

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

ADRISLAINE DA SILVA MANSANO

**Efeitos dos agrotóxicos diuron e carbofuran, isolados e em mistura,
sobre organismos aquáticos e avaliação de risco ecológico**

São Carlos – SP

2016

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

ADRISLAINE DA SILVA MANSANO

**Efeitos dos agrotóxicos diuron e carbofuran, isolados e em mistura,
sobre organismos aquáticos e avaliação de risco ecológico**

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 Doutor em Ciências, área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Profa. Dra. Mirna Helena Regali-Seleghim

Co-orientadora: Profa. Dra. Odete Rocha

São Carlos – SP

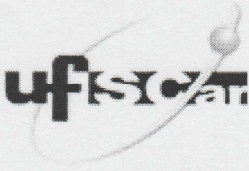
2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M286e Mansano, Adislaine da Silva
Efeitos dos agrotóxicos diuron e carbofuran,
isolados e em mistura, sobre organismos aquáticos e
avaliação de risco ecológico / Adislaine da Silva
Mansano. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
238 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

1. Ecotoxicologia. 2. Raphidocelis subcapitata.
3. Paramecium caudatum. 4. Ceriodaphnia silvestrii.
I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Adrislaine da Silva Mansano, realizada em 21/03/2016:

Profª. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim
UFSCar

Profª. Dra. Ana Teresa Lombardi
UFSCar

Profª. Dra. Emy Maria Vieira
USP

Profª. Dra. Claudia Fileto
USP

Profª. Dra. Andréa Novelli
UFS

Dedico a Deus, por estar sempre presente em minha vida e tornar tudo possível. Aos meus pais Uilton e Zenilda e ao meu marido Hugo, pelos inesquecíveis ensinamentos, confiança, incentivo e por todo amor que me conferiram em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Mirna Helena pela orientação, amizade, incentivo, confiança e ensinamentos ao longo desses 10 anos em que estamos trabalhando juntas.

À Profa. Dra. Odete Rocha pela co-orientação, amizade, confiança, incentivo e, principalmente, pelos valiosos ensinamentos e auxílio durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Maurício A. Leite a quem sou grata por me apresentar à Limnologia, pela minha iniciação na pesquisa e pela confiança e amizade durante todos esses anos.

À Profa. Dra. Eny M. Vieira pela amizade, simpatia e sugestões ao longo deste trabalho, e também pela parceria na realização das análises químicas dos agrotóxicos estudados.

Ao Prof. Dr. Hugo Sarmiento pela disponibilidade e auxílio na realização das análises de citometria de fluxo, as quais foram essenciais para o conteúdo dessa tese.

Ao Prof. Dr. Michiel Daam pela disciplina ministrada que contribuiu muito para este trabalho e por todo auxílio durante a realização desta pesquisa.

À CAPES, pelo auxílio financeiro e a concessão da bolsa de doutorado.

Ao Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (DEBE), Laboratório de Ecologia de Microrganismos Aquáticos e Laboratório de Ecotoxicologia, pela estrutura oferecida para a realização desta pesquisa.

À técnica Darci (*in memoriam*), pelo auxílio em várias etapas deste trabalho e principalmente pela amizade, incentivo, confiança, carinho e valiosos ensinamentos.

A todos os funcionários do DEBE, em especial à secretária Edna e aos técnicos José Valdecir, Alcídio e Luiz Aparecido por todo auxílio durante as análises no laboratório e pela grande amizade.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais pela minha formação acadêmica em nível de Doutorado, à Coordenação do Curso e à Secretaria do Programa por todo o apoio concedido durante a realização do doutorado.

À minha família por todo amor e incentivo. Em especial aos meus pais Uilton e Zenilda, meus irmãos Douglas e Adriéle, meus cunhados Graciela e Leandro, meu sobrinho Enzo e meus avós Rubens e Celina pela eterna confiança, carinho, atenção e apoio.

Ao meu querido e amado marido Hugo, pelo amor, carinho, amizade, confiança, incentivo, paciência, dedicação e ajuda em todos os momentos, principalmente para a realização deste trabalho. Obrigado por você existir e ser o alicerce da minha vida. Te amo!

