (SANCHES et al., 2003). Também podem ser classificados de acordo com seu modo de ação, compondo 20 classes distintas, apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Exemplos de classificação de agrotóxicos de acordo com seu modo de ação específico. Fonte: Modificado de Gavrilescu (GAVRILESCU, 2005).

CLASSE	MODO DE AÇÃO
Algicidas	Combate de algas
Antimicrobianos	Combate de microrganismos patogênicos
Atrativos	Atraem as pragas usando feromônios naturais que confundem e impedem o acasalamento de insetos
Avicidas	Controle de aves
Biopesticidas	Formulados naturais com propriedades pesticidas
Desfolhantes	Controle de folhagem, maior facilidade na colheita
Dessecantes	Auxiliam e diminuem o tempo de secagem de plantas e insetos
Fumigantes	Combate de pragas (e.g. insetos) e bactérias através da liberação de vapores e gases
Fungicidas	Combate de Fungos
Herbicidas	Controle de plantas invasoras
Inseticidas	Controle de insetos, larvas e formigas
Acaricidas	Controle de ácaros
Moluscicidas	Controle de moluscos
Nematicidas	Controle de nematóides e organismos do solo
Ovicidas	Controle de ovos de insetos
Piscicidas	Controle de peixes
Reguladores de crescimento vegetal	Acelera ou retarda o crescimento vegetal
Praguicidas	Controle de vertebrados
Repelentes	Repelem carrapatos, pulgas, mosquitos
Rodenticidas e/ou Raticidas	Combate de roedores

Outra classificação dos agrotóxicos é com relação a sua classe toxicológica representada por uma faixa de cores nas embalagens dos produtos que caracterizam quatro classes distintas de acordo com o grau de periculosidade. No Brasil, a Agência de

Vigilância Sanitária (ANVISA) define os agrotóxicos de acordo com o potencial de toxicidade aguda aos seres humanos. Já o Ministério da Saúde, define-os baseados na DL₅₀ oral para formulações líquidas e sólidas. Já para a Organização Mundial da Saúde (OMS), a classificação toxicológica é feita baseada na DL₅₀ em ratos, oral e dérmica por mg kg⁻¹ de peso, das formulações líquidas e sólidas. Em ambos os métodos, são considerados classes que seguem a numeração Romana de I (altamente perigoso), II (muito perigoso), III (perigoso) e IV (pouco perigoso) e representados por cores distintas na embalagem do produto, sendo: cor vermelha (classe I) considera-se o produto extremamente tóxico; cor amarela (classe II) considera-se o produto muito tóxico; cor azul (classe III) considera-se o produto moderadamente tóxico; e cor verde (classe IV) considera-se o produto pouco tóxico. Essa classificação de periculosidade ambiental é feita pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) que avalia os agrotóxicos de acordo com diferentes características dos produtos por meio de dados físicos e químicos, capacidade de persistência e deslocamento no ambiente, bioacumulação nos tecidos vivos e dados de toxicidade a organismos não-alvo de diversos níveis tróficos. De acordo com Hassan (1997), outra classificação dos agrotóxicos é com relação ao tempo de persistência no meio ambiente, demonstrando o potencial de contaminação do compostos através do tempo em que o produto fica disponível para o contato com organismos vivos, sendo classificados em compostos de vida curta (persistência menor do que cinco dias no ambiente); pouco persistente (persistência entre 5 e 15 dias no ambiente), moderadamente persistentes (persistência entre 16 e 30 dias no ambiente) e persistentes (persistência por mais de 30 dias no ambiente).

De acordo com a Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989 em seu artigo 41, os agrotóxicos só poderão ser produzidos, exportados, importados, comercializados e utilizados se previamente registrados em órgão federal, de acordo com suas diretrizes e exigências dos órgãos federais responsáveis pelos setores da saúde, do meio ambiente e da agricultura.

Até a última listagem datada em julho de 2016, existem no Brasil 381 Ingredientes Ativos permitidos, relatados (AGROFIT, 2014), no Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários do Ministério da Agricultura totalizando um consumo de aproximadamente 500 mil toneladas em 2018 (IBAMA, 2018). É previsto que com a política do atual governo de liberar o máximo possível de agrotóxicos deve ter aumentado muito.

O termo princípio ativo faz referência ao composto ativo de um agrotóxico, ou seja, o responsável por agir no alvo desejado. Os ingredientes ativos são substâncias, produtos ou agentes que resultam de processos de natureza química, física ou biológica de modo a manter a eficiência aos agrotóxicos (IBGE, 2015).

Aproximadamente, 18% do faturamento total com a comercialização de agrotóxicos no Brasil no ano de 2017 foram negociados no estado de São Paulo, representando aproximadamente 77 mil toneladas (IBAMA, 2018). Dentre os compostos, os mais utilizados no estado para as mais variadas culturas são o glifosato, 2,4-D, a Ametrina, o diuron, a atrazina e o tebutiurom, totalizando uma média de 35,6 mil toneladas por ano (IBAMA, 2014). Dentre as monoculturas no estado de São Paulo, a cana-de-açúcar se destaca como a que mais utiliza agrotóxicos em termos de quantidade de ingrediente ativo (IA), sendo que, em média, 10% do volume total de IA consumidos no Brasil têm sido utilizados na monocultura de cana-de-açúcar (SPADOTTO et al., 2004; ABRASCO, 2012).

De acordo com os dados da AGROFIT, estão registradas 85 formulações comerciais de ingredientes ativos no Brasil para uso nas lavouras de cana-de-açúcar, dentre os quais estão os acaricidas, os herbicidas, os inseticidas, os fungicidas, os feromônios sintéticos, os reguladores de crescimento, os agentes biológicos e os inseticidas (AGROFIT, 2017). O cultivo de cana-de-açúcar é um exemplo de cultivo brasileiro que mais utiliza agrotóxicos em termos de quantidade de ingredientes ativos. Como exemplo, na Tabela 2, está representado os ingredientes ativos separados por grupos de classificação. Do total de classes, 53% são herbicidas.

Tabela 2. Ingredientes Ativos permitidos nas monoculturas de cana-de-açúcar e suas respectivas classes de acordo com o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (AGROFIT, 2014).

HERBICIDAS	2,4D, Acetocloro, Alaclor, Ametrina , Amicarbazona, Asulam, Atrazina, Bispiribaque-sódico, Carfentrazona-etílica, Cianazina, Cletodim, Clomazona, Dicloreto de paraquete, Diclosulam, Diuron, Etoxissulfurom, Flazasulfurom, Fluazifope-P-butílico, Flumioxazina, Glifosato, Glifosato-sal de isopropilamina, Halossulfurom-metílico, Hexazinona, Imazapique, Imazapir, Iodosulfurom-metílico, Isoxaflutol, MCPA,
------------	--

	Mesotriona, Metolacoloro, MSMA, Oxadiazona, Oxifluorfem, Paraquate, Pendimetalina, Picloram, Simazina, S-metolacoloro, Sulfentrazona, Sulfometurom-metílico, Sulfosato, Tebutiuron, Tiazopir, Trifloxissulfurom-sódico, Trifluralina
INSETICIDAS	Alfa-cipermetrina, Cadusafós, Clorantianiliprole , Etiprole, Fipronil, Imidacloprido, Lambda-cialotrina, Novalurom, Terbufós, Tiametoxam Triflumurom
FUNGICIDAS	Epoconazol, Azoxistrobina, Ciproconazol, Fludioxonil, Metalaxil-M, Picoxistrobina, Triadimefom, Triadimenol
ACARICIDAS/INSETICIDAS	Abamectina, Aldicarbe, Bifentrina, Carbofurano, Endossulfam, Fluazinam, Lufenurom, Triclorfom
FEROMÔNIO SINTÉTICO	Acetato de (Z)-7-dodecenila, Acetato de (Z)-9-tetradecenila, N-2'S-metilbutil-2-metilbutilamida, Acetato de (Z)-11-hexadecenila
REGULADORES DE CRESCIMENTO	Ácido giberélico, Etefom, Trinexapaque-etílico
INSETICIDAS BIOLÓGICO/MICROBIOLÓGICO	<i>Bacillus thuringiensis</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> , <i>Steinernema puertoricense</i>
AGENTE BIOLÓGICO DE CONTROLE	<i>Cotesia flavipes</i> (Cameron, 1891)

De acordo com os dados do IBAMA, para o grupo dos herbicidas, a Ametrina foi o composto mais comercializado no estado de São Paulo, totalizando 3.600 toneladas no ano de 2014 (IBAMA, 2014). Apesar de necessária, até a presente data, não existe nenhuma legislação brasileira que regulamenta as concentrações máximas permitidas desse princípio ativo no ambiente ou na água destinada ao consumo humano.

De acordo com o estudo realizado por Acayaba (2017), esse composto foi detectado em 76% das amostras, em concentrações que variaram de 5,6 a 72 ng L⁻¹, ambos foram no rio Mogi-Guaçu no interior de São Paulo. Para o restante do Brasil, a Ametrina foi investigada em 183 amostras e quantificadas com uma frequência de detecção de 35% em concentrações que variaram entre 2 e 2900 ng L⁻¹ (ALBUQUERQUE et al. 2016). Já no trabalho de Salvatierra-Stamp e colaboradores (2015), em alguns rios do México, foram encontradas concentrações entre 89 e 207 ng L⁻¹.

No ano de 2011, o Brasil foi considerado pelo Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada (IPEA) como o maior consumidor mundial de agrotóxicos, com um aumento na produção de 9,6% quando comparado com o ano anterior, chegando a 902.408 toneladas (IPEA, 2012). Desse montante, 367.778 toneladas são de ingredientes ativos, segundo os dados fornecidos pelo Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa Agrícola. Segundo Instituto de Economia Agrícola (IEA), o aumento anual ocorre devido principalmente ao aumento das áreas de cultivo do país e pela maior necessidade de controle de pragas (IEA, 2014). Para os inseticidas, esse aumento foi cerca de 29,9% no ano de 2013 quando comparado com o ano de 2012, devido a ocorrência da lagarta *H. armigera* – a lagarta-falsa-medideira – e do ressurgimento da mosca-branca (IEA, 2014).

A fase de desenvolvimento de um novo inseticida é considerada uma fase onerosa, ou seja, implica em gastos, despesas e ônus (MCDOUGALL, 2015). Assim, é inevitável a preocupação a cada novo inseticida lançado no mercado, devido a sua resistência no ambiente, ainda mais quando seu uso e lançamento é feito de forma inadequada e desordenada. Isso se dá quando os produtores rurais utilizam o produto sem atentar para os cuidados descritos na bula como, por exemplo, extrapolando o número de aplicações ou fazendo misturas de ingredientes ou de inseticidas de forma aleatória ou, ainda, quando fazem as aplicações em condições climáticas não condizentes. São essas situações que comprometem a eficiência prolongada do produto, o controle natural feito pelos organismos, além de prejudicar a saúde dos trabalhadores, arredores e consumidores finais devido aos resíduos químicos que são cumulativos nos produtos e acarretar no ressurgimento de pragas mais resistentes aos inseticidas (OLIVEIRA, 2008). O inseticida Clorantniliprole apesar de novo no mercado (2009), é um exemplo disso, pois já existem estudos em algumas partes do mundo, inclusive no Brasil, que relataram a resistência de alguns artrópodes, como variação na suscetibilidade (da SILVA et al., 2012; TROCZKA et al., 2012; LEE et al., 2006; RIBEIRO, 2014; SIAL et al., 2010; WANG et al., 2010; TEMPLE et al., 2009). Esse inseticida tem um grande potencial de uso para o controle de insetos, porém dados sobre as consequências de seu lançamento no meio ambiente, principalmente nos corpos de água doce, em organismos de base da cadeia trófica, ainda são bastante escassos no Brasil, sendo no entanto importantes esses dados para futuros estudos de monitoramento desses ecossistemas.

1.2. A toxicidade dos agrotóxicos nos ecossistemas aquáticos

Os testes ecotoxicológicos são normalmente realizados em laboratório com organismos que tenham relevância e representatividade no tipo de ecossistema em estudo. Em ecossistemas aquáticos, várias espécies de diferentes níveis tróficos e pertencentes a diferentes comunidades podem ser utilizadas como organismo-teste em experimentos seguindo a protocolos pré-determinados. Na escolha da espécie, alguns critérios são estabelecidos previamente como, por exemplo, utilizar espécies indicadoras ambientais e que podem apresentar sensibilidade a contaminantes. Para o ecossistema em estudo, as espécies devem ocorrer em abrangência geográfica e com elevada abundância e disponibilidade, uniformidade, estabilidade genética nas populações e ter uma manutenção viável e adaptável nas condições de cultivo em laboratório. Normalmente, são realizados testes de toxicidade aguda que avaliam a exposição química em um curto período de tempo e de toxicidade crônica que testam concentrações química subletais e com uma exposição mais prolongada, variável de modo a abranger uma parte significativa do ciclo de vida do organismo-teste (COSTA et al., 2008; RAND e PETROCELLI, 1985).

Dessa maneira, organismos zooplancônicos da Ordem Cladocera, pertencentes a comunidades de invertebrados aquáticos que desempenham um papel ecológico fundamental por serem importantes consumidores nas cadeias tróficas, são uma ótima opção para os testes de toxicidade (TUNDISI e MATSUMURA-TUNDISI, 2008). Os microcrustáceos de água doce são exemplos de organismo-teste bastante utilizados devido ao ciclo de vida curto, por serem partenogenéticos com elevada taxa de reprodução, apresentar alta sensibilidade a contaminantes químicos, o que os tornam bastante viáveis para cultivo em laboratório devido à facilidade de manejo (ABREU et al., 2010; COSTA et al., 2008; DAMASCENO DE OLIVEIRA et al., 2018; RAND, G.M.; PETROCELLI, 1985). Dentre esses organismos, a espécie *Ceriodaphnia silvestrii* (Figura 1) é um cladócero pertencente à família Daphnidae amplamente distribuídas nas águas doce brasileira e muito utilizado e recomendado em análises ecotoxicológicas (ABNT, 2017; ABREU et al., 2010).



Figura 1. Vista geral do organismo-teste, cladóceros de água doce, *Ceriodaphnia silvestrii*. Fêmea adulta, com tamanho de 1 mm. Vista sob Microscópio estereoscópio, sob aumento de 50x (LUCCA, 2020).

A produção de produtos químicos vem sendo ampliada significativamente com o passar dos anos de modo a suprir as necessidades humanas (AMÉRICO et al., 2012; GRACIANI e FERREIRA, 2014). Tem-se variadas aplicações na medicina, agricultura, indústria e uso doméstico (AQUILINO et al., 2019; GRIFFERO et al., 2019). Com o aumento da população, proporcionalmente, ocorreu uma maior produção de alimentos que demandou avanços na agricultura para garantir uma maior produção em larga escala (CRIST; MORA; ENGELMAN, 2017) e, com isso, houve um aumento no uso de produtos agrotóxicos (AQUILINO et al., 2019; RELIGIA et al., 2019). Para se ter uma ideia, no Brasil, a comercialização de produtos agrotóxicos chegou a marca de 500 mil toneladas de ingrediente ativo no ano de 2014 (BRASIL, 2017). Esse avanço no uso e produção ocorreu em todas as regiões brasileiras, com um aumento significativo, principalmente dos compostos químicos de Classe II e III (Brasil, 2017). Conseqüentemente, com a elevada produção desses compostos químicos ocorreu um aumento significativo na contaminação dos recursos hídricos (SPOSITO et al., 2018). O impacto no uso de grandes quantidades de agrotóxicos para o meio ambiente tropical é devido, principalmente, às alterações causadas no habitat natural que evidenciam em grandes prejuízos através da contaminação de reservatórios de água (SOUSA et al., 2016), rios (CHIARELLO et al., 2016; MACHADO et al., 2016), recursos hídricos (GAMA; OLIVEIRA; CAVALCANTE, 2013) e bacias fluviais, interferindo nos organismos vivos aquáticos (VIEIRA et al., 2016) que formam grandes reservatórios de biodiversidade.

Ao atingir os ambientes aquáticos, tais poluentes podem ter diversos destinos que são determinados devido às propriedades físicas e químicas do composto, das

características físicas e biológicas do ambiente atingido, bem como da quantidade e frequência de entrada do composto no ambiente (RAND e PETROCELLI, 1985). Portanto, os riscos de contaminação são eminentes (ABHILASH e SINGH, 2009).

Da variedade de produtos comerciais e suas misturas que são utilizados em diversas culturas, nas monoculturas de cana-de-açúcar, por exemplo, 24 produtos são considerados extremamente tóxicos ou altamente tóxicos à saúde humana, 27 são altamente perigosos ou muito perigosos à saúde ambiental, sendo que 16 destes apresentaram toxicidade aguda aos organismos aquáticos e 38 destes apresentaram toxicidade crônica (SCHIESARI; CORRÊA, 2016). Os ingredientes ativos presentes nos produtos comerciais podem apresentar uma toxicidade diferente aos organismos expostos e os efeitos são ainda bastante desconhecidos, tanto nas avaliações isoladas quanto nas avaliações em misturas, ainda mais quando estão associados a condições abióticas de estresse. Desta maneira, há de se considerar o impacto causado nos ecossistemas aquáticos tropicais em consequência do aumento na liberação de agrotóxicos nesse tipo de ambiente, principalmente para o declínio da biodiversidade e na qualidade dos recursos hídricos, sugerindo a ampliação e aumentando a necessidade de estudos frequentes de monitoramento. Por isso, estudos de monitoramento do ambiente têm mostrado uma dissipação dos resíduos de agrotóxicos na atmosfera e nas precipitações chuvosas (MOREIRA et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2012), nas águas superficiais e subterrâneas (DORES; DE-LAMONICA-FREIRE, 1999) e, sendo conseqüentemente encontrados nos alimentos (ANVISA, 2017).

Os ecossistemas aquáticos constantemente estão sujeitos a condições de múltiplos fatores abióticos de estresse, tais como variações de temperatura (ondas de calor ou de frio), variações na condutividade (eutrofização) e pH (florações de algas) que podem causar perda da qualidade da água. Tais alterações nas condições ótimas de sobrevivência para cada espécie podem influenciar nas respostas fisiológicas desses organismos, no seu crescimento e reprodução quando expostos a um único composto e podem ainda ser potencializados quando os contaminantes são combinados em misturas e/ou acompanhados de um fator abiótico de estresse. Apesar disso, a maioria dos estudos ecotoxicológicos que avaliam os riscos que esses contaminantes podem causar para a comunidade aquática são realizados em situações específicas e controladas de laboratório (SEGNER; SCHMITT-JANSEN; SABATER, 2014; MENDES, 2015) com a utilização de contaminantes individuais e não através da combinação dos mesmos. O impacto resultante da combinação de diversos fatores de estresse difere dos impactos causados por um único fator isolado (SEGNER; SCHMITT-JANSEN; SABATER, 2014). Nesse

sentido, estudos em laboratório que utilizam a combinação de fatores abióticos de estresse e misturas de contaminantes assumem grande importância ecológica, permitindo avaliar uma condição mais próxima das encontradas em ambientes naturais, uma somatória de efeitos, uma vez que no ambiente há vários estressores que coexistem e, conseqüentemente, os organismos são expostos a essa combinação de fatores simultaneamente.

1.3. Misturas tóxicas

No meio ambiente, muitas vezes, os compostos químicos não agem de forma isolada nos organismos, lançados de forma desordenada, acabam se combinando e na maioria dos casos, potencializando seus efeitos ao modificar sua amplitude e natureza, tornando-se misturas tóxicas. Essas misturas interagem e produzem efeitos sinérgicos, aditivos ou antagônicos (BARATA et al, 2006; MANSANO et al., 2018; ROCHA et al., 2018). Assim, testes de toxicidade com misturas são necessários para entender o comportamento e a forma de ação dos compostos quando agem em conjuntos nos organismos (FAUST et al., 2001; PÉREZ et al., 2011).

Para entender o comportamento das misturas tóxicas no ambiente, dois modelos teóricos pré-estabelecidos são utilizados com conceitos distintos que conseguem prever a toxicidade da mistura esperada a partir de estudos de toxicidade individual dos compostos da mistura (FREITAS et al., 2014; PÉREZ et al., 2011). Os modelos utilizados são Adição de Concentração (CA) (LOEWE e MUISCHNEK, 1926) e Ação Independente (IA) (BLISS, 1939). O primeiro modelo assume que os compostos químicos individuais têm o mesmo modo de ação e agem sobre o mesmo alvo molecular, contribuindo para uma resposta comum em proporção às suas toxicidades relativas (FERREIRA; LOUREIRO; SOARES, 2008; FREITAS et al., 2014; PÉREZ et al., 2011). De acordo com Jonker et al. (2005), o conceito de Adição de Concentração pode ser definido com a fórmula matemática:

$$\sum_{i=1}^n \frac{C_i}{EC_{xi}} = 1$$

Onde, C_i é a concentração do composto químico i na mistura e EC_{xi} é a concentração de efeito do composto químico i .

O segundo modelo, Ação Independente, assume que os compostos individuais na mistura têm diferentes modos de ação e afetam os organismos de maneira independente

um do outro durante a exposição, absorção e ação tóxica causada pelas misturas. Para esse modelo, Jonker (2005) e seus colaboradores definem a seguinte fórmula matemática:

$$Y = u_{\text{MAX}} \prod_{i=1}^n q_i(C_i)$$

Onde, Y demonstra a resposta biológica, C_i a concentração do químico i na mistura, $q_i(C_i)$ a probabilidade de não-resposta, u_{MAX} a resposta do controle para endpoints e Π a função de multiplicação.

No caso do modo de ação do composto não ser conhecido, ambos os modelos citados acima podem ser utilizados, sendo escolhido aquele que melhor se ajustar aos dados (PAVLAKI et al., 2011).

O sinergismo é observado quando os efeitos das misturas são maiores do que aqueles esperados pela somatória dos efeitos dos compostos isolados e o antagonismo é observado quando os efeitos das misturas são menores do que aqueles esperados pela somatória dos efeitos dos compostos isolados. Os desvios podem ser ainda dependentes do nível da dose (DL), sendo possível observar diferentes desvios tanto para baixas quanto para altas concentrações ou serem dependentes da proporção da dose (DR) onde é possível observar desvios diferentes a partir da composição da mistura (JONKER et al., 2005).

A representação gráfica bidimensional das concentrações isoladas em associação na mistura que podem causar um efeito de x % é denominada de Isobograma (Figura 2), onde as coordenadas cartesianas X e Y representam as concentrações dos compostos químicos e cada ponto que conecta os dois compostos representa a concentração que atinge a Concentração Efetiva (CE_x). A sinergia, aditividade ou antagonismo são encontrados quando o ponto de encontro da CE_x dos compostos em mistura estiver abaixo, sobre ou acima da linha da aditividade. Quando os pontos se encontrarem na linha de aditividade é sinal de que não houve interação na combinação dos compostos (ALTENBURGER et al., 199; CASSEE et al., 1998; KRUSE et al., 2006; RYALL e TAN, 2015; TALLARIDA, 2012).

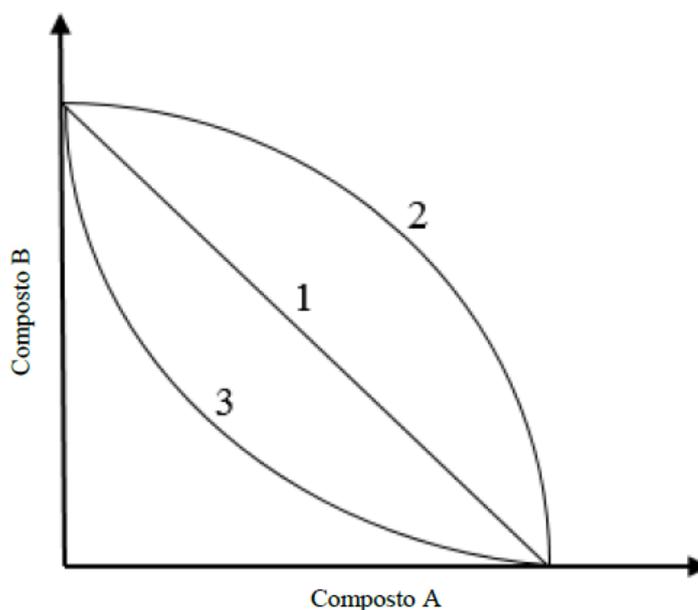


Figura 2 - Exemplo de Isoblograma representando diferentes tipos de efeito com a combinação dos compostos. A curva 1 representa a aditividade (sem interação), a curva 2 representa o antagonismo e a curva 3 representa o sinergismo (BELL, 2005).

Assim, a exposição de organismos aquáticos a uma série de compostos químicos, principalmente os defensivos agrícolas, é uma realidade que vem aumentando ao longo dos últimos anos no Brasil devido, principalmente, ao uso descontrolado, descarte inadequado e ao surgimento de novos e potentes agroquímicos que acabam atingindo nos corpos hídricos e tornam os testes de toxicidade com misturas necessários e urgentes. Já que o despejo e o surgimento de novos compostos não acompanham o ritmo dos estudos e dados que são publicados sobre os riscos ambientais que a mistura de agrotóxicos pode causar nos organismos que habitam as águas do Brasil pode-se concluir que os dados existentes são superficiais, limitados e escassos.

1.4. A Ecotoxicologia como ferramenta de avaliação ambiental

A Ecotoxicologia é uma importante área da toxicologia ambiental que concentra seus estudos nos efeitos ocasionados por agentes ambientais (físicos e químicos) sobre a dinâmica de populações e comunidades integrantes de ecossistemas definidos, utilizando como ferramentas a avaliação da qualidade dos recursos hídricos e avaliações de risco ecológico (CONNON; GEIST; WERNER, 2012; REBELO; CALDAS, 2014; RONCO et al., 2004).

O termo Ecotoxicologia é, algumas vezes, utilizado como sinônimo do termo toxicologia ambiental, entretanto a diferença é que este último também abrange os efeitos dos agentes químicos do ambiente sobre os seres humanos (STENERSEN, 2004).

Resumidamente, a Ecotoxicologia refere-se a uma sequência de eventos e causalidade que são apresentadas na figura 3 (COSTA et al., 2008). As informações obtidas por meio desses eventos são necessárias para se determinar os níveis de contaminantes no ambiente e seus destinos e, assim, estimar o grau de periculosidade dos contaminantes e seus metabólitos nos organismos vivos. Dessa maneira, pode-se prever os níveis máximos permitidos de contaminantes, ou seja, os padrões a serem mantidos, além de diagnosticar o efeito dos contaminantes no ambiente para que medidas de controle e avaliação os riscos ecológicos possam ser tomadas (de KRUIJF, 1988).



Figura 3 - Exemplos de algumas áreas de estudo da Ecotoxicologia (COSTA et al., 2008).

Assim, os ensaios de Ecotoxicologia, quando comparados com o uso de apenas análises físicas e químicas, têm a finalidade de avaliar a totalidade dos efeitos dos contaminantes puros ou em misturas, os limites aceitáveis de contaminação ambiental, suas possíveis interações, e como afetam os sistemas biológicos (AMBROZEVICIUS, 2009; COSTA et al., 2008; LOMBARDI, 2004). Além de contribuir para a regulamentação dos limites aceitáveis de contaminação ambiental, homologação e registros de produtos químicos comerciais que são utilizados no meio ambiente e em

testes com fármacos que possibilitem acompanhar e avaliar a eficácia e seus efeitos deletérios ao longo do tempo (Lombardi, 2004).

Diferentes organismos, de vários níveis tróficos, em diferentes estágios de desenvolvimento e com representatividade ecológica pertencentes a diferentes comunidades podem ser utilizados nos estudos padronizados de ecotoxicidade como, por exemplo, bactérias, protozoários, algas, insetos, microcrustáceos, plantas e peixes. A escolha do organismo-teste depende de fatores importantes como seu valor ecológico e econômico, abundância e distribuição, ciclo de vida e sensibilidade diante dos fatores de estresses ao qual serão submetidos (APHA, 1995). A escolha do organismo e sua condição de teste é de grande relevância pois os organismos respondem de maneira diferente ao mesmo fator de estresse devido, principalmente, a sensibilidade da espécie (VAN DEN BRINK et al., 2000). Portanto, não é possível prever e superestimar a sensibilidade de uma espécie a um determinado contaminante utilizando as mesmas concentrações de ensaio já previstas para outra espécie, de outro grupo taxonômico (CASTILLO et al., 2000).

Quando se fala em Ecotoxicologia e fatores de estresse, além do organismo-teste vale lembrar também das variáveis ambientais que são influenciadas pelas variações climáticas e seus eventos extremos que afetam as condições dos organismos mesmo que não haja modificação na concentração dos contaminantes. As características físicas e químicas da água podem afetar, de alguma forma, a sobrevivência, crescimento e reprodução dos organismos. São exemplos comuns de variáveis que influenciam na toxicidade dos compostos químicos, o pH, a salinidade, a radiação ultravioleta e a temperatura (DELORENZO et al., 2009). A temperatura se destaca por ser um fator determinante da homeostase nos organismos aquáticos, já que a maioria deles presentes nesse ambiente são ectotérmicos (CHANG et al., 2008). Dessa maneira, as condições térmicas locais afetam diretamente a fisiologia, o metabolismo e outros processos biológicos que são fundamentais para a sobrevivência (CHANG et al., 2008). Nos organismos aquáticos ectotérmicos, a temperatura pode alterar a absorção, distribuição, o metabolismo e a excreção de produtos químicos, fazendo com que o processo de desintoxicação fique alterado no sistema fisiológico.

Nesse sentido, é necessário avaliar a influência da temperatura em combinação com a toxicidade de outros estressores como, por exemplo, pesticidas e inseticidas, relação essa conhecida como toxicidade química termo-dependente. Apesar de se conhecer a relação entre a influência das alterações climáticas e o potencial e disponibilidade de pesticidas no ambiente (STEFFENS et al., 2013), atualmente, esse

conhecimento ainda é insuficiente e pouco investigado frente às mudanças climáticas, na relação de aumento ou diminuição da temperatura e seus efeitos interativos para espécies tropicais nos corpos de água doce.

1.5. Substâncias-teste

1.5.1. Ametrina

Os herbicidas são muito utilizados na agricultura (RELIGIA et al., 2019; TIAN et al., 2018) e, nos últimos anos, seu uso e aplicações tem sido cada vez mais ampliados, o que pode trazer efeitos adversos para o meio ambiente aquático.

O herbicida Ametrina (N2-ethyl-N4-isopropyl-6-methylthio-1,3,5-triazine-2,4-diamine, C₉H₁₇N₅S) é pertencente à classe das s-triazinas (Figura 4), umas das classes mais utilizadas e conhecidas no mundo, provavelmente devido ao seu excelente efeito seletivo sobre plantas e ervas daninhas (MANDELBAUMET al., 2008). Fazem parte desse grupo a Ametrina, atrazina, cianazina, prometon e simazina, que agem no fotossistema II, inibindo o transporte de elétrons e outros processos enzimáticos (ANVISA, 2003; EPA, 2005; FAUST et al., 2001; ROBERTS et al., 1998). Esse ingrediente ativo foi lançado na década de 50 (GAST; KNÜSLI; GYSIN, 1955) para aplicação em pré e pós emergência, para controle de ervas daninhas anuais, com folhas de estrutura anatômica estreitas e largas, associadas a culturas de abacaxi, banana, algodão, café, cana-de-açúcar, citros, mandioca, milho, uva, dentre outras.(ANVISA, 2003; RODRIGUES, B.N., ALMEIDA, 2005).

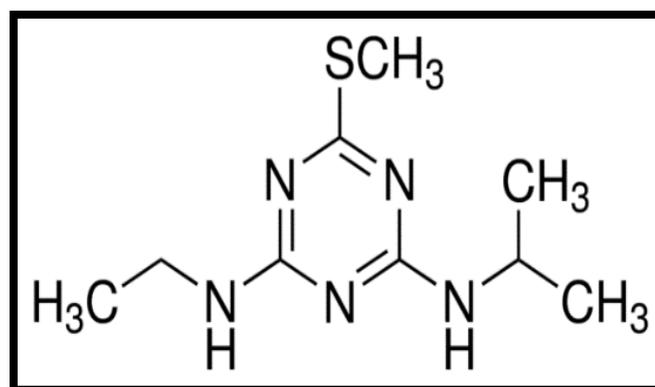


Figura 4 - Estrutura química da molécula de Ametrina (ANVISA, 2003).

É um ingrediente ativo de diversos herbicidas e comumente encontrado nos ecossistemas aquáticos, uma vez que é utilizado em aproximadamente 45 países, sendo o Brasil o maior consumidor, seguido por Tailândia, México e Cuba (HENRI, et al., 2008).

Ele tem classificação ecológica III, considerado mediamente tóxico, porém é facilmente adsorvido por colóides no solo, mantendo-se nas camadas superiores do solo ou em solos arenosos podendo ser lixiviável (ANVISA, 2003; RODRIGUES e ALMEIDA, 2005). Apesar da lixiviação ser dependente das características físicas e químicas do solo e do teor de matéria orgânica, solos com pH maior apresentam uma maior lixiviação. Assim, a Ametrina apresenta um grande potencial de atingir corpos de água.

Nas plantas e ervas daninhas, a Ametrina pode ser adsorvida pelas raízes, facilmente transportada pelo xilema, acumulando-se nos meristemas apicais e inibindo a fotossíntese ao bloquear a cadeia transportadora de elétrons (RODRIGUES e ALMEIDA, 2005).

A meia-vida do herbicida Ametrina é de 50 a 120 dias no solo e, aproximadamente, 200 dias em água natural com pH 7,0 e temperatura entre 5 a 29°C, porém seu tempo de meia-vida pode ser reduzido com o aumento da acidez, aumento da temperatura e diminuição da umidade. A Ametrina apresenta baixa volatilidade, e é medianamente sensível à fotólise. No solo, sua degradação acontece primeiramente por ação microbiana, entretanto pode ocorrer degradação química por processo de oxidação e hidrólise (Rodrigues e Almeida, 2005). Esse composto é ligeiramente solúvel em água (185 mg/100 mL) e solúvel na maioria dos solventes (56,9 g/100 mL em acetona, 61,4 g/100 / mL em cloreto de metileno, 51,6 g/100 mL em metanol, 46,0 g/100 mL em tolueno, 24,2 g/100 mL em n-octanol e 1,4 g/100 mL em n-hexano) (USEPA, 2005). Para que o solvente não interfira nos resultados, de acordo com as recomendações para uso de solventes em testes toxicológicos descritos na OECD (OECD, 2000), o valor recomendado é 100 $\mu\text{L L}^{-1}$, o qual é considerado seguro, não alterando significativamente os resultados dos ensaios.

No Brasil, muitos produtos comerciais de herbicidas utilizam como ingrediente ativo a Ametrina, conforme pode ser observado na Tabela 3.

Tabela 3. Exemplos de algumas marcas registradas de herbicidas que contém Ametrina como princípio ativo (Rodrigues e Almeida, 2005).

Ingrediente Ativo	Marca Comercial
Ametrina	<ul style="list-style-type: none"> • Gesapax-GrDa • Ametrex • Ametrina-Agripec • Ametrina-Atanor • Herbipack 500-BR • Gesapax 500-Ciba-Geigy • Metrimex 500-SC
Ametrina+diuron	<ul style="list-style-type: none"> • Ametron
Ametrina+tifloxysulfuron	<ul style="list-style-type: none"> • Krismat
Ametrina+clomazone	<ul style="list-style-type: none"> • Sinerge
Ametrina+diuron+MCPA	<ul style="list-style-type: none"> • Agritrin SC

1.5.2. Clorantraniliprole

O Clorantraniliprole (3-Bromo-*N*-[4-chloro-2-methyl-6- (methylcarbamoyl) phenyl]-1-(3- chloro-2- pyridine-2-yl)-1H-pyrazole-5-carboxamide, $C_{18}H_{14}BrCl_2N_5O_2$), pertencente ao grupo das diamidas-antranílicas (Figura 5), é utilizado nas culturas de abóbora, abobrinha, algodão, arroz, aveia, batata, brócolis, café, cana-de-açúcar, cevada, chuchu, citros, couve, couve-chinesa, couve-flor, feijão, girassol, maçã, melão, melancia, milho, soja, dentre outros, podendo ser aplicado nas folhas, diretamente no solo, nas sementes ou, ainda, pode ser pulverizado (SCHIESARI; CORRÊA, 2016; USEPA, 2008).

Esse inseticida é considerado moderadamente tóxico pela (ANVISA, 2017), caracterizado como persistente e móvel em ambientes aquáticos e terrestres (USEPA, 2008). A solubilidade na água destilada é de aproximadamente $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ($0,88 \text{ mg L}^{-1}$) a uma temperatura de 20°C e um pH 7, com uma densidade de $1,51 \text{ g mL}^{-1}$ (USEPA, 2008). Com o solvente acetona, a solubilidade é de $3,446 \pm 0,172 \text{ g L}^{-1}$ (EFSA, 2013).

O Clorantraniliprole é um produto recente no mercado, lançado e registrado em 2009 no Brasil pela DuPont (Prêmio 200 SC, 200 g i.a./L de produto comercial DuPont do Brasil S.A.) e tem um modo de ação diferenciado, agindo no combate da broca da cana-de-açúcar e do café, os quais eram combatidos até recentemente pelo proibido Endosulfan (CORDOVA et al., 2006; SCHIESARI; CORRÊA, 2016).

Os inseticidas do grupo químico das diamidas (ingredientes ativos: Clorantianiliprole, ciantraniprole, ciclaniliprole, flubendiamida) provocam ativação duradoura nos canais de cálcio no retículo sarcoplasmático dos músculos esqueléticos. Os canais de cálcio são ativados liberando um excesso de íons cálcio nos filamentos de proteínas e induzindo a contração muscular do esqueleto (CASIDA, 2009; CORDOVA et al., 2006; NAUEN; STEINBACH, 2016; RODITAKIS et al., 2017; SATTELLE; CORDOVA; CHEEK, 2008). Conseqüentemente, ocorre contração gradual do corpo, letargia, paralisia e morte do inseto (CORDOVA et al., 2006). Assim, esse pesticida atua diretamente nos receptores de rianodina, sem necessidade de uma proteína acessória (CORDOVA et al., 2006; WHALON, M.E., MOTA-SANCHEZ, D. AND HOLLINGWORTH, 2008).

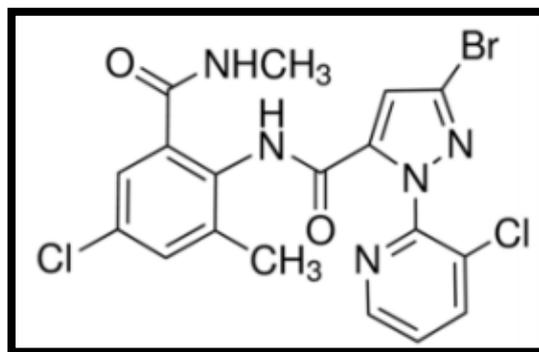


Figura 5. Estrutura química da molécula de Clorantianiliprole (Sigma Aldrich, (<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/FLUKA/32510>).

Considerando que o conhecimento sobre os efeitos ecotoxicológicos dos herbicidas e inseticidas em misturas sobre a biota aquática ainda é escasso, assim como o conhecimento dos efeitos ecotoxicológicos do herbicida Ametrina e do inseticida Clorantianiliprole sobre os cladóceros tropicais, o presente trabalho tem como objetivo além dos testes isolados com os dois compostos, avaliar os efeitos da mistura do herbicida Ametrina com o inseticida Clorantianiliprole sobre o cladóceros tropical *Ceriodaphnia silvestrii*, através da realização de testes de toxicidade agudos e crônicos e testes associados a um fator abiótico de estresse, como a temperatura, o que deverá contribuir para a melhor compreensão dos mecanismos de ação destes poluentes em organismos pertencentes ao segundo nível trófico. Os resultados deste estudo contribuirão para o

entendimento da causa e efeito desses compostos, utilizados em diversas lavouras, podendo ter seu efeito potencializado com os fatores abióticos nos organismos da base da cadeia alimentar nos ecossistemas dulcícolas, com possíveis consequências danosas à biota, a longo prazo.

1.6. Seleção de agrotóxicos

Para a seleção dos agrotóxicos utilizados nesse estudo, seis critérios foram estabelecidos:

1. Ingredientes ativos utilizados, principalmente, no cultivo de cana-de-açúcar no Brasil (AGROFIT, 2017);
2. Serem persistentes no meio ambiente (RÉGO et al., 2018);
3. Apresentarem grau de toxicidade moderada de nível II (IBAMA, 2018);
4. Apresentarem ação de desregulação endócrina (USEPA, 2012);
5. Estarem classificados entre os mais consumidos no estado de São Paulo em 2018 (IBAMA, 2018);
6. Vendas por classe de periculosidade ambiental e uso (IBAMA, 2018).

OBJETIVOS E HIPÓTESES

2. OBJETIVOS E HIPÓTESES

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo geral avaliar os efeitos isolados do herbicida Ametrina e do inseticida Clorantraniliprole e avaliar os efeitos desses pesticidas em misturas, em diferentes temperaturas, por meio de testes de toxicidade aguda e crônica, utilizando como organismo-teste o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*.

2.2. Objetivos específicos

1. Avaliar os efeitos tóxicos isolados do herbicida Ametrina e do inseticida Clorantraniliprole (padrão analítico) por meio da realização de testes de toxicidade aguda, utilizando como variável resposta a imobilidade do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*.
2. Avaliar os efeitos isolados do herbicida Ametrina e do inseticida Clorantraniliprole (padrão analítico) no crescimento e na reprodução do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, por meio da realização de testes de toxicidade crônica em concentrações sub-letais.
3. Avaliar os efeitos das misturas do herbicida Ametrina e do inseticida Clorantraniliprole (padrão analítico) na imobilidade do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* por meio da realização de testes de toxicidade crônica em concentrações sub-letais.
4. Avaliar os efeitos das misturas do herbicida Ametrina e do inseticida Clorantraniliprole (padrão analítico) no crescimento e reprodução do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* por meio da realização de testes de toxicidade crônica em concentrações sub-letais.

5. Avaliar do herbicida Ametrina (padrão analítico) sobre o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, em três diferentes temperaturas.
6. Avaliar os efeitos os efeitos agudos e crônicos do inseticida Clorantraniliprole e (padrão nalítico) sobre o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, em três diferentes temperaturas.

2.3. Hipóteses

1. A exposição de 96 horas do herbicida Ametrina e do inseticida Clorantraniliprole (padrão analítico) poderá acarretar um elevado número de indivíduos imóveis de *Ceriodaphnia silvestrii*;
2. A exposição crônica do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* (7 a 8 dias) ao herbicida Ametrina e ao inseticida Clorantraniliprole poderá acarretar na diminuição do crescimento corporal e da fertilidade das fêmeas;
3. O efeito tóxico do herbicida Ametrina, será menor nos cladóceros de *C. silvestrii* quando comparado com o efeito do inseticida Clorantraniliprole,
4. A mistura dos pesticidas Ametrina e Clorantraniliprole, terá efeito antagônico, sinérgico e dependente da dose.
5. O herbicida Ametrina terá seu efeito potencializado com a diminuição da temperatura nos cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* aclimatados a 17, 23 e 30°C nos testes de toxicidade aguda e crônica.
7. O inseticida Clorantraniliprole terá seu efeito potencializado com a diminuição da temperatura ambiente nos cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* aclimatados a 17, 23 e 30°C nos testes de toxicidade aguda e crônica.
8. O inseticida Clorantraniliprole terá seu efeito potencializado com o aumento da temperatura ambiente nos cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* aclimatados a 17, 23 e 30°C nos testes de toxicidade aguda e crônica.

2.4. Referências Bibliográficas

ABNT, A. B. D. N. T. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia spp* (Crustacea, Cladocera)**, 2017.

ABRASCO, 2012.(Associação Brasileira de Saúde Coletiva) **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJIV, 2015. Disponível em: <<http://www.abrasco.org.br/UserFiles/File/ABRASCODIVULGA/2012/DossieAGT.pdf>> Acesso: 02/05/2016.

ABHILASH, P. C.; SINGH, Nandita. Pesticide use and application: an Indian scenario. **Journal of hazardous materials**, v. 165, n. 1-3, p. 1-12, 2009.

ABREU, M. et al. The use of PCR-RFLP to genetically distinguish the morphologically close species: *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894 and *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Crustacea Cladocera). **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 1, p. 121–124, fev. 2010.

ACAYABA, R. D. **Ocorrência de agrotóxicos usados na cana-de-açúcar em corpos d'água do Estado de São Paulo**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2017.

AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>.

ALBUQUERQUE AF, RIBEIRO JS, KUMMROW F, NOGUEIRA AJ, MONTAGNER CC, UMBUZEIRO GA. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. **Environ Sci Process Impacts**. 2016 Jul 13;18(7):779-87.

ALTENBURGER, R., BÖDEKER, W., FAUST, M., GRIMME, L. Evaluation of the Isobologram Method for the Assessment of Mixtures of Chemicals: Combination Effect Studies with Pesticides in Algal Biotests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 28, n. 98–114, 1990.

AMBROZEVICIUS, A.P.. **Implicações do uso da ecotoxicologia na avaliação da qualidade de ambientes aquáticos**. Safety, Health and Environmental World Congress. **Anais**.Mongaguá: 2009

AMÉRICO, J. H. P. et al. Desreguladores endócrinos no ambiente e seus efeitos na biota e saúde humana. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 22, 31 dez. 2012.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. www.anvisa.gov.br, 2003.

ANVISA. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias//asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/divulgado-relatorio-sobre-residuos-de-agrotoxicos-em-alimentos/219201?inheritRedirect=false>. Acesso em: 2 set. 2017.

APHA, American Public Health Association. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 1368p. 19th Edition. New York. 1995.

AQUILINO, M. et al. Effects on tadpole snail gene expression after exposure to vinclozolin. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 170, p. 568–577, abr. 2019.

BARATA, C. et al. Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for multi-substance risks assessment. **Aquatic Toxicology**, v. 78, n. 1, p. 1-14, 2006.

Bell, A., 2005. Antimalarial drug synergism and antagonism: mechanistic and clinical significance. *FEMS Microbiol. Lett.* 253 (2), 171-184.

BLISS, C. **The toxicity of poisons applied jointly**. *Ann. Appl. Biol.*, v. 26, p. 585–615, 1939.

BRASIL. IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Indicadores Ambientais Nacionais. Quantidade de Agrotóxico Comercializado por Classe de Periculosidade Ambiental. Indicador: O12_M12.4_I03. 2017. Disponível em: https://www.mma.gov.br/images/arquivos/Informacoes_ambientais/ListaDeIndicadores/Quantidade_de_Agrotoxico/FM_Ibama_QuantidadedeAgrotoxico.pdf (Acessado em 20 de maio de 2020).

BREZONIK, P.L.; KING, S.O.; MACH, C. E. The influence of water chemistry on trace metal bioavailability and toxicity to aquatic organisms. **In: Metal ecotoxicology**. CRC Press, 2020. p. 1-31.

DELORENZO, M.E.; WALLACE, S.C.; DANESE, L.E.; BAIRD, T.D. Temperature and salinity effects on the toxicity of common pesticides to the Grass Shrimp, *Palaemonetes pugio*. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants and Agricultural Wastes**, v.44, n. 5, p.455-460, 2009.

DORES, E. F. G. de C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E. N. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas: vias de contaminação e dinâmica dos pesticidas no ambiente aquático. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 9, 31 dez. 1999.

CASIDA, J. E. Pest Toxicology: The Primary Mechanisms of Pesticide Action. **Chemical Research in Toxicology**, v. 22, n. 4, p. 609–619, 20 abr. 2009.

CASTILLO, G. C.; VILA, I.C.; NEILD, E.. Ecotoxicity assessment of metals and wastewater using multitrophic assays. *Environmental Toxicology: An International Journal*, v. 15, n. 5, p. 370-375, 2000.

CASSEE, F.R., GROTEN, J.P., BLADEREN, P.J., FERON, V. J. Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 28, p. 73–101, 1998.

CAVALHEIROS, D. F. **Ecotoxicologia de compostos organoclorados persistentes em um ecossistema eutrófico Represa Barra Bonita (Médio Tiête - SP)**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 1993.

CHANG, K.H., SAKAMOTO, M., HA, J.Y., MURAKAMI, T., MIYABARA, Y., NAKANO, S., I.; H., DOI, H., HANAZATO, T. Comparative study of pesticide effects (herbicide and fungicide) on zooplankton community. In: MURAKAMI, Y. ET AL. (Ed.). **Interdisciplinary studies on environmental chemistry – biological responses to chemical pollutants**. TERRAPUB, 2008. p. 361–366.

CHIARELLO, M. et al. Determinação de agrotóxicos na água e sedimentos por HPLC-HRMS e sua relação com o uso e a ocupação do solo. **Química Nova**, 20 out. 2016.

CONNON, R. E.; GEIST, J.; WERNER, I. Effect-Based Tools for Monitoring and Predicting the Ecotoxicological Effects of Chemicals in the Aquatic Environment. **Sensors**, v. 12, n. 9, p. 12741–12771, 18 set. 2012.

CORDOVA, D. et al. Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 84, n. 3, p. 196–214, mar. 2006.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

CRIST, E.; MORA, C.; ENGELMAN, R. The interaction of human population, food production, and biodiversity protection. **Science**, v. 356, n. 6335, p. 260–264, 21 abr. 2017.

DA SILVA, J. E. et al. Baseline susceptibility to chlorantraniliprole of Brazilian populations of *Plutella xylostella*. **Crop Protection**, v. 35, p. 97–101, maio 2012.

DAMASCENO DE OLIVEIRA, L. L. et al. Acute and Chronic Effects of Three Pharmaceutical Drugs on the Tropical Freshwater Cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 229, n. 4, p. 116, 15 abr. 2018.

DE KRUIJF, H. A. M. **Manual on Aquatic Ecotoxicology**. Dordrecht: Kluwer Academica, 1988.

DELORENZO, M. E.; DANESE, L. E.; BAIRD, T. D. Influence of increasing temperature and salinity on herbicide toxicity in estuarine phytoplankton. **Environmental Toxicology**, v. 28, n. 7, p. 359–371, jul. 2013.

EEA. European Environment Agency. **The impacts of endocrine disruptors on wildlife, people and their environments**. 2012.

EFSA. Guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters. **EFSA Journal**, 11(7) jul.2013.

EPA (Environmental Protection Agency). **Federal Register**. Reregistration Eligibility Decision (RED) for Ametryn. Set. 2005. Disponível em: <<https://www.govinfo.gov/content/pkg/FR-2005-09-21/pdf/05-18706.pdf>>.

FAO. **Food and Agriculture Organization. Livestock impacts on the environment. Agriculture and consumer protection**. 2006. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/magazine/0612sp1.htm>>. Acesso em: 17 jun. 2018.

FAUST, M. et al. Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. **Aquatic Toxicology**, v. 56, n. 1, p. 13–32, dez. 2001.

FERREIRA, A. L. G.; LOUREIRO, S.; SOARES, A. M. V. M. Toxicity prediction of binary combinations of cadmium, carbendazim and low dissolved oxygen on *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v. 89, n. 1, p. 28–39, ago. 2008.

FREITAS, E. C. et al. Can mixtures of cyanotoxins represent a risk to the zooplankton? The case study of *Daphnia magna* Straus exposed to hepatotoxic and neurotoxic cyanobacterial extracts. **Harmful Algae**, v. 31, p. 143–152, jan. 2014.

GAMA, A. F.; OLIVEIRA, A. H. B. DE; CAVALCANTE, R. M. Inventário de agrotóxicos e risco de contaminação química dos recursos hídricos no semiárido cearense. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 462–467, 2013.

GAST, A.; KNÜSLI, E.; GYSIN, H. Über Pflanzenwachstumsregulatoren. **Experientia**, v. 11, n. 3, p. 107–108, mar. 1955.

GAVRILESCU, M. Fate of Pesticides in the Environment and its Bioremediation. **Engineering in Life Sciences**, v. 5, n. 6, p. 497–526, dez. 2005.

GODOY, ROSSANA CATIE BUENO DE; OLIVEIRA, M. I. DE. **Agrotóxicos no Brasil: processo de registro, riscos à saúde e programas de monitoramento**. 1. ed. [s.l.] Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2003.

GRACIANI, F.S.; FERREIRA, G.L.B.V.. Descarte de medicamentos: Panorama da logística reversa no Brasil. **Revista ESPACIOS**| Vol. 35 (Nº 5) Año 2014, 2014.

GRIFFERO, L. et al. Basin-scale monitoring and risk assessment of emerging contaminants in South American Atlantic coastal lagoons. **Science of The Total Environment**, v. 697, p. 134058, dez. 2019.

HASSAN, S. A. Métodos padronizados para testes de seletividade com ênfase em Trichogramma. In: PARRA, J. R. P.; ZUCCHI, R. A. (Ed.). **Trichogramma e o controle biológico aplicado**. Piracicaba: [s.n.]. p. 207–233.

HENRI, W.; PFISTER, F.; CARROLL, B.; PARSHLEY, T. Production, development, and registration of triazine herbicides. In: LEBARON, M. H.; MCFARLAND, J. E.; BURNSIDE, O. . (Ed.). . **The triazines herbicides: 50 years revolutionizing agriculture**. [s.l.] Elsevier, 2008. p. 31–43.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). 2009IBAMA. Disponível em: <www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-deagrototoxicos/tudo>.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). 2018. **Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil:2005-2010**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrototoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrototoxicos>>.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE) 2015. Disponível em: ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Fasciculo_Indicadores_IBGE/estProdAgr_2015_05.pdf. acesso em:09/07/2015.

IEA. **Instituto de Economia Agrícola. Defensivos Agrícolas: comercialização recorde em 2013 e expectativas de acréscimo nas vendas em 2014.** 2015. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/LerTexto.php?codTexto=13467%3E>>.

IPEA. **Boletim Radar: Tecnologia, Produção E Comércio Exterior.** Disponível em: <<https://www.ipea.gov.br/sites/manualeditorial/publicacoes-do-ipea/boletins/radar>>. n. 20, 04 jun. 2012.

JONKER, M. J. et al. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level–dependent, or dose ratio–dependent effects in mixture dose–response analysis. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 10, p. 2701, 2005.

KRUSE, N.D., VIDAL, R.A., TREZZI, M. M. Curvas de resposta e isoblograma como forma de descrever a associação de herbicidas inibidores do Fotossistema II e da Síntese de Carotenoides. **Planta Daninha**, v. 24, n. 3, p. 579–587, 2006.

LEE, G.-S. et al. Voice low tone to high tone ratio: a potential quantitative index for vowel [a:] and its nasalization. **IEEE Transactions On Biomedical Engineering**, v. 53, n. 7, 2006.

LOEWE, S., MUISCHNEK, HLOEWE, S., MUISCHNEK, H. Combined effects I announcement – implements to the problem. **Arch. Exp. Pathol. Pharmacol**, v. 114, p. 313–326, 1926.

LOMBARDI, J. V. Sanidade de organismos aquáticos. In: RANZANI-PAIVA, M. J. T. .; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M. A. P. (Eds.). **Fundamentos de toxicologia aquática**. Varela, 2004. p. 263–272.

MACHADO, C. S. et al. Chemical Contamination of Water and Sediments in the Pardo River, São Paulo, Brazil. **Procedia Engineering**, v. 162, p. 230–237, 2016.

MANDELBAUM, Raphi T. et al. Microbial degradation of s-triazine herbicides. **The triazine herbicides**, v. 50, p. 301-28, 2008.

MANSANO, A. S. et al. Acute and chronic toxicity of diuron and carbofuran to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 14, p. 13335–13346, 21 maio 2018.

MAYER, FOSTER L.; ELLERSIECK, M. R. **Manual of acute toxicity: interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals**. U.S. Dept. of the Interior, Fish and Wildlife Service, 1989.

MCDUGALL, P. **A Consultancy Study for CropLife International, CropLife America and the European Crop Protection Association**, 2015. Disponível em: <<https://croplife.org/wp-content/uploads/2016/04/Cost-of-CP-report-FINAL.pdf>>

MENDES, A. M.; GONÇALVES, A. E. Zoneamento da resistência a pesticidas piretroides e organofosforados em populações de moscas-dos-chifres em Rondônia. 2015. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1047754>

MOREIRA, J. C. et al. Contaminação de águas superficiais e de chuva por agrotóxicos em uma região do estado do Mato Grosso. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 6, p. 1557–1568, jun. 2012.

NAUEN, R.; STEINBACH, D. Resistance to Diamide Insecticides in Lepidopteran Pests. In: **Advances in Insect Control and Resistance Management**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 219–240.

NOGUEIRA, E. N. et al. Currently used pesticides in water matrices in Central-Western Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 8, p. 1476–1487, ago. 2012.

OECD. (2004). **OECD Guideline for testing of chemicals *Daphnia sp.*, Acute Immobilisation Test 202**.

OECD. (2008). **OECD Guidelines for testing of chemicals *Daphnia magna* reproduction Test 2011**.

OLIVEIRA, F. E. B. **Suscetibilidade de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) a metaflumizone na cultura do milho: bases para o manejo da resistência**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2008.

PAVLAKI, M. D. et al. Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 1, p. 99–110, jan. 2011.

PÉREZ ESPEJO, ROSARIO; AGUILAR IBARRA, ALONSO; HANSEN, ANNE M.; GONZÁLEZ RODRÍGUEZ, CONSUELO; GONZÁLEZ MÁRQUEZ, LUIS CARLOS; BERNAL GONZÁLEZ, MARISELA; SANTOS BACA, ANDREA Y JARA DURÁN, A. **Agricultura y contaminación del agua**. México: [s.n.].

PÉREZ, J. et al. Growth rate of *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to herbicides found in surface waters in the Alqueva reservoir (Portugal): a bottom-up approach using binary mixtures. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 6, p. 1167–1175, 30 ago. 2011.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S. R. (ED.). **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Methods and Applications**. Washington, DC: Hemisphere Publishing Corporation, 1985.

REBELO, R. M.; CALDAS, E. D. ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT OF AQUATIC SYSTEMS AFFECTED BY PESTICIDE USE. **Química Nova**, 2014.

RÉGO, A. P. J. et al. DCPIP and Respirometry Used in the Understanding of Ametryn Biodegradation. **Journal of Environment and Ecology**, v. 9, n. 1, p. 27, 29 jun. 2018.

RELIGIA, P. et al. Atrazine exposed phytoplankton causes the production of non-viable offspring on *Daphnia magna*. **Marine Environmental Research**, v. 145, p. 177–183, mar. 2019.

RIBEIRO, R. DA S. **Monitoramento da suscetibilidade de populações de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) a inseticidas diamidas no Brasil.** Piracicaba: Universidade de São Paulo, 9 out. 2014.

ROBERTS, T.R.; HUTSON, D.H; LEE, P.W.; NICHOLLS, P.H.; ROBERTS, M. C. R. **Metabolic Pathways of Agrochemicals. Part 1: Herbicides and Plant Growth Regulators.** Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1998.

BV in Groundwater for Sustainable Development. 2018;7:20-29.

ROCHA, O. et al. Sensitivities of three tropical indigenous freshwater invertebrates to single and mixture exposures of diuron and carbofuran and their commercial formulations. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 7, p. 834–844, 20 set. 2018.

RODITAKIS, E. et al. Ryanodine receptor point mutations confer diamide insecticide resistance in tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 80, p. 11–20, jan. 2017.

RODRIGUES, B.N., ALMEIDA, F. . **Guia de Herbicidas.** 5ed. ed. Lnodrina: Instituto Plantarum, 2005.

RODRÍGUEZ, A.G.; LÓPEZ, M. I.R.; CASILLAS, Á. V.; LEÓN, J. A. A. et al. Impact of pesticides in karst groundwater. Review of recent trends in Yucatan, Mexico. **Elsevier**

RONCO, ALICIA; BÁEZ, MARÍA CONSUELO DÍAZ; GRANADOS, Y. P. CONCEPTOS GENERALES. In: CASTILLO, G. M. (Ed.). **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad De Aguas.** México: IMTA, 2004. p. 17–22.

RYALL, K.A., TAN, A. C. Systems biology approaches for advancing the discovery of effective drug combinations. **Journal of Cheminformatics**, v. 7, n. 7, p. 1–15, 2015.

SACHIN, KUMAR; ANIL, K; SHARMA, SS; RAWAT, DK; JAIN, S. Use of pesticides and livestock animals and its impact on environment in India. **Asian J. Environ. Sci.**, v. 8, n. 1, p. 51–57, 2013.

Salvatierra-Stamp, V. C., Ceballos-Magaña, S.G., Gonzalez, J., Jurado, J.M., Muñoz-Valenci,a R. Emerging contaminant determination in water samples by liquid chromatography using a monolithic column coupled with a photodiode array detector. **Anal Bioanal Chem.** 2015 Jun;407(16):4661-70.

SANCHES, S. M. et al. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, 31 dez. 2003.

SATTELLE, D. B.; CORDOVA, D.; CHEEK, T. R. Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals. **Invertebrate Neuroscience**, v. 8, n. 3, p. 107–119, 12 set. 2008.

SCHIESARI, L.; CORRÊA, D. T. Consequences of agroindustrial sugarcane production to freshwater biodiversity. **GCB Bioenergy**, v. 8, n. 3, p. 644–657, 24 maio 2016.

SEGNER, H.; SCHMITT-JANSEN, M.; SABATER, S. Assessing the Impact of Multiple Stressors on Aquatic Biota: The Receptor's Side Matters. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 14, p. 7690–7696, 15 jul. 2014.

SHORTLE, J. S.; ABLER, D. G. (EDS.). **Environmental policies for agricultural pollution control**. Wallingford: CABI, 2001.

SIAL, A. A.; BRUNNER, J. F.; DOERR, M. D. Susceptibility of *Choristoneura rosaceana* (Lepidoptera: Tortricidae) to Two New Reduced-Risk Insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 103, n. 1, p. 140–146, 1 fev. 2010.

SOUSA, A. S. et al. Estimated Levels of Environmental Contamination and Health Risk Assessment for Herbicides and Insecticides in Surface Water of Ceará, Brazil. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 96, n. 1, p. 90–95, jan. 2016.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. DE. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações**. [s.l.:(2004).

SPOSITO, J. C. V. et al. Emerging contaminants in Brazilian rivers: Occurrence and effects on gene expression in *zebrafish* (*Danio rerio*) embryos. **Chemosphere**, v. 209, p. 696–704, out. 2018.

STEFFENS, K. et al. Predicting pesticide leaching under climate change: Importance of model structure and parameter uncertainty. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 172, p. 24-34, 2013.

STENERSEN, J. **Chemical Pesticides Mode of Action and Toxicology**. 1st Editio ed. [s.l.] CRC Press, 2004.

TABREZ, S. et al. Gene–environment interactions in heavy metal and pesticide carcinogenesis. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 760, p. 1–9, jan. 2014.

TALLARIDA, R. J. Revisiting the Isobole and Related Quantitative Methods for Assessing Drug Synergism. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 342, n. 1, p. 2–8, jul. 2012.

TEMPLE, J.H.; POMMIREDDY, P.L.; COOK, D.R.; MARÇON, P. Susceptibility of Selected Lepidopteran Pests to Rynaxypyr®, a Novel Insecticide. **The Journal of Cotton Science**, v. 13, p. 23–31, 2009.

TERRA, FABIO HENRIQUE BITTES; PELAEZ, V. M. **A evolução da indústria de agrotóxicos no brasil de 2001 a 2007: a expansão da agricultura e as modificações na lei de agrotóxicos**. Conference Paper. Anais.Sociedade Brasileira de Economia, Administracao e Sociologia Rural (SOBER) > 46th Congress, July 20-23, 2008, Rio Branco, Acre, Brazil, Disponível em: <<https://ageconsearch.umn.edu/record/109607>>

TIAN, D. et al. Novel two-tiered approach of ecological risk assessment for pesticide mixtures based on joint effects. **Chemosphere**, v. 192, p. 362–371, fev. 2018.

TROCZKA, B.; ZIMMER, C. T.; ELIAS, J.; SCHORN, C.; BASS, C.; DAVIES, T. E.; FIELD, L. M.; WILLIAMSON, M. S.; SLATER, R.; NAUEN, R. Resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) is associated with a mutation in the membrane-spanning domain of the ryanodine receptor. **Insect biochemistry and molecular biology**, v. 42, n. 11, p. 873-880, 2012.

- TUNDISI, J.; MATSUMURA-TUNDISI, T. Biodiversity in the neotropics: ecological, economic and social values. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 4 suppl, p. 913–915, nov. 2008.
- USEPA. Pesticide ecotoxicity database, formerly: environmental effects database. **Environ Fate Eff Div U S EPA**, 2005.
- USEPA. United States Environmental Protection Agency Pesticide Fact Sheet: Chlorantraniliprole. **Environ. Prot. Agency, Washington**, p. 1–77, 2008.
- USEPA. Endocrine Disruptor Screening Program Universe of Chemicals. **Environ Fate Eff Div U S EPA**, 2012.
- VAN DEN BRINK, P. J. et al. Impact of the fungicide carbendazim in freshwater microcosms. II. Zooplankton, primary producers and final conclusions. **Aquatic Toxicology**, v. 48, n. 2–3, p. 251–264, mar. 2000.
- VELASCO, A. et al. Detection of residual organochlorine and organophosphorus pesticides in agricultural soil in Rio Verde region of San Luis Potosi, Mexico. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 49, n. 7, p. 498–504, 3 jul. 2014.
- VIEIRA, D. C. et al. Ecological risk analysis of pesticides used on irrigated rice crops in southern Brazil. **Chemosphere**, v. 162, p. 48–54, nov. 2016.
- WANG, X.; LI, X.; SHEN, A.; WU, Y. Baseline susceptibility of the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to chlorantraniliprole in China. **Journal of economic entomology**, v. 103, n. 3, p. 843-848, 2010.
- WALISZEWSKI, et al. Niveles de plaguicidas organoclorados en habitantes de México. **Revista Internacional De Contaminación Ambiental**, v. 29, p. 121–131, 2013.
- WHALON, M.E., MOTA-SANCHEZ, D. AND HOLLINGWORTH, R. M. Analysis of global pesticide resistance in arthropods. In: Whalon, M., Mota-Sanchez, D. And Hollingworth, R. (Ed.). **Global Pesticide Resistance in Arthropods**. CAB International, 2008. p. 5–31.
- ZAMBRONE, F. A. D. Perigosa família. **Ciência Hoje**, v. 4, n. 22, p. 44–47, 1986.
- ZHANG, W., LIU, W., ZHANG, J., ZHAO, H., ZHANG, Y., QUAN, X., JIN, Y. Characterisation of acute toxicity, genotoxicity and oxidative stress posed by textile effluent on zebrafish. **J Environ Sci (China)**. 2012;24(11):2019-27.
- ZHANG L.J., YING, G.G., CHEN, F., ZHAO, J.L., WANG, L., FANG, Y.X. Development and application of whole-sediment toxicity test using immobilized freshwater microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Environ Toxicol Chem**. 2012 Feb;31(2):377-86.

Efeitos dos agrotóxicos Ametrina e Clorantraniliprole, isoladamente em suas formas analíticas padrão sobre o cladóceros de água doce *Ceriodaphnia silvestrii*.

RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade dos agrotóxicos Ametrina e Clorantraniliprole sobre o cladóceros neotropical *Ceriodaphnia silvestrii*, isoladamente. Para isso, foram realizados testes de toxicidade aguda e crônica com os ingredientes ativos padrão para ambos os compostos. Os testes indicaram que tanto o herbicida Ametrina como o inseticida Clorantraniliprole são compostos bastante tóxicos para o organismo-teste em suas formulações padrão. Para a Ametrina, a CE_{50-48h} foi de 7320 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($IC_{95\%}$ 6490 - 7740 $\mu\text{g L}^{-1}$) e para o Clorantraniliprole, a CE_{50-48h} foi de 2,76 $\mu\text{g L}^{-1}$ ($IC_{95\%}$ 2,60 - 3,07 $\mu\text{g L}^{-1}$). Dentre os compostos estudados, o inseticida Clorantraniliprole é potencialmente mais tóxico do que o herbicida Ametrina. Com relação à toxicidade crônica, o herbicida Ametrina reduziu significativamente a reprodução do organismo-teste em concentrações a partir de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$. Já o inseticida Clorantraniliprole causou efeitos horméticos sobre a fertilidade das fêmeas do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* nas menores concentrações testadas (0,02 e 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$). Tais resultados indicaram efeitos deletérios diretos e indiretos de ambos os compostos em suas respectivas formulações padrão, levando a possíveis riscos ecológicos devido ao importante papel ecológico desempenhado por essa espécie nos corpos de água doce tropicais.

Palavras-chave: Ensaios ecotoxicológicos; microcrustáceos; inseticida; herbicida; efeitos horméticos; risco ecológico.

1.INTRODUÇÃO

Para controlar e combater pragas e doenças das mais diversas culturas, herbicidas e inseticidas são amplamente utilizados em todo o mundo pela agricultura moderna, constituindo uma ameaça em potencial para o meio ambiente, incluindo os ecossistemas aquáticos. Nos corpos de água, os agrotóxicos podem se dissolver livremente na água ou se ligar à matéria suspensa e aos sedimentos e, assim, serem transferidos para os tecidos dos organismos durante os processos de bioacumulação, resultando em consequências adversas para as espécies não-alvo, comprometendo a biodiversidade e o funcionamento dos ecossistemas (RODRIGUES et al., 2013; SCHREINEMACHERS & TIPRAQSA, 2012).

No Brasil, a cultura de cana-de-açúcar é abundante. Os primeiros cultivos de cana-de-açúcar por colonizadores portugueses datam de 1530. Nas últimas décadas, o produto gerou extrema riqueza, transformando o país em um grande produtor mundial, com abrangência de área cultivável de aproximadamente 10,4 milhões de hectares e uma produção anual de 740 milhões de toneladas (FAOSTAT, 2016). A estimativa é de crescimento nos próximos anos devido ao aumento na produção de energia limpa, renovável e com custo acessível, e.g. etanol, para utilização como biocombustível. Assim, anualmente, novos produtos agroquímicos, tais como herbicidas e pesticidas, são formulados para o controle de ervas daninhas e de outras pragas nas grandes lavouras de cana-de-açúcar, estando entre eles o princípio ativo da Ametrina, o qual é um dos padrões analíticos mais utilizados.

O Brasil está entre os maiores consumidores mundiais de agrotóxicos, principalmente devido à diversidade de culturas (policulturas) desenvolvidas e à grande abrangência de áreas cultiváveis no país (PERES e MOREIRA, 2007). Além dos herbicidas, outros pesticidas bastante eficazes no combate às pragas são os inseticidas, que se tornaram ao longo de décadas uma importante ferramenta de crescimento e otimização da atividade agrícola no país. Dentre os diversos grupos químicos utilizados em diferentes culturas está o pesticida Clorantraniliprole e, o qual é muito utilizado em culturas de cana-de-açúcar e também em culturas de soja, milho, café, arroz, aveia, girassol, batata, tomate, maçã, uva, dentre outras (ANVISA, 2014; AYALEW, 2015).

O uso excessivo de agrotóxicos torna as pragas e as doenças mais resistentes com o passar dos anos. Para se combater a resistência das doenças e das pragas nas lavouras,

são necessários estudos e o desenvolvimento de novos químicos agrícolas com modos de ação únicos e específicos (RODRIGUES et al., 2013).

A Ametrina passou a ser comercializada no Brasil por volta de 1962, tendo como nomes comerciais Evik[®] e Gesapax[®]. É um herbicida seletivo pertencente à família das triazinas, com degradação lenta, funcionando como um protetor de longa atividade nas lavouras de cana-de-açúcar (MOURA et al., 2018). Cerca de 60% das culturas de cana-de-açúcar na América Latina utilizam o princípio ativo Ametrina nas lavouras, especialmente no Brasil (SMITH et al., 2008).

O composto Ametrina (2-Ethylamino-4-isopropylamino-6-methylthio-1,3,5-triazine), apesar de proibido na Europa, é amplamente utilizado pela agricultura moderna em várias partes do mundo, incluindo o Brasil. Essa substância elimina gramíneas anuais e ervas daninhas de folhas largas. O mecanismo de toxicidade das triazinas consiste na interrupção do fluxo contínuo dos elétrons no fotossistema II (PSII) do aparato fotossintético, causando a inatividade da proteína D1 nas plantas (MIMMO et al., 2015; SANDOVAL-CARRASCO et al., 2013). A Ametrina é preferencialmente utilizada nas culturas de cana-de-açúcar, milho, soja e abacaxi {Formatting Citation}. Estudos sobre o seu risco ambiental, em específico à contaminação das águas e aos organismos aquáticos, ainda são escassos, principalmente para espécies zooplancônicas endêmicas.

Os inseticidas ainda são considerados pela agricultura moderna os melhores defensivos para o controle de uma grande variedade de pragas que podem prejudicar e condenar lavouras inteiras. Porém, o uso em larga escala traz sérios riscos ambientais (RODRIGUES et al., 2013). Assim, com base em relatórios de risco ambiental, é de extrema importância que sejam desenvolvidos novos e potentes pesticidas, menos prejudiciais, para substituir aqueles comumente utilizados e considerados nocivos aos ecossistemas aquáticos e terrestres (RODRIGUES et al., 2013).

Um desses novos pesticidas é o inseticida Clorantraniliprole (3-Bromo-4'-chloro-1-(3-chloro-2-pyridyl)-2'-methyl-6'-(methylcarbonyl)pyrazole-5-carboxanilide, 3-Bromo-N-[4-chloro-2-methyl-6-[(methylamino)carbonyl]phenyl]-1-(3-chloro-2-pyridinyl)-1H-pyrazole-5-carboxamide, DPX E2Y45), pertencente ao grupo das diamidas antranílicas (Clorantraniliprole, cyantraniliprole e flubendiamide). Esse inseticida é relativamente recente, mas sua formulação já vem sendo bastante utilizada em vários países. No Brasil, está sendo comercializado pela DuPont desde 2007 (FENOLL et al., 2015). Atualmente, as diamidas são consideradas uma nova e promissora classe de inseticidas (CUI et al., 2017; JEANGUENAT, 2013) devido, principalmente, à sua alta eficiência e seletividade no combate de uma ampla variedade

de insetos, permitindo proteção e tratamento a uma crescente quantidade de culturas (BASSI et al., 2009; CORDOVA et al., 2006; *DuPont. Altacor® & Coragen® Now Registered for Use on More Crops*, 2011; LAHM et al., 2007; RODRIGUES et al., 2013).

O modo de ação das diamidas ocorre nos receptores de rianodina, os quais, quando ativados, liberam reservas de cálcio (Ca^{2+}) de forma descontrolada, resultando em contração muscular, paralisia, letargia e morte (CORDOVA et al., 2006; CUI et al., 2017; LAHM et al., 2009; TEIXEIRA e ANDALORO, 2013). Uma característica desse grupo de inseticidas é a baixa toxicidade evidenciada em mamíferos (CORDOVA et al., 2006; LAHM et al., 2009). A alta seletividade e toxicidade do inseticida Clorantroliprole em organismos-alvo têm gerado preocupações em relação a insetos não-alvo e outros artrópodes, porém os estudos de toxicidade para organismos não-alvos ainda são bastante escassos (CUI et al., 2017). Além disso, a quantidade de estudos desse composto com espécies nativas tropicais, quando comparada com espécies de regiões temperadas, é muito inferior, fazendo com que ocorra uma crescente preocupação no âmbito da Ecotoxicologia Aquática para que novos testes de toxicidade sejam feitos, utilizando-se uma gama de espécies nativas que rotineiramente possam ser incluídas nas avaliações de risco ambiental, tornando-as mais robustas (DAAM E VAN den BRINK, 2010; MENCHACA et al., 2010).

Nas últimas décadas, é crescente o número de estudos com compostos tóxicos emergentes utilizando como alvo as mais variadas espécies nativas de ambientes aquáticos tropicais. Tais estudos têm demonstrado que, frequentemente, espécies tropicais são muito mais sensíveis quando comparadas com espécies temperadas (ALHO et al., 2020; BUI et al., 2016; de LUCCA et al., 2018; MANSANO et al., 2018; MIGUEL, 2020; MOREIRA et al., 2017; RAYMUNDO et al., 2019; ROCHA et al., 2018). Salientamos a importância desses e de mais estudos consistentes com espécies dulcícolas nativas, de modo a ampliar informações que garantam o entendimento dos variados mecanismos de ação desses químicos na biota, permitindo uma avaliação robusta e o aumento do conhecimento dos potenciais riscos ecológicos para melhoria na proteção da biodiversidade de ambientes tropicais.

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos tóxicos do herbicida Ametrina e do inseticida Clorantroliprole, ingredientes ativos padrão, sobre o cladóceros neotropical *C. silvestrii*. Esta espécie foi escolhida devido a sua ampla distribuição geográfica na América do Sul, por seu ciclo de vida curto e facilidade de cultivo, sendo considerado um dos grupos de organismos aquáticos de água doce mais sensíveis para uma ampla gama de contaminantes, além de ocupar uma posição central dentro das

cadeias alimentares aquáticas (FONSECA e ROCHA, 2004). Estudos com o princípio ativo são de grande relevância, uma vez que é necessário primeiro caracterizar os efeitos adversos dos compostos puros para depois verificar suas toxicidades nas formulações comerciais.

Neste estudo, a sensibilidade da espécie *C. silvestrii* aos agrotóxicos Ametrina e Clorantpranilprole foi avaliada por meio de testes de toxicidade aguda (valores de CE_{50-48h}) e testes de toxicidade crônica, nos quais foram avaliados o comprimento corporal, a sobrevivência, o número de ovos e o número de neonatas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Organismo-teste e condições de cultivo

O organismo-teste selecionado para este estudo foi a espécie nativa e endêmica de cladóceros da região Neotropical *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Crustacea, Cladocera). Esse cladóceros atua como consumidor primário nas cadeias alimentares aquáticas e se alimenta por filtração de material orgânico particulado. Os adultos possuem cerca de 0,8 a 0,9 mm de comprimento, corpo ovalado com acentuado sino cervical e com 9 a 12 espinhos anais no pós-abdômen (FONSECA e ROCHA, 2004), sendo encontrado no Brasil e na Argentina (ABNT NBR 13373, 2010).

O método para o cultivo em laboratório dos organismos de *C. silvestrii* e o protocolo padronizado para a sua utilização em testes de toxicidade foram previamente desenvolvidos pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 13373, 2010; FONSECA e ROCHA, 2004; SANTOS et al., 2006).

A espécie foi inicialmente coletada do reservatório do Lobo-Broa, Itirapina, SP, Brasil e mantida por cerca de 5 anos em cultivo no Laboratório de Ecotoxicologia do Departamento de Biologia Evolutiva (DEBE) da Universidade Federal de São Carlos (São Carlos, SP).

Os organismos foram cultivados em água reconstituída previamente preparada com 1,5 g de $CaSO_4 \cdot 2H_2O$ (solução 1) e 0,2 g de KCl, 4,8 g de $NaHCO_3$ e 6,1 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (solução 2), ambas as soluções diluídas em 1 L de água destilada (ABNT NBR 13373, 2017). Em um recipiente com aeração constante, a água destilada foi acrescida das duas soluções específicas (solução 1 e 2) a fim de que ela tivesse as seguintes características: pH entre 7,0 e 7,5 e dureza total entre 40 e 48 mg $CaCO_3 L^{-1}$ (ABNT NBR 13373, 2017; ASTM, 2001). Os indivíduos de *C. silvestrii* foram mantidos

em béqueres de 2 L, com um máximo de 120 indivíduos, alimentados com a alga clorofícea *Raphidocelis subcapitata* (10^5 células mL⁻¹), cultivada em meio CHU-12 (MÜLLER, 1972) e com um suplemento alimentar (1 mL L⁻¹) composto por uma suspensão de leveduras e ração para peixe preparada a partir da mistura de partes iguais de fermento biológico seco (Fleischmann®) e ração para peixe (Vitormômio®) fermentada (ABNT NBR 13373, 2017).

Os béqueres foram recobertos com um filme plástico para evitar evaporação do meio. As manutenções das culturas foram realizadas três vezes por semana, quando eram renovados a água e o alimento, sendo uma troca total da água e duas parciais (apenas 50% da água de cultivo era renovada). Os cultivos de *C. silvestrii* foram mantidos em incubadoras com temperatura controlada a 25°C e com fotoperíodo de 12/12 horas de claro/escuro.

2.2. Substâncias e soluções-estoque

Os compostos Ametrina (CAS n° 834-12-8) e Clorantraniliprole (CAS n° 500008-45-7) com pureza $\geq 98\%$ (padrão analítico) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O herbicida Ametrina foi diluído em acetona de grau analítico (C₃H₆O; LabSynth) e sua solução-estoque preparada pela diluição de uma quantidade específica em água de cultivo (água reconstituída) imediatamente antes dos testes devido a sua baixa solubilidade em água que pode chegar até 209 mg L⁻¹ a 25°C (National Center for Biotechnology Information (a), 2021) O inseticida Clorantraniliprole também foi diluído em acetona de grau analítico (C₃H₆O; LabSynth) devido à baixa solubilidade em água que pode chegar até 1,0 mg L⁻¹ a 20°C (National Center for Biotechnology Information (b), 2021).

As concentrações nominais de cada composto testado foram obtidas pela diluição da solução-estoque, a qual também foi feita em água de cultivo (água reconstituída).

2.3 Testes de sensibilidade com a substância de referência cloreto de sódio

Testes de sensibilidade aguda (48 h) com a substância de referência cloreto de sódio (NaCl) foram realizados periodicamente para avaliar as condições fisiológicas dos organismos cultivados no laboratório e, conseqüentemente, garantir a confiabilidade e precisão dos dados durante os testes de toxicidade aguda e crônica de acordo com as diretrizes da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 13373, 2017).

Cinco neonatas (6 a 24 h de idade) foram colocadas em recipientes de plástico de poliestireno de 50 mL, os quais continham 15 mL de solução-controle (apenas água de cultivo) e as soluções-teste. As concentrações experimentais foram testadas em réplicas que variaram de 0,6 a 2,2 g L⁻¹. Essas concentrações foram preparadas por diluição de uma solução-estoque de 100 g L⁻¹, utilizando água reconstituída como diluente. Os indivíduos de *C. silvestrii* foram mantidos nas mesmas condições de cultivo, sem iluminação e alimento durante todo o período de exposição. Após 48h, o número de organismos imóveis foi contado para obter os valores de CE_{50-48h}. Os organismos foram considerados saudáveis e adequados para o uso nos testes de toxicidade quando os valores de CE_{50-48 h} estavam dentro dos limites já pré-estabelecidos (1,0 a 1,83 g L⁻¹) para essa substância de referência (CASALI-PEREIRA et al., 2015). O teste foi considerado válido quando a porcentagem de organismos imóveis no controle não excedeu 10% (ABNT NBR 13373, 2017)

As variáveis pH, temperatura da água, condutividade elétrica, dureza e concentração de oxigênio dissolvido foram medidos no início e no final dos testes.

2.4. Testes de toxicidade aguda e crônica

Os testes de toxicidade aguda e crônica com o cladóceros *C. silvestrii* seguiram as diretrizes pré-estabelecidas pela Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD, 2004; 2008) e pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 13373, 2017). Testes preliminares foram necessários para se estabelecer a faixas de concentrações que seriam utilizadas para cada composto nos testes definitivos. Os testes de toxicidade aguda foram realizados com as seguintes faixas de concentrações nominais: 500 a 20.000 µg L⁻¹ de Ametrina e 1,2 a 9,0 µg L⁻¹ de Clorantraniliprole. Essas concentrações foram preparadas por diluição a partir das soluções-estoque de 20.000.000 µg L⁻¹ para o composto Ametrina e 18.000 µg L⁻¹ para o Clorantraniliprole.

Nos testes de toxicidade aguda, cinco réplicas foram utilizadas por tratamento. Cada réplica continha cinco neonatos (6-24h de idade) em um recipiente de polipropileno atóxico com 15 mL de solução-teste ou 15 mL de água reconstituída (controle). Para ambos os compostos, foi necessário adicionar um controle-solvente (água reconstituída + acetona) em uma concentração nominal de 0,01% de acetona (v/v). Os organismos expostos não foram alimentados no decorrer dos experimentos e foram mantidos em incubadora na temperatura constante de 25 ± 1°C e no escuro, como recomendado pela OECD (2004) e ABNT NBR 13373 (2017). Após 48h de exposição, os organismos foram

observados sob microscópio estereoscópico e o número de indivíduos imóveis foi contado e usado para o cálculo da concentração efetiva mediana (CE_{50-48h}) de cada composto estudado.

Os testes de toxicidade crônica foram realizados utilizando-se dez réplicas, cada uma contendo uma neonata (6-24h de idade) em 15 mL de solução-teste ou 15 mL de água reconstituída (controle). Um controle-solvente (0,01% de acetona, v/v) foi adicionado. Os testes foram dinâmicos, sendo as soluções-teste renovadas diariamente. A duração do experimento foi de sete dias e os organismos foram alimentados e mantidos sob as mesmas condições de temperatura e fotoperíodo descritas para o cultivo. Diariamente, durante o período experimental, os organismos foram observados sob microscópio estereoscópico, a fim de verificar a sobrevivência das fêmeas, o número de ovos e o número de descendentes, os quais eram contados e descartados a cada renovação do meio.