À minha segunda família por todo carinho e incentivo. Em especial a minha sogra Vera, meu amigo Roberto, minha cunhada Carolina, meu cunhado Maurício e meu sobrinho Matias.

Às queridas e eternas amigas Karina e Maressa pela amizade, apoio, carinho e paciência em todos os momentos.

Às amigas Raquel e Emanuela pelo carinho, amizade, paciência, ajuda e valiosos conselhos durante este trabalho.

Aos amigos(as) do laboratório: Bruna Vacondio, Caio, Dani, Denise, Fernanda, Germano, Helena, Henrique, Laira, Lidiane, Luciana, Maíra, Marcos, Mariana, Matheus, Mayara, Natália, Neto, Pedro, Raquel, Renata e Zaryf pela amizade, incentivo e momentos de descontração.

Aos amigos(as) do laboratório LAQUAAE: Asma, Carol Derisso, Lia, Maressa, Thiessa e Tiago.

Aos professores(as) Ana Lombardi, Hugo Sarmento e Emanuela Freitas por participarem do meu exame de qualificação e pelas importantes contribuições para a publicação do artigo da qualificação e finalização deste trabalho.

Às professoras Ana Lombardi, Andréa Novelli, Cláudia Fileto e Eny Vieira por aceitarem fazer parte da banca de defesa e pelas valiosas contribuições para a conclusão desta tese.

A Deus pelos pequenos detalhes, pelas pessoas que colocou em minha vida e por tornar tudo possível.

Por fim, a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Viver é acalentar sonhos e esperanças,
fazendo da fé a nossa inspiração maior. É
buscar nas pequenas coisas, um grande motivo
para ser feliz!”*

Mário Quintana

Resumo

O objetivo desta pesquisa foi avaliar os efeitos do diuron e do carbofuran, isolados e em mistura, sobre as espécies *Raphidocelis subcapitata*, *Paramecium caudatum* e *Ceriodaphnia silvestrii* e realizar uma avaliação de risco preliminar destes agrotóxicos para os corpos d'água brasileiros. Para isso, testes de toxicidade aguda e crônica foram realizados com os compostos isolados e em mistura, nas suas formas padrão e comercial. Os resultados mostraram que, em ação individual, estes agrotóxicos inibiram significativamente o crescimento populacional de *R. subcapitata* e causaram alterações fisiológicas (conteúdo de clorofila *a*) e morfológicas (complexidade e tamanho celular) nas células. Para esta espécie de alga, a toxicidade dos ingredientes ativos nas formas padrão e comercial não apresentaram diferenças significativas. Para o protozoário *P. caudatum*, os testes de toxicidade aguda evidenciaram um aumento da mortalidade com o aumento do tempo de exposição aos compostos selecionados. Além disso, estes agrotóxicos causaram uma diminuição significativa no crescimento populacional, no número de gerações e na biomassa de *P. caudatum*. A toxicidade do diuron padrão e de sua formulação comercial foi similar para este protozoário, enquanto que o carbofuran comercial foi mais tóxico do que a sua forma padrão, sugerindo a ocorrência de interações sinérgicas com os ingredientes "inertes". Diferentemente, para o cladóceros *C. silvestrii*, os testes de toxicidade aguda mostraram que o produto comercial de diuron foi 7,2 vezes mais tóxico do que o seu ingrediente ativo padrão, enquanto que para o carbofuran, o produto comercial foi 1,5 vezes menos tóxico do que o seu ingrediente ativo padrão. Em relação à toxicidade crônica, o herbicida diuron, tanto na forma padrão como comercial, causou efeitos horméticos sobre a fertilidade das fêmeas de *C. silvestrii*. Já o carbofuran reduziu significativamente a reprodução de *C. silvestrii* em concentrações a partir de $0,38 \mu\text{g L}^{-1}$. A espécie tropical *C. silvestrii* foi mais sensível a estes agrotóxicos do que cladóceros comumente utilizados em regiões temperadas, e além disso, para o carbofuran, esta espécie foi o organismo-teste mais sensível já registrado na literatura ($\text{CE}_{50-48\text{h}} = 0,86 \mu\text{g L}^{-1}$). De acordo com os resultados dos testes de toxicidade das misturas de diuron e carbofuran, exposições agudas e crônicas sobre todos os organismos-teste selecionados causaram desvios significativos da toxicidade prevista pelos modelos de referência de Adição de Concentração e Ação Independente. Para a alga *R. subcapitata*, os dados evidenciaram a ocorrência do sinergismo na mistura destes compostos, principalmente quando o diuron é o produto químico dominante na mistura. Para o *P. caudatum*, o desvio dependente da proporção da dose (sinergismo causado pelo carbofuran e antagonismo causado pelo diuron) foi observado em exposições agudas e desvio para o antagonismo foi verificado para o crescimento populacional em concentrações subletais das misturas dos compostos padrões. Para a *C. silvestrii*, observou-se o antagonismo em baixas doses e o sinergismo em altas doses, prevalecendo o sinergismo nas exposições agudas das misturas dos agrotóxicos padrões, enquanto que para a reprodução foi encontrado o desvio para o antagonismo. As misturas dos produtos comerciais de diuron e carbofuran apresentaram efeitos significativamente diferentes e mais graves do que as misturas dos compostos padrões para o *P. caudatum* e a *C. silvestrii*. Portanto, diuron e carbofuran em mistura podem interagir e causar respostas tóxicas diferentes das previstas para os compostos individuais. De acordo com as concentrações encontradas nos corpos d'água brasileiros, estes compostos podem causar efeitos tóxicos diretos e indiretos sobre as comunidades de algas, protozoários e cladóceros, podendo alterar a estrutura e o funcionamento dos