Para garantir a variabilidade e a reprodutibilidade dos valores de toxicidade encontrados, dez testes definitivos de toxicidade aguda e três testes de toxicidade crônica foram realizados. Além disso, as variáveis abióticas, tais como o pH, a temperatura da água, a condutividade elétrica, a dureza e a concentração de oxigênio dissolvido, foram medidas no início e no final dos testes de toxicidade aguda e diariamente nos testes de toxicidade crônica.

2.5. Análise dos dados

Os valores de CE_{50-48h} e seus respectivos intervalos de confiança de 95% para os testes de toxicidade aguda foram calculados por regressão não linear, ajustando-se uma equação logística aos dados no software Statistica 7.0 (Statsoft, 2004). Já os dados dos testes de toxicidade crônica foram submetidos à análise de normalidade (teste de Chi-Quadrado) e homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett) e, em seguida, a análise de variância (ANOVA). Os testes de Tukey e Kruskal-Wallis foram utilizados para verificar a existência de diferenças entre os tratamentos e o controle em dados que seguiram uma distribuição normal. Nos testes estatísticos, diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do *software* BioEstat 5.3 (AYRES et al., 2007).

3. RESULTADOS

3.1. Variáveis abióticas dos testes de toxicidade aguda e crônica

Durante todos os dez testes de toxicidade aguda com cada composto, os valores de pH das soluções-teste ficaram dentro do intervalo de 7,0 a 7,5, não variando mais que 1,0 unidade por teste. A dureza da água variou de 40 a 42 mg CaCO₃ L⁻¹, enquanto que a temperatura da água permaneceu estável a 25°C em todos os testes. O oxigênio dissolvido variou de 8,0 a 8,5 mg L⁻¹ e a condutividade elétrica ficou entre 160 e 165 μS cm⁻¹.

Nos três testes de toxicidade crônica realizados com cada composto, os valores de pH das soluções-teste ficaram dentro do intervalo de 7,0 a 8,3, não variando mais que 1,0 unidade por teste. A dureza da água variou de 40 a 44 mg CaCO₃ L⁻¹ e a temperatura da água ficou entre 24 e 25°C. O oxigênio dissolvido variou de 6,08 a 8,26 mg L⁻¹, enquanto que a condutividade elétrica ficou entre 160 e 165 μS cm⁻¹. Assim, todos os testes preencheram os critérios de validade estabelecidos nas orientações fornecidas tanto pela OECD (2004, 2008) como pela ABNT NBR 13373 (2017).

3.2. Testes de Sensibilidade com a substância de referência cloreto de sódio

Os valores de CE_{50-48 h} dos testes de sensibilidade com cloreto de sódio (NaCl) para o cladóceros *C. silvestrii* ficaram dentro dos limites inferior e superior da tabela de controle determinada neste estudo, ou seja, 1,42 a 1,60 g L⁻¹, mostrando que os organismos estavam saudáveis o suficiente para serem utilizados nos ensaios de toxicidade de acordo com a faixa de referência de 1,00 a 1,83 g L⁻¹ obtida para testes com 48 h de exposição (CASALI-PEREIRA et al., 2015; DE LUCCA et al., 2018; MACHADO et al., 2009; MANSANO et al., 2016; MIGUEL, 2020; TAKENAKA, 2007) (Figura 1).

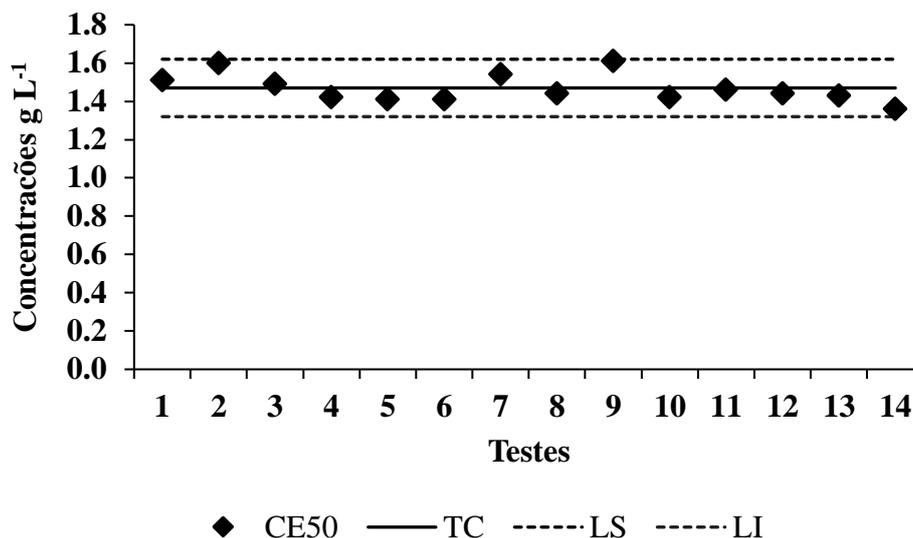


Figura 1. Faixa de sensibilidade de *Ceriodaphnia silvestrii* (CE₅₀-48h) à substância de referência cloreto de sódio com base nos resultados de 14 testes de toxicidade aguda. Os limite superior (LS) e o limite inferior (LI) foram de 1,32 e 1,62 g L⁻¹, respectivamente, com uma tendência central (TC) de 1,47 g L⁻¹.

3.3. Testes de toxicidade com o cladóceros *C. silvestrii*

No final dos testes de toxicidade aguda e crônica, a sobrevivência dos organismos de *C. silvestrii* foi de 100%, tanto controle como no controle com solvente, mostrando que não houve diferença significativa ($\pm 10\%$ de organismos imóveis) entre os resultados do controle e do controle com solvente (0,01% de acetona). Assim, exclui-se qualquer possibilidade de interferência do solvente nos resultados dos testes de toxicidade aguda e crônica.

Para os testes de toxicidade aguda com os compostos Ametrina e Clorantianiliprole, os valores de CE₅₀-48h foram calculados separadamente para cada um dos dez testes realizados nesse estudo. Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Com os dados relativos aos dez testes de toxicidade aguda também foi possível calcular a CE₁₀-48h, que corresponde ao NOEC (Concentração de Efeito Não Observado) para ambos os compostos. O valor médio da CE₁₀-48h encontrado para o herbicida Ametrina foi de $2.728 \pm 19,6 \mu\text{g L}^{-1}$ e para o inseticida Clorantianiliprole foi de $1,06 \pm 0,22 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 1. Valores de CE₅₀-48h do herbicida Ametrina e do inseticida Clorantraniliprole e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) obtidos nos testes de toxicidade aguda realizados com o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*.

Número do teste	Ametrina		Clorantraniliprole	
	CE ₅₀ -48h (µg L ⁻¹)	IC (95%)	CE ₅₀ -48h (µg L ⁻¹)	IC (95%)
1	7640	6370-8910	2,72	2,38-3,06
2	6960	5800-8120	2,73	2,35-3,11
3	7700	6240-9160	3,07	2,73-3,41
4	6490	4820-8160	2,61	2,29-2,93
5	7750	6780-8720	2,89	2,54-3,24
6	6990	5810-8180	2,69	2,25-3,06
7	7370	6190-8560	2,66	2,25-3,06
8	7580	6310-8850	2,60	2,08-3,11
9	7740	6530-8950	2,73	2,42-3,05
10	6960	5690-8220	2,91	2,55-3,26
Média	7318		2,76	
Desvio-padrão	439,1		0,14	
Coefficiente de Variação (%)	6,00		5,15	
Faixa de sensibilidade	6490 - 7750		2,60 - 3,07	

Os resultados encontrados neste estudo demonstraram um aumento na toxicidade aguda com o aumento gradual das concentrações testadas, tanto para o herbicida Ametrina (Kruskal-Wallis, H=67,01; p < 0,001) como para o inseticida Clorantraniliprole (Kruskal-Wallis, H=77,15; p < 0,001). Possivelmente, houve um aumento proporcional do gasto energético sofrido pelos organismos na tentativa de manutenção da vida (Figura 2). Para a Ametrina, até a concentração de 1000 µg L⁻¹, menos de 20% dos organismos ficaram imóveis, enquanto que a partir da concentração de 5000 µg L⁻¹, em média, mais de 30% dos organismos de *C. silvestrii* ficaram imóveis e a partir da concentração de 15000 µg L⁻¹, em média, mais de 85% dos organismos ficaram imóveis após 48h de exposição. Valores bem abaixo dos encontrados para a Ametrina foram observados para o Clorantraniliprole. Para a concentração de 1,2 µg L⁻¹, em média, mais de 20% dos organismos ficaram imóveis após 48h de exposição a esse inseticida. Na concentração de 6 µg L⁻¹, 85% dos organismos ficaram imóveis e, na concentração de 9 µg L⁻¹, 100% dos organismos ficaram imóveis ao final do teste de toxicidade aguda. Esses dados indicam uma maior toxicidade do inseticida Clorantraniliprole ao ser comparado com o herbicida Ametrina.

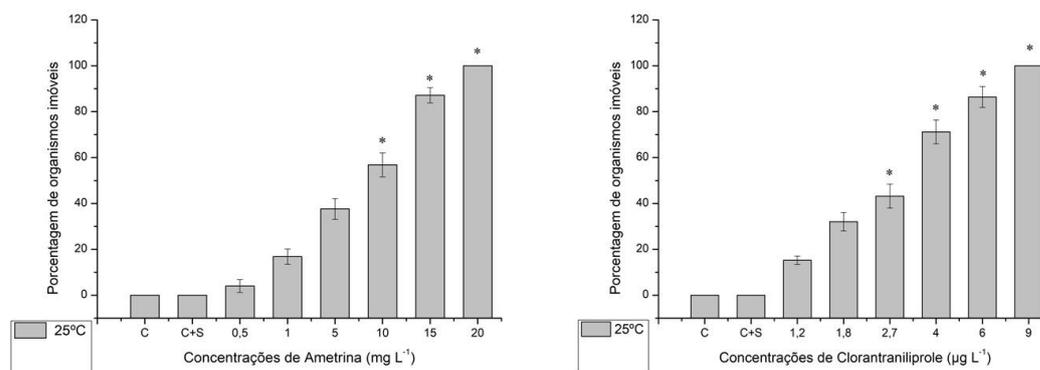


Figura 2. Média das porcentagens (\pm desvio-padrão) dos organismos imóveis do cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* durante os dez testes de toxicidade aguda nas diferentes concentrações testadas do herbicida Ametrina (A) e do inseticida Clorrantraniliprole (B).

Os comprimentos corpóreos obtidos para os indivíduos de *C. silvestrii* antes da exposição mostraram que os organismos tinham o mesmo tamanho para os diferentes tratamentos e controle (para Ametrina: Kruskal-Wallis, $H= 4,79$; $p > 0,05$; para Clorrantraniliprole : Kruskal-Wallis, $H= 1,27$; $p > 0,05$).

Após 7 dias de exposição, não houve diferenças significativas no comprimento corporal dos organismos expostos ao herbicida Ametrina quando comparados com o controle (Kruskal-Wallis, $H= 6,05$; $p > 0,05$). Já para o pesticida Clorrantraniliprole, ocorreram diferenças significativas no comprimento corporal em relação ao controle nas duas maiores concentrações testadas ($0,14$ e $0,28 \mu\text{g L}^{-1}$) (Kruskal-Wallis, $H= 46,50$; $p < 0,05$) (Figura 3). Para o comprimento corpóreo, a maior concentração sem qualquer efeito observável (CENO) foi de $160 \mu\text{g L}^{-1}$ para Ametrina e de $0,07 \mu\text{g L}^{-1}$ para o Clorrantraniliprole, enquanto que a menor concentração com efeito observável (CEO) não pode ser estimada para Ametrina e foi de $0,14 \mu\text{g L}^{-1}$ para o Clorrantraniliprole.

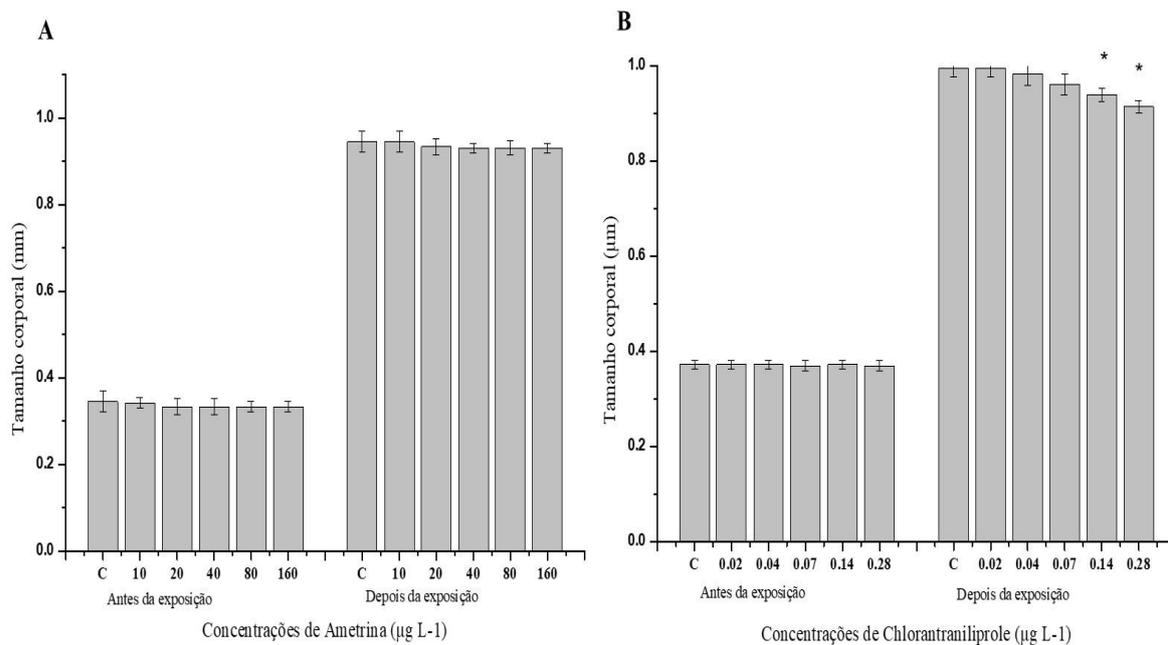


Figura 3. Comprimento corpóreo médio de *Ceriodaphnia silvestrii* (mm) antes e depois da exposição ao herbicida Ametrina (**A**) e ao inseticida Clorantraniliprole (**B**) para as cinco concentrações testadas nos testes de toxicidade crônica. Os asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação ao controle.

Nos experimentos com o herbicida Ametrina, houve diferença significativa entre a última concentração testada e o controle com relação à sobrevivência dos indivíduos de *C. silvestrii* para os testes de toxicidade crônica (Kruskal-Wallis, $H= 19,89$; $p < 0,05$). O mesmo ocorreu quando os espécimes de *C. silvestrii* foram expostos ao inseticida Clorantraniliprole, diferenças significativas foram observadas nas duas maiores concentrações testadas ao serem comparadas com o controle (Kruskal-Wallis, $H= 16,99$; $p < 0,05$) (Figura 4).

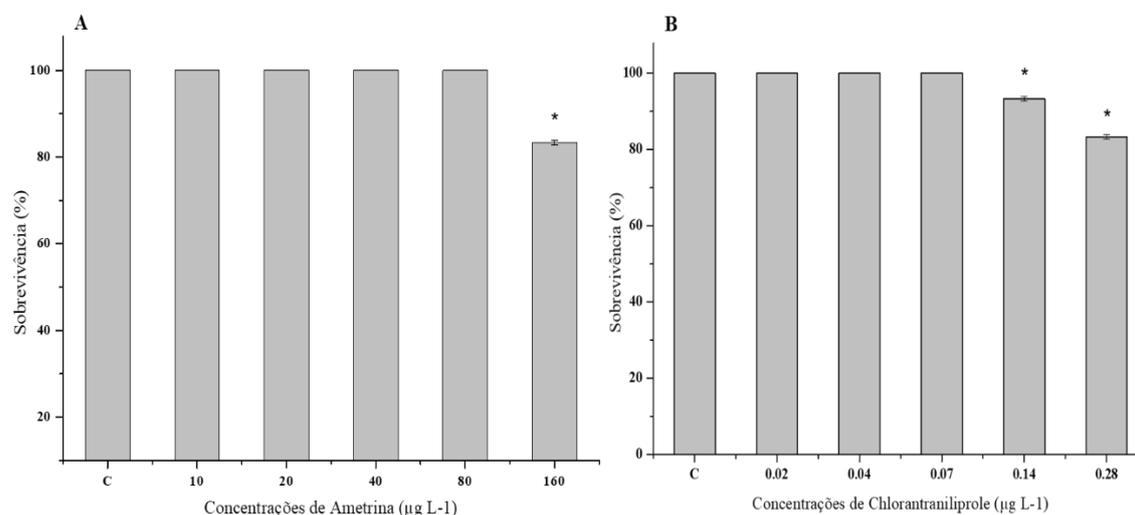


Figura 4. Porcentagem de sobrevivência (%) das fêmeas de *Ceriodaphnia silvestrii* após 7 dias de exposição a diferentes concentrações do herbicida Ametrina (A) e do inseticida Clorantraniliprole (B) nos testes de toxicidade crônica. O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle ($p < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis).

Os resultados obtidos nos testes de toxicidade crônica mostram que os agrotóxicos Ametrina e Clorantraniliprole causaram efeitos negativos significativos na reprodução das fêmeas de *C. silvestrii*.

Para o herbicida Ametrina, uma redução significativa no número de ovos e no número de neonatas por fêmea foi observada nas concentrações que variaram entre 20 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$ e entre 10 e 160 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Figura 5 A e B). Para o inseticida Clorantraniliprole, no entanto, foram observados efeitos estimulantes (hormesis), com um aumento significativo no número de ovos e no número de neonatas por fêmea nas concentrações de 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$ e de 0,02 e 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (Figura 5 C e D). Uma diminuição significativa no número de ovos e no número de neonatas por fêmea foi observada nas concentrações de 0,14 e 0,28 $\mu\text{g L}^{-1}$ do inseticida Clorantraniliprole (Figura 5 C e D). Os resultados estatísticos foram todos dados pelo teste de Tukey [Ametrina: número de ovos ($F_{6,203} = 341,17$; $p < 0,001$) e número de neonatas por fêmea ($F_{6,203} = 917,54$; $p < 0,001$) e Clorantraniliprole: número de ovos ($F_{6,203} = 321,26$; $p < 0,001$) e número de neonatas por fêmea ($F_{6,203} = 665,64$; $p < 0,001$)].

Para o número de ovos, os valores de CENO e CEO foram, respectivamente de 10 e 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o herbicida Ametrina e de 0,07 e 0,14 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o inseticida Clorantraniliprole. Para o número de neonatas por fêmea, o valor de CENO não pode ser calculado para a Ametrina e o valor de CEO foi $\geq 10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Ametrina, enquanto os

valores de CENO e CEO foram, respectivamente de 0,07 e 0,14 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o inseticida Clorantianiliprole.

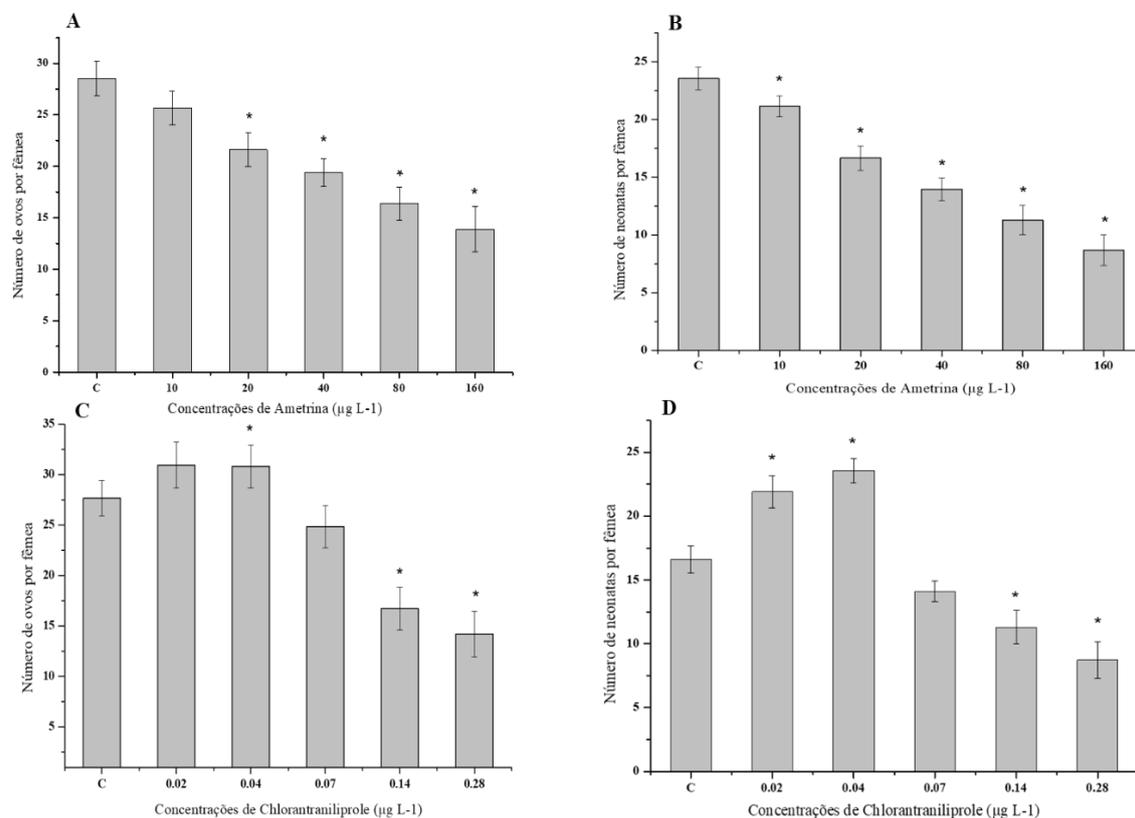


Figura 5. Número de ovos e neonatos produzidos por fêmea (média \pm DP) do cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostos por 7 dias a várias concentrações do herbicida Ametrina (A e B) e do inseticida Clorantianiliprole (C e D) em testes de toxicidade crônica. O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle (Teste de Tukey; $p < 0,001$).

4. DISCUSSÃO

Herbicidas e inseticidas fazem parte do grupo dos pesticidas e são encontrados com frequência em ambientes como o solo, a água dos rios, aquíferos, o mar e áreas remotas como as geleiras, o que os tornam fatores de risco iminente em todo o mundo devido ao seu potencial de desregulador endócrino, além de contribuir para a origem de várias doenças em seres humanos, tais como o câncer (DECOURTEN et al., 2019; MATTHIESSEN et al., 2018; SCOGNAMIGLIO et al., 2016). Uma grande quantidade

de novos produtos surge no mercado e são aplicados nos solos anualmente. Evidências têm sugerido que esses produtos podem permanecer por décadas no solo, causando impactos desconhecidos e ainda controversos no meio ambiente (GRIFFERO et al., 2019; MACHADO et al., 2016).

Neste estudo, evidenciamos o efeito tóxico de dois desses compostos, o herbicida Ametrina e o inseticida Clorantraniliprole, ambos bastante utilizados em diversas culturas como a cana-de-açúcar, em uma espécie nativa tropical de cladóceros, a *C. silvestrii*. Esse microcrustáceo tem importante papel ecológico em ecossistemas de água doce, uma vez que compõe a base das cadeias alimentares. Até a presente data, estudos ecotoxicológicos envolvendo esses agrotóxicos e essa espécie nativa de cladóceros são inexistentes, de acordo com o banco de dados da USEPA (2005) (<http://cfpub.epa.gov/ecotox/>) e com pesquisas na literatura, razão pela qual o modo de ação desses pesticidas nessa espécie ainda não está totalmente esclarecido.

Comparando-se os valores médios da CE_{50-48h} do herbicida Ametrina ($7320 \mu\text{g L}^{-1}$) e do inseticida Clorantraniliprole ($2,76 \mu\text{g L}^{-1}$) obtidos no presente estudo, verificou-se que este último é aproximadamente 2.652 vezes mais tóxico. A alta toxicidade do Clorantraniliprole está relacionada, principalmente, ao seu modo de ação específico para artrópodes, em particular os insetos. Esse inseticida estimula a liberação do cálcio ao se ligar a moléculas receptoras de rianodina, presentes em músculos, células epiteliais e neurônios, afetando a homeostase das células nervosas e musculares, acarretando contrações musculares anormais, estresse oxidativo e impedindo o indivíduo de se alimentar, por consequência, levando-o à paralisia e à morte (CORDOVA et al., 2006; LAVTIŽAR et al., 2015; SATTELLE et al., 2008; TEIXEIRA e ANDALORO, 2013). Devido ao seu modo de ação específico, esse inseticida é capaz de atingir uma grande variedade de insetos (Qi et al., 2014). Já o herbicida Ametrina, pertencente ao grupo das triazinas, é considerado um potente inibidor da fotossíntese, por interferir no transporte de elétrons do fotossistema II e em outros processos enzimáticos (ANVISA, 2003; DUKE, 1990; RELIGIA et al., 2019; ROBERTS et al., 2007; SILVEYRA et al., 2018; USEPA, 2005), não agindo em microcrustáceos como alvos específicos. Apesar disso, uma alta sensibilidade do cladóceros *C. silvestrii* ao herbicida Ametrina foi encontrada neste estudo, com evidências de efeitos tóxicos significativos nesta espécie. É importante que tais efeitos sejam considerados, pois no ambiente aquático, organismos zooplânctônicos podem ter sua sobrevivência e reprodução afetadas devido à inibição de seus movimentos, o que também prejudica sua capacidade de fuga e sua alimentação (filtradores).

Até a presente data, não foram encontrados dados disponíveis na literatura para testes de toxicidade aguda e crônica com o herbicida Ametrina para a espécie *C. silvestrii* e poucos foram os estudos já realizados com cladóceros (FARRÉ et al., 2002; RÉGO et al., 2017), enquanto que para outros compostos do grupo das triazinas ou compostos que apresentam modos de ação similares, tais estudos já são bastante consolidados para as mais diversas espécies aquáticas (de ALBUQUERQUE et al., 2020; MANSANO et al., 2016; MONTIEL-LEÓN et al., 2019; MOREIRA et al., 2014; RELIGIA et al., 2019; SILVEYRA et al., 2018; SOUSA et al., 2016; ZHENG et al., 2017). Dados comparativos quanto à concentração do herbicida Ametrina que causou a imobilidade dos organismos (CE₅₀-48h) mostram que a espécie *C. silvestrii* foi muito mais sensível quando comparada às espécies *Daphnia similis* e *Daphnia magna* (25730 µg L⁻¹ e 28000 µg L⁻¹, respectivamente) (Farré et al., 2002; Régo et al., 2018). A partir da concentração de 20.000 µg L⁻¹, os organismos de *C. silvestrii* não apresentaram nenhuma mobilidade (CL₅₀-48h), enquanto que para os organismos de *Daphnia similis*, a concentração foi aproximadamente 2,5 vezes maior. Para outras espécies de crustáceo, como o Anostraca *Artemia* sp., o herbicida Ametrina, também pode ser considerado muito tóxico, resultando em uma CL₅₀ variando entre 20.000-50.000 µg L⁻¹, uma vez que, em média, a toxicidade de herbicidas do grupo das triazinas, para a ordem de Cladocera pode ser encontrada em torno de 43.000 µg L⁻¹ (SÁNCHEZ-BAYO, 2006).

Para o inseticida Clorantraniliprole, nosso estudo mostrou que, mesmo em baixa concentração, esse pesticida é extremamente tóxico para a espécie *C. silvestrii*, elevando o potencial de risco ecológico para o meio ambiente aquático. Para a espécie *Daphnia magna*, foi encontrado um valor de CE₅₀-48h de 8,5 µg L⁻¹ de Clorantraniliprole (CUI ET AL., 2017). Essa concentração foi cerca de 3 vezes maior que a encontrada em nosso estudo para a espécie *C. silvestrii* (2,76 µg L⁻¹). Outros autores afirmam que, apesar das espécies tropicais serem consideradas mais sensíveis a contaminantes emergentes, a espécie *Daphnia magna*, que ocorre em regiões temperadas, também é um invertebrado de água doce da ordem Cladocera e, assim como *C. silvestrii*, desempenha um papel muito importante na cadeia alimentar, ficando entre os produtores primários e os peixes, por isso, alterações no ambiente, afetam significativamente essas espécies (BANG et al., 2015). Por seu fácil cultivo e manutenção em laboratório, essa espécie é bastante estudada e também possui uma sensibilidade alta para uma variedade de produtos químicos (TOUMI et al., 2015). Além disso, esses dados precisam ser vistos com cuidado, uma vez que cada espécie possui suas próprias características como, por exemplo, tamanho e idade, além de apresentarem diferenças nas próprias condições em que os organismos são

mantidos no laboratório e/ou como os testes são conduzidos como, por exemplo, as variáveis físicas e químicas, meio de ensaio, alimentação e fotoperíodo (FREITAS e ROCHA, 2012; MANSANO et al., 2016; MOREIRA et al., 2014).

Com relação à toxicidade crônica, os agrotóxicos Ametrina e Clorantranilprole apresentaram efeitos sobre a reprodução de *C. silvestrii*. Além disso, para os organismos expostos ao inseticida Clorantranilprole, uma redução significativa no comprimento do corpo foi observada nas duas maiores concentrações testadas, 0,14 e 0,28 ug L⁻¹, quando comparadas com o controle, enquanto que para o herbicida Ametrina nenhuma diminuição significativa foi observada nas concentrações testadas. Cui et al. (2017), para o cladóceros *Daphnia magna*, também encontraram uma diminuição do tamanho corporal com o aumento das concentrações-teste, com diminuição significativa do tamanho corporal a partir da concentração de 4,5 ug L⁻¹ após 21 dias de exposição. A diminuição do tamanho corpóreo está intimamente relacionada com a capacidade reprodutiva, o que pode gerar diminuição significativa do número de descendentes porque leva a uma diminuição da câmara de incubação, o que dificulta a acomodação dos ovos, uma vez que há um comprimento mínimo do corpo que os cladóceros precisam atingir para que consigam produzir ovos normalmente (CUI et al., 2017; de LUCCA et al., 2018; GREEN, 1956; LEBLANC e MCLACHLAN, 1999; RÉGO et al., 2017; Z. MACIEJ GLIWICZ; BOAVIDA, 1996). Mais estudos ecotoxicológicos que relacionem o tamanho corporal de cladóceros com sua capacidade reprodutiva são necessários para o completo entendimento dos efeitos dos químicos emergentes sobre os processos reprodutivos desses microcrustáceos e os consequentes efeitos sobre suas populações e, em última análise, sobre as cadeias alimentares aquáticas ao longo do tempo.

O herbicida Ametrina reduziu significativamente o número de ovos e de descendentes das fêmeas de *C. silvestrii* em concentrações a partir de 10 ug L⁻¹. Comparando-se esses dados com os de outras espécies para o mesmo grupo de herbicida, *C. silvestrii* é significativamente mais sensível ao composto. Sua sobrevivência foi afetada significativamente no decorrer dos 7 dias de exposição, é possível admitir que houve uma diminuição da mobilidade na concentração 160 µg L⁻¹, indicando que a toxicidade desse herbicida aumenta com o passar do tempo de exposição. Até onde sabemos, não existem estudos na literatura abordando os efeitos desse herbicida sobre a reprodução de *C. silvestrii*. No entanto, para outro herbicida triazínico, Mansano et al. (2016) relataram redução na fertilidade de *C. silvestrii* exposta ao herbicida Diuron na concentração de 250 µg L⁻¹. Para a espécie de peixe *Danio rerio* exposta ao herbicida Ametrina, Moura et al. (2018) encontraram uma diminuição e retardo na fertilidade e no

desenvolvimento de seus embriões em concentrações de $47.600 \mu\text{g L}^{-1}$. Efeitos na reprodução e consequente diminuição no número de descendentes também foram observados no lagostim *Procambarus clarkii*, no copépode marinho *Tigriopus japonicus* e em rotíferos *Brachionus calyciflorus* para herbicidas triazínicos (LU et al., 2012; SILVEYRA et al., 2018; YOON et al., 2019). Em relação aos valores de CENO-7d = $10,0 \mu\text{g L}^{-1}$ e CEO-7d = $20,0 \mu\text{g L}^{-1}$, a espécie *C. silvestrii* foi muito mais sensível quando comparada com a espécie *D. magna* (CENO-21d = $240 \mu\text{g L}^{-1}$ e CEO-21d = $320 \mu\text{g L}^{-1}$ (USEPA, 2005). Portanto, dados adicionais são necessários para conhecimento e aprofundamento dos efeitos de toxicidade do herbicida Ametrina em organismos que vivem na zona limnética dos corpos d'água.

Este estudo, ao longo de 7 dias, demonstrou que o inseticida Clorantraniliprole afeta severamente a produção de ovos e o número de descendentes, comprometendo a história de vida do cladóceros *C. silvestrii* ao longo do tempo. Uma relação clara entre a concentração-resposta para a população foi observada quando os dados nos revelaram efeito hormesis para o número de ovos na concentração de $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$ e para o número de neonatas nas duas concentrações mais baixas ($0,02$ e $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$), enquanto que nas maiores concentrações testadas ocorreu um retardo na maturação reprodutiva que, consequentemente, afetou significativamente a fecundidade das fêmeas de *C. silvestrii*. Portanto, o parâmetro reprodutivo foi significativamente mais sensível do que a sobrevivência de *C. silvestrii*. Outros autores também relataram, em seus estudos, uma sensibilidade maior do parâmetro reprodutivo quando comparado com a sobrevivência para organismos aquáticos expostos a produtos químicos emergentes (CUI et al., 2017; KNOPS et al., 2001; SANCHO et al., 2016). Semelhante aos nossos resultados, Cui et al. (2017) relataram que o inseticida Clorantraniliprole afetou severamente a reprodução de *D. magna* em 21 dias de teste, porém, diferiu dos nossos resultados, quando relataram que a sobrevivência dessa espécie também foi bastante afetada no decorrer do tempo de exposição. Diferentemente dos nossos resultados, em um estudo anterior, Lavtizar et al. (2015) não encontraram nenhum efeito negativo na reprodução de *D. magna* em 21 dias de teste em concentrações até $12 \mu\text{g L}^{-1}$, porém encontraram uma diminuição na sobrevivência desses organismos a partir da concentração de $3,5 \mu\text{g L}^{-1}$. Em relação ao valor de CENO-7d = $0,07 \mu\text{g L}^{-1}$, a espécie *C. silvestrii* foi aproximadamente 8,8 vezes menor quando comparada com a espécie *C. dubia* (CENO-7d = $0,61 \mu\text{g L}^{-1}$) (MOURA et al., 2018; NOGUEIRA, 2016) e aproximadamente 63,9 vezes menor do que o de *D. magna* (CENO-21d = $4,47 \mu\text{g L}^{-1}$) (EFSA, 2013; USEPA, 2008). Assim, como também para outros grupos, como o mosquito *Chironomus riparius* (CENO-28d = $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$;

EFSA, 2013) e o peixe *Oncorhynchus mykiss* (CENO-21d = 110,0 $\mu\text{g L}^{-1}$; DataBase, 2019), a espécie *C. silvestrii* é notadamente mais sensível. Já os valores de CEO de *C. silvestrii* foram inferiores (CEO-7d = 0,02 $\mu\text{g L}^{-1}$) quando comparados à espécie de clima temperado *D. magna* (CEO-21d = 4,05 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Sabendo da importância de novos e complementares estudos da toxicidade do herbicida Ametrina e do inseticida Clorantrolilprole, sugerimos para estudos futuros uma avaliação dos efeitos tóxicos desses agrotóxicos em mistura e também estudos que avaliem toda a história de vida, desenvolvimento embrionário e estresse oxidativo desses cladóceros, informações necessárias para uma melhor compreensão dos riscos ecológicos e suas implicações nas cadeias tróficas aquáticas.

5. CONCLUSÕES

O presente estudo evidenciou os efeitos tóxicos do herbicida Ametrina e do inseticida Clorantrolilprole sobre o cladóceros *C. silvestrii*. Nossos resultados indicam que tanto o herbicida como o inseticida foram altamente tóxicos durante a exposição aguda e crônica do cladóceros dentro da uma faixa estudada. Efeitos negativos foram observados na sobrevivência, reprodução e crescimento dos dafnídeos em baixas concentrações. Para o inseticida Clorantrolilprole, efeitos horméticos foram observados em concentrações baixas. Portanto, as informações obtidas nesse estudo mostram que, mesmo em baixas concentrações, esses compostos podem implicar em riscos ecológicos para os ecossistemas aquáticos tropicais.

REFERÊNCIAS

ABNT – Associação Brasileira De Normas Técnicas. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera), Pub. L. No. NBR13373, 18 (2017).

ALHO, L. DE O. G., SOUZA, J. P., ROCHA, G. S., MANSANO, A. DA S., LOMBARDI, A. T., SARMENTO, H., & MELÃO, M. G. G. (2020). Photosynthetic, morphological and biochemical biomarkers as tools to investigate copper oxide nanoparticle toxicity to a freshwater chlorophyceae. **Environmental Pollution**, 265, 114856.

ANVISA. (2003). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. www.anvisa.gov.br.

ANVISA. (2014). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [www.anvisa.gov.br](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2915340/%281%29CONSULTA+PÚBLICA+N+956+GGTOX.pdf/f324fd37-da1c-414f-8bb1-86ab846e73b3)
<http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/2915340/%281%29CONSULTA+PÚBLICA+N+956+GGTOX.pdf/f324fd37-da1c-414f-8bb1-86ab846e73b3>

ASTM. (2001). American Society for Testing and Materials. Standard guide for conducting acute toxicity testing on test materials with fishes, macroinvertebrates, and amphibians, West Conshohocken. 729–796.

Ayalew, G. (2015). Efficacy of Selected Insecticides Against the South American Tomato Moth, *Tuta absoluta* Meyrick (Lepidoptera: Gelechiidae) on Tomato in the Central Rift Valley of Ethiopia. **African Entomology**, 23(2), 410–417.

AYRES M, AYRES JÚNIOR M, AYRES DL, S. A. (2007). *BIOESTAT - Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Bio-Médicas* (p. 364).

BANG, S. H., AHN, J.-Y., HONG, N.-H., SEKHON, S. S., KIM, Y.-H., & MIN, J. (2015). Acute and chronic toxicity assessment and the gene expression of Dhb, Vtg, Arnt, CYP4, and CYP314 in *Daphnia magna* exposed to pharmaceuticals. **Molecular & Cellular Toxicology**, 11(2), 153–160. <https://doi.org/10.1007/s13273-015-0013-7>

BASSI DUPONT ITALY SRL (ITALY), A., RISON, J. L., & WILES, J. A. (2009). *Klorantranilprol (DPX-E2Y45, Rynaxypyr(R), Coragen(R)), nov diamidni insekticid za zatiranje jabolcnega zavijaca koloradskega hrosca (Leptinotarsa decemlineata) in krizastega grozdnega sukaca (Lobesia botrana)*. **Plant Protection Society of Slovenia**; Chamber of Agriculture and Forestry of Slovenia.

BUI, T.-K. L., DO-HONG, L. C., DAO, T.-S., & HOANG, T. C. (2016). Copper toxicity and the influence of water quality of Dongnai River and Mekong River waters on copper bioavailability and toxicity to three tropical species. **Chemosphere**, 144, 872–878.

CASALI-PEREIRA, M. P., DAAM, M. A., RESENDE, J. C. DE, VASCONCELOS, A. M., ESPÍNDOLA, E. L. G., & BOTTA, C. M. R. (2015). Toxicity of Vertimec® 18 EC (active ingredient abamectin) to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Chemosphere**, 139, 558–564. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.006>

CORDOVA, D., BENNER, E. A., SACHER, M. D., RAUH, J. J., SOPA, J. S., LAHM, G. P., SELBY, T. P., STEVENSON, T. M., FLEXNER, L., GUTTERIDGE, S., RHOADES, D. F., WU, L., SMITH, R. M., & TAO, Y. (2006). Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 84(3), 196–214.

CUI, F., CHAI, T., QIAN, L., & WANG, C. (2017). Effects of three diamides (chlorantraniliprole, cyantraniliprole and flubendiamide) on life history, embryonic development and oxidative stress biomarkers of *Daphnia magna*. **Chemosphere**, 169

DAAM, M. A., & VAN DEN BRINK, P. J. (2010). Implications of differences between temperate and tropical freshwater ecosystems for the ecological risk assessment of pesticides. **Ecotoxicology**, 19(1), 24–37. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0402-6>

DE ALBUQUERQUE, F. P., DE OLIVEIRA, J. L., MOSCHINI-CARLOS, V., & FRACETO, L. F. (2020). An overview of the potential impacts of atrazine in aquatic environments: Perspectives for tailored solutions based on nanotechnology. **Science of The Total Environment**, 700, 134868. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134868>

DE LUCCA, G. M., FREITAS, E. C., & DA GRAÇA GAMA MELÃO, M. (2018). Effects of TiO₂ Nanoparticles on the Neotropical Cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii* by Waterborne and Dietary Routes. **Water, Air, & Soil Pollution**, 229(9), 307.

DECOURTEN, B. M., CONNON, R. E., & BRANDER, S. M. (2019). Direct and indirect

parental exposure to endocrine disruptors and elevated temperature influences gene expression across generations in a euryhaline model fish. **PeerJ**, 7, e6156.

DUKE, S. O. (1990). Overview of herbicide mechanisms of action. **Environmental Health Perspectives**, 87, 263–271.

DuPont. *Altacor® & Coragen® now registered for use on more crops*. (2011). https://www.dupont.ca/content/ca/en_ca/products-and-services/crop-protection/vegetable-protection/press-releases/altacorcoragen.htm

EFSA. (2013). Guidance on tiered risk assessment for plant protection products for aquatic organisms in edge-of-field surface waters. **EFSA Journal**, 11(7).

FAOSTAT. (2016). **Food and Agricultural Organization of the United Nations**—Statistics Division.

FARRÉ, M., FERNANDEZ, J., PAEZ, M., GRANADA, L., BARBA, L., GUTIERREZ, H., PULGARIN, C., & BARCELÓ, D. (2002). Analysis and toxicity of methomyl and ametryn after biodegradation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 373(8), 704–709. h

FENOLL, J., GARRIDO, I., CAVA, J., HELLÍN, P., FLORES, P., & NAVARRO, S. (2015). Photometabolic pathways of chlorantraniliprole in aqueous slurries containing binary and ternary oxides of Zn and Ti. **Chemical Engineering Journal**, 264, 720–727.

FONSECA, A.R.; ROCHA, O. (2004). The life-cycle of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902, a Neotropical endemic species (Crustacea, Cladocera, Daphnidae). **Acta Limnol. Bras**, 16((4)), 319–328.

FREITAS, E. C., & ROCHA, O. (2012). Acute and chronic effects of atrazine and sodium dodecyl sulfate on the tropical freshwater cladoceran *Pseudosida ramosa*. **Ecotoxicology**, 21(5), 1347–1357.

GREEN, J. (1956). Growth, Size And Reproduction In *Daphnia* (Crustacea: Cladocera)*. **Proceedings of the Zoological Society of London**, 126(2), 173–204.

GRIFFERO, L., ALCÁNTARA-DURÁN, J., ALONSO, C., RODRÍGUEZ-GALLEGO, L., MORENO-GONZÁLEZ, D., GARCÍA-REYES, J. F., MOLINA-DÍAZ, A., & PÉREZ-PARADA, A. (2019). Basin-scale monitoring and risk assessment of emerging contaminants in South American Atlantic coastal lagoons. **Science of The Total Environment**, 697, 134058.

JEANGUENAT, A. (2013). The story of a new insecticidal chemistry class: the diamides. **Pest Management Science**, 69(1), 7–14.

KNOPS, M., ALTENBURGER, R., & SEGNER, H. (2001). Alterations of physiological energetics, growth and reproduction of *Daphnia magna* under toxicant stress. **Aquatic Toxicology**, 53(2), 79–90.

LAHM, G. P., CORDOVA, D., & BARRY, J. D. (2009). New and selective ryanodine receptor activators for insect control. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 17(12), 4127–4133.

LAHM, G. P., STEVENSON, T. M., SELBY, T. P., FREUDENBERGER, J. H., DUBAS, C. M., SMITH, B. K., CORDOVA, D., FLEXNER, L., CLARK, C. E., BELLIN, C. A., & HOLLINGSHAUS, J. G. (2007). Rynaxypyr™: A New Anthranilic Diamide Insecticide Acting at the Ryanodine Receptor. In **Pesticide Chemistry** (Vol. 17, Issue 22, pp. 111–120).

Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

LAVTIŽAR, V., HELMUS, R., KOOLS, S. A. E., DOLENC, D., VAN GESTEL, C. A. M., TREBŠE, P., WAAIJERS, S. L., & KRAAK, M. H. S. (2015). Daphnid Life Cycle Responses to the Insecticide Chlorantraniliprole and Its Transformation Products. **Environmental Science & Technology**, *49*(6), 3922–3929.

LEBLANC, G. A., & MCLACHLAN, J. B. (1999). Molt-independent growth inhibition of *Daphnia magna* by a vertebrate antiandrogen. **Environmental Toxicology and Chemistry**, *18*(7), 1450–1455.

LU, Z., ZHAO, B., YANG, J., & SNELL, T. W. (2012). Effects of atrazine and carbaryl on growth and reproduction of the rotifer *Brachionus calyciflorus* Pallas. **Journal of Freshwater Ecology**, *27*(4), 527–537.

MACHADO, K.S. CASALI-PEREIRA, M. P. OLIVEIRA, D. M.; ISIQUE, W.D.; LEITE, M.A.; MINILLO, A. (2009). **Bioensaios de toxicidade aguda com fármacos: diclofenaco de sódio e paracetamol.**

MACHADO, K. C., GRASSI, M. T., VIDAL, C., PESCARA, I. C., JARDIM, W. F., FERNANDES, A. N., SODRÉ, F. F., ALMEIDA, F. V., SANTANA, J. S., CANELA, M. C., NUNES, C. R. O., BICHINHO, K. M., & SEVERO, F. J. R. (2016). A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil. **Science of The Total Environment**, *572*, 138–146.

MANSANO, A. S., MOREIRA, R. A., DORNFELD, H. C., DINIZ, L. G. R., VIEIRA, E. M., DAAM, M. A., ROCHA, O., & SELEGHIM, M. H. R. (2018). Acute and chronic toxicity of diuron and carbofuran to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Environmental Science and Pollution Research**, *25*(14), 13335–13346.

MANSANO, A. S., MOREIRA, R. A., PIEROZZI, M., OLIVEIRA, T. M. A., VIEIRA, E. M., ROCHA, O., & REGALI-SELEGHIM, M. H. (2016). Effects of diuron and carbofuran pesticides in their pure and commercial forms on *Paramecium caudatum*: The use of protozoan in ecotoxicology. **Environmental Pollution**, *213*, 160–172.

MATTHIESSEN, P., WHEELER, J. R., & WELTJE, L. (2018). A review of the evidence for endocrine disrupting effects of current-use chemicals on wildlife populations. **Critical Reviews in Toxicology**, *48*(3), 195–216.

MENCHACA, I., BELZUNCE, M. J., FRANCO, J., GARMENDIA, J. M., MONTERO, N., & REVILLA, M. (2010). Sensitivity Comparison of Laboratory-Cultured and Field-Collected Amphipod *Corophium multisetosum* in Toxicity Tests. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, *84*(4), 390–394.

MIGUEL, M. (2020). *Efeito do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol e do herbicida atrazina em espécies de dois níveis tróficos.* Escola De Engenharia De São Carlos-Universidade De São Paulo.

MIMMO, T., BARTUCCA, M. L., DEL BUONO, D., & CESCO, S. (2015). Italian ryegrass for the phytoremediation of solutions polluted with terbuthylazine. **Chemosphere**, *119*, 31–36.

MONTIEL-LEÓN, J. M., VO DUY, S., MUNOZ, G., BOUCHARD, M. F., AMYOT, M., &

SAUVÉ, S. (2019). Quality survey and spatiotemporal variations of atrazine and desethylatrazine in drinking water in Quebec, Canada. **Science of The Total Environment**, 671, 578–585.

MOREIRA, R.A., MANSANO, A.S., SILVA, L.C., ROCHA, O. (2014). A comparative study of the acute toxicity of the herbicide atrazine to cladocerans *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii* and *Macrothrix flabelligera*. **Acta Limnol. Bras**, 26, 1–8.

MOREIRA, R. A., DAAM, M. A., VIEIRA, B. H., SANCHES, A. L. M., REGHINI, M. V., DA SILVA MANSANO, A., DE FREITAS, E. C., ESPINDOLA, E. L. G., & ROCHA, O. (2017). Toxicity of abamectin and difenoconazole mixtures to a Neotropical cladoceran after simulated run-off and spray drift exposure. **Aquatic Toxicology**, 185, 58–66.

MOURA, M. A. M., OLIVEIRA, R., JONSSON, C. M., DOMINGUES, I., SOARES, A. M. V. M., & NOGUEIRA, A. J. A. (2018). The sugarcane herbicide ametryn induces oxidative stress and developmental abnormalities in zebrafish embryos. **Environmental Science and Pollution Research**, 25(14), 13416–13425.

MÜLLER, H. (1972). Wachstum and phosphatbedarf von *Nitzschia actinastroides* (Lemn.) v. Goor in statischer und homokontiuierlicher kultur unter phosphatlimitierung. **Arch. Hydrobiol**, 38, 399–484.

National Center for Biotechnology Information (a). (2021). **PubChem Compound Summary for CID 13263**. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ametryn>.

National Center for Biotechnology Information (b). (2021). **PubChem Compound Summary for CID 11271640, Chlorantraniliprole**. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorantraniliprole>.

NAVARATNA, D., ELLIMAN, J., COOPER, A., SHU, L., BASKARAN, K., & JEGATHEESAN, V. (2012). Impact of herbicide Ametryn on microbial communities in mixed liquor of a membrane bioreactor (MBR). **Bioresource Technology**, 113, 181–190.

NOGUEIRA, L. R. (2016). *Toxicidade aguda e crônica do pesticida chlorantraniliprole sobre o organismo-teste Ceriodaphnia dubia*. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/144509>

OECD. (2004). *OECD Guideline for testing of chemicals Daphnia sp., Acute Immobilisation Test 202*.

OECD. (2008). *OECD Guidelines for testing of chemicals Daphnia magna reproduction Test 2011*.

PERES, F., & MOREIRA, J. C. (2007). Saúde e ambiente em sua relação com o consumo de agrotóxicos em um pólo agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 23 Sup, 4:S612-S621.

QI, S., LÜMMEN, P., NAUEN, R., & CASIDA, J. E. (2014). Diamide Insecticide Target Site Specificity in the *Heliothis* and *Musca* Ryanodine Receptors Relative to Toxicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 62(18), 4077–4082. <https://doi.org/10.1021/jf501236h>

RAYMUNDO, L. B., ROCHA, O., MOREIRA, R. A., MIGUEL, M., & DAAM, M. A. (2019). Sensitivity of tropical cladocerans to chlorpyrifos and other insecticides as compared to their temperate counterparts. **Chemosphere**, 220, 937–942.

RÉGO, A. P. J., BIDOIA, E. D., & REGANHAN-CONEGLIAN, C. M. (2017). Toxicity

Studies of Ametryne to Land and Aquatic Organisms. **Aquatic Science and Technology**, 6(1), 8.

RÉGO, A. P. J., MENDES, K. F., BIDOIA, E. D., & TORNISIELO, V. L. (2018). DCPIP and Respirometry Used in the Understanding of Ametryn Biodegradation. **Journal of Environment and Ecology**, 9(1), 27.

RELIGIA, P., KATO, Y., FUKUSHIMA, E. O., MATSUURA, T., MURANAKA, T., & WATANABE, H. (2019). Atrazine exposed phytoplankton causes the production of non-viable offspring on *Daphnia magna*. **Marine Environmental Research**, 145, 177–183.

ROBERTS, T. R., HUTSON, D. H., LEE, P. W., NICHOLLS, P. H., & PLIMMER, J. R. (Eds.). (2007). **Metabolic Pathways of Agrochemicals**. Royal Society of Chemistry.

ROCHA, O., NETO, A. J. G., DOS SANTOS LIMA, J. C., FREITAS, E. C., MIGUEL, M., DA SILVA MANSANO, A., MOREIRA, R. A., & DAAM, M. A. (2018). Sensitivities of three tropical indigenous freshwater invertebrates to single and mixture exposures of diuron and carbofuran and their commercial formulations. **Ecotoxicology**, 27(7), 834–844.

RODRIGUES, E. T., LOPES, I., & PARDAL, M. Â. (2013). Occurrence, fate and effects of azoxystrobin in aquatic ecosystems: A review. **Environment International**, 53, 18–28.

SÁNCHEZ-BAYO, F. (2006). Comparative acute toxicity of organic pollutants and reference values for crustaceans. I. Branchiopoda, Copepoda and Ostracoda. **Environmental Pollution**.

SANCHO, E., VILLARROEL, M. J., & FERRANDO, M. D. (2016). Assessment of chronic effects of tebuconazole on survival, reproduction and growth of *Daphnia magna* after different exposure times. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 124, 10–17.

SANDOVAL-CARRASCO, C. A., AHUATZI-CHACÓN, D., GALÍNDEZ-MAYER, J., RUIZ-ORDAZ, N., JUÁREZ-RAMÍREZ, C., & MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F. (2013). Biodegradation of a mixture of the herbicides ametryn, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in a compartmentalized biofilm reactor. **Bioresource Technology**, 145, 33–36.

SANTOS, , M.A.P.F. DOS, M., LOMBARDI, M. G. G. & A.T. (2006). Life history characteristics and production of *Ceriodaphnia silvestrii* daday (crustacea, cladocera) under different experimental conditions. **Acta Limnol. Bras**, 18(2), 199–212.

SATTELLE, D. B., CORDOVA, D., & CHEEK, T. R. (2008). Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals. **Invertebrate Neuroscience**, 8(3), 107–119.

SCHREINEMACHERS, P., & TIPRAQSA, P. (2012). Agricultural pesticides and land use intensification in high, middle and low income countries. **Food Policy**, 37(6), 616–626.

SCOGNAMIGLIO, V., ANTONACCI, A., PATROLECCO, L., LAMBREVA, M. D., LITESCU, S. C., GHUGE, S. A., & REA, G. (2016). Analytical tools monitoring endocrine disrupting chemicals. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 80, 555–567.

SILVEYRA, G. R., SILVEYRA, P., VATNICK, I., MEDESANI, D. A., & RODRÍGUEZ, E. M. (2018). Effects of atrazine on vitellogenesis, steroid levels and lipid peroxidation, in female red swamp crayfish *Procambarus clarkii*. **Aquatic Toxicology**, 197, 136–142.

SMITH, D. T., RICHARD, E. P., & SANTO, L. T. (2008). Weed Control in Sugarcane and the Role of Triazine Herbicides. In **The Triazine Herbicides** (pp. 185–197). Elsevier.

SOUSA, A. S., DUAVÍ, W. C., CAVALCANTE, R. M., MILHOME, M. A. L., & DO NASCIMENTO, R. F. (2016). Estimated Levels of Environmental Contamination and Health Risk Assessment for Herbicides and Insecticides in Surface Water of Ceará, Brazil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, *96*(1), 90–95.

STATSOFT, I. (2004). *Statistica (data analysis software system)* (No. 07).

TAKENAKA, R. A. (2007). *Avaliação da toxicidade de Mycrocistis aeruginosa de florações naturais de cianobactérias de reservatórios do Rio Tietê*. Escola de Engenharia de São Carlos.

TEIXEIRA, L. A., & Andaloro, J. T. (2013). Diamide insecticides: Global efforts to address insect resistance stewardship challenges. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, *106*(3), 76–78.

TOUMI, H., BOUMAIZA, M., MILLET, M., RADETSKI, C. M., CAMARA, B. I., FELTEN, V., & FERARD, J.-F. (2015). Investigation of differences in sensitivity between 3 strains of *Daphnia magna* (crustacean Cladocera) exposed to malathion (organophosphorous pesticide). **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, *50*(1), 34–44.

USEPA. (2005). Pesticide ecotoxicity database, formerly: environmental effects database (EEDB). **Environ Fate Eff Div U S EPA**.

USEPA. (2008). United States Environmental Protection Agency Pesticide Fact Sheet: Chlorantraniliprole. **U.S. Environ. Prot. Agency, Washington, DC**, 1–77.

YOON, D.-S., PARK, J. C., PARK, H. G., LEE, J.-S., & HAN, J. (2019). Effects of atrazine on life parameters, oxidative stress, and ecdysteroid biosynthetic pathway in the marine copepod *Tigriopus japonicus*. **Aquatic Toxicology**, *213*, 105213.

Z. MACIEJ GLIWICZ; BOAVIDA, M. J. (1996). Clutch size and body size at first reproduction in *Daphnia pulex* at different levels of food and predation. **Journal of Plankton Research**, *18*(6), 863–880.

ZHENG, L., ZHANG, Y., YAN, Z., ZHANG, J., LI, L., ZHU, Y., ZHANG, Y., ZHENG, X., WU, J., & LIU, Z. (2017). Derivation of predicted no-effect concentration and ecological risk for atrazine better based on reproductive fitness. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, *142*, 464

A Influência da temperatura no potencial tóxico do inseticida Clorantraniliprole na história de vida do cladócero de água doce *Ceriodaphnia silvestrii*.

RESUMO

Inseticidas são distribuídos de forma ubíqua no ambiente, causando crescente preocupação em relação ao seu potencial de toxicidade para os organismos. Até o momento, a maioria das pesquisas tem se concentrado nos impactos dos pesticidas em organismos de ambiente temperados e marinhos, com menos estudos de seus efeitos em ecossistemas de água doce, especialmente em diferentes condições ambientais. No presente estudo, a sensibilidade de uma espécie tropical de água doce, *Ceriodaphnia silvestrii*, foi estudada em associação com um fator abiótico - a temperatura. Ensaios de toxicidade aguda e sub-letais com o inseticida Clorantraniliprole foram realizados a 17, 23 e 30°C para determinar a influência da temperatura como um fator adicional de estresse. Nossos resultados mostraram uma relação direta entre a temperatura e o inseticida Clorantraniliprole, influenciando negativamente na sensibilidade, na reprodução e no desenvolvimento dos indivíduos de *C. silvestrii*, o que reforça a necessidade da inclusão de estressores naturais nos estudos de avaliação de risco em potencial dos inseticidas para ambientes aquáticos tropicais.

Palavras-chave: Clorantraniliprole, inseticida, variação térmica, dafinídeos, toxicidade

1. INTRODUÇÃO

Experiências positivas com o Clorantraniliprole e seu alto potencial inseticida principalmente devido ao modo de ação ativo, eficiente e específico no combate a insetos agindo nos receptores de rianodina liberando de forma desordenada Ca^{+} intracelular, causando paralisia, letargia e morte em uma variedade crescente de culturas, fez com que esse pesticida e seus produtos formulados fossem registrados e comercializados em diversos países (BASSI et al., 2009; DUPONT, 2014; LAHM et al., 2007; CORDOVA et al., 2005;).

O Clorantraniliprole é um inseticida recentemente desenvolvido e bastante aplicado na agricultura moderna como forma de proteção de suas culturas. O conhecimento sobre sua ecotoxicidade e modos de ação específico em organismos aquáticos são encontrados apenas em registros e relatórios de avaliação regulatória (DUPONT, 2014; LAVTIŽAR et al., 2015). Assim, estudos sobre a ecotoxicidade aquática agudos e crônicos, seus efeitos de exposição e, principalmente, de transformação combinados com outros fatores ambientais, como, por exemplo, a temperatura, permanecem ainda limitados ou completamente desconhecidos nos corpos de água doce (BRANS et al., 2017; CHRISTENSEN, et al., 2006).

Estudar e conhecer os efeitos combinados de múltiplos estressores faz-se urgente e necessário devido ao aumento no declínio médio de populações em todos os ecossistemas, com impacto mais severo registrado nos ecossistemas de água doce, onde 76% das espécies vivenciam um declínio desde o ano de 1970 tendo como causa principal além da eutrofização humana, o super aquecimento global (JENKINS, 2003; WWF, 2014).

Estratégias de intervenção para remediar ou diminuir os impactos das mudanças ambientais são limitadas, pois o efeito dos estressores podem ser sinérgicos, ou seja, maior do que a soma dos seus efeitos isolados (SALA OE, et al. 2000). Assim, a previsibilidade de impacto causado por dois ou mais fatores de estresse, como por exemplo a temperatura e inseticida, é desafiante e árduo quando comparados com um único estressor (SPAACK et al, 2017; WU et al., 2017). Somados a isso, os resultados de testes em nível de população podem sofrer com a variabilidade em suas respostas devido às diferenças na sensibilidade ambiental, tolerância entre as espécies e padrões de adaptação, ou seja, a temperatura é um fator chave que interfere com efeitos distintos na diversidade, determinado o ciclo de vida, e aptidão de toda a comunidade de água

doce (BENNETT E LENSKI, 2007; BINZER et al., 2016; KNEITEL e CHASE, 2004; MÜLLER e COLOMER, 2018).

Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito combinado do inseticida Clorantroliprole com três diferentes temperaturas (17, 23 e 30°C) a um organismo não-alvo, o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, pertencente a climas subtropical e tropical por meio de testes de toxicidade aguda no parâmetro imobilidade e testes de toxicidade crônica onde foram avaliados os parâmetros fecundidade e tamanho corporal. O diferencial desse estudo é tratar da influência da aclimação como fator adicional de estresse na toxicidade da espécie *Ceriodaphnia silvestrii* que é amplamente distribuída em águas doces brasileiras e considerada um modelo adequado para análises ecotoxicológicas devido sua elevada sensibilidade (ABREU et al., 2010, RAYMUNDO et al., 2019). Sendo assim, utilizar essa espécie em testes combinados de toxicidade contribui para a obtenção de respostas mais próximas da realidade dessas regiões.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Organismo-teste e condições de cultivo

O organismo-teste selecionado para este estudo foi uma espécie nativa e endêmica de cladóceros da região Neotropical e padronizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) - *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Crustacea, Cladocera). Esse cladóceros atua como consumidor primário nas cadeias alimentares aquáticas e se alimenta por filtração de material orgânico particulado. Possui 0,8 a 0,9 mm de comprimento, corpo ovalado com acentuado sino cervical e com 9 a 12 espinhos anais no pós-abdômen (FONSECA; ROCHA, 2004), sendo encontrado no Brasil e na Argentina (ABNT NBR 13373, 2017).

A espécie foi inicialmente coletada do reservatório do Lobo-Broa, Itirapina (SP), e mantido a aproximadamente 5 anos em cultivo no Laboratório de Ecotoxicologia do Departamento de Biologia Evolutiva (DEBE) da Universidade Federal de São Carlos (São Carlos – SP).

A espécie foi cultivada em água reconstituída previamente preparada com 1500 mg de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (solução 1) e 200 mg de KCl, 4800 mg de NaHCO_3 e 6100 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (solução 2) ambos diluídos em 1 L de água destilada (ABNT NBR 13373, 2017). Em um recipiente com aeração constante, a água destilada foi acrescida das duas soluções específicas (solução 1 e 2) a fim de que ela tivesse as seguintes características:

pH entre 7,0 e 7,5 e uma dureza total entre 40 e 48 mgCaCO₃ L⁻¹ (ABNT NBR 13373, 2017; Sociedade Americana de Testes e Materiais - ASTM, 2001). Essa espécie foi mantida em béqueres de 2 L, com um máximo de 120 indivíduos e alimentados com a alga clorofícea *Raphidocelis subcapitata* (10⁵ células mL⁻¹), cultivada em meio CHU-12 (MÜLLER, 1972), e uma suspensão contendo levedura e ração para peixe preparado a partir da mistura de partes iguais de fermento biológico seco tipo Fleischmann® e ração para peixe (Vitormômio®) foi fornecida como suplemento alimentar (1 mL L⁻¹) (ABNT NBR 13373, 2017).

Os béqueres foram recobertos com um filme plástico para evitar evaporação. As manutenções das culturas foram realizadas três vezes por semana, quando eram renovados a água e o alimento, sendo uma troca total da água e duas parciais (apenas 50% da água de cultivo foi renovada). Os cultivos de *Ceriodaphnia silvestrii* foram mantidos em incubadoras e aclimatados para as temperaturas de 17, 23 e 30°C e com fotoperíodo de 12/12 horas de claro/escuro.

2.2. Substâncias e soluções-estoque

O composto Clorantraniliprole (CAS n° 500008-45-7) com pureza ≥98% (padrão analítico) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O inseticida Clorantraniliprole foi diluído em acetona de grau analítico (C₃H₆O; LabSynth), e sua solução-estoque preparada pela diluição de uma quantidade específica em água de cultivo (água reconstituída) imediatamente antes dos testes devido a sua baixa solubilidade em água. que pode chegar até 1,0 mg L⁻¹ a 20°C (National Center for Biotechnology Information (b), 2021).

As concentrações nominais do composto testado foram obtidas pela diluição da solução-estoque também feita em água de cultivo (água reconstituída).

2.3. Testes de sensibilidade com o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*

Testes de sensibilidade aguda (48 h) com a substância de referência cloreto de sódio (NaCl) foram realizados periodicamente para avaliar as condições fisiológicas dos organismos cultivados no laboratório e aclimatados nas temperaturas de 17, 23 e 30°C e, conseqüentemente, garantir a confiabilidade e precisão dos dados durante os testes de toxicidade aguda e crônica de acordo com as diretrizes da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 13373, 2017).

Cinco neonatos (6 - 24 h) de idade foram colocados em recipientes de plástico de poliestireno de 50 mL, que continham 15 mL de solução controle (apenas água de cultivo) e solução teste. As concentrações testes foram testadas em réplicas que variaram de: 0,6 a 2,2 g L⁻¹. Essas concentrações foram preparadas por diluição de uma solução-estoque de 100 g L⁻¹ usando água reconstituída como diluente. Os cladóceros *C. silvestrii* foram mantidos nas mesmas condições de cultivo, sem iluminação e alimentos durante todo o período de exposição. Após 48 h de teste, o número de organismos imóveis foi contado para obter valores de CE₅₀ - 48 h. Os organismos foram considerados saudáveis e adequados para o uso nos testes de toxicidade quando os valores de CE₅₀ - 48 h estavam dentro de limites já pré-estabelecidos (1,0 a 1,83 g L⁻¹) para a substância de referência. (CASALI-PEREIRA et al., 2015). O teste foi considerado válido quando a porcentagem de organismos imóveis no controle não excedeu 10% (ABNT NBR 13373, 2017).

As variáveis pH, temperatura da água, condutividade elétrica, dureza e concentração de oxigênio dissolvido foram medidos no início e no final dos testes.

2.4. Testes de toxicidade aguda e crônica com efeito combinado da temperatura

Os testes de toxicidade aguda e crônica com o cladóceros *C. silvestrii* seguiram as diretrizes pré-estabelecidas pela Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD, 2004; 2008) e pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 13373, 2017). Testes preliminares foram necessários para se estabelecer a faixa de concentração utilizada para cada composto nos testes definitivos. Em seguida, testes de toxicidade aguda foram realizados respeitando a seguinte faixa de concentrações nominais de 1,2 a 9,0 µg L⁻¹ de Clorantraniliprole. Essas concentrações foram preparadas por diluição de uma solução-estoque de 18.000 µg L⁻¹.

De acordo com as pesquisas de OETKEN et al (2009), provavelmente as temperaturas médias globais terão um aumento de 3°C até o ano de 2100. Assim, nossos cultivos foram realizados a 23°C conforme indicado na ABNT NBR 13373 (2017) que estabelece uma faixa ótima de temperatura entre 23 e 27°C como controle, ou seja, em situação de não-estresse, para testes de toxicidade. De forma a simular uma previsão de aumento médio da temperatura das águas de ambientes tropicais, como um fator de estresse para o cladóceros *C. silvestrii*, foi determinado 3°C acima do valor máximo estabelecido pela ABNT NBR 13373 (2017) para testes de toxicidade com cladóceros (27°C), ficando em 30°C. Esse valor ficou 7°C acima da temperatura de controle (23°C). Assim, determinamos também 6°C abaixo da nossa temperatura de controle. De acordo

com nossos estudos preliminares, essas temperaturas são consideradas causadores de estresse para populações de cladóceros *C. silvestrii*. Em combinação com o inseticida Clorraniliprole esses efeitos podem ser ainda mais previsíveis.

Após os testes preliminares, testes definitivos agudos e crônicos foram realizados com o cladóceros *C. silvestrii*, utilizando os neonatos das fêmeas que já estavam aclimatadas nas temperaturas determinadas para os testes (17, 23 e 30°C).

Nos testes de toxicidade aguda, cinco réplicas foram usadas por tratamento. Cada réplica continha cinco neonatos (6 - 24 h de idade) em um recipiente de polipropileno atóxico com 15 mL de solução-teste ou 15 mL de água reconstituída (controle). Para o composto foi necessário adicionar um controle de solvente (água reconstituída + acetona) em uma concentração nominal de 0,01% de acetona (v/v). Os organismos expostos não foram alimentados no decorrer dos experimentos e foram mantidos em incubadora e no escuro, como recomendado pela OECD, 2004 e ABNT NBR 13373, 2017 nas temperaturas de 17, 23 e 30°C, respectivamente. Após as 48 h de exposição, os organismos foram observados sob microscópio estereoscópico e o número de indivíduos imóveis foi contado e usado para o cálculo da concentração efetiva mediana (CE50 - 48 h) de cada composto estudado.

Os testes de toxicidade crônica foram realizados utilizando-se dez réplicas, cada uma contendo um neonato (6 - 24 h de idade) em 15 mL de solução-teste ou 15 mL de água reconstituída (controle). Um controle do solvente (0,01% de acetona, v/v) foi adicionado. Os testes foram dinâmicos, sendo as soluções-teste renovadas diariamente. A duração do experimento foi de sete dias e os organismos foram alimentados e mantidos sob as mesmas condições de temperatura, fotoperíodo descritas para o cultivo. Diariamente, durante os sete dias, os organismos foram observados sob microscópio estereoscópico, a fim de verificar a sobrevivência das fêmeas, o número de ovos e o número de descendentes contados e descartados a cada renovação.

Para garantir a variabilidade e a reprodutibilidade dos valores de toxicidade encontrados cinco testes definitivos de toxicidade aguda e três testes de toxicidade crônica foram realizados para cada temperatura. Além disso, as variáveis abióticas como o pH, temperatura da água, condutividade elétrica, dureza e concentração de oxigênio dissolvido foram medidos no início e no final dos testes de toxicidade aguda e diariamente nos testes de toxicidade crônica.

2.5. Análise dos dados

Os valores de CE_{50} - 48 h e seus respectivos intervalos de confiança de 95% para os testes de toxicidade aguda foram calculados por regressão não linear, ajustando-se uma equação logística aos dados no software Statistica 10.0 (Statsoft Inc., 2011). Já os dados dos testes de toxicidade crônica foram submetidos à análise de normalidade (teste de Chi-Quadrado) e homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett) e, em seguida a análise de variância (ANOVA). Os testes de Tukey e Kruskal-Wallis foram utilizados para verificar a existência de diferenças entre os tratamentos e o controle em dados que seguiram uma distribuição normal. Nos testes estatísticos, diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do *software* BioEstat 5.3 (AYRES et al., 2007).

3. RESULTADOS

3.1. Variáveis abióticas dos testes de toxicidade aguda e crônica

Durante os testes de toxicidade aguda, os valores de pH das soluções-teste ficaram dentro do intervalo de 7,0 a 7,5, não variando mais que 1,0 unidade por teste. A dureza da água não ultrapassou o valor de 48 mg $CaCO_3$, ficando entre 40,5 e 43,5 mg $CaCO_3$. Cada temperatura-teste da água permaneceu estável nas condições estabelecidas (17, 23 e 30°C). O oxigênio dissolvido foi superior a 4,0 mg L^{-1} , ficando entre 6,5 e 7,0. A condutividade elétrica não variou mais que 165 $\mu s\ cm^{-1}$, seguindo os critérios estabelecidos pela OECD, 2004; 2008 como pela ABNT NBR 13373, 2017.

Nos testes de toxicidade crônica realizados com o inseticida Clorrantraniliprole, os valores de pH das soluções-teste ficaram dentro do intervalo de 7,0 a 8,0, não variando mais que 1,0 unidade por teste. A dureza da água variou de 40 a 44 mg $CaCO_3$. A temperatura da água ficou dentro da faixa estabelecida para cada condição-teste (17, 23 e 30°C). O oxigênio dissolvido variou de 6,00 a 8,16 mg L^{-1} . A condutividade elétrica ficou entre 160 e 165 $\mu s\ cm^{-1}$. Assim, todos os testes preencheram os critérios de validade estabelecidos nas orientações fornecidas tanto pela OECD (2004; 2008) como pela ABNT NBR 13373 (2017).

3.2. Testes de Sensibilidade com o cladóceros *C. silvestrii*

Os valores de CE_{50} - 48 h dos testes de sensibilidade com cloreto de sódio (NaCl) para o cladóceros *C. silvestrii* estavam dentro dos limites inferior e superior da tabela de controle determinada neste estudo, ou seja, 1,35 a 1,51 $g L^{-1}$ na temperatura de 17°C, 1,33 a 1,59 $g L^{-1}$ na temperatura de 23°C e 1,35 a 1,53 $g L^{-1}$ na temperatura de 30°C, mostrando que não houve diferença na sensibilidade com o NaCl e os organismos estavam saudáveis o suficiente para serem utilizados nos ensaios de acordo com a faixa de referência: 1,00 a 1,83 $g L^{-1}$ para testes com 48 h de exposição (CASALI-PEREIRA et al., 2015; TAKENAKA et al., 2007; MACHADO et al., 2009; MANSANO et al., 2016) (Figura 1).

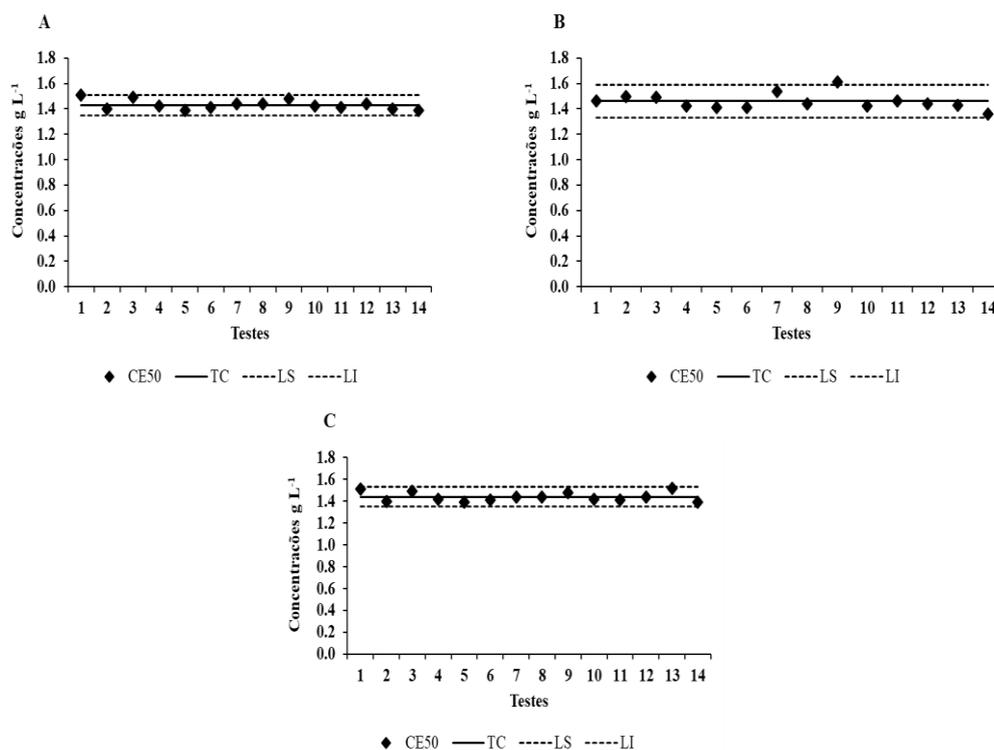


Figura 1. Faixa de sensibilidade de *Ceriodaphnia silvestrii* (CE_{50} -48h) a substância de referência cloreto de sódio com base nos resultados de 14 testes de toxicidade com cloreto de sódio (NaCl) nas temperaturas testadas 17°C (A), 23°C (B) e 30°C (C). Os limites superior e inferior correspondendo a intervalos de confiança de 95% respectivamente.

3.3. Testes de toxicidade com efeito combinado de temperaturas e inseticida para o cladóceros *C. silvestrii*

No final dos testes de toxicidade aguda e crônica, a sobrevivência dos organismos de *C. silvestrii* foi de 100%, tanto no controle como também no controle com solvente, mostrando que não houve diferença significativa ($\pm 10\%$ de organismos imóveis) entre os resultados do controle e do controle com solvente (0.01% de acetona), excluindo assim qualquer possibilidade de interferência do solvente nos resultados finais dos testes de toxicidade aguda e crônica.

Para os testes de toxicidade aguda com efeito combinado de temperaturas (17, 23 e 30°C) com o inseticida Clorantraniliprole (ingrediente ativo com formulação padrão), os valores de CE_{50} - 48 h foram calculados separadamente para cada um dos 5 testes realizados nesse estudo. Os resultados comparativos são apresentados na tabela 1, onde é possível observar que na maior temperatura testada (30°C), a média de mortalidade ocorreu em concentrações mais baixas quando comparada com a média de mortalidade das temperaturas mais baixas (17 e 23°C).

Com os dados relativos aos 5 testes de toxicidade aguda também foi possível calcular a CE_{10} - 48 h, que corresponde ao NOEC (Concentração de Efeito Não Observado) para o composto nas temperaturas mais baixas de 17 e 23°C. Já na temperatura de 30°C, o valor da NOEC não pode ser estimado. O valor médio da CE_{10} - 48 h encontrado para o inseticida Clorantraniliprole foi de $1,47 \pm 28,70 \mu\text{g L}^{-1}$ na temperatura de 17°C e $0,85 \pm 4,05 \mu\text{g L}^{-1}$ na temperatura de 23°C. Da mesma forma, foi possível calcular a CE_{20} - 48 h, que corresponde ao CEO (Concentração de Efeito Observado) para o composto em todas das temperaturas de teste. O valor médio da CE_{20} - 48 h encontrado para o inseticida Clorantraniliprole foi de $1,99 \pm 21,30 \mu\text{g L}^{-1}$ na temperatura de 17°C, $1,82 \pm 10,33 \mu\text{g L}^{-1}$ na temperatura de 23°C e $1,10 \pm 10,89 \mu\text{g L}^{-1}$ na temperatura de 30°C.

Tabela 1. Valores de CE_{50} - 48 h do padrão Clorantraniliprole combinado com o fator de estresse nas respectivas temperaturas de 17, 23 e 30°C, e seus respectivos intervalos de confiança, para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* nos testes de toxicidade aguda.

Clorantraniliprole						
Temperatura	17°C		23°C		30°C	
Números de ensaio	CE_{50} (48 h)	IC(95%)	CE_{50} (48 h)	IC(95%)	CE_{50} (48 h)	IC(95%)
1	3,06	2,56 - 3,60	2,94	2,67 - 3,20	1,82	1,68 - 1,98
2	3,42	3,01 - 3,83	3,00	2,68 - 3,32	1,95	1,77 - 2,13
3	3,78	3,33 - 4,24	2,79	2,40 - 3,19	1,84	1,61 - 2,05
4	3,15	2,62 - 3,69	2,86	2,68 - 3,04	1,92	1,70 - 2,13
5	3,38	2,83 - 3,93	2,67	2,51 - 2,83	1,75	1,34 - 2,17
Média $\mu\text{g L}^{-1}$	3,36		2,85		1,86	
Desvio Padrão	0,28		0,12		0,07	
Coefficiente de Variação (%)	8,35		4,05		3,86	
Faixa de Sensibilidade $\mu\text{g L}^{-1}$	3,06 - 3,78		2,79 - 3,00		1,75 - 1,95	

Porcentagem de organismos imóveis

Os resultados encontrados neste estudo demonstraram um aumento na toxicidade aguda com o aumento gradual das concentrações testadas, para o inseticida Clorantraniliprole (para 17°C: Kruskal-Wallis, $H=36,74$; $p < 0,001$; para 23°C: Kruskal-Wallis, $H=36,62$; $p < 0,001$; para 30°C: Kruskal-Wallis, $H=37,17$; $p < 0,001$). Possivelmente, houve um aumento proporcional do gasto energético sofrido pelos organismos na tentativa de manutenção da vida (Figura 2). Para as temperaturas de 17°C e 23°C, até a concentração de $1,8 \mu\text{g L}^{-1}$, menos de 40% dos organismos ficaram imóveis, enquanto que a partir da concentração de $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$, em média, 50% estavam imóveis na temperatura de 17°C e mais de 70% na temperatura de 23°C. Para a temperatura de 30°C, a partir da concentração de $1,8 \mu\text{g L}^{-1}$, em média, mais de 40% dos organismos de *C. silvestrii* ficaram imóveis e a partir da concentração de $4,0 \mu\text{g L}^{-1}$, em média, mais de 85% dos organismos ficaram imóveis após 48h de exposição. O teste de toxicidade aguda demonstrou que a 30°C a porcentagem de organismos imóveis de *C. silvestrii* foi maior em concentrações mais baixas, comparando com as temperaturas de 17 e 23°C, sugerindo maior sensibilidade que nas temperaturas mais baixas (Figura 2).

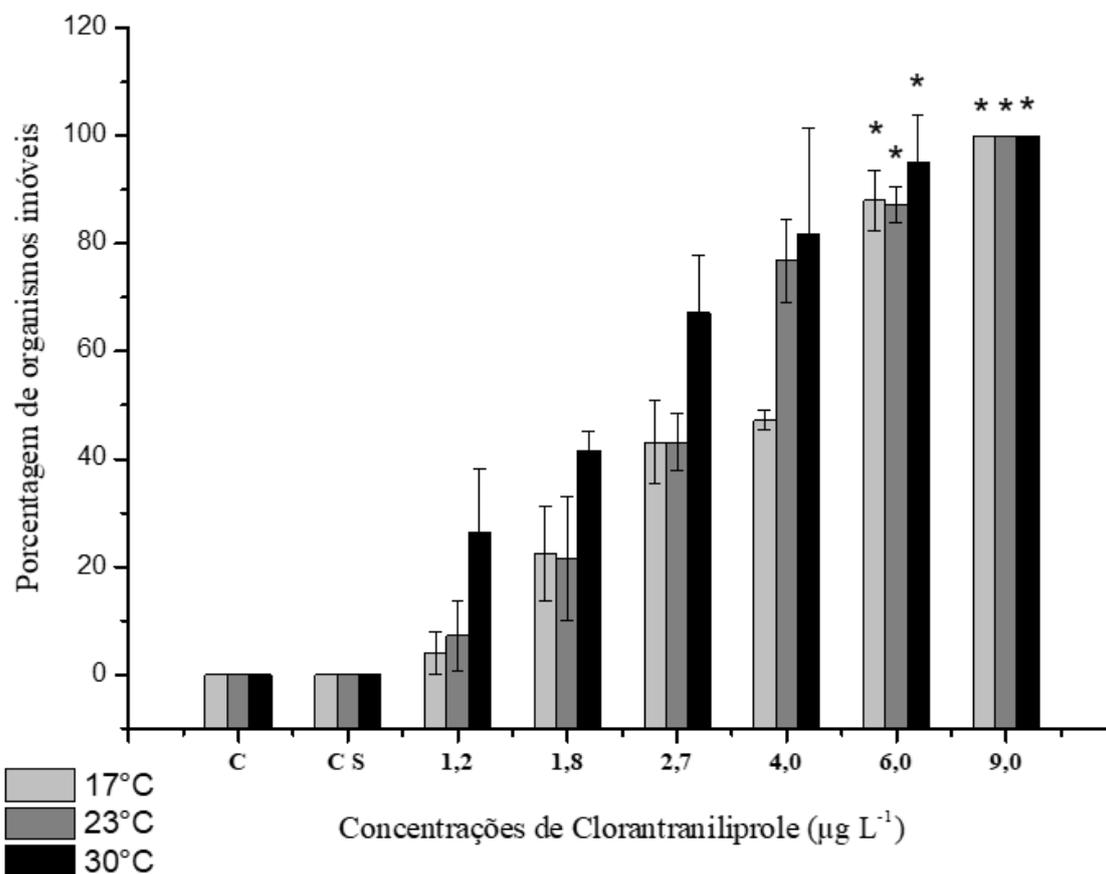


Figura 2. Média das porcentagens (\pm desvio-padrão) dos organismos imóveis do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* durante os cinco testes de toxicidade aguda nas diferentes concentrações testadas do inseticida Clorotraniliprole nas temperaturas de 17, 23 e 30° C.

Os comprimentos corpóreos obtidos para os indivíduos de *C. silvestrii* antes da exposição mostraram que os organismos tinham o mesmo tamanho para os diferentes tratamentos e controle (para 17°C: Kruskal-Wallis, $H= 2,14$; $p > 0,05$; para 23°C: Kruskal-Wallis, $H= 1,28$; $p > 0,05$; para 30°C: Kruskal-Wallis, $H= 1,28$; $p > 0,05$).