ecossistemas aquáticos. Na avaliação de risco preliminar destes agrotóxicos, os quocientes de risco foram maiores do que 1, indicando que o diuron e o carbofuran representam riscos ecológicos potenciais para os corpos d'água brasileiros. Diante do exposto, conclui-se que os agrotóxicos estudados, isolados e em mistura, causaram toxicidade aos organismos avaliados e representam riscos ecológicos potenciais para os ambientes aquáticos, o que sugere a implantação pelas agências reguladoras de medidas mais restritivas para o uso destes agrotóxicos, visando uma melhor proteção da biota aquática.

Palavras-chave: Ecotoxicologia; *Raphidocelis subcapitata*; *Paramecium caudatum*; *Ceriodaphnia silvestrii*; Diuron Nortox[®] 500 SC; Furadan[®] 350 SC

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of diuron and carbofuran, isolated and mixed, on *Raphidocelis subcapitata*, *Paramecium caudatum* and *Ceriodaphnia silvestrii* and carry out a preliminary risk assessment of these pesticides for Brazilian water bodies. For this, acute and chronic toxicity tests were performed with individual compounds and in combination, in its standard form and commercial formulations. The results showed that in individual action, these pesticides significantly inhibited the *R. subcapitata* population growth and caused physiological (chlorophyll *a* content) and morphological (complexity and cell size) changes in the cells. For this alga, the toxicity of standard active ingredients and their commercial formulations showed no significant differences. For the protozoan *P. caudatum*, acute toxicity tests evidenced an increase of mortality with increasing exposure time for the selected compounds. Moreover, these pesticides caused a significant decrease in population growth, number of generations and biomass of *P. caudatum*. The toxicity of standard diuron and its commercial formulation was similar for this protozoan, while commercial carbofuran was more toxic than its standard form, suggesting a synergistic interaction with “inert” ingredients. In contrast, for the cladoceran *C. silvestrii*, acute toxicity tests showed that diuron commercial product was 7.2 times more toxic than its standard active ingredient, whereas for carbofuran, commercial product was 1.5 times less toxic than its standard active ingredient. Regarding chronic toxicity of diuron herbicide, both standard and commercial form caused hormetic effects on fertility of *C. silvestrii* female. Carbofuran significantly reduced the reproduction of *C. silvestrii* at concentrations from 0.38 $\mu\text{g L}^{-1}$ onwards. The tropical species *C. silvestrii* was more sensitive to these pesticides than cladocerans commonly used in temperate regions, and in addition, for carbofuran, this species was the most sensitive organism already tested ($\text{EC}_{50-48\text{h}} = 0,86 \mu\text{g L}^{-1}$). According to the toxicity tests results of diuron and carbofuran mixtures, acute and chronic exposures on all selected test organisms caused significant deviations from the toxicity predicted by Concentration Addition and Independent Action reference models. For *P. subcapitata*, data indicated the occurrence of synergism in the mixture of these compounds, especially when diuron is the dominant chemical in combination. For *P. caudatum*, dose ratio dependent deviation (synergism caused by carbofuran and antagonism caused by diuron) was observed in acute exposure and deviation for antagonism was verified for population growth at sublethal concentrations of the standard compounds mixtures. For *C. silvestrii*, antagonism was observed in low doses and synergism at high doses, predominating synergism in acute exposures of standard pesticides mixtures, while for reproduction the deviation for antagonism was found. The commercial product mixtures of diuron and carbofuran showed significantly different effects and more severe than the standard compounds mixtures for *P. caudatum* and *C. silvestrii*. Therefore, diuron and carbofuran mixture can interact and cause toxic responses different from those predicted for individual compounds. According to the concentrations found in water bodies in Brazil, these compounds can cause direct and indirect toxic effects on communities of algae, protozoa and cladocerans and may change the structure and functioning of aquatic ecosystems. In a preliminary risk assessment of these pesticides, risk quotients were larger than 1, indicating that diuron and carbofuran represent potential ecological risks to Brazilian water bodies. Given the above, it is concluded that the pesticides studied alone and in combination, caused toxicity to test organisms and represent potential ecological risk for aquatic environments, which suggests the implementation by