Após 7 dias de exposição, houve diferenças significativas no comprimento corporal dos organismos expostos ao inseticida Clorotraniliprole nas temperaturas de 17°C e 30°C para as três maiores concentrações testadas (0,07, 0,14 e 0,28 $\mu\text{g L}^{-1}$) quando comparados com o controle (para 17°C: Kruskal-Wallis, $H= 61,32$; $p < 0,001$; para 30°C: Kruskal-Wallis, $H= 59,79$; $p < 0,001$). Já para a temperatura de 23°C, ocorreram diferenças significativas no comprimento corporal em relação ao controle nas duas maiores concentrações testadas (0,14 e 0,28 $\mu\text{g L}^{-1}$) (para 23°C: Kruskal-Wallis, $H= 46,50$; $p > 0,001$) (Figura 3). Para o comprimento corpóreo, nas temperaturas de 17°C e

30°C, a maior concentração sem qualquer efeito observável (CENO) foi 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$, e a menor concentração com efeito observável (CEO) foi de 0,07 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto que para a temperatura de 23°C, a maior concentração sem qualquer efeito observável (CENO) foi 0,07 $\mu\text{g L}^{-1}$ e a menor concentração com efeito observável (CEO) foi de 0,14 $\mu\text{g L}^{-1}$.

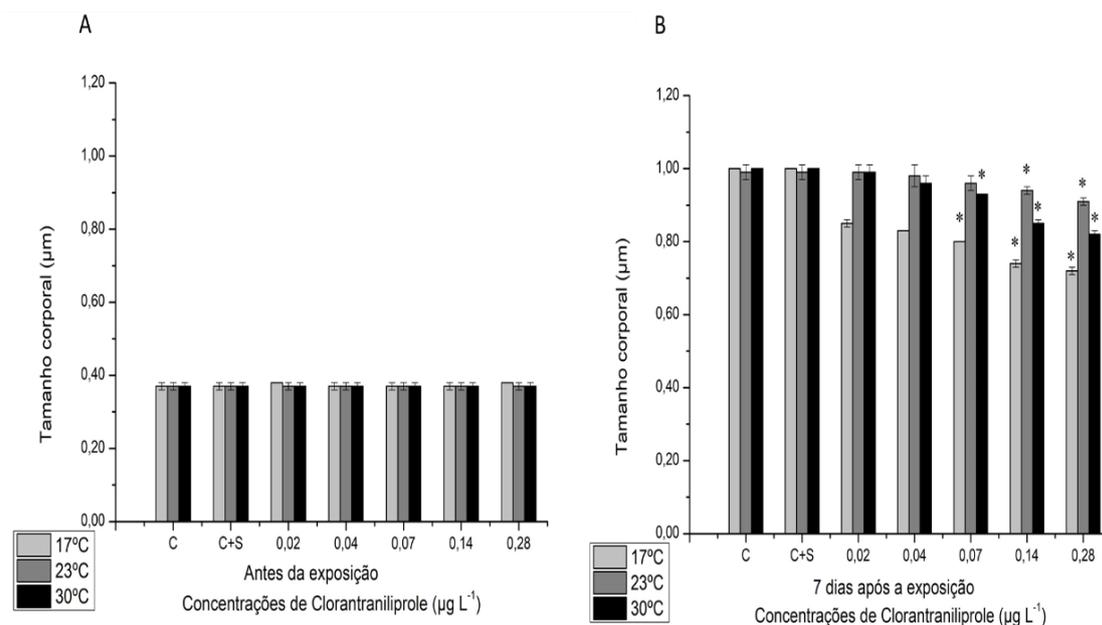


Figura 3. Comprimento corpóreo médio de *Ceriodaphnia silvestrii* (mm) antes (A) e depois (B) da exposição ao inseticida Clorraniliprole nas temperaturas de 17°C, 23°C e 30°C para as cinco concentrações testadas nos testes de toxicidade crônica. Os asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação ao controle.

Nos experimentos com o inseticida Clorraniliprole não ocorreram diferenças significativas entre as concentrações testadas e o controle com relação à sobrevivência dos indivíduos de *C. silvestrii* para os testes de toxicidade crônica nas temperaturas testadas respectivamente (para 17°C: Kruskal-Wallis, H= 19,78; $p < 0,05$; para 23°C: Kruskal-Wallis, H= 16,93; $p < 0,05$ e para 30°C: Kruskal-Wallis, H= 17,41; $p < 0,05$) (Figura 4).

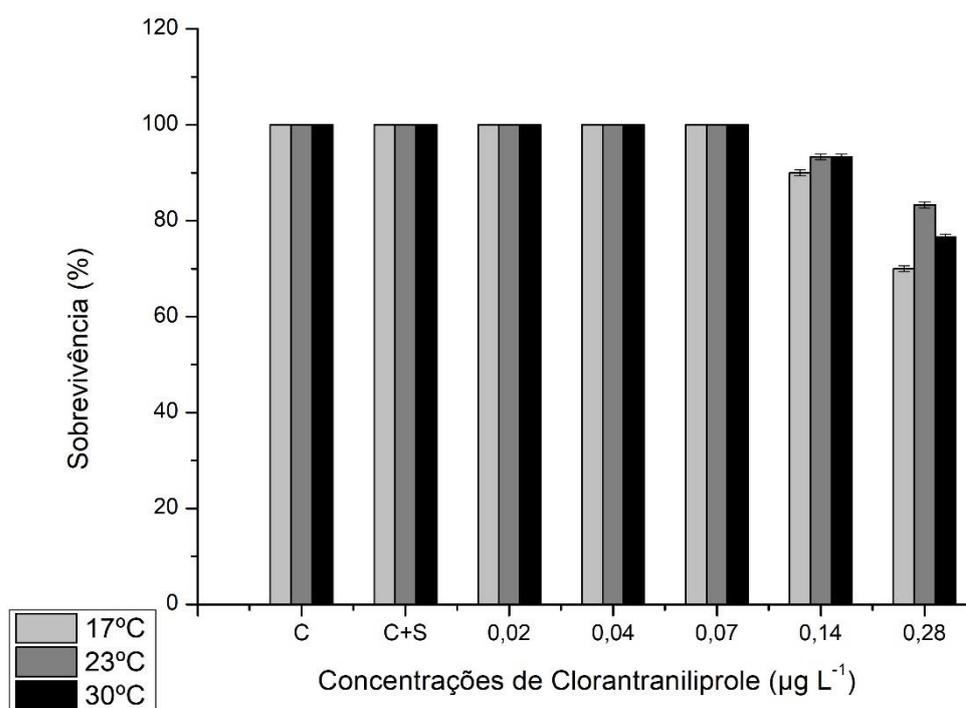


Figura 4. Porcentagem de sobrevivência (%) das fêmeas de *Ceriodaphnia silvestrii* após 7 dias de exposição a diferentes concentrações do inseticida Clorantropilprole, nas temperaturas de 17°C, 23°C e 30°C, nos testes de toxicidade crônica ($p < 0,05$; Teste de Kruskal-Wallis).

Os resultados obtidos nos testes de toxicidade crônica mostraram que o inseticida Clorantropilprole em combinação com a variação termal causou efeitos negativos significativos na reprodução das fêmeas de *C. silvestrii*.

Para as temperaturas de 17°C e 30°C, uma redução significativa no número de ovos por fêmea foi observada em todas as concentrações que variaram entre 0,02 a 0,28 µg L⁻¹, respectivamente (para 17°C: Teste de Tukey $F_{6,203} = 7080,0$; $p < 0,001$ e para 30°C: Teste de Tukey $F_{6,203} = 2893,80$; $p < 0,001$). Já na temperatura de 23°C, a redução significativa foi observada a partir da concentração de 0,04 µg L⁻¹ (Teste de Kruskal-Wallis $H = 198,55$; $p < 0,001$) (Figura 5).

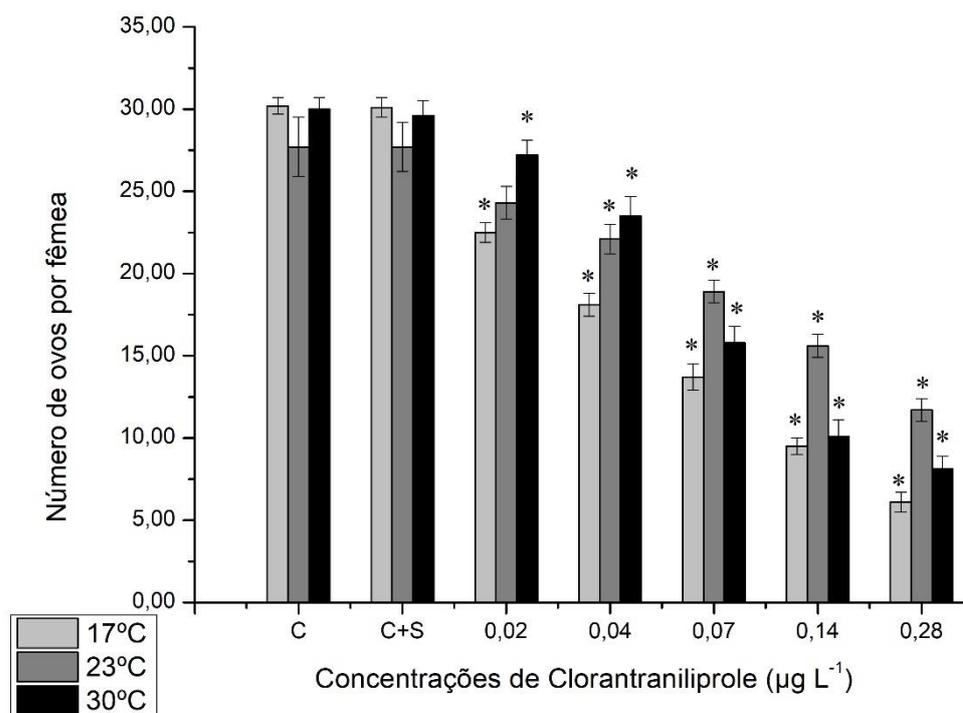


Figura 5. Número de ovos produzidos por fêmea (média \pm DP) do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostos por 7 dias a várias concentrações do inseticida Clorantropilprole nas temperaturas de 17, 23 e 30°C. O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle (Teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,001$; Teste de Tukey; $p < 0,001$).

Para o parâmetro número de neonatas por fêmea, uma redução significativa foi observada a partir da concentração de 0,04 µg L⁻¹ nas temperaturas de 17 e 30°C (para 17°C: Teste de Kruskal-Wallis $H = 190,72$; $p < 0,001$ e para 30°C: Teste de Kruskal-Wallis $H = 198,02$; $p < 0,001$). Para a temperatura de 23°C, no entanto, foram observados efeitos estimulantes (hormesis), com um aumento significativo no número de neonatas por fêmea nas concentrações de 0,04 µg L⁻¹ (Teste de Kruskal-Wallis $H = 200,79$; $p < 0,001$) (Figura 6).

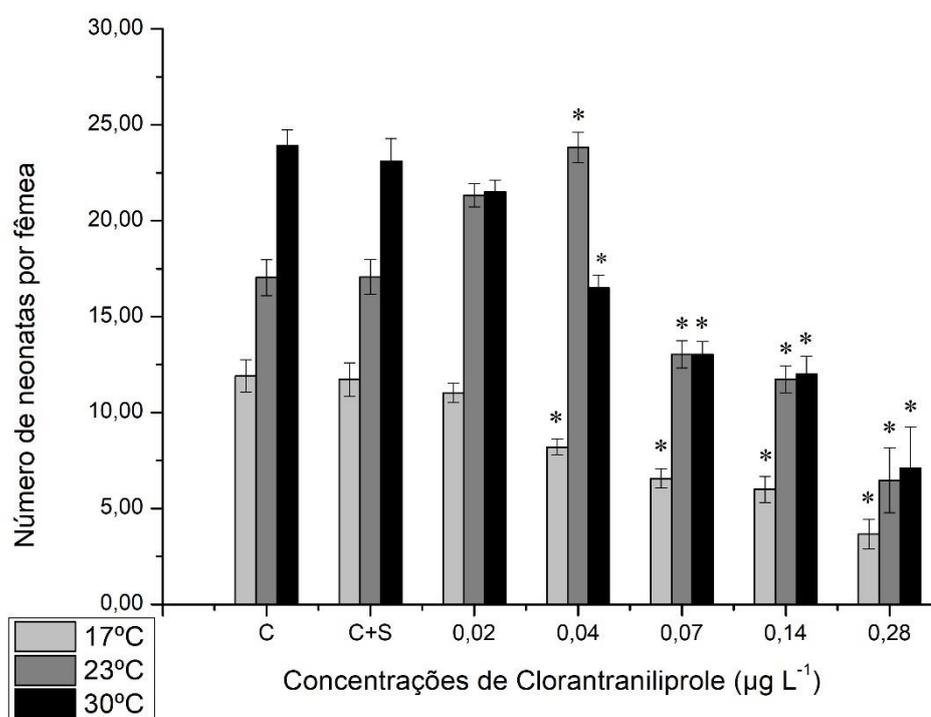


Figura 6. Número de neonatos produzidos por fêmea (média ± DP) do cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostos por 7 dias a várias concentrações do inseticida Clorantianiliprole nas temperaturas de 17, 23 e 30°C. O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle (Teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,001$).

Para o parâmetro número de ovos, nas temperaturas de 17°C e 30°C, os valores da Concentração de Efeito Não Observado (CENO) não puderam ser estimados e os valores da Concentração de Efeito Observado (CEO) foram, respectivamente, de 0,02 µg L⁻¹. Para a temperatura de 23°C, o valor de CENO foi de 0,02 µg L⁻¹ e o de CEO foi de 0,04 µg L⁻¹, enquanto que para o número de neonatas, nas temperaturas de 17°C, 23°C e 30°C, os valores de CENO e CEO foram 0,02 e 0,07 µg L⁻¹, respectivamente.

4. DISCUSSÃO

Em nosso melhor conhecimento, este é o primeiro estudo no qual os efeitos agudos e crônicos do inseticida Clorantianiliprole sobre o cladócero de água doce *C. silvestrii* é avaliado em três temperaturas diferentes.

Os resultados demonstraram que a temperatura tem um efeito significativo na toxicidade do inseticida Clorantianiliprole para o cladócero tropical *C. silvestrii*. Esse

organismo faz parte da cadeia heterotrófica da comunidade planctônica, pertencente ao clima tropical ou subtropical, são consumidores primários com papel importante no fluxo de energia e, em conjunto com outros organismos, compõem a produção secundária e a ciclagem de nutrientes dos ecossistemas de água doce. São organismos com um ciclo de vida curto, o que os tornam sensíveis a respostas rápidas aos fatores bióticos e abióticos de estresse, tais como a temperatura. Sendo assim, são considerados bons indicadores e podem ser utilizados como modelos para estudos das mudanças climáticas globais (Meirinho, 2016). Em testes de toxicidade com resposta para o clima tropical a contaminantes, podemos observar que a grande maioria dos estudos de sensibilidade laboratoriais ainda utilizam com mais frequência os cladóceros de ambientes temperados como a *Daphnia magna* e/ou a *Ceriodaphnia dubia*, espécie encontrada tanto em ambiente tropical quanto temperado. Portanto, ao utilizar espécies que não são nativas, dificilmente se obtém uma resposta ecológica esclarecida e próxima da realidade e do risco em potencial da substância-teste do que quando se utiliza uma espécie nativa, esta reduz restrições logísticas e evita o risco de introdução de espécies exóticas (MANSANO et al., 2016; ROCHA, et al., 2018). Assim, é necessário se pensar na espécie escolhida, sua distribuição geográfica e o habitat natural como fator determinante de tolerância em testes de efeito comparativo entre temperatura e toxicidade de inseticidas.

Comparando-se os valores médios da CE_{50-48h} nos testes de toxicidade aguda para as três temperaturas testadas, é possível observar que na maior temperatura testada (30°C), a média de mortalidade ocorreu em concentrações mais baixas quando comparada com a média de mortalidade das temperaturas mais baixas (17 e 23°C). Corroborando com o único estudo encontrado na literatura, para o cladóceros *Ceriodaphnia dubia*, a toxicidade do inseticida Carbofurano foi dependente da temperatura (ROLDÃO, 2014).

Nos testes de toxicidade crônica, foi observado um padrão do efeito na toxicidade de Clorantpriliprole diretamente proporcional à temperatura, assim como os encontrados por BAO et al. (2008) diferente dos encontrados nos testes de toxicidade aguda. Os resultados encontrados no presente estudo foram próximos dos encontrados pelos autores FLORES et al. (2011); ROLDÃO (2014) SAVAGE et al. (2004), para a espécie de cladóceros *C. dubia*, onde temperaturas inferiores (15°C) reduziram significativamente o metabolismo e o crescimento populacional quando comparados com os resultados encontrados para temperaturas mais altas. Estes mesmos autores afirmaram que a temperatura de 15°C é uma temperatura abaixo da faixa ideal para crescimento populacional de *C. dubia*, assim como no presente estudo que encontrou na temperatura de 17°C uma temperatura inferior a ideal para o crescimento populacional de *C. silvestrii*.

Com relação à toxicidade crônica, o inseticida Clorantraniliprole apresentou efeitos na reprodução dos organismos de *C. silvestrii* em todas as temperaturas testadas 17, 23 e 30°C. Em comparação, o cladóceros *C. silvestrii* apresentou uma maior sensibilidade nas temperaturas de 17 e 30°C. Esse padrão pode estar relacionado a tolerância intrínseca da espécie escolhida a temperatura de 23°C para concentrações sub letais.

Uma redução do tamanho corporal foi observada nas duas maiores concentrações na temperatura de 23°C (0,14 e 0,28 $\mu\text{g L}^{-1}$) e nas três últimas concentrações para as temperaturas de 17 e 30°C (0,07; 0,14 e 0,28 $\mu\text{g L}^{-1}$), quando comparadas com o controle. A redução do tamanho corporal está intimamente ligada com a capacidade reprodutiva, já que esses organismos necessitam de maior espaçamento para acomodar os embriões na câmara de incubação, a ventilação precisa ser mais ativa dentro da bolsa embrionária e com a diminuição do tamanho do corpo ocorreu a perda de recursos para se aplicar no desenvolvimento dos embriões, limitando a capacidade reprodutiva (ATKINSON et al., 2001; DICK et al., 1998; LEE et al., 1998; LÜRLING et al., 2003; SIBLY; CALOW, 1984; XIE et al., 2000). Outros autores dizem ainda que é necessário que os cladóceros atinjam um comprimento do corpo mínimo para que a produção de ovos ocorra normalmente (CUI et al., 2017; de LUCCA et al., 2018; GREEN, 1956; LEBLANC; MCLACHLAN, 1999; RÉGO et al., 2017; Z. MACIEJ GLIWICZ; BOAVIDA, 1996).

O inseticida Clorantraniliprole reduziu significativamente o número de ovos e de descendentes das fêmeas de *C. silvestrii* a partir da concentração de 0,02 $\mu\text{g L}^{-1}$ para as temperaturas de 17 e 30°C. Já para a temperatura de 23°C, houve um retardo da maturação reprodutiva a partir de 0,07 $\mu\text{g L}^{-1}$. Já na concentração de 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$, foi observado um efeito de hormesis para o número de descendentes, quando comparado com o controle. Thuelher (2017) também relatou hormesis induzida por Clorantraniliprole para insetos heterópteros *Euschistos heros*. De acordo com Brandão (2009), esse retardo na produção de descendentes ocorreu também na população do cladóceros tropical *Daphnia laevis* em temperatura acima da faixa ótima pré-estabelecida. O mesmo autor disse que, a longo prazo, o aumento gradual da temperatura proporcionalmente diminuiria o crescimento populacional desses cladóceros. Outros autores como Khan & Khan (2008) concluíram que, para a espécies de ambiente temperado como o cladóceros *D. magna*, um aumento de aproximadamente 6°C na temperatura acelera o metabolismo e, conseqüentemente, aumenta o batimento cardíaco que demanda por mais oxigênio, o que acarreta um maior gasto energético, ocasionando uma redução do tamanho e massa corporal. O mesmo foi observado nesse estudo para a espécie *C. silvestrii*, onde tanto acima como abaixo da

faixa ótima (23 a 25°C) tem relação importante com o desenvolvimento reprodutivo na história de vida dessa espécie quando se utiliza o fator combinante abiótico junto com o inseticida Clorantraniliprole.

O inseticida Clorantraniliprole em nosso estudo se mostrou extremamente tóxico quando combinado com a temperatura fora da sua faixa de tolerância térmica de origem para organismos tropicais, aumentando muito o fator de risco ecológico. Por exemplo, o número de descendentes foi 50% menor na temperatura de 17°C, quando comparado com as temperaturas de 23 e 30°C para o cladóceros *C. silvestrii*. Uma hipótese provável para explicar a menor toxicidade a 23°C e 30°C pode ser devido o resultado da faixa de tolerância térmica para essa espécie e o efeito da temperatura sobre a toxicidade do inseticida Clorantraniliprole. Assim, a toxicidade de Clorantraniliprole é menor a 23°C em todos os parâmetros avaliados, pois se trata de uma temperatura de desempenho para *C. silvestrii*, com um aumento diretamente proporcional nos extremos máximo da faixa de tolerância térmica testada (BAO et al., 2008; BOECKMAN; BIDWELL, 2006; PRATO et al., 2008).

Um outro fator que pode ter contribuído para esse padrão no resultado da toxicidade crônica dependente da temperatura é o fato de que a substância-teste utilizada nesse estudo se tratar de um princípio ativo (Clorantraniliprole). Dessa maneira, os resultados observados nesse estudo são resultados de um efeito tóxico de um componente dos produtos formulados que levam esse princípio ativo. Os produtos comerciais, geralmente, são compostos formulados a partir de um conjunto dessas substâncias químicas. Dessa forma, o padrão-resposta dependente da temperatura pode mudar, pois cada princípio ativo pode determinar um efeito diferente. Assim, os testes com produtos formulados a partir desse princípio ativo podem apresentar um padrão de resposta completamente diferente do que os que ocorreram com o princípio ativo isolado quando os organismos de *C. silvestrii* são expostos a diferentes temperaturas, já que a mistura de diferentes padrões analíticos pode levar a diferentes formas de interações com provável efeito pronunciado, resultando em efeitos aditivos, antagônicos ou sinérgicos. Por ser considerado um composto novo no mercado, apesar de já bastante comercializado, é necessário atentar-se para estudos novos complementares que incorporem a combinação de fatores abióticos de estresse na avaliação da toxicidade de organismos aquáticos de água doce, colaborando para estratégias de manejo e preservação desse ambiente, com previsão mais realísticas diante das mudanças climáticas.

5. CONCLUSÕES

O presente estudo evidenciou os efeitos tóxicos do inseticida Clorantraniliprole para três temperaturas (17, 23 e 30°C) sobre o cladóceros *C. silvestrii*. Nossos resultados indicaram que o inseticida foi altamente tóxico para o cladóceros em questão durante a exposição aguda e crônica dentro de uma faixa restrita a $\mu\text{g L}^{-1}$ em todas as temperaturas testadas. Efeitos negativos foram observados na sobrevivência, reprodução e crescimento em baixas concentrações e seu efeito foi potencializado pelas alterações das temperaturas fora da faixa ótima para a espécie. Para o inseticida Clorantraniliprole, efeitos horméticos foram observados em concentrações baixas na temperatura de 23°C. Portanto, as informações obtidas nesse estudo mostram que, mesmo em baixas concentrações, a temperatura como fator abiótico tem um efeito negativo e potencializador quando combinado com o inseticida Clorantraniliprole que podem implicar em possíveis riscos ecológicos para os ecossistemas aquáticos tropicais.

Novos estudos são necessários para não subestimar ou superestimar efeitos como os estudos moleculares, celulares e testes com novos delineamentos experimental que podem complementar e auxiliar na compreensão de como as espécies tropicais reagem frente às alterações climáticas sofridas no decorrer dos séculos.

REFERÊNCIAS

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera). **ABNT NBR 13373**,2017
- ABREU, M.J., SANTOS-WISNIEWSKI, M.J., ROCHA, O., ORLANDO, T.C. The use of PCR-RFLP to genetically distinguish the morphologically close species: *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894 and *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Crustacea Cladocera). **Braz. J. Biol.**, 70:1, 121-124 p, 2010
- AYRES M, AYRES JÚNIOR M, AYRES DL, S. A. (2007). **BIOESTAT - Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Bio-Médicas** (p. 364).
- ATKINSON, D., MORLEY, S. A., WEETMAN, D.; HUGHES, R. N. Offspring size responses to maternal temperature in ectotherms. In ATKINSON, D.; THORNDYKE, M. (eds), Environment and Animal Development: Genes, Life Histories and Plasticity. Bios Scientific Publishers, Oxford, pp. 269–285, 2001.
- BAO, V. W., KOUTSAFTIS, A., & LEUNG, K. M. (2008). Temperature-dependent Toxicities of Chlorothalonil and Copper Pyrethrin to the Marine Copepod *Tigriopus Japonicus* and Dinoflagellate *Pyrocystis Lunula*. **Australasian Journal of Ecotoxicology**, 14(2/3), 45–54. <https://search.informit.org/doi/10.3316/informit.696861159889577>

BASSI DUPONT ITALY SRL (ITALY), A., RISON, J. L., & WILES, J. A. Klorantranilprol (DPX-E2Y45, Rynaxypyr(R), Coragen(R)), nov diamidni insekticid za zatiranje jabolcnega zavijaca koloradskega hrosca (*Leptinotarsa decemlineata*) in krizastega grozdnega sukaca (*Lobesia botrana*). **Plant Protection Society of Slovenia**; Chamber of Agriculture and Forestry of Slovenia. 2009.

BENNETT AF, LENSKI RE. An experimental test of evolutionary trade-offs during temperature adaptation. **P Natl Acad Sci USA**. 2007;104:8649–8654.

BINZER A, GUILL C, RALL BC, BROSE U. Interactive effects of warming, eutrophication and size structure: impacts on biodiversity and food-web structure. **Glob Chang Biol**. 2016;22:220–227.

BOECKMAN, C.J., BIDWELL, J.R. The Effects of Temperature, Suspended Solids, and Organic Carbon on Copper Toxicity to Two Aquatic Invertebrates. **Water Air Soil Pollut** 171, 185–202 (2006). <https://doi.org/10.1007/s11270-005-9036-3>

BRANDÃO, L. P. M. Efípios de *Daphnia Laevis* em Um Lago Permanente Tropical – Mecanismo de Resiliência a Alterações Ambientais. Dissertação (Mestrado) UFMG, 2009.

BRANS KI, et al. The heat is on: Genetic adaptation to urbanization mediated by thermal tolerance and body size. **Global Change Biol**. 2017;3:5218–5227.

CASALI-PEREIRA, M.P., DAAM, M.A., RESENDE, J.C., Vasconcelos, A.M., Espíndola, E. L., Botta, C.M., 2015. Toxicity of Vertimec® 18 EC (active ingredient abamectin) to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. *Chemosphere* 139, 558-564.

CORDOVA, D., BENNER, E. A., SACHER, M. D., RAUH, J. J., SOPA, J. S., LAHM, G. P., SELBY, T. P., STEVENSON, T. M., FLEXNER, L., GUTTERIDGE, S., RHOADES, D. F., WU, L., SMITH, R. M., & TAO, Y. (2006). Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 84(3), 196–214.

CHRISTENSEN MR, et al. Multiple anthropogenic stressors cause ecological surprises in boreal lakes. **Global Change Biol**. 2006;12:2316–2322.

CUI, F., CHAI, T., QIAN, L., & WANG, C. (2017). Effects of three diamides (chlorantraniliprole, cyantraniliprole and flubendiamide) on life history, embryonic development and oxidative stress biomarkers of *Daphnia magna*. **Chemosphere**, 169,

DE LUCCA, G. M., FREITAS, E. C., & DA GRAÇA GAMA MELÃO, M. (2018). Effects of TiO₂ Nanoparticles on the Neotropical Cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii* by Waterborne and Dietary Routes. **Water, Air, & Soil Pollution**, 229(9), 307.

DICK, J. T. A.; FALCON, S. E.; ELWOOD, R. W. Active brood care in an amphipod: influences of embryonic development, temperature and oxygen. *Animal Behaviour*, 1998. 56: 663–672.

DuPont. Altacor® & Coragen® now registered for use on more crops. (2011). https://www.dupont.ca/content/ca/en_ca/products-and-services/crop-protection/vegetable-protection/press-releases/altacorcoragen.

FONSECA, A.R.; ROCHA, O. (2004). **The life-cycle of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902,**

a Neotropical endemic species (Crustacea, Cladocera, Daphnidae). *Acta Limnol. Bras.*, 16((4)), 319–328.

FLORES, J. L. G.; SALAS, M. E. H.; SARMA, S. S. S.; NANDINI, S. Somatic and population growth responses of *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia pulex* (Cladocera) to changes in food (*Chlorella vulgaris*) level and temperature. **Journal of Environmental Biology**. 2011. 32: 489 – 495.

GREEN, J. (1956). Growth, Size And Reproduction In *Daphnia* (Crustacea: Cladocera)*. **Proceedings of the Zoological Society of London**, 126(2), 173–204.

JENKINS M. Prospects for biodiversity. **Science**. 2003;302:1175–1177. doi: 10.1126/science.1088666

Khan, M. A. Q.; Khan, M. A. Effect of temperature on waterflea *Daphnia magna* (Crustacean: Cladocera). **Nature Precedings**. 2008.

KNEITEL JM, CHASE JM. Trade-offs in community ecology: linking spatial scales and species coexistence. *Ecology Letters*. 2004;7:69–80

LAHM, G. P., et al.. (2007). Rynaxypyr™ : A New Anthranilic Diamide Insecticide Acting at the Ryanodine Receptor. In **Pesticide Chemistry** (Vol. 17, Issue 22, pp. 111–120). Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

LAVTIŽAR, V., HELMUS, R., KOOLS, S. A. E., DOLENC, D., VAN GESTEL, C. A. M., TREBŠE, P., WAAIJERS, S. L., & KRAAK, M. H. S. (2015). Daphnid Life Cycle Responses to the Insecticide Chlorantraniliprole and Its Transformation Products. **Environmental Science & Technology**, 49(6), 3922–3929.

LEBLANC, G. A., & MCLACHLAN, J. B. (1999). Molt-independent growth inhibition of *Daphnia magna* by a vertebrate antiandrogen. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 18(7), 1450–1455.

LEE, C. E.; Strathmann, R. R. Scaling of gelatinous clutches: effects of siblings' competition for oxygen on clutch size and parental investment per offspring. **American Naturalist**., 1998. 151: 293–301.

LÜRLING, M.; ROOZEN, F.; VAN DONK, E.; GOSER, B. Response of *Daphnia* to substances released from crowded congeners and conspecifics. **Journal Of Plankton Research**. 2003. 25(8): 967 – 978

MACHADO, K. S.; CASALI-PEREIRA, M. P.; OLIVEIRA, D.M.; ISIQUE, W.D.; LEITE, M.A.; MINILLO, A. (2009). **Bioensaios de toxicidade aguda com fármacos: diclofenaco de sódio e paracetamol**.

MANSANO, A. S. et al. (2016). Effects of diuron and carbofuran pesticides in their pure and commercial forms on *000*: The use of protozoan in ecotoxicology. **Environmental Pollution**, 213, 160–172.

MEIRINHO, PA. Ecologia do zooplâncton. Disponível em:
<http://www.ecologia.ib.usp.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=167&Itemid=469>. Acesso em: 27 out. 2018.

MÜLLER, H., 1972. Wachstum and phosphatbedarf von *Nitzschia actinastroides* (Lemn.). Goor in statischer und homokontiuierlicher kultur unter phosphatlimitierung. *Arch.*

Hydrobiol. Suppl. 38, 399-484.

MÜLLER MF, Colomer J, Serra T (2018) Temperature-driven response reversibility and short-term quasi-acclimation of *Daphnia magna*. PLoS ONE 13(12): e0209705.

National Center for Biotechnology Information (b). (2021). *PubChem Compound Summary for CID 11271640, Chlorantraniliprole*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorantraniliprole>.

OECD. (2004). **OECD Guideline for testing of chemicals *Daphnia sp.*, Acute Immobilisation Test 202.**

OECD. (2008). **OECD Guidelines for testing of chemicals *Daphnia magna* reproduction Test 2011.**

OETKEN, M.; JAGODZINSKI, L. S.; VOGT, C.; JOCHUM, A.; OEHLMANN, J. Combined effects of chemical and temperature stress on *Chironomus riparius* populations with differing genetic variability. **Journal of Environmental Science and Health**. Part A. 2009. 44: 955–962.

PRATO, E.; SCARDICCHIO, C.; BIANCOLINO, F. Effects of Temperature on the Acute Toxicity of Cadmium to *Corophium insidiosum*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 136, n. 1-3, p. 161-166, 1 jan. 2008.

RAYMUNDO, L.B., ROCHA, O., MOREIRA, R.A., MIGUEL, M., DAAM, M.A. Sensitivity of tropical cladocerans to chlorpyrifos and other insecticides as compared to their temperate counterparts. **Chemosphere**, 220, 937-942, 2019

RÉGO, A. P. J., BIDOIA, E. D., & REGANHAN-CONEGLIAN, C. M. (2017). Toxicity Studies of Ametryne to Land and Aquatic Organisms. **Aquatic Science and Technology**, 6(1), 8.

ROCHA, O. et al. Sensitivities of three tropical indigenous freshwater invertebrates to single and mixture exposures of diuron and carbofuran and their commercial formulations. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 7, p. 834–844, 20 set. 2018.

ROLDÃO, T. M. Avaliação do efeito combinado de carbofurano e temperatura para *Ceriodaphnia dubia*. Dissertação de Mestrado, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2014.

SALA OE, et al. Global biodiversity scenarios for the year 2100. **Science**. 2000;287:1770–1774

SAVAGE, V. M.; GILLOOLY, J. F.; BROWN, J. H.; WEST, G. B.; CHARNOV, E. L. Effects of body size and temperature on population growth. **The American Naturalist**. 2004. 163: 429-441.

SIBLY, R. M.; CALOW, P. Direct and absorption costing in the evolution of life cycles. **Journal of Theoretical Biology**. 1984. 111: 463–473

SPAACK JW, et al. Shifts of community composition and population density substantially affect ecosystem function despite invariant richness. **Ecol Lett**. 2017;20:1315–1324.

TAKENAKA, R. A. (2007). Avaliação da toxicidade de *Mycrocistis aeruginosa* de florações naturais de cianobactérias de reservatórios do Rio Tietê. Escola de Engenharia de São Carlos.

TUELHER, Edmar S. et al. Chlorantraniliprole-mediated toxicity and changes in sexual fitness of the Neotropical brown stink bug *Euschistus heros*. **Journal of pest science**, v. 90, n. 1, p. 397-405, 2017.

WU, P. P. Y. *et al.* Timing anthropogenic stressors to mitigate their impact on marine ecosystem resilience. **Nature Communications**8, 10.1038/s41467-017-01306-9 (2017).

WWF. Living Planet Report 2014: Species and Spaces, People and Places (Gland, Switzerland, 2014).

XIE, P.; IWAKUMA, T.; FUJII, K. Effect of Available Food and Temperature on the Growth and Reproduction of *Daphnia rosea*. **Journal of freshwater ecology**. 2000. 15(3):379-388.

Z. MACIEJ GLIWICZ, BOAVIDA, M.J., Clutch size and body size at first reproduction in *Daphnia pulicaria* at different levels of food and predation, **Journal of Plankton Research**, Volume 18, Issue 6, June 1996, Pages 863–880.

Implicações entre diferentes temperaturas no potencial tóxico do herbicida Ametrina na história de vida do cladócero de água doce *Ceriodaphnia silvestrii*.

RESUMO

Nos últimos anos, a intervenção das atividades antrópicas como as ligadas a agricultura tem aumentado consideravelmente e no meio ambiente tem causado efeitos adversos na estrutura e nas funções dos ecossistemas aquáticos devido, principalmente, ao despejo de compostos químicos, como os herbicidas, que tem ganhado destaque pela parcela de responsabilidade diante do aumento desses desequilíbrios. O Brasil tem se destacado por ser um dos grandes exportadores de produtos químicos, além de ser considerado o maior consumidor de agroquímicos do mundo desde o ano de 2008. Como consequência, a contaminação aquática, principalmente por agrotóxicos, tem causado efeitos graves de desequilíbrios na biota que podem ter seus efeitos potencializados diante dos cenários de mudanças climáticas. Assim, foram avaliados, nesse estudo, os efeitos tóxicos agudos e crônicos do herbicida Ametrina, um dos ingredientes ativos mais utilizados no combate a ervas daninhas, na relação dose-resposta (mg L^{-1}) e temperatura (17, 23 e 30°C) para um organismo aquático tropical de ampla distribuição, a *Ceriodaphnia silvestrii*. Os testes agudos e crônicos indicaram toxicidade do herbicida Ametrina em todas as temperaturas testadas. Porém, nas temperaturas extremas (17 e 30°C), no qual o organismo-teste foi aclimatado, os efeitos deletérios nos parâmetros avaliados foram significativamente maiores em concentrações mais baixas do inseticida. Os testes de toxicidade crônica demonstram uma diminuição significativa no comprimento corporal, na produção de ovos e no número de descendentes na temperatura mais baixa testada, mostrando que a temperatura tem um efeito significativo na população de *Ceriodaphnia silvestrii*. Com base nesses resultados, ressaltamos a importância da inclusão de fatores abióticos nos ensaios de toxicidade com xenobióticos e a utilização de espécies nativas para avaliação de risco ambiental.

Palavras-chave: microcrustáceos, herbicida, ingrediente ativo, temperatura, mudança climática

1. INTRODUÇÃO

Manter e melhorar a produtividade agrícola para suprir a demanda por alimentos e matéria prima é um dos desafios desse século para a agricultura moderna. Para isso, a utilização de agrotóxicos é fundamental, pois seu objetivo é ampliar a capacidade de produção agrícola. Porém, muitas vezes, não ocorre um controle no uso desses químicos, o que leva a contaminação e, como consequência, aparecem graves problemas de saúde pública e danos aos seres vivos devido a perda da biodiversidade e a contaminação do meio ambiente (CARVALHO, 2006; DAAM; VAN DEN BRINK, 2010).

Seguindo essa tendência de expansão, ao longo dos anos, a agricultura mundial cresceu muito em área cultivada e produção, acompanhado pelo crescimento no uso de fertilizantes, técnicas de manejo e uso intensivo de agrotóxicos (ARMAS et al.; 2007). Mundialmente, a cada ano, é estimado que cerca de 2,5 milhões de agrotóxicos sejam lançados no meio ambiente. Desses, 37% correspondem aos herbicidas (VERCRAENE-EAIRMAL et al., 2010). O Brasil é considerado o maior consumidor de agrotóxicos no mundo, seguido pelos Estados Unidos (PELAEZ et al., 2013). No Brasil, o estado de São Paulo é o maior consumidor de agrotóxico, com destaque para a monocultura da cana-de-açúcar de onde provém 11% das vendas de agrotóxicos (ARMAS et al.; 2007), e mais de 50% dos produtos utilizados anualmente no país são herbicidas (IBGE, 2014)

Apesar dos benefícios rentáveis da utilização de agrotóxicos para as monoculturas de grande importância econômica, surgiram algumas preocupações quanto aos efeitos deletérios do seu uso para os organismos não-alvo, como as plantas, microrganismos, animais e seres humanos, já que esses compostos não são totalmente seletivos e podem causar diversos efeitos tóxicos, representando uma ameaça em potencial aos ecossistemas (JIANG et al., 2020; SCHREINEMACHERS; TIPRAQSA, 2012). Alguns estudos têm relatado que apenas 0,1% dos agrotóxicos aplicados nas diversas culturas atingem seu alvo específico e, os outros 99,9 % restantes da aplicação são persistentes no ambiente, ou seja, com potencial de bioacumulação, mantendo-se instável nos solos, água superficiais e subterrâneas e no ar (PIMENTEL; LEVITAN, 1986; LÓPEZ-PÉREZ et al.; 2006; SHARMA et al., 2010). Após a sua aplicação, por ser persistente no meio ambiente, os agrotóxicos são submetidos a uma série de fatores bióticos e abióticos que podem levar a degradação e ao transporte por deriva, lixiviação e escoamento superficial através da água, sedimento e solo (WILSON; FOOS, 2006). A combinação das condições geográficas e climáticas que são específicas para cada ecossistema também tem influência direta na toxicidade dos organismos não-alvo (MANSANO, 2016).

Diversas pesquisas referentes a contaminação ambiental causada pelo uso de agrotóxicos são relatadas na literatura (HUERTAS et al., 2010; JACOMINI et al., 2009; MANSANO et al., 2016; MIGUEL, 2020; MOREIRA et al., 2017). Dessa maneira, é claro o risco de contaminação da água no ambiente, principalmente quando as culturas agrícolas que estão em constante expansão e em proximidade com os corpos d'água (ABHILASH; SINGH, 2009). E sua degradação é dependente de fatores abióticos, como o pH, a temperatura, umidade, além das propriedades do solo e características próprias do agrotóxico (pka/b, hidrofobicidade) e da comunidade microbiana do solo (VAN EERD et al., 2014). Consequentemente, os corpos d'água dessas regiões sofrerão alterações no seu fluxo hidrológico, com aumento da temperatura, da carga de sedimento depositada e nutrientes e diminuição da taxa de oxigênio dissolvido, devido ao excesso do uso desse contaminantes, que aumentam o nível de poluentes como os agrotóxicos (DUDGEON et al., 2006). Dessa forma, os corpos d'água doce tropical e subtropical estão entre os mais ameaçados do planeta (LAURANCE et al., 2014). Consequentemente, esse aumento ou diminuição da temperatura pode levar a mais adaptações do sistema agrícola que seguirão em expansão.

A Ametrina faz parte do grupo de herbicidas pertencentes a classe das s-triazinas. Ela é bastante utilizada no mundo e frequentemente detectada nas amostras de solos e água, com alta resistência no meio ambiente e nos organismos (JACOMINI et al., 2009; LIU et al., 2017). Sua persistência, e excelente desempenho dos efeitos seletivos sobre as ervas daninhas e os prováveis danos causados a biota levou essa classe uma série de pesquisas, tornando a classe das s-triazinas uma das mais estudadas no mundo (MANDELBAUM et al., 2008). Porém, poucos são os estudos que classificam o grau de sua toxicidade com as mudanças climáticas.

O herbicida Ametrina surgiu na década de 50, com aplicação em pré e pós emergência agindo no controle de ervas daninhas anuais com folhas estreitas e largas, encontradas principalmente junto as culturas de cana-de-açúcar, milho, banana e outras (GAST et al., 1955; RODRIGUES; ALMEIDA, 2005). Esse herbicida tem modo de ação rápido, por ser absorvido rapidamente pelas folhas e raízes, transportado pelo xilema, acumula-se no meristema apical e dessa forma acaba impedindo a fotossíntese e outros processos enzimáticos considerados essenciais a sobrevivência da planta (ROBERTS, 1998). Sendo considerado um herbicida bastante utilizado no mundo e o Brasil é considerado o seu maior consumidor, seguido pela Tailândia, México, Chile e Cuba (HENRI, 2008). No Brasil, diversas marcas registradas utilizam o Ametrina como princípio ativo em suas demais composições (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005). Esse

herbicida é considerado de classe toxicológica III (EPA, 2005), que o classifica como moderadamente tóxico, porém é facilmente adsorvido pelo solo e pode ser medianamente lixiviado dependendo das características químicas e do teor de matéria orgânica do solo (ANDRADE et al., 2010; RODRIGUES; ALMEIDA, 2005). A meia-vida do herbicida Ametrina é de 50 a 120 dias em solo e até 200 dias em água natural, com pH 7,0 e temperatura variando de 5 a 29°C. O tempo de meia-vida pode ser reduzido com o aumento da temperatura e acidez e diminuição da umidade. É considerado pouco volátil e mediante sensível a volatilidade (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005).

Com a quantidade de informação que temos hoje e o aumento do uso da terra pelo sistema agrícola em associação com o uso permanente de herbicidas que levam a desmatamentos, captações de água e contaminações aquáticas que auxiliam para um aumento das mudanças climáticas, achamos pertinente unir a avaliação toxicológica de um organismo não-alvo como a *C. silvestrii* a uma variável ambiental, a temperatura, e um herbicida bastante utilizado no Brasil e outras partes do mundo como o Ametrina.

Para isso, foram realizados testes de toxicidade aguda e crônica como importantes ferramentas de avaliação do comportamento do agente tóxico no organismo e fornecer subsídios para prever como podem ser os efeitos em níveis hierárquicos maiores (PIVATO et al., 2014).

Nos ambientes aquáticos, os alvos dos efeitos do herbicida Ametrina são ampliados para invertebrados e vertebrados, como por exemplo, em algas, onde os efeitos tóxicos do herbicida causaram inibição fotossintética (WILKINSON et al., 2005). Já para o peixe Zebra (*Danio rerio*), o efeito tóxico do herbicida Ametrina induziu má formação das larvas (LIN et al., 2018) e afetou a sensibilidade das rãs tropicais *Physalaemus cuvieri* e *Hypsiboas pardalis* (DAAM et al., 2019). Para o cladóceros *C. silvestrii*, até a presente data não foram encontrados dados na literatura do efeito do herbicida Ametrina, muito menos em combinação com fatores abióticos de estresse e poucos foram os estudos já realizados com espécies de cladóceros (FARRÉ et al., 2002; RÉGO et al., 2017).

Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito tóxico do herbicida Ametrina sobre um organismo não-alvo, o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, por meio de testes de toxicidade aguda e testes de toxicidade crônica combinado a um fator adicional de estresse, a temperatura. A espécie tropical *C. silvestrii* é amplamente encontrada em águas doces brasileiras e é considerada uma espécie-modelo adequada para análises de ecotoxicidade devido sua elevada sensibilidade e fácil manutenção em laboratório (ABREU et al., 2010, RAYMUNDO et al., 2019).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Organismo-teste e condições de cultivo

O organismo-teste selecionado para este estudo foi uma espécie nativa e endêmica da de cladóceros da região Neotropical e padronizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas, a *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Crustacea, Cladocera). Esse cladóceros atua como consumidor primário nas cadeias alimentares aquáticas e se alimenta por filtração de material orgânico particulado. Esse organismo possui 0,8 a 0,9 mm de comprimento, corpo ovalado com acentuado sino cervical e com 9 a 12 espinhos anais no pós-abdômen (FONSECA; ROCHA, 2004), sendo encontrado no Brasil e na Argentina (ABNT NBR 13373, 2017).

A espécie foi inicialmente coletada do reservatório do Lobo-Broa, Itirapina (SP) e mantido a aproximadamente 5 anos em cultivo no Laboratório de Ecotoxicologia do Departamento de Biologia Evolutiva (DEBE) da Universidade Federal de São Carlos (São Carlos – SP).

A espécie foi cultivada em água reconstituída previamente preparada com 1500 mg de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (solução 1) e 200 mg de KCl, 4800 mg de NaHCO_3 e 6100 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (solução 2) ambos diluídos em 1 L de água destilada (ABNT NBR 13373, 2017). Em um recipiente com aeração constante, a água destilada foi acrescida das duas soluções específicas (solução 1 e 2) a fim de que ela tivesse as seguintes características: pH entre 7,0 e 7,5 e uma dureza total entre 40 e 48 $\text{mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ (ABNT, 2017; ASTM, 2001). Essa espécie foi mantida em béqueres de 2 L, com um máximo de 120 indivíduos e alimentados com a alga clorofícea *Raphidocelis subcapitata* (10^5 células mL^{-1}), cultivada em meio CHU-12 (MÜLLER, 1972) e uma suspensão contendo levedura e ração para peixe preparado a partir da mistura de partes iguais de fermento biológico seco tipo Fleischmann® e ração para peixe (Vitormômio®) foi fornecida como suplemento alimentar (1 mL L^{-1}) (ABNT, 2017).

Os béqueres foram recobertos com um filme plástico para evitar evaporação. As manutenções das culturas foram realizadas três vezes por semana, quando eram renovados a água e o alimento, sendo uma troca total da água e duas parciais (apenas 50% da água de cultivo foi renovada). Os cultivos de *Ceriodaphnia silvestrii* foram mantidos em incubadoras e aclimatados na faixa de teste com temperatura controlada a 17, 23 e 30°C e com fotoperíodo de 12/12 horas de claro/escuro.

2.2. Substâncias e soluções-estoque

O herbicida Ametrina (CAS n° 834-12-8) com pureza $\geq 98\%$ (padrão analítico) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O herbicida Ametrina foi diluído em acetona de grau analítico (C_3H_6O ; LabSynth) e sua solução-estoque preparada pela diluição de uma quantidade específica em água de cultivo (água reconstituída) imediatamente antes dos testes devido a sua baixa solubilidade em água que pode chegar até 209 mg L^{-1} a 25°C (National Center for Biotechnology Information (a), 2021).

As concentrações nominais do herbicida foram obtidas pela diluição da solução-estoque, a qual também foi feita em água de cultivo (água reconstituída).

2.3. Testes de sensibilidade com o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*

Testes de sensibilidade com a substância de referência cloreto de sódio (NaCl) foram realizados periodicamente para avaliar as condições fisiológicas dos organismos cultivados no laboratório e aclimatados nas temperaturas de 17, 23 e 30°C , conseqüentemente, garantir a confiabilidade e precisão dos dados durante os testes de toxicidade aguda e crônica de acordo com as diretrizes da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2017).

Cinco neonatos (6 - 24 h) de idade foram colocados em recipientes de plástico de poliestireno de 50 mL, que continham 15 mL de solução controle (apenas água de cultivo) e solução teste. As concentrações testes foram testadas em réplicas que variaram de: 0,6 a $2,2 \text{ g L}^{-1}$. Essas concentrações foram preparadas por diluição de uma solução-estoque de 100 g L^{-1} usando água reconstituída como diluente. Os cladóceros *C. silvestrii* foram mantidos nas mesmas condições de cultivo, sem iluminação e alimentos durante todo o período de exposição. Após 48 h de teste, o número de organismos imóveis foi contado para obter valores de CE_{50} - 48 h. Os organismos foram considerados saudáveis e adequados para o uso nos testes de toxicidade quando os valores de CE_{50} - 48 h estavam dentro de limites já pré-estabelecidos ($1,0$ a $1,83 \text{ g L}^{-1}$) para a substância de referência. (CASALI-PEREIRA et al., 2015). O teste foi considerado válido quando a porcentagem de organismos imóveis no controle não excedeu 10% (ABNT, 2017)

As variáveis pH, temperatura da água, condutividade elétrica, dureza e concentração de oxigênio dissolvido foram medidos no início e no final dos testes.

2.4. Testes de toxicidade aguda e crônica com efeito combinado da temperatura

Os testes de toxicidade aguda e crônica com o cladóceros *C. silvestrii* seguiram as diretrizes pré-estabelecidas pela Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD, 2004; 2008) e pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2017). Testes preliminares foram necessários para se estabelecer a faixa de concentração utilizada para cada composto nos testes definitivos. Em seguida, testes de toxicidade aguda foram realizados respeitando a seguinte faixa de concentrações nominais de 0,5 a 20 mg L⁻¹ de Ametrina administrado em sua formulação padrão adquiridos do sigma Aldrich. Essas concentrações foram preparadas por diluição de uma solução-estoque de 2000 mg L⁻¹.

De acordo com as pesquisas de Oetken et al (2009), provavelmente as temperaturas médias globais terão um aumento de 3°C até o ano de 2100. Assim, nossos cultivos foram realizados a 23°C conforme indicado na ABNT (2017) que estabelece uma faixa ótima de temperatura entre 23 e 27°C como controle, ou seja, em situação de não-estresse, para testes de toxicidade. De forma a simular uma previsão de aumento médio da temperatura das águas de ambientes tropicais, como um fator de estresse para o cladóceros *C. silvestrii*, foi determinado 3°C acima do valor máximo estabelecido pela ABNT (2017) para testes de toxicidade com cladóceros (27°C), ficando em 30°C. Esse valor ficou 7°C acima da nossa temperatura de controle (23°C). Assim, determinamos também 6°C abaixo da nossa temperatura de controle. De acordo com nossos estudos preliminares, essas temperaturas são consideradas causadores de estresse para populações de cladóceros *C. silvestrii*. Em combinação com o herbicida Ametrina esses efeitos podem ser ainda mais previsíveis.

Após testes preliminares, testes definitivos agudos e crônicos foram realizados com o cladóceros *C. silvestrii* utilizando neonatos de fêmeas que já estavam aclimatadas nas temperaturas determinadas para os testes combinados com o inseticida (17, 23 e 30°C).

Nos testes de toxicidade aguda, cinco réplicas foram usadas por tratamento. Cada réplica continha cinco neonatos (6 - 24 h de idade) em um recipiente de polipropileno atóxico com 15 mL de solução-teste ou 15 mL de água reconstituída (controle). Para o composto foi necessário adicionar um controle de solvente (água reconstituída + acetona) em uma concentração nominal de 0,01% de acetona (v/v). Os organismos expostos não foram alimentados no decorrer dos experimentos e foram mantidos em incubadora e no escuro, como recomendado pela OECD (2004) e ABNT (2017) nas temperaturas de teste 17, 23 e 30°C, respectivamente. Após as 48 h de exposição, os organismos foram observados sob microscópio estereoscópico e o número de indivíduos imóveis foi contado

e usado para o cálculo da concentração efetiva mediana (CE_{50} - 48 h) de cada composto estudado.

Os testes de toxicidade crônica foram realizados utilizando dez réplicas, cada uma contendo um neonato (6 - 24 h de idade) em 15 mL de solução-teste ou 15 mL de água reconstituída (controle). Um controle do solvente (0,01% de acetona, v/v) foi adicionado. Os testes foram dinâmicos, sendo as soluções-teste renovadas diariamente. A duração do experimento foi de sete dias e os organismos foram alimentados e mantidos sob as mesmas condições de temperatura, fotoperíodo descritas para o cultivo. Diariamente, durante os sete dias, os organismos foram observados sob microscópio estereoscópico, a fim de verificar a sobrevivência das fêmeas, o número de ovos e o número de descendentes contados e descartados a cada renovação.

Para garantir a variabilidade e a reprodutibilidade dos valores de toxicidade encontrados, cinco testes definitivos de toxicidade aguda e três testes de toxicidade crônica foram realizados para cada temperatura. Além disso, as variáveis abióticas como o pH, temperatura da água, condutividade elétrica, dureza e concentração de oxigênio dissolvido foram medidos no início e no final dos testes de toxicidade aguda e diariamente nos testes de toxicidade crônica.

2.5. Análise dos dados

Os valores de CE_{50} -48 h e seus respectivos intervalos de confiança de 95% para os testes de toxicidade aguda foram calculados por regressão não linear, ajustando-se uma equação logística aos dados no software Statistica 10.0 (Statsoft Inc., 2011). Já os dados dos testes de toxicidade crônica foram submetidos à análise de normalidade (teste de Chi-Quadrado) e homogeneidade das variâncias (teste de Bartlett) e, em seguida a análise de variância (ANOVA). Os testes de Tukey e Kruskal-Wallis foram utilizados para verificar a existência de diferenças entre os tratamentos e o controle em dados que seguiram uma distribuição normal. Nos testes estatísticos, diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas por meio do *software* BioEstat 5.3 (AYRES et al., 2007).

3. RESULTADOS

3.1. Variáveis abióticas dos testes de toxicidade aguda e crônica

Durante todos os cinco testes de toxicidade aguda com cada composto em combinação com o fator de estresse temperatura, os valores de pH das soluções-teste ficaram dentro do intervalo de 7,0 a 7,5 não variando mais que 1,0 unidade por teste. A dureza da água não ultrapassou o valor de 48 mg CaCO₃, ficando entre 40,0 e 43,0 mg CaCO₃. Cada temperatura de teste da água permaneceu estável nas condições estabelecidas (17, 23 e 30°C). O oxigênio dissolvido foi superior a 4,0 mg L⁻¹, ficando entre 6,5 e 7,0. A condutividade elétrica não variou mais que 165 µs cm⁻¹, seguindo os critérios estabelecidos pela OECD (2004; 2008) como pela ABNT (2017).

Nos três testes de toxicidade crônica realizados com o herbicida Ametrina, os valores de pH das soluções-teste ficaram dentro do intervalo de 7,0 a 8,0, não variando mais que 1,0 unidade por teste. A dureza da água variou de 40 a 44 mg CaCO₃. A temperatura da água ficou dentro da faixa estabelecida para cada condição-teste (17, 23 e 30°C). O oxigênio dissolvido variou de 6,00 a 8,23 mg L⁻¹. A condutividade elétrica ficou entre 160 e 165 µs cm⁻¹. Assim, todos os testes preencheram os critérios de validade estabelecidos nas orientações fornecidas tanto pela OECD (2004; 2008) como pela ABNT (2017).

3.2. Testes de Sensibilidade com a substância de referência cloreto de sódio

Os valores de CE₅₀-48 h dos testes de sensibilidade com o cloreto de sódio (NaCl) para o cladóceros *C. silvestrii* estavam dentro dos limites inferior (LI) e superior (LS) da tabela de controle determinada neste estudo, ou seja, 1,64 a 1,29 g L⁻¹ na temperatura de 17°C; 1,37 a 1,67 g L⁻¹ na temperatura de 23°C e 1,32 a 1,76 g L⁻¹ na temperatura de 30°C, mostrando que os organismos eram saudáveis o suficiente para serem utilizados nos ensaios de acordo com a faixa de referência: 1,00 a 1,83 g L⁻¹ para testes com 48 h de exposição (CASALI-PEREIRA et al., 2015; TAKENAKA et al., 2007; MACHADO et al., 2009; MANSANO et al., 2016) (Figura 1).

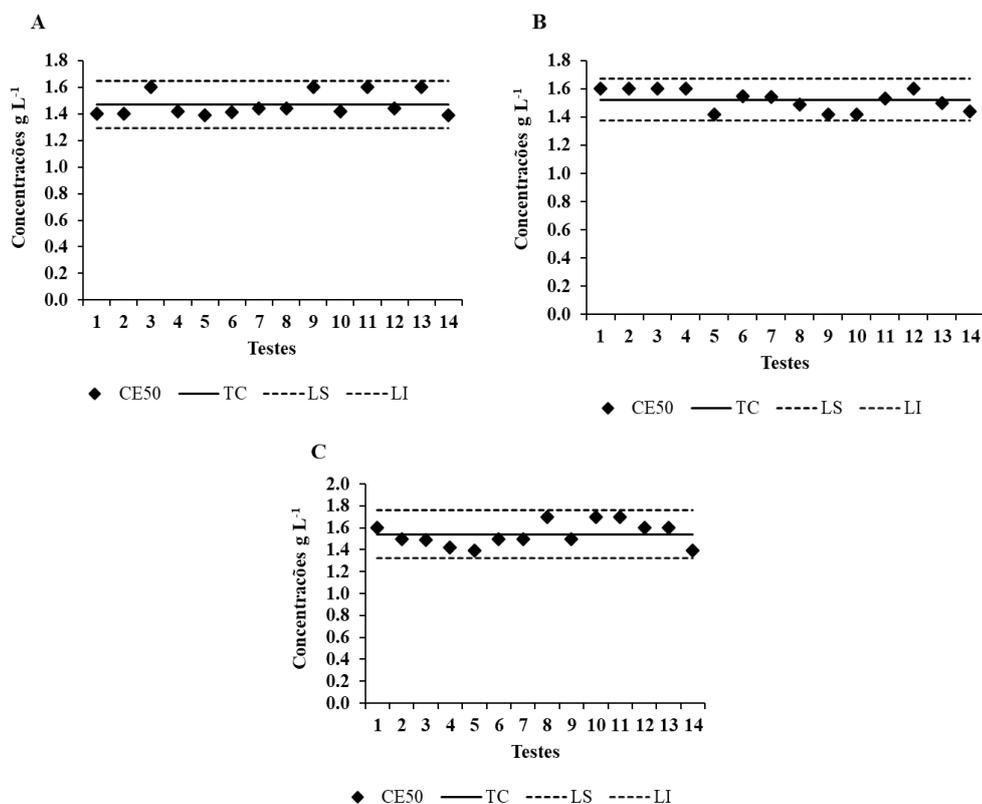


Figura 1. Faixa de sensibilidade de *Ceriodaphnia silvestrii* (CE₅₀-48h) a substância de referência Cloreto de Sódio (NaCl) com base nos resultados de 14 testes de toxicidade nas temperaturas testadas 17°C (A), 23°C (B) e 30°C (C). Os limites superior e inferior correspondendo a intervalos de confiança de 95% respectivamente.

3.3. Testes de toxicidade com efeito combinado de temperaturas e herbicida para o cladócero *C. silvestrii*

No final dos testes de toxicidade aguda e crônica a sobrevivência dos organismos de *C. silvestrii* foi de 100% tanto controle como também no controle com solvente, mostrando que não houve diferença significativa ($\pm 10\%$ de organismos imóveis) entre os resultados do controle e do controle com solvente (0,01% de acetona) excluindo qualquer possibilidade de interferência do solvente nos resultados finais dos testes de toxicidade aguda e crônica.

Para os testes de toxicidade aguda com efeito combinado de temperaturas (17, 23 e 30°C) com o herbicida Ametrina (ingrediente ativo com formulação padrão), os valores de CE₅₀-48h foram calculados separadamente para cada um dos cinco testes realizados nesse estudo. Os resultados comparativos são apresentados na tabela 1 onde é possível

observar que na maior temperatura testada (30°C), a média de mortalidade ocorreu em concentrações mais baixas do que quando comparada com a média de mortalidade das temperaturas mais baixas (17 e 23°C).

Com os dados relativos aos cinco testes de toxicidade aguda também foi possível calcular a CE_{10-48 h}, que corresponde ao NOEC (Concentração de Efeito Não Observado) para o composto nas temperaturas mais baixas de 17 e 23°C, já na temperatura de 30°C o valor da NOEC não pode ser estimado. O valor médio da CE_{10-48 h} encontrado para o herbicida Ametrina foi de 0,21 ± 128,0 mg L⁻¹ na temperatura de 17°C e 2,15 ± 39,51 mg L⁻¹ na temperatura de 23°C. Da mesma forma, foi possível calcular a CE_{20-8 h}, que corresponde ao CEO (Concentração de Efeito Observado) para o composto em todas das temperaturas de teste. O valor médio da CE_{20-48 h} encontrado para o herbicida Ametrina foi de 1,05 ± 10,17 mg L⁻¹ na temperatura de 17°C, 3,28 ± 28,23 mg L⁻¹ na temperatura de 23°C e 0,22 ± 122,5 mg L⁻¹ na temperatura de 30°C.

Tabela 1. Valores de CE₅₀ - 48 h do padrão Ametrina combinado com o fator de estresse nas respectivas temperaturas de 17, 23 e 30°C, e seus respectivos intervalos de confiança, para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* nos testes de toxicidade aguda.

Ametrina						
Temperatura	17°C		23°C		30°C	
Números de ensaio	CE ₅₀ (48 h)	IC(95%)	CE ₅₀ (48 h)	IC(95%)	CE ₅₀ (48 h)	IC(95%)
1	3,75	2,14 - 5,36	8,16	7,10 - 9,24	1,23	0,93 - 1,53
2	4,02	2,13 - 5,91	5,22	3,95 - 6,49	1,38	1,09 - 1,67
3	4,44	2,47 - 6,41	7,21	5,12 - 9,31	1,7	1,13 - 2,21
4	3,60	2,18 - 5,02	7,06	4,92 - 9,20	1,69	0,93 - 2,44
5	3,30	2,07 - 4,52	6,85	4,94 - 8,76	1,44	0,96 - 1,91
Média µg L⁻¹	3,82		6,90		1,49	
Desvio Padrão	0,43		0,95		0,18	
Coefficiente de Variação (%)	11,31		13,80		12,26	
Faixa de Sensibilidade mg L⁻¹	3,30 - 4,44		5,22 - 8,16		1,23 - 1,70	

Porcentagem de organismos imóveis

Os resultados encontrados neste estudo demonstraram um aumento na toxicidade aguda com o aumento gradual das concentrações testadas, para o herbicida Ametrina (para 17°C: Kruskal-Wallis, H=33,39; p < 0,001; para 23°C: Kruskal-Wallis, H=32,86; p < 0,001; para 30°C: Kruskal-Wallis, H=33,67; p < 0,001). Possivelmente, houve um aumento proporcional do gasto energético sofrido pelos organismos na tentativa de

manutenção da vida (Figura 2). Para as temperaturas de 17°C e 23°C, até a concentração de 5 mg L⁻¹, mais de 40% dos organismos ficaram imóveis. Na temperatura de 17°C, a partir da concentração de 10,0 mg L⁻¹, em média, 80% estavam imóveis, enquanto que na temperatura de 23 °C, em média 80% estavam imóveis na concentração de 15 mg L⁻¹. Para a temperatura de 30°C, a partir da concentração de 1,0 mg L⁻¹, em média, 50% dos organismos de *C. silvestrii* ficaram imóveis e a partir da concentração de 10,0 mg L⁻¹, em média, mais de 90% dos organismos ficaram imóveis após 48h de exposição. O teste de toxicidade aguda demonstrou que a 30°C a porcentagem de organismos imóveis de *C. silvestrii* foi maior em concentrações mais baixas, comparando com as temperaturas de 17 e 23°C, sugerindo maior sensibilidade que nas temperaturas mais baixas testadas (Figura 2).

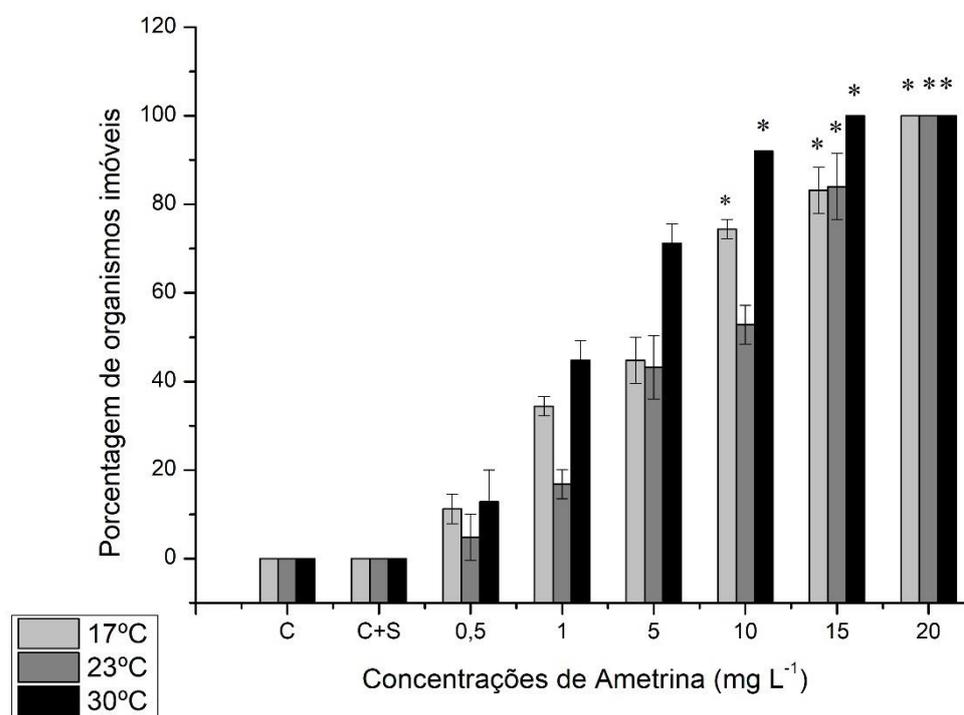


Figura 2. Média das porcentagens (\pm desvio-padrão) dos organismos imóveis do cladócer *Ceriodaphnia silvestrii* durante os três testes de toxicidade aguda nas diferentes concentrações testadas do herbicida Atrina nas temperaturas de 17, 23 e 30° C.

*= diferenças significativas em relação ao controle

Os comprimentos corpóreos obtidos para os indivíduos de *C. silvestrii* antes da exposição mostraram que os organismos tinham o mesmo tamanho para os diferentes tratamentos e controle (para 17°C: Kruskal-Wallis, H= 2,14; p > 0,05; para 23°C: Kruskal-Wallis, H= 53,76; p < 0,05; para 30°C: Kruskal-Wallis, H= 2,14; p > 0,05).

Após 7 dias de exposição, houve diferenças significativas no comprimento corporal dos organismos expostos ao herbicida Ametrina, em todas as temperaturas de testadas quando comparados com o controle respectivamente, (para 17°C: Kruskal-Wallis, H= 59,46; p > 0,05; para 23°C: Kruskal-Wallis, H= 52,16; p < 0,001 para 30°C: Kruskal-Wallis, H= 58,85; p < 0,001) (Figura 3). Para o comprimento corpóreo, nas temperaturas de 17°, 23° e 30°C, a maior concentração sem qualquer efeito observável (CENO) foi 0,02 mg L⁻¹ e a menor concentração com efeito observável (CEO) foi de 0,04 mg L⁻¹.

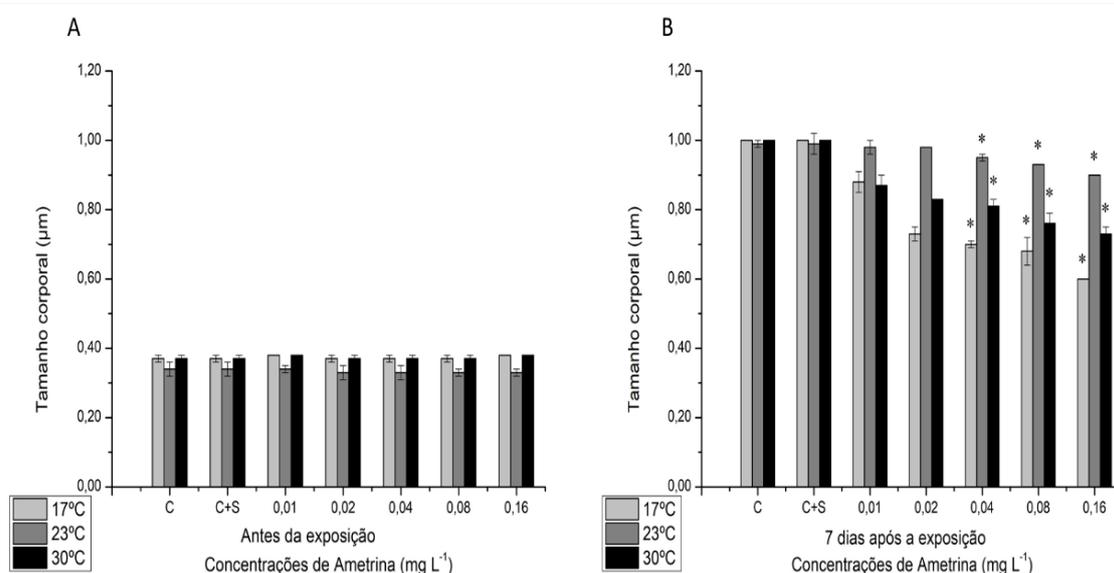


Figura 3. Comprimento corpóreo médio de *Ceriodaphnia silvestrii* (mm) antes (A) e depois (B) da exposição ao herbicida Ametrina nas temperaturas de 17°C, 23°C e 30°C para as cinco concentrações testadas nos testes de toxicidade crônica. Os asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação ao controle.

Nos experimentos com o herbicida Ametrina, não ocorreram diferença significativa entre a última concentração testada e o controle com relação à sobrevivência dos indivíduos de *C. silvestrii* para os testes de toxicidade crônica nas temperaturas testadas respectivamente (para 17°C: Kruskal-Wallis, H= 19,89; p < 0,01; para 23°C:

Kruskal-Wallis, $H= 12,63$; $p < 0,05$ e para 30°C : Kruskal-Wallis, $H= 16,51$; $p = 0,01$). (Figura 4).

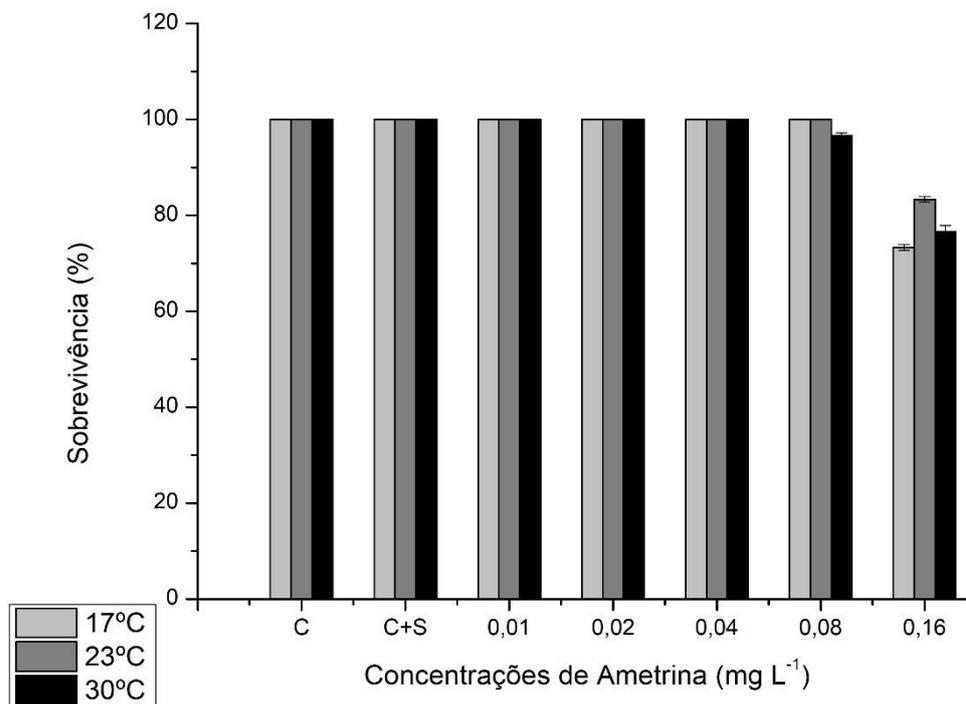


Figura 4. Porcentagem de sobrevivência (%) das fêmeas de *Ceriodaphnia silvestrii* após 7 dias de exposição a diferentes concentrações do inseticida Clorantprilprole, nas temperaturas de 17°C , 23°C e 30°C , nos testes de toxicidade crônica (Teste de Kruskal-Wallis).

Os resultados obtidos nos testes de toxicidade crônica mostraram que o herbicida Ametrina em combinação com a variação termal fora da faixa de destino causou efeitos negativos significativos na reprodução das fêmeas de *C. silvestrii*.

Para todas as temperaturas testadas, uma redução significativa no número de ovos por fêmea foi observada nas concentrações que variaram entre 0,02 a 0,16 mg L⁻¹, respectivamente (para 17°C : Teste de Kruskal-Wallis $H= 201,57$; $p < 0,001$; para 23°C : Teste de Kruskal-Wallis $H= 195,38$; $p < 0,001$ e para 30°C : Teste de Tukey $F_{6,203} = 1332,9$; $p < 0,001$). (Figura 5).

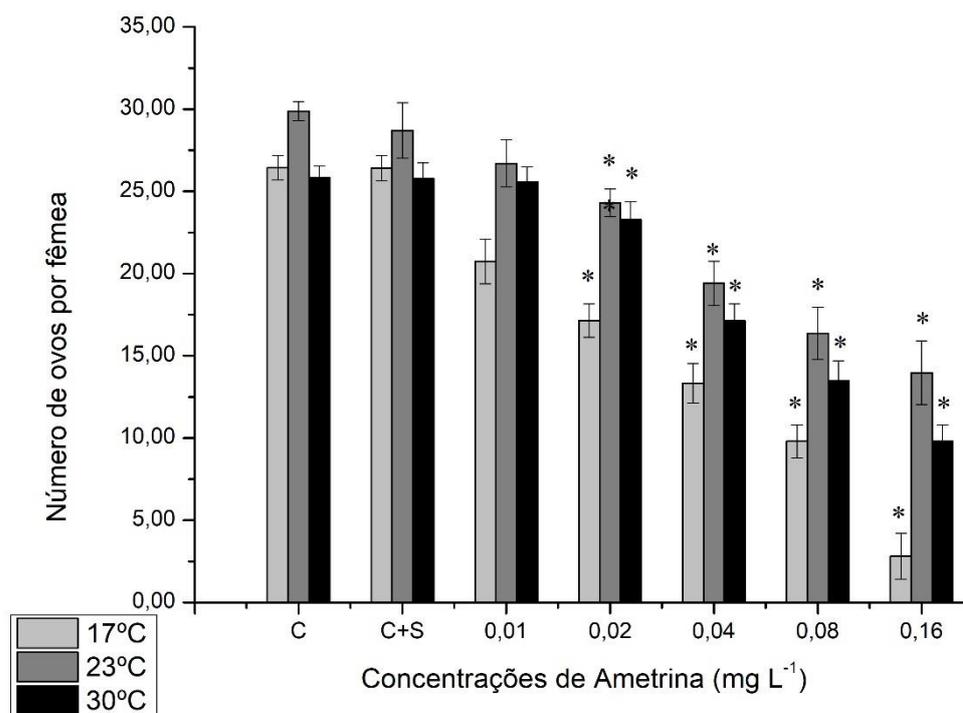


Figura 5. Número de ovos produzidos por fêmea (média \pm DP) do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostos por 7 dias a várias concentrações do herbicida Ametrina nas temperaturas de 17, 23 e 30°C. O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle (Teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,001$; Teste de Tukey; $p < 0,001$).

Para o parâmetro número de neonatas por fêmea, uma redução significativa foi observada desde a menor concentração testada que foi de 0,01 mg L⁻¹ nas temperaturas de 17 e 30°C (para 17°C: Teste de Tukey $F_{6,203} = 3096,63$; $p < 0,001$; e para 30°C: Teste de Kruskal-Wallis $H = 201,59$; $p < 0,001$). Para a temperatura de 23°C, foi observada uma redução significativa no número de neonatas por fêmea a partir da concentração de 0,02 mg L⁻¹ (Teste de Kruskal-Wallis $H = 198,02$; $p < 0,001$) (Figura 6).

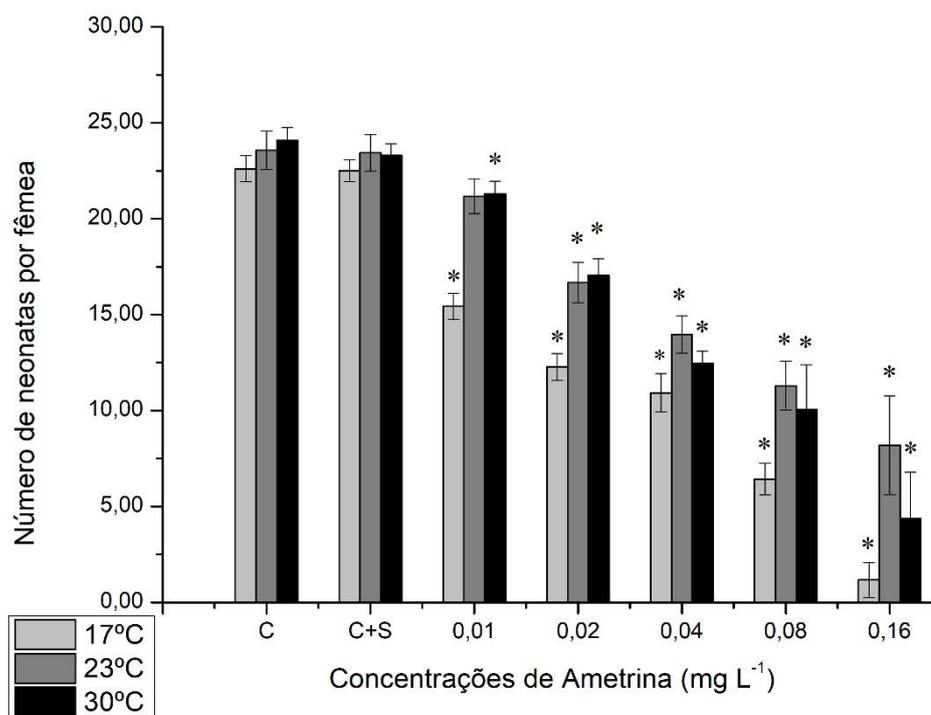


Figura 6. Número de neonatos produzidos por fêmea (média \pm DP) do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostos por 7 dias a várias concentrações do herbicida Ametrina nas temperaturas de 17, 23 e 30°C. O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle (Teste de Kruskal-Wallis; $p < 0,001$; Teste de Tukey; $p < 0,001$).

Para o parâmetro número de ovos, em todas as temperaturas testadas, o valor da Concentração de Efeito Não Observado (CENO) foi respectivamente 0,01 mg L⁻¹ e o valores da Concentração de Efeito Observado (CEO) foi de 0,02 mg L⁻¹. Enquanto que para o número de neonatas, nas temperaturas de 17° e 30°C, os valores de CENO não puderam ser estimados e CEO foi 0,01 mg L⁻¹, respectivamente. Já na temperatura de 23°C, os valores de CENO e CEO foram 0,01 e 0,02 mg L⁻¹.

4. DISCUSSÃO

A maior parte dos trabalhos que analisam o comportamento de herbicidas diz respeito aos ambientes aquáticos temperados deixando grande lacunas no conhecimento de seus efeitos em ambientes com clima tropical (TESOLIN et al., 2014). E, tampouco, são os estudos de toxicidade de herbicidas combinado com estressores abióticos, como a

temperatura. Esses estudos tornam-se mais relevantes uma vez que no século 20, principalmente dentre os anos de 1976 e 2000, a temperatura da superfície da Terra aumentou $0,76^{\circ}\text{C}$ e diante dos cenários globais atuais, até o final desse século, uma nova ascensão é esperada, na melhor das perspectivas, em mais $1,8^{\circ}\text{C}$ (variação entre $1,1$ a $2,9^{\circ}\text{C}$) e, no pior cenário, esse aumento seria de até $4,0^{\circ}\text{C}$ (variação entre $2,4$ a $6,4^{\circ}\text{C}$) (IPCC, 2007a, 2007b; LEÃO, 2000; SCHMIDHUBER; TUBIELLO, 2007). Tais previsões das alterações meteorológicas poderão ser sentidas por longos períodos de seca em áreas produtivas e longos períodos de chuvas em ambiente desértico, influenciando diretamente na produção agrícola e pesca, nos recursos hídricos, no uso da energia e no cotidiano do ser humano, podendo acelerar processos de extinção de inúmeras espécies de plantas e animais (LEÃO, 2000).

Nossos estudos demonstraram que o herbicida Ametrina acompanhado do estressor ambiental, a temperatura, potencializou os efeitos adversos agudos e crônicos na espécie tropical *C. silvestrii* nas temperaturas médias testadas. Alguns estudos relatam que projeções para um aumento da temperatura de rios e mares podem causar na biota impactos positivos, negativos ou mistos (KIBRIA et al., 2017). Já que como o aumento da temperatura proporcionalmente aumenta a volatilização e degradação de agrotóxicos, assim aumenta a mobilidade e o transporte de forma global (LAMON et al., 2009).

Ao comparar os valores de toxicidade aguda, *C. silvestrii* foi mais sensível nas temperaturas extremas de 17°C ($\text{CE}_{50-48\text{h}} = 3,82 \text{ mg L}^{-1}$) e 30°C ($\text{CE}_{50-48\text{h}} = 1,49 \text{ mg L}^{-1}$), quando comparados com a temperatura ótima de 23°C ($\text{CE}_{50-48\text{h}} = 6,90 \text{ mg L}^{-1}$). Um aumento na porcentagem de organismos imóveis também foi dependente da temperatura, por exemplo, na temperatura de 17°C , a partir da concentração de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$, em média, 80% estavam imóveis, enquanto que na temperatura de 23°C , em média 80% estavam imóveis na concentração de 15 mg L^{-1} . Para a temperatura de 30°C , a partir da concentração de $1,0 \text{ mg L}^{-1}$, em média, 50% dos organismos de *C. silvestrii* ficaram imóveis e a partir da concentração de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$, em média, mais de 90% dos organismos ficaram imóveis após 48h de exposição. Esses dados corroboraram com o único estudo encontrado feito por Barroso (2009) para a espécie de ambiente temperado *Daphnia magna* com o herbicida Simazina, pertencente ao grupo das triazinas, seguindo um delineamento experimental semelhante ao desse estudo, onde a $\text{CE}_{50-48\text{h}}$ foi de $24,9 \text{ mg L}^{-1}$ a temperatura de 20°C e $\text{CE}_{50-48\text{h}}$ foi de $12,3 \text{ mg L}^{-1}$ na temperatura extrema de 25°C . Para a imobilidade dos organismos de *D. magna*, a mesma autora encontrou na concentração de 15 mg L^{-1} , 40% dos organismos imóveis na temperatura de 20°C e 65% na temperatura 25°C , sugerindo uma maior toxicidade em temperaturas mais elevadas

quando comparadas com a temperatura de origem (BARROSO, 2009). Em outro estudo, utilizando temperaturas de 20°C e 30°C, a toxicidade do herbicida AKB para o cladóceros *C. silvestrii* foi aumentada, dependente do aumento da temperatura de destino (25°C) (SILVA, 2017).

Após sete dias de exposição, diferenças significativas no comprimento corporal dos organismos expostos ao herbicida Ametrina foram observadas em todas as temperaturas testadas a partir da concentração de 0,04 mg L⁻¹, quando comparados com o controle respectivamente. Aumentos na temperatura e diminuição do suprimento de oxigênio podem afetar o crescimento dos peixes, o sucesso reprodutivo e a sobrevivência já que o oxigênio dissolvido na água é inversamente relacionado à temperatura (KIBRIA 2014) que pode gerar um déficit energético, pela respiração ser mais rápida, não acompanhando a quantidade de alimento ingerido e excreção (GOPHEN, 1976). Para a sobrevivência, nos experimentos com o herbicida Ametrina, não ocorreram diferença significativa entre a última concentração testada e o controle dos indivíduos de *C. silvestrii* nas três temperaturas testadas.

No entanto, o mesmo padrão ocorreu para os demais parâmetros analisados nos testes de toxicidade crônica na comparação do o efeito tóxico, que foi dependente da dose (mg L⁻¹) e aumentado de acordo com a temperatura testada (17, 23 e 30°C). Ao comparar as temperaturas extremas para essa espécie, verificou-se uma redução maior na fecundidade (número médio de ovos e neonatas) na temperatura de 17 °C quando comparado com a temperatura de 30°C, apesar de todas as temperaturas testadas causar redução significativa no número de descendentes. Alguns autores que estudaram a correlação de compostos químicos e temperatura dizem que essa temperatura é fora da faixa ideal para o crescimento populacional de cladóceros tropicais e uma explicação possível para a redução da fertilidade está na redução do metabolismo devido a maior alocação de energia estar no crescimento e não na produção de descendentes, dessa maneira, nas temperaturas baixas, os organismos podem ser maiores porém a fecundidade média é bastante reduzida (GOPHEN, 1976; GOSS; BUNTING, 1983; ERWIN et al., 1991; EBERT, 1996; MCKEE; EBERT, 1996; ROLDÃO, 2014). Diferente dos nossos resultados, vários estudos na literatura relatam que a toxicidade e/ou letalidade de compostos químicos aumentaram proporcionalmente com o aumento da temperatura para uma série de organismos estuarinos ou marinhos, como, por exemplo, a toxicidade do herbicida Ametrina no fitoplâncton *Dunaliella tertiolecta*, com diminuição na taxa de crescimento, densidade celular e no conteúdo de amido (DeLorenzo et al., 2013). Já o estudo de Silva (2017), para estudos de aclimação do cladóceros *C. silvestrii*

e o herbicida AKB mostram uma melhor aptidão desses organismos em temperaturas altas (30°C) quando expostos a temperaturas mais baixas com relação aos organismos que já estavam naquela condição.

Assim, apesar de os relatos serem conhecidos da correlação entre temperatura e toxicidade de compostos químicos, os dados ainda não são claros e totalmente esclarecidos para os ambientes tropicais. Além disso, pesquisas com novos e diferentes delineamentos experimentais, por exemplo, utilizando neonatas de fêmeas em temperatura ideal que são alocadas a temperaturas extremas precisam ser melhor estudadas.

5. CONCLUSÕES

O presente estudo evidenciou os efeitos tóxicos do herbicida Ametrina para três temperaturas (17, 23 e 30°C) sobre o cladóceros *C. silvestrii*. Nossos resultados indicaram que o herbicida foi altamente tóxico durante a exposição aguda e crônica do cladóceros dentro de uma faixa restrita a mg L⁻¹ em todas as temperaturas testadas. Efeitos negativos foram observados na sobrevivência, na reprodução e no crescimento dos cladóceros em baixas concentrações, e seus efeitos foram potencializados pelas alterações das temperaturas fora da faixa ótima para a espécie. Foi possível observar que a relação entre toxicidade do herbicida e temperatura não seguiu um padrão linear para as temperaturas extremas e o motivo que levou aos seus efeitos deletérios específicos podem ser a relação da amplitude de tolerância térmica para esses organismos de hábitos tropicais. No entanto, sugerimos que a temperatura mais alta (30°C) pode levar a um efeito protetivo maior e conservador para a continuidade da espécie. Portanto, as informações obtidas nesse estudo mostram que, mesmo em baixas concentrações, alterações climáticas têm um efeito negativo e potencializador na relação toxicidade e herbicida que podem implicar em riscos ecológicos para os ecossistemas aquáticos tropicais.

Apesar dos resultados serem relevantes, eles não são suficientes. Eles servem de aporte para a necessidade de novas pesquisas que levem em conta fatores metabólicos e fisiológicos da espécie escolhida como mais uma ferramenta de estudos para aclimação para saber como essas espécies reagem e diferem nas vias de interação entre herbicidas e aquecimento.

REFERÊNCIAS

- ABHILASH, P.C., SINGH, N. Pesticide use and application: an Indian scenario. **J. Hazard. Mater.** 165, 1-12.2009
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera). **ABNT NBR 13373**, 2017
- ABREU, M.J., SANTOS-WISNIEWSKI, M.J., ROCHA, O., ORLANDO, T.C. The use of PCR-RFLP to genetically distinguish the morphologically close species: *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894 and *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Crustacea Cladocera). **Braz. J. Biol.**, 70:1, 121-124 p, 2010
- ANDRADE, S.R.B. et al. Meia-vida do ametryn em Argissolo VermelhoAmarelo e Latossolo Vermelho-Amarelo, com diferentes valores de pH. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v. 28, n. 2, p. 375-383, 2010.
- ARMAS, E. D. D., MONTEIRO, R. T. R., ANTUNES, P. M., SANTOS, M. A. P. F. D., CAMARGO, P. B. D., & ABAKERLI, R. B. (2007). Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes. **Química Nova**, 30, 1119-1127.
- ASTM - American Society for Testing and Materials, 2001. Standard guide for conducting acute toxicity testing on test materials with fishes, macroinvertebrates, and amphibians, West Conshohocken, PA, pp. E729-E796.
- AYRES M, AYRES JÚNIOR M, AYRES DL, S. A. (2007). *BIOESTAT - Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Bio-Médicas* (p. 364).
- BARROSo, M. F. S. Efeitos ecotoxicológicos de pesticidas e fatores abióticos em *Daphnia magna*. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar – Universidade do Porto, 2009.
- CARVALHO, F.P., 2006. Agriculture, pesticides, food security and food safety. **Environ.Sci. Policy** 9, 685-692.
- CASALI-PEREIRA, M. P., DAAM, M. A., RESENDE, J. C. DE, VASCONCELOS, A. M., ESPÍNDOLA, E. L. G., & BOTTA, C. M. R. (2015). Toxicity of Vertimec® 18 EC (active ingredient abamectin) to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Chemosphere**, 139, 558–564. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.006>
- DAAM, M.A., VAN DEN BRINK, P.J., 2010. Implications of differences between temperate and tropical freshwater ecosystems for the ecological risk assessment of pesticides. **Ecotoxicology** 19, 24-37.
- DELORENZO, M.E., DANESE, L., BAIRD, T.D., 2013. Influence of increasing temperature and salinity on herbicide toxicity in estuarine phytoplankton. **Environ. Toxicol.** 28 (7), 359–371
- DUDGEON, David et al. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. **Biological reviews**, v. 81, n. 2, p. 163-182, 2006.

EBERT, D. et al. Development, life cycle, ultrastructure and phylogenetic position of *Pasteuria ramosa* Metchnikoff 1888: rediscovery of an obligate endoparasite of *Daphnia magna* Straus. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, v. 351, n. 1348, p. 1689-1701, 1996.

EPA (Environmental Protection Agency). Reregistration Eligibility Decision (RED) for Ametryn. Set. 2005. Disponível em: . Acesso em: 21 nov. 2018.

ERWIN; N.; Winter. Carbofuran and Bird Kills: Regulation at a Snail's Pace. **Journal of Pesticide Reform**. 1991. 11(4): 15-17

FARRÉ, M., FERNANDEZ, J., PAEZ, M., GRANADA, L., BARBA, L., GUTIERREZ, H., PULGARIN, C., & BARCELÓ, D. (2002). Analysis and toxicity of methomyl and ametryn after biodegradation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 373(8), 704–709.

FONSECA, A.R.; ROCHA, O. (2004). The life-cycle of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902, a Neotropical endemic species (Crustacea, Cladocera, Daphnidae). **Acta Limnol. Bras**, 16((4)), 319–328.

GAST A, KNUSLI E, GYSIN H. Uber Pflanzenwachstumsregulatoren; Chlorazin, eine phytotoxisch wirksame Substanz [Plant growth regulators; chlorazin, a phytotoxic substance]. *Experientia*. 1955 Mar 15;11(3):107-8.

Gophen, M. Temperature dependence of food intake, ammonia excretion, and respiration in *Ceriodaphnia reticulata*, Lake Kinneret, Israel. **Freshwater Biology**. 1976. 6(5): 451-455.

GOSS, L. B.; BUNTING, D. L. *Daphnia* development and reproduction: responses to temperature. **Journal of Thermal Biology**. 1983 8: 375–380

HENRI, W.; PFISTER, F.; CARROLL, B.; PARSHLEY, T. Production, development, and registration of triazine herbicides. In: LEBARON, M. H.; MCFARLAND, J. E.;

HUERTAS, I. Emma et al. Estimating the capability of different phytoplankton groups to adapt to contamination: herbicides will affect phytoplankton species differently. **New Phytologist**, v. 188, n. 2, p. 478-487, 2010.

IBGE/SIDRA. (s.d.) Brasil, série histórica de área plantada; série histórica de produção agrícola; safras 1998 a 2011. Disponível em < www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric ou www.mapa.gov.br>, acessado em 03/05/2014.

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change), 2007a. Summary for policymakers. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. In: Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 996 p.

IPCC (Intergovernmental Panel on Climate Change), 2007b. *Climate Change 2007. Impacts, Adaptation and Vulnerability. Contribution of Working Group II to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press. IPCC (Intergovernmental Panel online)

JACOMINI, A. E., CAMARGO, P. B., AVELAR, W. E. P., BONATO, P. S. Determination of Ametryn in River Water, River Sediment and Bivalve Mussels by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 20, No. 1, 107-116, 2009

JIANG C, YANG Y, ZHANG L, LU D, LUL, YANG X, CAI T. Degradation of Atrazine, Simazine and Ametryn in an arable soil using thermal-activated persulfate oxidation process: Optimization, kinetics, and degradation pathway. **J Hazard Mater.** 2020 Dec 5;400:123201

KIBRIA, G., 2014. Global fish kills: causes and consequences. DOI: 10.13140/RG.2.1.1 422.8965. https://www.researchgate.net/publication/261216309_Global_fish_Kills_Causes_and_Consequences.

LAURANCE, W.F.; SAYER, J.; CASSMAN, K.G. Agricultural expansion and its impacts on tropical nature. **Trends in ecology & evolution**, v. 29, n. 2, p. 107-116, 2014.

LAMON, L., WALDOW, H.V., MCLEOD, M., ET AL., 2009. Modeling the global levels and distribution of polychlorinated biphenyls in air under a climate change scenario. **Environment Science and Technology** 43 (5818), 8824.

LEÃO, Z.M.A.N.; DOMINGUEZ, J.M.L. (2000). Tropical coast of Brazil, in: Sheppard, C.R.C. (Ed.) Seas at the millennium: an environmental evaluation: 1. Regional chapters: Europe, The Americas and West Africa. pp. 719-729

LIN HD, HSU LS, CHIEN CC, CHEN SC. Proteomic analysis of ametryn toxicity in zebrafish embryos. **Environ Toxicol.** 2018 May;33(5):579-586.

LIU, Y., MA, L. Y., LU, Y. C., JIANG, S. S., WU, H. J., & YANG, H. (2017). Comprehensive analysis of degradation and accumulation of ametryn in soils and in wheat, maize, ryegrass and alfalfa plants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 140, 264-270.

LÓPEZ-PÉREZ, G. C. et al. Dynamics of pesticides in potato crops. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1797-1803, 2006.

MACHADO, C. S. et al. Chemical Contamination of Water and Sediments in the Pardo River, São Paulo, Brazil. **Procedia Engineering**, v. 162, p. 230–237, 2016.

MCKEE, D.; EBERT, D. (b). The interactive effects of temperature, food level and maternal phenotype on offspring size in *Daphnia magna*. **Oecologia**, 1996. 107: 189–196

MANDELBAUM, R. T., SADOWSKY, M. J., WACKETT, L. P., LEBARON, H. M., MCFARLAND, J. E., & BURNSIDE, O. C. (2008). Microbial degradation of s-triazine herbicides. **The triazine herbicides**, 50, 301-28.

MANSANO, A. S., MOREIRA, R. A., PIEROZZI, M., OLIVEIRA, T. M. A., VIEIRA, E. M., ROCHA, O., & REGALI-SELEGHIM, M. H. (2016). Effects of diuron and carbofuran pesticides in their pure and commercial forms on *Paramecium caudatum*: The use of protozoan in ecotoxicology. **Environmental Pollution**, 213, 160–172.

MIGUEL, M. Efeito do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol e do herbicida atrazina em espécies de dois níveis tróficos. 2020. 173 p. Tese de Doutorado – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

Moreira, R. A., Daam, M. A., Vieira, B. H., Sanches, A. L. M., Reghini, M. V., da Silva Mansano, A., de Freitas, E. C., Espindola, E. L. G., & Rocha, O. (2017). Toxicity of abamectin and difenoconazole mixtures to a Neotropical cladoceran after simulated runoff and spray drift exposure. **Aquatic Toxicology**, 185, 58–66. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.02.001>

MÜLLER, H., 1972. Wachstum and phosphatbedarf von *Nitzschia actinastroides* (Lemn.)Goor in statischer und homokontiuierlicher kultur unter phosphatlimitierung. **Arch.Hydrobiol. Suppl.** 38, 399-484.

National Center for Biotechnology Information (a). (2021). *PubChem Compound Summary for CID 13263*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ametryn>.

OECD. (2004). *OECD Guideline for testing of chemicals Daphnia sp., Acute Immobilisation Test 202*.

OECD. (2008). *OECD Guidelines for testing of chemicals Daphnia magna reproduction Test 2011*.

OETKEN, M.; JAGODZINSKI, L. S.; VOGT, C.; JOCHUM, A.; OEHLMANN, J. Combined effects of chemical and temperature stress on *Chironomus riparius* populations with differing genetic variability. **Journal of Environmental Science and Health**. Part A. 2009. 44: 955–962.

PIVATO, A., RAGA, R., VANIN, S., ROSSI, M. **Assessment of compost quality for its environmentally safe use by means of an ecotoxicological test on a soil organism**. J. Mater Cycles Wast Manag Vol. 16, 763-774 p, 2014

PELAEZ, V., SILVA, L.R., ARAÚJO, E.B., 2013. Regulation of pesticides: A comparative analysis. **Sci. Public Policy** 40 (5), 644-656.

PIMENTEL, D., & LEVITAN, L. (1986). Pesticides: amounts applied and amounts reaching pests. **Bioscience**, 36(2), 86-91.

RAYMUNDO, L.B., ROCHA, O., MOREIRA, R.A., MIGUEL, M., DAAM, M.A. Sensitivity of tropical cladocerans to chlorpyrifos and other insecticides as compared to their temperate counterparts. **Chemosphere**, 220, 937-942, 2019

RÉGO, A. P. J., BIDOIA, E. D., & REGANHAN-CONEGLIAN, C. M. (2017). Toxicity Studies of Ametryne to Land and Aquatic Organisms. **Aquatic Science and Technology**, 6(1), 8.

ROBERTS, T.R.; HUTSON, D.H; LEE, P.W.; NICHOLLS, P.H.; ROBERTS, M.C.R. *Metabolic Pathways of Agrochemicals. Part 1: Herbicides and Plant Growth Regulators*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1998. 870 p.

RODRIGUES, B.N., ALMEIDA, F.S., 2005. *Guia de Herbicidas*. 5ed. Londrina: Instituto Plantarum. 591 p.

SCHMIDHUBER, J., TUBIELLO, F.N., 2007. Global food security under climate change. *PNAS*. 104 (50), 19703–19708.

SCHREINEMACHERS, P., TIPRAQSA, P., 2012. Agricultural pesticides and land use intensification in high, middle and low income countries. **Food Policy** 37, 616-626.

SHARMA A, KUMAR V, BHARDWAJ R, THUKRAL AK (2017) Seed pre-soaking with 24-epibrassinolide reduces the imidacloprid pesticide residues in green pods of *Brassica juncea* L. **Toxicol Environ Chem** 99(1):95–103

SILVA, Laís Conceição Menezes da. **Efeito da aclimação termal sobre a sensibilidade e toxicidade termo-dependente ao Glifosato para *Ceriodaphnia silvestrii***. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

TAKENAKA, R. A. (2007). Avaliação da toxicidade de *Mycrocistis aeruginosa* de florações naturais de cianobactérias de reservatórios do Rio Tietê. Escola de Engenharia de São Carlos.

TESOLIN, G.A.S.et al.,.Toxicity evaluation of herbicides used in sugarcane crops to Zebrafish (*Danio rerio*). **Mundo saúde** (Impr.);38(1):86-97, dez. 2013.

VAN EERD, Laura L. et al. Long-term tillage and crop rotation effects on soil quality, organic carbon, and total nitrogen. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 94, n. 3, p. 303-315, 2014.

VERCRAENE-EAIRMAL, M., LAUGA, B., SAINT LAURENT, S., MAZZELLA, N., BOUTRY, S., SIMON, M., ... & DURAN, R. (2010). Diuron biotransformation and its effects on biofilm bacterial community structure. **Chemosphere**, 81(7), 837-843.

WILKINSON, A. D., COLLIER, C. J., FLORES, F., & NEGRI, A. P. (2015). Acute and additive toxicity of ten photosystem-II herbicides to seagrass. **Scientific reports**, 5(1), 1-11.

WILSON, P.C., FOOS, J.F., 2006. Survey of carbamate and organophosphorous pesticide export from a South Florida (USA) agricultural watershed: implications of sampling frequency on ecological risk estimation. **Environ. Toxicol. Chem.** 25, 2847-2852.

Efeitos da mistura dos agrotóxicos clorantraniliprole e ametrina, em suas formas padrão, sobre o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*.

RESUMO

Em ecossistemas aquáticos, os organismos estão expostos concomitantemente a diversos compostos químicos. Apesar dessas interações químicas serem bastante conhecidas, ainda são escassos os estudos que analisam os efeitos adversos causados pela mistura de duas ou mais substâncias nos ambientes aquáticos dulcícolas. Embora o herbicida Ametrina e o inseticida Clorantraniliprole sejam considerados muito tóxicos e perigosos para o meio ambiente, os mesmos são bastante comercializados e utilizados em grande escala nas lavouras, principalmente nos cultivos de cana-de-açúcar. Neste estudo, foram realizados testes de toxicidade aguda e crônica com a Ametrina e o Clorantraniliprole, em suas formas analíticas padrão, sobre o cladóceros tropical *Ceriodaphnia silvestrii*, a partir de exposições isoladas e em mistura desses pesticidas. Nos testes de toxicidade com os compostos isolados, os valores da CE_{50-48h} para a Ametrina e o Clorantraniliprole foram $7,82 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,003 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente. Já os valores de CE_{50-8d} obtidos nos testes crônicos para os dois compostos foram $0,042 \text{ mg L}^{-1}$ para o composto Ametrina e $0,0001 \text{ mg L}^{-1}$ para o composto Clorantraniliprole. Nos testes de toxicidade aguda com as misturas dos ingredientes ativos, os dados se ajustaram ao desvio dependente do nível da dose a partir do modelo de Adição de Concentração (CA), sendo que em baixas doses ocorreu antagonismo e, em altas doses, ocorreu sinergismo. Já nos testes de toxicidade crônica com misturas da Ametrina e Clorantraniliprole, os dados foram melhor ajustados ao modelo de referência da Ação Independente (IA) e não apresentaram desvios significativos. Assim, nossos resultados indicaram que exposições agudas aos compostos testados nas misturas, podem interagir e causar respostas tóxicas diferentes dos testes isolados. Portanto, é necessário que avaliações de risco ecológico para a mistura desses agrotóxicos, particularmente para organismos não-alvo de ecossistemas tropicais, sejam consideradas e estudadas em profundidade.

Palavras-chave: Pesticidas; misturas tóxicas; cladóceros; sinergismo; antagonismo

1. INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos surgiram com a finalidade de proteção dos cultivos agrícolas contra insetos, doenças e ervas daninhas. O uso excessivo dessas substâncias tóxicas e seu descarte frequentemente incorreto elevam os riscos de contaminação das águas superficiais e subterrâneas e, por conseguinte, os impactos negativos aos organismos terrestres e aquáticos são cada vez mais perceptíveis (GRIFFERO et al., 2019; SPADOTTO et al., 2004; MARTINOU E STAVRINIDES, 2015; MANSANO et al., 2016; ZHANG et al., 2012). Mesmo em baixas concentrações, esses compostos químicos são prejudiciais à biota, por serem persistentes e, muitas vezes, a curto prazo provocarem efeitos adversos ainda desconhecidos ou agirem no sistema endócrino causando alterações graves de estrutura e função dos organismos vivos (SCOGNAMIGLIO et al., 2016; SODRÉ et al., 2010; MATTHIESSEN et al., 2017; DECOURTEN et al., 2019). Uma vez que esses compostos químicos dificilmente são lançados isoladamente nos ecossistemas, na maioria das vezes, são encontrados de maneira combinada com a denominação de misturas tóxicas (BIZARRO et al., 2016; CHOUNG et al., 2013; SHAO et al., 2019).

Para os compostos químicos dispersos na água e que interagem com os organismos vivos, podemos distinguir dois processos, quais sejam a toxicodinâmica (onde os compostos químicos agem em nível celular, ou seja, no receptor, órgão ou alvo celular) e a toxicocinética (onde temos os processos de captação, metabolismo, distribuição e excreção). Com a combinação de diferentes compostos presentes nos ambientes aquáticos, é provável que ocorram interações químicas inesperadas, capazes de potencializar e modificar a estrutura e a natureza do efeito tóxico de cada composto isolado. Essas interações podem resultar em efeitos totais sobre o organismo-alvo denominados antagônicos, sinérgicos ou aditivos, em relação aos efeitos de cada componente químico isoladamente (BIZARRO et al., 2016; MANSANO et al., 2016; ROCHA et al., 2018). Conceitualmente, denomina-se *Aditividade* quando o efeito de dois ou mais contaminantes combinados é igual à soma dos efeitos individuais. *Sinergismo* é quando o efeito de dois ou mais contaminantes combinados é maior do que a soma dos efeitos individuais. *Antagonismo* é quando o efeito de dois ou mais contaminantes combinados é menor do que a soma dos efeitos individuais. Assim, conhecer as interações dos compostos químicos presentes nos ecossistemas aquáticos e seus efeitos conjuntos sobre a biota, proporciona cenários mais realísticos para avaliações de risco ambiental,

quando comparadas a avaliações baseadas em exposições químicas de maneira individual (PHYU et al., 2011).

Para explicar o comportamento das misturas tóxicas, a ecotoxicologia faz uso de conceitos preestabelecidos denominados de Concentração de Adição (CA) (LOEWE; MUISCHNEK, 1926) e a Ação Independente (IA) (BLISS, 1939). No modelo CA, os compostos químicos possuem o mesmo modo de ação e agem sobre o mesmo alvo biológico, gerando respostas proporcionais e comuns a somatória de suas respectivas toxicidades (PÉREZ et al., 2011; FERREIRA et al., 2008; FREITAS et al., 2014). Já o modelo IA, assume que os compostos tóxicos têm modos de ação diferentes e únicos, sem interferência um no outro, agindo em sítios específicos nos organismos-alvo (LOUREIRO et al., 2010; FREITAS et al., 2018).

Na literatura, até a presente data, não foram encontrados estudos que avaliem os efeitos simultâneos do inseticida Clorantraniliprole e do herbicida Ametrina para espécies não-alvo em ambientes aquáticos dulcícolas no Brasil e no mundo, apesar desses agrotóxicos serem comumente encontrados nos corpos d'água e no solo (ALBUQUERQUE et al., 2016; ACAYABA, 2017; CETESB, 2019; JACOMINI et al., 2009; REBELO; CALDAS, 2014; LIU et al., 2017).

O herbicida Ametrina (N2-ethyl-N4-isopropyl-6-methylthio-1,3,5-triazine-2,4-diamine, C₉H₁₇N₅S) é pertencente a classe das s-triazinas (Figura 4), uma das classes mais utilizadas e conhecidas no mundo, provavelmente devido ao seu excelente efeito seletivo sobre plantas e ervas daninhas (Mandelbaum; Sandowsky; Wackett, 2008). Fazem parte desse grupo a Ametrina, atrazina, cianazina, prometon e simazina, que agem no fotossistema II, inibindo o transporte de elétrons e outros processos enzimáticos (ANVISA, 2003; Brain et al., 2012; Faust et al., 2001; Roberts e Hutson, 1999). Foi lançado na década de 50 (Gast; Knusli, Gysin, 1955) para aplicação em pré e pós emergência, para controle de ervas daninhas anuais, com folhas de estrutura anatômica estreitas e largas, associadas a culturas de abacaxi, banana, algodão, café, cana-de-açúcar, citros, mandioca, milho, uva, dentre outras (ANVISA, 2003; RODRIGUES; ALMEIDA, 2005).

Já o inseticida Clorantraniliprole é um produto recente no mercado, lançado e registrado em 2009 no Brasil pela DuPont (Prêmio 200 SC, 200 g i.a./L de produto comercial DuPont do Brasil S.A.) e tem um modo de ação diferenciado, agindo no combate da broca da cana-de-açúcar e do café, os quais eram combatidos até recentemente pelo proibido Endosulfan (CORDOVA et al., 2006; CORRÊA, 2016).

Os inseticidas do grupo químico das diamidas (Clorantraniliprole, ciantraniprole, ciclaniliprole e flubendiamida) provocam ativação duradoura dos canais de cálcio no retículo sarcoplasmático dos músculos esqueléticos. Os canais de cálcio são ativados liberando um excesso de íons cálcio nos filamentos de proteínas e induzindo a contração muscular do esqueleto (CORDOVA et al., 2006; SATTELLE et al., 2008; CASIDA, 2009; NAUEN; STEINBACH, 2016; RODITAKIS et al., 2017). Consequentemente, ocorre contração gradual do corpo, letargia, paralisia e morte do inseto (CORDOVA et al., 2006). Assim, esse pesticida atua diretamente nos receptores de rianodina, sem necessidade de uma proteína acessória (CORDOVA et al., 2006; WHALON, 2008).

A mistura do herbicida Ametrina e do inseticida Clorantraniliprole nos ambientes aquáticos pode causar efeitos tóxicos sobre organismos não-alvo, tais como os cladóceros, sendo um componente importante das interações tróficas fitoplâncton-zooplâncton-larvas de peixes (DETTMERS; STEIN, 1992). Desta maneira, efeitos de compostos tóxicos sobre os cladóceros podem afetar a cadeia trófica e alterar significativamente o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos.

Além dos atributos ecológicos, os cladóceros apresentam baixo custo, facilidade de cultivo e manutenção laboratorial, altas taxas de reprodução e são sensíveis a vários compostos químicos (CASALI-PEREIRA et al., 2015; NOVELLI et al., 2012), características importantes que os tornam organismos-teste adequados para bioensaios de toxicidade aguda e crônica. Em relação à toxicidade de misturas, raros são os estudos que utilizaram a espécie nativa e endêmica *Ceriodaphnia silvestrii* (MANSANO et al., 2016; MIGUEL, 2020). Apesar de existirem diversas pesquisas com cladóceros na literatura (FREITAS et al, 2014; PAVLAKI et al 2011; PHYU et al, 2011), nenhum estudo foi realizado com a espécie neotropical *C. silvestrii* como organismo-teste em estudos de misturas do herbicida Ametrina e do inseticida Clorantraniliprole.

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos tóxicos letais e subletais da mistura do herbicida Ametrina e do inseticida Clorantraniliprole, em suas formas analíticas padrão, nos cladóceros *C. silvestrii*. Para isso, testes de toxicidade aguda e crônica foram realizados com a mistura dos ingredientes ativos padrões e os parâmetros analisados foram a imobilidade e a reprodução (fertilidade).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Organismo-teste e condições de cultivo

O organismo-teste selecionado para este estudo foi o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Crustacea, Cladocera), espécie nativa e endêmica da região Neotropical. Esse cladóceros atua como consumidor primário nas cadeias alimentares aquáticas e se alimenta por filtração de material orgânico particulado. Os adultos medem de 0,8 a 0,9 mm de comprimento, têm corpo ovalado com acentuado sino cervical e com 9 a 12 espinhos anais no pós-abdômen (FONSECA; ROCHA, 2004), sendo encontrado no Brasil e na Argentina (ABNT, 2017).

O método para o cultivo em laboratório dos organismos de *C. silvestrii* e o protocolo padronizado para a sua utilização em testes de toxicidade foram previamente desenvolvidos pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (FONSECA; ROCHA, 2004; ABNT, 2017).

A espécie foi inicialmente coletada do reservatório do Lobo-Broa, Itirapina (SP), Brasil e mantida por cerca de 5 anos em cultivo no Laboratório de Ecotoxicologia do Departamento de Biologia Evolutiva (DEBE), da Universidade Federal de São Carlos (São Carlos, SP).

Os organismos foram cultivados em água reconstituída previamente preparada com 1,5 g de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (solução 1) e 0,2 g de KCl, 4,8 g de NaHCO_3 e 6,1 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (solução 2), ambas as soluções diluídas em 1 L de água destilada (ABNT, 2017). Em um recipiente com aeração constante, a água destilada foi acrescida das duas soluções específicas (solução 1 e 2) a fim de que ela tivesse as seguintes características: pH entre 7,0 e 7,5 e dureza total entre 40 e 48 $\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ (ABNT, 2017; ASTM, 2001). Os indivíduos de *C. silvestrii* foram mantidos em béqueres de 2 L, com um máximo de 120 indivíduos, alimentados com a alga clorofícea *Raphidocelis subcapitata* (10^5 células mL^{-1}), cultivada em meio CHU-12 (MÜLLER, 1972) e com um suplemento alimentar (1 mL L^{-1}) composto por uma suspensão de leveduras e ração para peixe preparada a partir da mistura de partes iguais de fermento biológico seco (Fleischmann®) e ração para peixe (Vitormômio®) fermentada (ABNT, 2017).

Os béqueres foram recobertos com um filme plástico para evitar evaporação do meio. As manutenções das culturas foram realizadas três vezes por semana, quando eram renovados a água e o alimento, sendo uma troca total da água e duas parciais (apenas 50% da água de cultivo era renovada). Os cultivos de *C. silvestrii* foram mantidos em incubadoras com temperatura controlada a 25°C e com fotoperíodo de 12/12 horas de claro/escuro.

2.2. Substâncias e soluções-estoque

Os compostos Ametrina (CAS n° 834-12-8) e Clorantraniliprole (CAS n° 500008-45-7) com pureza $\geq 98\%$ (padrão analítico) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O herbicida Ametrina foi diluído em acetona de grau analítico (C₃H₆O; LabSynth) e sua solução-estoque (de 20.000.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o composto Ametrina e 18.000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o Clorantraniliprole) preparada pela diluição de uma quantidade específica em água de cultivo (água reconstituída) imediatamente antes dos testes devido a sua baixa solubilidade em água que pode chegar até 209 mg L^{-1} a 25°C (National Center for Biotechnology Information, 2021a) O inseticida Clorantraniliprole também foi diluído em acetona de grau analítico (C₃H₆O; LabSynth) devido à baixa solubilidade em água que pode chegar até 1,0 mg L^{-1} a 20°C (National Center for Biotechnology Information, 2021b).

As concentrações nominais de cada composto testado foram obtidas pela diluição da solução-estoque, a qual também foi feita em água de cultivo (água reconstituída).

2.3 Testes de sensibilidade com a substância de referência cloreto de sódio

Testes de sensibilidade aguda (48 h) com a substância de referência cloreto de sódio (NaCl) foram realizados periodicamente para avaliar as condições fisiológicas dos organismos cultivados no laboratório e, conseqüentemente, garantir a confiabilidade e precisão dos dados durante os testes de toxicidade aguda e crônica, de acordo com as diretrizes da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2017).

Cinco neonatas (6 a 24 h de idade) foram colocadas em recipientes de plástico de poliestireno de 50 mL, os quais continham 15 mL de solução-controle (apenas água de cultivo) e as soluções-teste. As concentrações experimentais foram testadas em réplicas que variaram de 0,6 a 2,2 g L^{-1} . Essas concentrações foram preparadas por diluição de uma solução-estoque de 100 g L^{-1} , utilizando água reconstituída como diluente. Os indivíduos de *C. silvestrii* foram mantidos nas mesmas condições de cultivo, sem iluminação e alimento durante todo o período de exposição. Após 48h, o número de organismos imóveis foi contado para obter os valores da concentração efetiva mediana (CE_{50-48h}). Os organismos foram considerados saudáveis e adequados para o uso nos testes de toxicidade quando os valores de CE_{50-48 h} estavam dentro dos limites já pré-estabelecidos (1,0 a 1,83 g L^{-1}) para essa substância de referência (CASALI-PEREIRA et

al., 2015). O teste foi considerado válido quando a porcentagem de organismos imóveis no controle não excedeu 10% (ABNT, 2017)

As variáveis pH, temperatura da água, condutividade elétrica, dureza e concentração de oxigênio dissolvido foram medidos no início e no final dos testes.

2.4. Testes de toxicidade aguda e crônica

Os testes de toxicidade aguda e crônica com o cladóceros *C. silvestrii* seguiram as diretrizes pré-estabelecidas pela Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD, 2004; 2008) e pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2017). Testes preliminares foram necessários para se estabelecer a faixas de concentrações que seriam utilizadas para cada composto nos testes definitivos. Os testes de toxicidade aguda foram realizados com as seguintes faixas de concentrações nominais: 0,5 a 20 mg L⁻¹ de Ametrina e 0,0012 a 0,009 mg L⁻¹ de Clorantraniliprole. Essas concentrações foram preparadas por diluição a partir das soluções-estoque de 20000 mgL⁻¹ para o composto Ametrina e 18 mg L⁻¹ para o composto Clorantraniliprole.

Nos testes de toxicidade aguda, cinco réplicas foram utilizadas por tratamento. Cada réplica continha cinco neonatos (6-24h de idade) em um recipiente de polipropileno atóxico com 15 mL de solução-teste ou 15 mL de água reconstituída (controle). Para ambos os compostos, foi necessário adicionar um controle-solvente (água reconstituída + acetona) em uma concentração nominal de 0,01% de acetona (v/v). Os organismos expostos não foram alimentados no decorrer dos experimentos e foram mantidos em incubadora na temperatura constante de 25 ± 1°C e no escuro, como recomendado pela OECD (2004) e ABNT (2017). Após 48h de exposição, os organismos foram observados sob microscópio estereoscópico e o número de indivíduos imóveis foi contado e usado para o cálculo da CE50-48h de cada composto estudado.

Os testes de toxicidade crônica foram realizados utilizando-se 10 réplicas, cada uma contendo um neonato (6-24h de idade) em 15 mL de solução-teste ou 15 mL de água reconstituída (controle). Um controle-solvente (0,01% de acetona, v/v) foi adicionado. Os testes foram semi-estáticos, sendo as soluções-teste renovadas a cada dois dias. A duração do experimento foi de oito dias e os organismos foram alimentados e mantidos sob as mesmas condições de temperatura e fotoperíodo descritas para o cultivo. Durante o período experimental, os organismos foram observados sob microscópio estereoscópico, a fim de verificar o número de descendentes, os quais eram contados e descartados a cada renovação do meio.

As variáveis abióticas, tais como o pH, a temperatura da água, a condutividade elétrica, a dureza e a concentração de oxigênio dissolvido, foram medidas no início e no final dos testes de toxicidade aguda e diariamente nos testes de toxicidade crônica.

2.5. Testes de toxicidade das misturas

Os testes de toxicidade aguda e crônica com misturas do herbicida Ametrina e do inseticida Clorantropilprole em suas formas analíticas padrão foram realizados com os organismos-teste de *C. silvestrii* de acordo com as diretrizes da OECD (2004, 2008).

Os testes de toxicidade aguda (48 h) foram realizados utilizando 5 réplicas, cada uma contendo cinco neonatos (6-24 h de idade) em 10 mL de solução-teste. Os organismos não foram alimentados no decorrer dos experimentos e foram mantidos em temperatura controlada de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e ausência de luz. Após o período de exposição de 48 h, os organismos foram observados sob microscópio estereoscópico e o número de indivíduos imóveis foi contado.

Para os testes de toxicidade crônica foram utilizadas dez réplicas, cada uma contendo um neonato (6-24 h de idade) em 15 mL de solução-teste. Os testes foram semi-estáticos, sendo as soluções-teste renovadas a cada 2 dias. A duração do experimento foi de 8 dias e os organismos foram alimentados e mantidos sob as mesmas condições de temperatura, fotoperíodo e meio já descritas para o cultivo.

Durante o período de teste, os cladóceros de *C. silvestrii* foram observados diariamente sob microscópio estereoscópico para verificar a sobrevivência das fêmeas, o número de ovos e de descendentes, que foram contados e descartados.

Os experimentos de misturas com o herbicida e o inseticida foram feitos utilizando-se dados provenientes dos testes de toxicidade aguda e crônica obtidos a partir dos estudos feitos com exposição individual dos compostos, como foi apresentado no capítulo 1.

Os testes de toxicidade aguda e crônica de misturas incluem simultaneamente um teste isolado para cada composto e um conjunto de 25 combinações de ambos (*design* fatorial completo, Figura 1). Os testes com os compostos individuais Ametrina e Clorantropilprole foram realizados simultaneamente com os testes de mistura, de modo que as diferenças nas respostas dos organismos devido às variações de sensibilidade pudessem ser controladas e não invalidassem a análise.

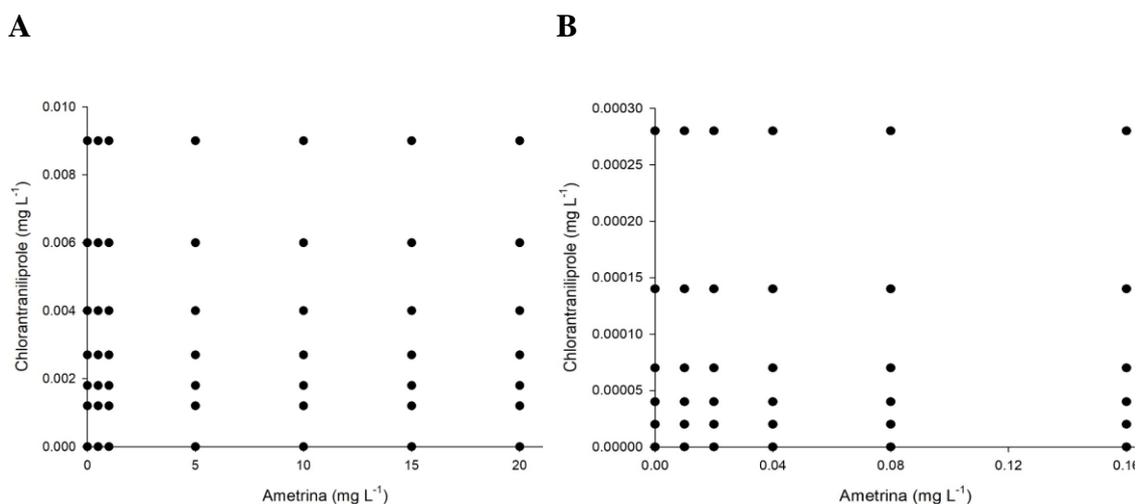


Figura 1. Design experimental esquemático para as misturas do herbicida Ametrina e do inseticida Clorantraniliprole utilizados nos testes de toxicidade aguda (A) e nos testes de toxicidade crônica (B): design fatorial completo.

2.6. Análise dos dados

Os valores de $CE_{50-48\text{ h}}$ e $CE_{50-8\text{ d}}$ e seus respectivos intervalos de confiança de 95% para os testes de toxicidade aguda e crônica foram calculados por regressão não linear, ajustando-se uma equação logística de três parâmetros aos dados no software SigmaPlot v. 11.0 (SYSTAT, 2008). O mesmo foi feito para os testes de sensibilidade com a substância Cloreto de Sódio (NaCl).

Para o teste de toxicidade aguda e crônica com mistura, os dados foram analisados pelos modelos conceituais da Adição de Concentração (CA) e da Ação Independente (IA), utilizando-se a ferramenta MIXTOX (JONKER et al., 2005). O efeito combinado esperado, calculado a partir das exposições individuais, foi comparado com os dados observados. As análises comparadas foram estendidas e os três desvios dos modelos de referência (1. interações sinérgicas/antagônicas - S/A; 2. desvio dependente da proporção da dose – DR (do inglês *Dose Ration-dependent*); e 3. desvio dependente do nível da dose – DL (do inglês *Dose Level-dependent*) foram modelados pela adição dos parâmetros a e b. Em desvios sinérgicos e antagônicos, o parâmetro “a” (que indica o desvio em baixas e altas doses) se torna, respectivamente, negativo ou positivo. Para o DR, além do parâmetro “a”, está incluso um segundo parâmetro, o “bDR”, que permite a identificação do papel de cada composto na mistura. Um segundo parâmetro, além do parâmetro “a”, também está incluso para o DL, o “bDL”, que indica em qual nível da dose o desvio muda.

Na Tabela 1 e em Jonker et al. (2005), encontram-se maiores detalhes dessas funções de desvio. Após ajustar os dados aos desvios e modelos conceituais, foi escolhido o melhor ajuste pelo método de máxima verossimilhança e após identificado o modelo mais adequado, o padrão de efeitos foi deduzido dos valores dos parâmetros e o desvio máximo foi calculado em termos de nível de efeito (JONKER et al., 2005; FREITAS et al., 2014; MANSANO et al., 2017).

Tabela 1. Interpretação dos parâmetros adicionais (“a” e “b”) que definem a forma funcional do padrão dos desvios a partir da Adição de Concentração (CA) e da Ação Independente (IA). Adaptado de Jonker et al. (2005).

Desvio Padrão	Parâmetro "a" (CA e IA)		Parâmetro "b" (CA e IA)	
Sinergismo / Antagonismo (S/A)	a > 0 - antagonismo a < 0 - sinergismo			
Dependente da proporção da dose (DR)	a > 0 - antagonismo, exceto para aquelas proporções de misturas onde um valor de b negativo significativo indica sinergismo		bi > 0 - antagonismo onde a toxicidade da mistura é causada principalmente pelo toxicante i	
	a < 0 - sinergismo, exceto para aquelas proporções de misturas onde um valor de b positivo significativo indica antagonismo		bi < 0 - sinergismo onde a toxicidade da mistura é causada principalmente pelo toxicante i	
Dependente do nível da dose (DL)	a > 0 - antagonismo em nível da dose baixo e		bDL > 1 - mudança em nível da dose menor do que CE50	bDL > 2 - mudança em nível da dose menor do que CE50

sinergismo em nível da dose alto	bDL = 1 - mudança em CE50	bDL = 2 - mudança em CE50
a < 0 - sinergismo em nível da dose baixo e antagonismo em nível da dose alto	0 < bDL < 1 - mudança em nível da dose maior do que CE50	1 < bDL < 2 - mudança em nível da dose maior do que CE50
	bDL < 0 - sem mudança, mas a magnitude do S/A é dependente do nível da dose	bDL < 1 - sem mudança, mas a magnitude do S/A é dependente do nível de efeito

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Variáveis abióticas dos testes de toxicidade aguda e crônica

Nos testes de toxicidade com o cladóceros *C. silvestrii*, os valores de pH das soluções-teste ficaram dentro do intervalo de 7,2 a 7,8, não variando mais que 1,0 unidade por teste. A dureza das soluções-teste variou de 40 a 44 mg CaCO₃ L⁻¹ e a temperatura permaneceu estável a 25°C em todos os testes. A concentração de oxigênio dissolvido variou de 8,0 a 8,5 mg L⁻¹ e a condutividade elétrica ficou entre 160,2 e 165,1 μS cm⁻¹. Assim, todos os testes preencheram os critérios de validade estabelecidos nas orientações fornecidas tanto pela OECD (2004, 2008) como pela ABNT (2017).

3.2. Testes de Sensibilidade com a substância de referência cloreto de sódio

Os valores de CE₅₀-48 h dos testes de sensibilidade com cloreto de sódio (NaCl) para o cladóceros *C. silvestrii* ficaram dentro dos limites inferior e superior da tabela de controle determinada neste estudo, ou seja, 1,32 a 1,62 g L⁻¹, mostrando que os organismos estavam saudáveis o suficiente para serem utilizados nos ensaios de toxicidade de acordo com a faixa de referência de 1,00 a 1,83 g L⁻¹ obtida para testes com 48 h de exposição (TAKENAKA, 2007; MACHADO et al., 2009; CASALI-PEREIRA et al., 2015; MANSANO et al., 2016; de LUCCA et al., 2018; MIGUEL, 2020;) (Figura 2).

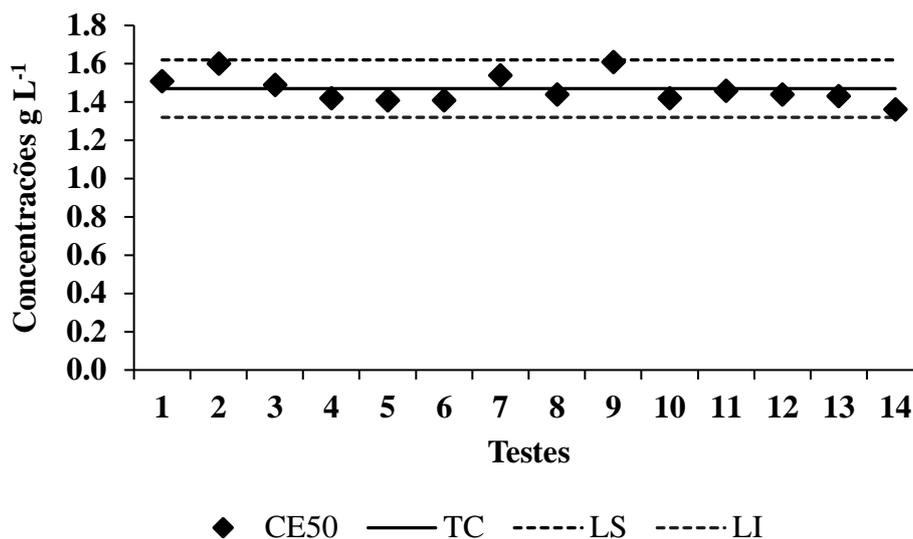


Figura 2. Faixa de sensibilidade de *Ceriodaphnia silvestrii* (CE₅₀-48h) à substância de referência cloreto de sódio, com base nos resultados de 14 testes de toxicidade aguda. Os limites superior (LS) e inferior (LI) foram de 1,32 e 1,62 g L⁻¹, respectivamente, com uma tendência central (TC) de 1,47 g L⁻¹.

3.3. Testes de toxicidade isolados com o cladóceros *C. silvestrii*

No final dos testes de toxicidade aguda e crônica com os compostos isolados, a sobrevivência dos organismos de *C. silvestrii* foi de 100%, tanto no controle como no controle com solvente, mostrando que não houve diferença significativa ($\pm 10\%$ de organismos imóveis) entre os resultados do controle e do controle com solvente (0,01% de acetona). Assim, exclui-se qualquer possibilidade de interferência do solvente nos resultados dos testes de toxicidade aguda e crônica.

Para os testes de toxicidade aguda isolados, a CE₅₀-48h do herbicida Ametrina e do inseticida Clorantraniliprole foram 7,82 mg L⁻¹ e 0,003 mg L⁻¹, respectivamente. Já os valores de CE₅₀-8d obtidos nos testes crônicos para o herbicida e o inseticida foram 0,042 para o herbicida Ametrina e 0,0001 para o inseticida Clorantraniliprole.

3.4. Toxicidade dos compostos Ametrina e Clorantraniliprole em mistura

No presente estudo, ambos os modelos de referência, o de Adição de Concentração (CA) e o de Ação Independente (IA), foram utilizados para analisar os resultados da exposição aguda (48h) e crônica (8 dias) do cladóceros *C. silvestrii* à mistura do herbicida Ametrina e do inseticida Clorantraniliprole.

Com base nos valores obtidos nos testes de toxicidade aguda, ambos os modelos CA e IA foram validados estatisticamente. Todos os dados e parâmetros do teste de significância obtidos pela ferramenta MIXTOX estão apresentados na Tabela 2 para ambos os modelos.

Os dados ajustados ao modelo CA resultaram em um valor SS (soma dos quadrados dos resíduos) de 143,91 com $p < 0,05$ e r^2 de 0,76. Ao adicionar o parâmetro “a” ao modelo CA para descrever o desvio S/A, o valor de SS diminuiu para 127,20 ($p = 0,00004$). Ao se adicionarem os parâmetros “a” e b_{DR} , para o DR, foi observada uma diminuição de SS para 123,86, que não foi estatisticamente significativo ($p = 0,07$). Já a adição dos parâmetros “a” e “ b_{DL} ” para o DL, foi estatisticamente significativo ($p = 0,0006$ e r^2 de 0,81) com SS diminuindo para 115,35. As mesmas etapas foram seguidas para o modelo IA, que alcançou um valor SS de 129,51 com $p < 0,05$ e $r^2 = 0,79$. Ao estender o modelo para descrever o desvio S/A adicionando o parâmetro “a” (para verificar sinergismo ou antagonismo), SS foi reduzido para 125,91, porém o desvio não foi estatisticamente significativo ($p > 0,05$). Os desvios DR e DL também não foram significativos para o modelo IA ($p > 0,05$).

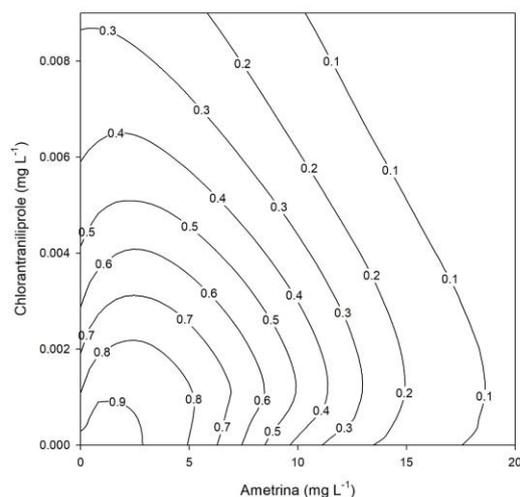
Com base nas análises dos dois modelos, o desvio DL do modelo CA teve o melhor ajuste, explicando 81% dos dados. Em resumo, ao expor *C. silvestrii* à mistura de Ametrina e Clorantraniliprole, a toxicidade aguda dessa mistura foi dependente do nível da dose, indicando que em baixas doses ocorre antagonismo, mas em altas doses o que se observa é o sinergismo entre os efeitos dos compostos ($a > 0$), de modo que a mudança de interação ocorre em concentrações acima da CE_{50} ($b_{DL} = 0,34$) (Figura 3).

Tabela 2. Resumo dos parâmetros e testes de ajuste dos modelos de referência Adição de Concentração e Ação Independente aplicados à mobilidade do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* exposto à mistura do herbicida Ametrina e do inseticida Clorantraniliprole, durante 48 h.

	Modelo CA				Modelo IA			
	CA	S/A	DR	DL	IA	S/A	DR	DL
Max	0,93	0,90	0,89	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93
β amet.	3,09	4,83	6,48	3,1	2,58	2,69	2,73	2,95
β chlo.	1,53	1,75	1,65	1,23	1,76	1,7	1,69	1,79
IC ₅₀ amet.	9,85	10,04	10,33	8,65	8,78	8,5	8,43	8,93
IC ₅₀ chlo.	0,0062	0,0051	$\frac{0,892}{6}$	0,0045	0,0052	0,0047	0,0047	0,0048
A	-	1,4	0,89	4,98	-	0,95	0,54	-0,002
b _{DR/DL}	-	-	0,89	0,34	-	-	0,8	439,58
SS	143,91	127,20	$\frac{123,8}{6}$	115,35	129,51	125,91	125,72	126,77
r ²	0,76	0,79	0,80	0,81	0,79	0,79	0,79	0,79
Teste χ^2 ou F	464,5	16,71	3,35	11,85	478,9	3,61	3,79	2,75
Df	-	1	1	1	-	1	2	2
p(χ^2 ou F)	$3,18 \times 10^{-99}$	0,0000	$\frac{0,067}{4}$	0,0006	$\frac{2,45 \times 10^{-102}}$	0,0575	0,15	$\frac{0,253}{1}$

CA = modelo de Adição de concentração; IA = modelo de Ação Independente; S/A = desvio Sinergismo ou Antagonismo; DR = desvio Dependente da Proporção da Dose; DL = desvio Dependente do Nível da Dose; max= valor máximo da resposta; β = inclinação da curva de resposta aos compostos isolados; CE50 = concentração média efetiva; a = bDR e bDL = parâmetros da função; SS = soma dos quadrados dos resíduos; r² = coeficiente de regressão; Teste χ^2 ou F = teste estatístico; Df = graus de liberdade; p (χ^2 ou F) = nível de significância do teste estatístico. Os valores foram obtidos pela ferramenta MIXTOX (JONKER et al., 2005)

A



B

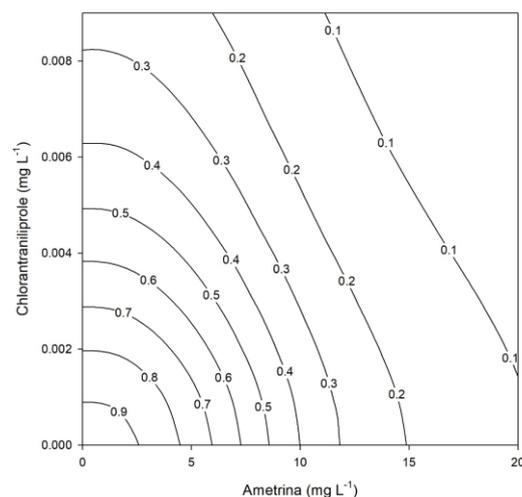


Figura 3. Isobologramas para os resultados do teste de toxicidade aguda da mistura do herbicida Ametrina e do inseticida Clorantraniliprole sobre a mobilidade do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* após 48h, seguindo o modelo de referência de Adição de Concentração com desvio dependente do nível da dose (A) e o modelo de Ação Independente (B).

Para os testes de toxicidade crônica de mistura, as análises foram feitas com base nos valores relativos médios de neonatas acumuladas por fêmea, após 8 dias de exposição aos compostos. Na ferramenta MIXTOX, apenas o modelo IA foi significativo. No entanto, nenhum desvio do modelo de referência foi significativo. Todos os dados e parâmetros do teste de significância obtidos para esse modelo estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Resumo dos parâmetros e testes de ajuste do modelo de referência Ação Independente (IA) aplicado ao número relativo médio de neonatas acumuladas por fêmea do cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* exposto à mistura do herbicida Ametrina e do inseticida Clorantraniliprole, por 8 dias.

Modelo IA				
	IA	S/A	DR	DL
Max	1,00	1,02	1,01	1,00
β amet.	0,99	0,97	1,03	0,99
β chlo.	1,03	1,01	0,95	1,03
CE ₅₀ amet.	0,047	0,045	0,044	0,047
CE ₅₀ chlo.	1,06x10 ⁻⁴	1,00x10 ⁻⁴	1,05x10 ⁻⁴	1,06 x10 ⁻⁴
A	-	0,18	-0,74	0,00002
b _{DR/DL}	-	-	1,72	2,00
SS	0,0578	0,0574	0,0515	0,0577
r ²	0,97	0,97	0,97	0,97
Teste χ^2 ou F	266,68	0,20	4,15	0,01
Df	-	1	2	2
p(χ^2 ou F)	1,56x10 ⁻²³	0,66	0,13	0,99

IA = modelo de Ação Independente; S/A = desvio Sinergismo ou Antagonismo; DR = desvio Dependente da Proporção da Dose; DL = desvio Dependente do Nível da Dose; max= valor máximo da resposta; β = inclinação da curva de resposta aos compostos isolados; CE50 = concentração média efetiva; a = bDR e bDL = parâmetros da função; SS = soma dos quadrados dos resíduos; r² = coeficiente de regressão; Teste χ^2 ou F = teste estatístico; Df = graus de liberdade; p (χ^2 ou F) = nível de significância do teste estatístico. Os valores foram obtidos pela ferramenta MIXTOX (Jonker et al., 2005)

Os dados de toxicidade crônica foram ajustados ao modelo IA e resultaram em um valor SS de 0,058 com p<0,05 e r² de 0,97. Ao adicionar o parâmetro “a” ao modelo IA para descrever o desvio S/A, o valor de SS foi praticamente o mesmo (p>0,05), assim como para a adição dos parâmetros b_{DR} e b_{DL} (p>0,05). Sendo assim, os desvios S/A, DR e DL não foram significativos para o modelo IA. Em resumo, ao expor *C. silvestrii* à mistura do herbicida Ametrina e do inseticida Clorantraniliprole por 8 dias, os resultados

se ajustaram ao modelo de referência sem desvio. Portanto, o modelo da mistura que melhor descreveu a relação entre os dois componentes foi a ação independente (Figura 4).

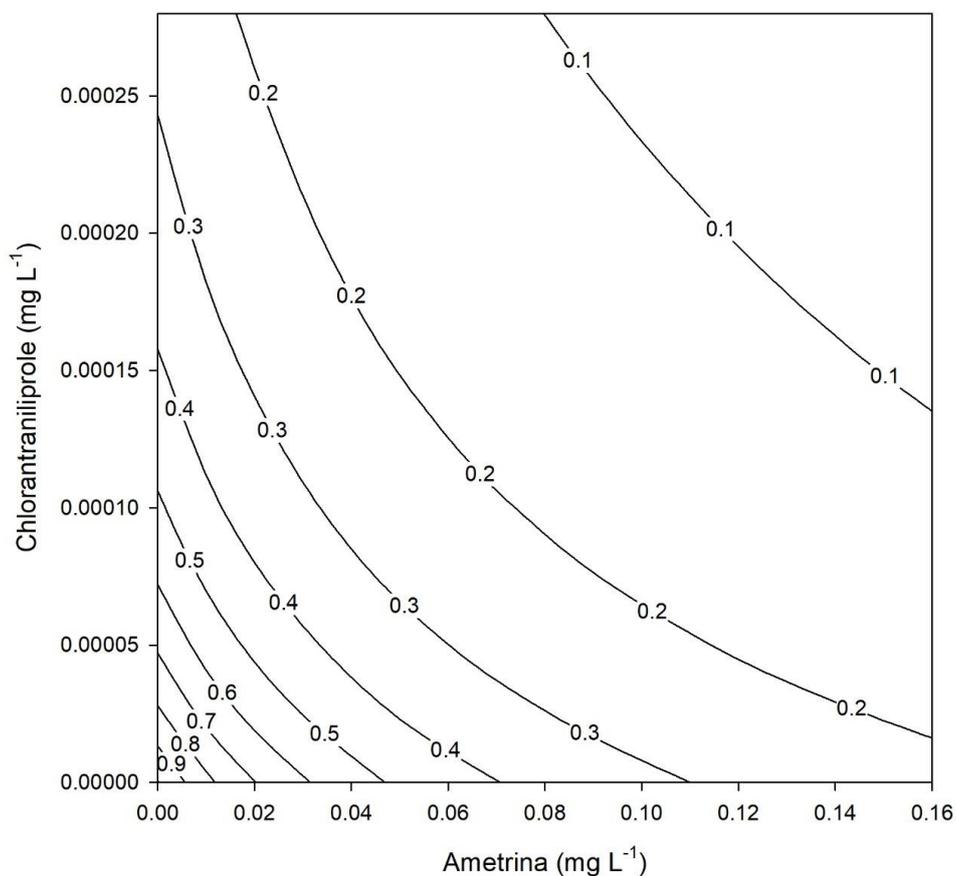


Figura 4. Isoblograma para os resultados do teste de toxicidade crônica da mistura do herbicida Ametrina e do inseticida Clorantraniliprole sobre o número relativo médio de neonatos acumulados por fêmea do cladócero *Ceriodaphnia silvestrii*, após 8 dias de exposição, seguindo o modelo de referência de Ação Independente (IA). Nenhum dos desvios foi significativo.

4. DISCUSSÃO

A Ametrina é um herbicida que tem um modo de ação sistêmico nas plantas, inibindo o transporte de elétrons no fotossistema II da fotossíntese, afetando tal processo. Como outros herbicidas, também afeta a fotossíntese de algas (SANDOVAL-CARRASCO, 2013; MANSANO *et al.*, 2016; SUN *et al.*, 2020), inibindo seu crescimento e/ou diminuindo o teor de clorofila *a* (FERNANDEZ-NAVEIRA *et al.*, 2016; CHIN *et al.*, 2019).

No entanto, organismos que não realizam fotossíntese também podem ser afetados pelo herbicida Ametrina. Estudos em que espécies não-alvo foram expostas à Ametrina mostraram efeitos endócrinos, alterações morfológicas, reprodutivas, de sobrevivência e comportamentais. Um grau moderado de toxicidade aguda da Ametrina foi relatado para alevinos de tilápia, os quais apresentaram dispnéia (com aceleração dos movimentos branquiais e busca da superfície), perda de equilíbrio, letargia e aumento da mortalidade. Também há registros de que peixes *Danio rerio* expostos à Ametrina apresentam letargia, aumento da imobilidade (MOURA *et al.*, 2011), bem como alterações no desenvolvimento embrionário, tais como edema, *delay* (atraso no desenvolvimento), atraso na absorção do saco vitelínico e deformidade da cauda (TESOLIN *et al.*, 2014).

O inseticida Clorantraniliprole funciona como ativador dos receptores de rianodina, atuando em sítios de nervos e músculos, onde a molécula do inseticida imita a acetilcolina e compete com ela. Esta, por sua vez, não é degradada, ocorrendo a passagem descontrolada e contínua dos impulsos nervosos. Diversos estudos demonstraram os impactos negativos desse inseticida sobre cladóceros e a alta sensibilidade desses organismos não-alvo ao Clorantraniliprole (LAVTIŽAR *et al.*, 2015). *Daphnia magna*, após exposição aguda ao Clorantraniliprole, apresentou aumento significativo nas espécies reativas de oxigênio (ROS) e diminuição significativa nas atividades de enzimas antioxidantes (superóxido dismutase - SOD - e glutatona peroxidase - GPx), com indicação de que mesmo níveis baixos dessa diamida podem representar riscos ecológicos para os ecossistemas aquáticos (CUI *et al.*, 2017).

No entanto, é difícil prever os efeitos de misturas pelo modo de ação de cada substância isolada, uma vez que mesmo que compostos tenham um alvo similar, podem ter efeitos diferentes quando combinados (ZHAO *et al.*, 2018). Nos ambientes aquáticos, os organismos ficam expostos à mistura de diversos contaminantes, os quais podem interagir produzindo efeitos sinérgicos, aditivos ou antagônicos (ROCHA *et al.*, 2018; MANSANO *et al.*, 2016; BARATA *et al.*, 2006).

Embora os compostos utilizados no presente estudo sejam amplamente utilizados, este é o primeiro trabalho que aborda a toxicidade de misturas de Ametrina e Clorantraniliprole, particularmente sobre uma espécie neotropical nativa. O uso de espécies nativas torna a sensibilidade e a avaliação do risco potencial dos compostos na água ecologicamente mais relevantes (ROCHA *et al.*, 2018; MANSANO *et al.*, 2016). A ausência de dados na literatura sobre misturas do herbicida Ametrina e do inseticida Clorantraniliprole não nos permite comparar diretamente nossos resultados com o de outros autores. Este estudo evidenciou que, em relação a toxicidade aguda, tais compostos em mistura interagem de modo dependente do nível da dose, apresentando antagonismo nas concentrações mais baixas e sinergismo nas maiores concentrações. Interações semelhantes foram obtidas para a mesma espécie de cladóceros (*C. silvestrii*) exposta a misturas binárias dos antibióticos florfenicol e oxitetraciclina (FREITAS *et al.*, 2018) e dos agrotóxicos diuron e carbofuran (MANSANO *et al.*, 2020). O tipo de interação, no entanto, depende dos compostos e do organismo testado. Choung *et al.* (2011) avaliaram a toxicidade da mistura de um herbicida (atrazina) e um inseticida (terbufós) sobre a imobilidade de *Ceriodaphnia dubia*, detectando sinergismo (aumento da toxicidade) dos compostos em mistura. Por outro lado, o estudo realizado por Phyu *et al.* (2011) avaliando a toxicidade da mistura do herbicida atrazina e do inseticida permetrina indicaram diminuição da toxicidade crônica (antagonismo) ao cladóceros *Ceriodaphnia cf. dubia*. Estudos da toxicidade de misturas de inseticidas também apontaram para interação sinérgica (entre imidacloprid e tiaclopride) ou antagônica (entre imidacloprid e clorpirifós) em exposições agudas (imobilização) da espécie *Daphnia magna* (LOUREIRO *et al.*, 2010). A conclusão da interação de uma mistura obtida para um organismo-teste não pode ser extrapolada para outros organismos (LIU *et al.*, 2013).

No presente estudo, em relação à toxicidade crônica da mistura, ao se analisar os efeitos dos ingredientes ativos padrões sobre o número relativo médio de neonatos acumulados por fêmea de *C. silvestrii* constatou-se que a interação de Ametrina e Clorantraniliprole em mistura levou à aditividade, ou seja, os dados se ajustaram apenas aos modelos de referência de não interação.

Neste estudo, os dados de toxicidade aguda se ajustaram melhor ao modelo CA e os dados crônicos ao modelo IA. De um ponto de vista teórico, tem sido frequentemente argumentado que o modelo de ação independente (IA) seria o modelo de referência mais correto a ser usado para prever o efeito conjunto de misturas de produtos químicos com diferentes locais-alvo moleculares. Para testar essa afirmação, Cedergreen *et al.* (2008) fizeram um estudo de revisão onde testaram a precisão de IA e CA para 98 misturas

binárias de produtos químicos com diferentes alvos moleculares, principalmente, pesticidas e produtos farmacêuticos testados em um ou vários organismos-teste (*Vibrio fischeri*, microrganismos de lodo ativado, *Daphnia magna*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Lemna minor*, *Tripleurospermum inodorum*, *Stellaria*). Os autores concluíram que nenhum modelo pode ser selecionado sobre o outro com base apenas na precisão. No entanto, um grande número de trabalhos indica que o modelo CA como mais protetivo para fins regulatórios e de avaliações de risco ambiental, fornecendo estimativas preditivas mesmo para misturas quimicamente diferentes (BELDEN et al., 2007; KORTENKAMP et al., 2009; BACKHAUS; FAUST, 2012; HASSOLD; BACKHAUS, 2014).

A elevada sensibilidade de *C. silvestrii* aos compostos testados, aliada a características como a facilidade de cultivo e a reprodução rápida e partenogenética fazem dessa espécie de Cladocera um organismo-teste adequado para as análises realizadas.

Considerando que os organismos estão expostos a diversos compostos químicos concomitantemente nos ecossistemas aquáticos, avaliar a toxicidade de misturas é fundamental para a adequada proteção da biota aquática. Os resultados do presente estudo demonstraram que, ao analisar o parâmetro mobilidade, o herbicida Ametrina e o inseticida Clorantraniliprole misturados podem causar toxicidade maior (sinergismo) ou menor (antagonismo) a *C. silvestrii* do que quando analisados sozinhos. Assim, estudos ecotoxicológicos e avaliações de risco que levem em conta apenas exposições individuais podem não refletir o real impacto desses poluentes nos ecossistemas aquáticos.

5. CONCLUSÕES

Os resultados dos efeitos tóxicos da mistura dos agrotóxicos Ametrina e Clorantraniliprole no cladóceros *C. silvestrii* obtidos nesse estudo são inéditos até a presente data. Os resultados mostraram que nos testes de toxicidade aguda, a mistura desses compostos causa desvios significativos pelo modelo CA apresentando interações sinérgicas e antagônicas, além de interações dependentes do nível da dose. Para os testes crônicos, os dados obtidos foram ajustados para o modelo IA e nenhum desvio foi significativo. O organismo-teste escolhido para este estudo foi sensível e exibiu respostas letais e subletais a toxicidade com misturas. No entanto, são necessários mais estudos sobre o modo de ação desses compostos em mistura afim de se evitar a sub ou sobre-estimação dos efeitos sobre o cladóceros *C. silvestrii* e melhor compreender seus efeitos em organismos zooplanctônicos tropicais.

REFERÊNCIAS

ABNT, A. B. D. N. T. **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera)**, 2017.

ACAYABA, R. D. Ocorrência de agrotóxicos usados na cana-de-açúcar em corpos d'água do Estado de São Paulo. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2017.

ALBUQUERQUE AF, RIBEIRO JS, KUMMROW F, NOGUEIRA AJ, MONTAGNER CC, UMBUZEIRO GA. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. **Environ Sci Process Impacts**. 2016 Jul 13;18(7):779-87.

ANVISA. (2003). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. www.anvisa.gov.br.

ASTM. (2001). American Society for Testing and Materials. Standard guide for conducting acute toxicity testing on test materials with fishes, macroinvertebrates, and amphibians, West Conshohocken. 729–796.

ATTHIESSEN, P., WHEELER, J. R., & WELTJE, L. (2018). A review of the evidence for endocrine disrupting effects of current-use chemicals on wildlife populations. **Critical Reviews in Toxicology**, 48(3), 195–216.

BACKHAUS, T.; FAUST, M. Predictive environmental risk assessment of chemical mixtures: a conceptual framework. *Environmental science & technology*, v. 46, n. 5, p. 2564-2573, 2012.

BARATA, C. et al. Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for multi-substance risks assessment. **Aquatic Toxicology**, v. 78, n. 1, p. 1-14, 2006.

BELDEN, J.B.; GILLIOM, R.J.; LYDY, M.J. How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life?. **Integrated Environmental Assessment and Management: An International Journal**, v. 3, n. 3, p. 364-372, 2007

BIZARRO, C., EIDE, M., HITCHCOCK, D.J., GOKSØYR, A., ORTIZ-ZARRAGOITIA, M. Single and mixture effects of aquatic micropollutants studied in precision-cut liver slices of Atlantic cod (*Gadus morhua*). **Aquatic Toxicology**, 177, 395–404 p, 2016.

BLISS, C. **The toxicity of poisons applied jointly**. *Ann. Appl. Biol*, v. 26, p. 585–615, 1939.

CASALI-PEREIRA, M. P., DAAM, M. A., RESENDE, J. C. DE, VASCONCELOS, A. M., ESPÍNDOLA, E. L. G., & BOTTA, C. M. R. (2015). Toxicity of Vertimec® 18 EC (active ingredient abamectin) to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Chemosphere**, 139, 558–564. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.006>

CASIDA, J. E. Pest Toxicology: The Primary Mechanisms of Pesticide Action. **Chemical Research in Toxicology**, v. 22, n. 4, p. 609–619, 20 abr. 2009.

CEDERGREEN N., CHRISTENSEN A.M., KAMPER A., KUDSK P., MATHIASSEN, S.K., STREIBIG J.C., SØRENSEN, H. A review of independent action compared to

concentration addition as reference models for mixtures of compounds with different molecular target sites. **Environ Toxicol Chem.** 2008 Jul;27(7):1621-32.

CETESB: DIAGNÓSTICO DA CONTAMINAÇÃO DE ÁGUAS SUPERFICIAIS, SUBTERRÂNEAS E SEDIMENTOS POR AGROTÓXICOS, CETESB – Companhia Ambiental do Estado do São Paulo, 2019. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2020/03/Relatorio-Agrot%C3%B3xicos_28_11_2019_Conclu%C3%ADdo_PDF-1.pdf>, acesso em: 04/12/21.

CHOUNG, C.B., HYNE, R.V., STEVENS, M.M., HOSE, G.C., 2013. The ecological effects of a herbicide–insecticide mixture on an experimental freshwater ecosystem. **Environ. Pollut.** 172, 264-274.

CHOUNG, C.B., HYNE, R.V., STEVENS, M.M., HOSE, G.C., 2011. Toxicity of the insecticide terbufos, its oxidation metabolites, and the herbicide atrazine in binary mixtures to *Ceriodaphnia cf dubia*. Arch. Environ. **Contam. Toxicol.** 60 (3), 417-425.

CORDOVA, D., BENNER, E. A., SACHER, M. D., RAUH, J. J., SOPA, J. S., LAHM, G. P., SELBY, T. P., STEVENSON, T. M., FLEXNER, L., GUTTERIDGE, S., RHOADES, D. F., WU, L., SMITH, R. M., & TAO, Y. (2006). Anthranilic diamides: A new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 84(3), 196–214.

CORRÊA, C. E. S. Aspectos histológicos de gônadas e fígado de *Danio rerio* como potenciais biomarcadores indicativos de atuação de interferentes endócrinos do pesticida Chlorantraniliprole. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Sorocaba, 2016.

CUI, F., CHAI, T., QIAN, L., & WANG, C. (2017). Effects of three diamides (chlorantraniliprole, cyantraniliprole and flubendiamide) on life history, embryonic development and oxidative stress biomarkers of *Daphnia magna*. **Chemosphere**, 169.

CHIN, Y.Y., CHU, W.L., KOK, Y.Y., PHANG, S.M., WONG, C.Y., TAN, B.K., MUSTAFA, E.M. Sensitivity of selected tropical microalgae isolated from a farmland and a eutrophic lake to atrazine and endosulfan. **Journal of Applied Phycology**, Vol. 31, 2981–2998p, 2019.

DECOURTEN, B. M., CONNON, R. E., & BRANDER, S. M. (2019). Direct and indirect parental exposure to endocrine disruptors and elevated temperature influences gene expression across generations in a euryhaline model fish. **PeerJ**, 7, e6156.

DE LUCCA, G. M., FREITAS, E. C., & DA GRAÇA GAMA MELÃO, M. (2018). Effects of TiO₂ Nanoparticles on the Neotropical Cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii* by Waterborne and Dietary Routes. **Water, Air, & Soil Pollution**, 229(9), 307.

DETTMERS, J.M., STEIN, R.A., 1992. Food consumption by larval gizzard shad: zooplankton effects and implications for reservoir communities. T. **Am. Fish. Soc.** 121, 494- 507.

FERNÁNDEZ-NAVEIRA, A., RIOBOO, C., CID, A., HERRERO, C. Atrazine induced changes in elemental and biochemical composition and nitrate reductase activity in

Chlamydomonas reinhardtii. **European Journal of Phycology**, Vol. 51, 338-345 p, 2016.

FERREIRA, A. L. G.; LOUREIRO, S.; SOARES, A. M. V. M. Toxicity prediction of binary combinations of cadmium, carbendazim and low dissolved oxygen on *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v. 89, n. 1, p. 28–39, ago. 2008.

FONSECA, A.R.; ROCHA, O. (2004). The life-cycle of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902, a Neotropical endemic species (Crustacea, Cladocera, Daphnidae). **Acta Limnol. Bras**, 16((4)), 319–328.

FREITAS, E. C. et al. Can mixtures of cyanotoxins represent a risk to the zooplankton? The case study of *Daphnia magna* Straus exposed to hepatotoxic and neurotoxic cyanobacterial extracts. **Harmful Algae**, v. 31, p. 143–152, jan. 2014.

FREITAS, E.C., ROCHA, O., ESPÍNDOLA, E.L.G. **Effects of florfenicol and oxytetracycline on the tropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii***: A mixture toxicity approach to predict the potential risks of antimicrobials for zooplankton. *Ecotox Environ Safe* 162:663–672, 2018

GRIFFERO, L. et al. Basin-scale monitoring and risk assessment of emerging contaminants in South American Atlantic coastal lagoons. **Science of The Total Environment**, v. 697, p. 134058, dez. 2019.

HASSOLD, Enken; BACKHAUS, Thomas. The predictability of mixture toxicity of demethylase inhibiting fungicides to *Daphnia magna* depends on life-cycle parameters. **Aquatic toxicology**, v. 152, p. 205-214, 2014.

JACOMINI, A. E., CAMARGO, P. B., AVELAR, W. E. P., BONATO, P. S. Determination of Ametryn in River Water, River Sediment and Bivalve Mussels by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 20, No. 1, 107-116, 2009.

JONKER, M. J. et al. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 10, p. 2701, 2005.

KORTENKAMP, A., BACKHAUS, T., FAUST, M., 2009. State of the art report on mixture toxicity. Report for the directorate general for the environment of the European Commission.

LAVTIŽAR, V., HELMUS, R., KOOLS, S. A. E., DOLENC, D., VAN GESTEL, C. A. M., TREBŠE, P., WAAIJERS, S. L., & KRAAK, M. H. S. (2015). Daphnid Life Cycle Responses to the Insecticide Chlorantraniliprole and Its Transformation Products. **Environmental Science & Technology**, 49(6), 3922–3929.

LIU, S.S., WANG, C.L., ZHANG, J., ZHU, X.W., LI, W.Y. Combined toxicity of pesticide mixtures on green algae and photobacteria. *Ecotox. Environ. Saf.* 95, 98-103. 2013.

LIU, Y., MA, L. Y., LU, Y. C., JIANG, S. S., WU, H. J., & YANG, H. 2017. Comprehensive analysis of degradation and accumulation of ametryn in soils and in

wheat, maize, ryegrass and alfalfa plants. *Ecotoxicology and environmental safety*, 140, 264-270. 2017.

LOEWE, S., MUISCHNEK, H., LOEWE, S., MUISCHNEK, H. Combined effects I announcement – implements to the problem. **Arch. Exp. Pathol. Pharmacol**, v. 114, p. 313–326, 1926.

LOUREIRO, S., SVENDSEN, C., FERREIRA, A.L.G., PINHEIRO, C., RIBEIRO, F., SOARES, A.M.V.M., 2010. Toxicity of three binary mixtures to *Daphnia magna*: comparing chemical modes of action and deviations from conceptual models. **Environ. Toxicol. Chem.** 29 (8) 1716-1726.

MACHADO, K. S.; CASALI-PEREIRA, M. P.; OLIVEIRA, D.M.; ISIQUE, W.D.; LEITE, M.A.; MINILLO, A. (2009). **Bioensaios de toxicidade aguda com fármacos: diclofenaco de sódio e paracetamol.**

MANSANO, A. S., MOREIRA, R. A., PIEROZZI, M., OLIVEIRA, T. M. A., VIEIRA, E. M., ROCHA, O., & REGALI-SELEGHIM, M. H. (2016). Effects of diuron and carbofuran pesticides in their pure and commercial forms on *Paramecium caudatum*: The use of protozoan in ecotoxicology. **Environmental Pollution**, 213, 160–172.

MANSANO, Adrislaine S. et al. Individual and mixture toxicity of carbofuran and diuron to the protozoan *Paramecium caudatum* and the cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 201, p. 110829, 2020.

MARTINOU AF; STAVRINIDES MC (2015) Effects of Sublethal Concentrations of Insecticides on the Functional Response of Two Mirid Generalist Predators. *Ploys ONE* 10(12): e0144413.

MIGUEL, M. (2020). *Efeito do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol e do herbicida atrazina em espécies de dois níveis tróficos.* Escola De Engenharia De São Carlos- Universidade De São Paulo.

MOURA, M.A.M.; DOMINGUES, I.; OLIVEIRA, R.; JONSSON, C.M.; NOGUEIRA, A.J.A. Efeitos subletais da Ametrina em paulistinha (*Danio rerio*). *O Biológico*, São Paulo, SP, v. 73, n. 2, p. 154, jul./dez. 2011. Edição dos resumos da **24ª Reunião Anual do Instituto Biológico**, São Paulo, nov. 2011. Resumo 051.

MÜLLER, H. (1972). Wachstum and phosphatbedarf von *Nitzschia actinastroides* (Lemn.) v. Goor in statischer und homokontiuierlicher kultur unter phosphatlimitierung. **Arch. Hydrobiol**, 38, 399–484.

National Center for Biotechnology Information (b). (2021). **PubChem Compound Summary for CID 11271640, Chlorantraniliprole.** <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorantraniliprole>.

NAUEN, R.; STEINBACH, D. Resistance to Diamide Insecticides in Lepidopteran Pests. In: **Advances in Insect Control and Resistance Management.** Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 219–240.

NOVELLI, A., VIEIRA, B.H., VASCONCELOS, A.M., PERET, A.C., ESPÍNDOLA, E.L., 2012. Field and laboratory studies to assess the effects of Vertimec® 18EC on *Daphnia similis*. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 75, 87-93.

OECD. (2004). *OECD Guideline for testing of chemicals Daphnia sp., Acute Immobilisation Test 202*.

OECD. (2008). *OECD Guidelines for testing of chemicals Daphnia magna reproduction Test 2011*.

PAVLAKI, M. D. et al. Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 1, p. 99–110, jan. 2011.

PÉREZ, J. et al. Growth rate of *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to herbicides found in surface waters in the Alqueva reservoir (Portugal): a bottom-up approach using binary mixtures. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 6, p. 1167–1175, 30 ago. 2011.

PHYU, Y.L., PALMER, C.G., WARNE, M.S.J., HOSE, G.C., CHAPMAN, J.C., LIM, R.P., 2011. A comparison of mixture toxicity assessment: examining the chronic toxicity of atrazine, permethrin and chlorothalonil in mixtures to *Ceriodaphnia cf. dubia*. **Chemosphere** 85 (10), 1568-1573.

REBELO, R. M.; CALDAS, E. D. ENVIRONMENTAL RISK ASSESSMENT OF AQUATIC SYSTEMS AFFECTED BY PESTICIDE USE. **Química Nova**, 2014.

ROCHA, O. et al. Sensitivities of three tropical indigenous freshwater invertebrates to single and mixture exposures of diuron and carbofuran and their commercial formulations. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 7, p. 834–844, 20 set. 2018.

RODITAKIS, E. et al. Ryanodine receptor point mutations confer diamide insecticide resistance in tomato leafminer, *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 80, p. 11–20, jan. 2017.

RODRIGUES, B.N., ALMEIDA, F. . **Guia de Herbicidas**. 5ed. ed. Lnodrina: Instituto Plantarum, 2005.

ROCHA, O. et al. Sensitivities of three tropical indigenous freshwater invertebrates to single and mixture exposures of diuron and carbofuran and their commercial formulations. **Ecotoxicology**, v. 27, n. 7, p. 834–844, 20 set. 2018.

SANDOVAL-CARRASCO, C. A., AHUATZI-CHACÓN, D., GALÍNDEZ-MAYER, J., RUIZ-ORDAZ, N., JUÁREZ-RAMÍREZ, C., & MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F. (2013). Biodegradation of a mixture of the herbicides ametryn, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in a compartmentalized biofilm reactor. **Bioresource Technology**, 145, 33–36.

SATTELLE, D. B.; CORDOVA, D.; CHEEK, T. R. Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals. **Invertebrate Neuroscience**, v. 8, n. 3, p. 107–119, 12 set. 2008.

SCOGNAMIGLIO, V., ANTONACCI, A., PATROLECCO, L., LAMBREVA, M. D., LITESCU, S. C., GHUGE, S. A., & REA, G. (2016). Analytical tools monitoring endocrine disrupting chemicals. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, 80, 555–567.

SODRÉ, F.F., PESCARA, I.C., MONTAGNER, C.C., JARDIM, W.F. **Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry**. *Microchemical Journal*, Vol. 96, 92–98 p, 2010.

SHAO, Y., CHEN, Z., HOLLERT, H., ZHOU, S., DEUTSCHMANN, B., SEILER, T.B. Toxicity of 10 organic micropollutants and their mixture: Implications for aquatic risk assessment. **Science of the Total Environment**, 666, 1273–1282 p, 2019.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. DE. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações**. 2004.

SUN, C., XU, Y., HU, N., MA, J., SUN, S., CAO, W., GLOBUČAR, G., HU, C., ZHAO, Y. To evaluate the toxicity of atrazine on the freshwater microalgae *Chlorella* sp. using sensitive indices indicated by photosynthetic Parameters. **Chemosphere**, 244, 125514, 2020.

SYSTAT, 2008. Systat Software, Incorporation SigmaPlot for Windows Version 11.0.

TAKENAKA, R. A. (2007). Avaliação da toxicidade de *Mycrocystis aeruginosa* de florações naturais de cianobactérias de reservatórios do Rio Tietê. Escola de Engenharia de São Carlos.

TESOLIN, G.A.S.et al. Toxicity evaluation of herbicides used in sugarcane crops to Zebrafish (*Danio rerio*). **Mundo saúde** (Impr.);38(1):86-97, dez. 2013.

ZHAO, F., LI, Y., HUANG, L., GU, Y., ZHANG, H., ZENG, D., TAN, H. Individual and combined toxicity of atrazine, butachlor, halosulfuronmethyl and mesotrione on the microalga *Selenastrum capricornutum*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 148, 969–975 p, 2018.

ZHANG, W., LIU, W., ZHANG, J., ZHAO, H., ZHANG, Y., QUAN, X., JIN, Y. Characterisation of acute toxicity, genotoxicity and oxidative stress posed by textile effluent on zebrafish. **J Environ Sci** (China). 201.

WHALON, M.E., MOTA-SANCHEZ, D. AND HOLLINGWORTH, R. M. Analysis of global pesticide resistance in arthropods. In: Whalon, M., Mota-Sanchez, D. And Hollingworth, R. (Ed.). **Global Pesticide Resistance in Arthropods**. CAB International, 2008. p. 5–31.