the regulatory agencies of more stringent measures for the use of pesticides to improve the protection of aquatic biota.

Keywords: Ecotoxicology; *Raphidocelis subcapitata*; *Paramecium caudatum*; *Ceriodaphnia silvestrii*; Diuron Nortox[®] 500 SC; Furadan[®] 350 SC

Lista de Figuras

Contextualização e justificativa da pesquisa

- Figura 1.** Transporte de agrotóxicos no ambiente. Fonte: Adaptado de Gavrilesco (2005). 7
- Figura 2.** Isobograma mostrando interações entre os compostos A e B. A curva 1 indica aditividade (sem interação), a curva 2 sinergismo e a curva 3 antagonismo. A linha pontilhada apresenta um exemplo de uma isobole enviesada. Fonte: Modificado de Bell (2005). 11
- Figura 3:** Estrutura química de diuron. Fonte: Araujo et al. (2012)..... 15
- Figura 4:** Estrutura química do carbofuran. Fonte: Valencia et al. (2008)..... 17

Capítulo 1 - Efeitos dos agrotóxicos diuron e carbofuran em ação individual e em mistura sobre a microalga *Raphidocelis subcapitata*

- Figura 1.** Design experimental esquemático das combinações estabelecidas para os testes de toxicidade das misturas dos agrotóxicos diuron e carbofuran. 43
- Figura 2.** Curvas de crescimento populacional de *Raphidocelis subcapitata* (número de células x10⁴ mL⁻¹) após 96 horas de exposição a diferentes concentrações de diuron padrão (A), diuron administrado como Diuron Nortox[®] 500 SC (B), carbofuran padrão (C) e carbofuran administrado como Furadan[®] 350 SC (D). 47
- Figura 3.** Inibição da taxa de crescimento (%) de *Raphidocelis subcapitata* exposta a diferentes concentrações de diuron padrão (A), diuron administrado como Diuron Nortox[®] 500 SC (B), carbofuran padrão (C) e carbofuran administrado como Furadan[®] 350 SC (D). A linha representa a curva de ajuste logístico. O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle ($p \leq 0,05$). 49
- Figura 4.** Concentração de clorofila a (pg célula⁻¹) em *Raphidocelis subcapitata* exposta a diferentes concentrações de diuron padrão (A), diuron administrado como Diuron Nortox[®] 500 SC (B), carbofuran padrão (C) e carbofuran administrado como Furadan[®] 350 SC (D). O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle ($p \leq 0,05$). 50

Figura 5. Valores médios de fluorescência da clorofila a (FL3-H), complexidade (SSC-H) e tamanho celular (FSC-H) da população de <i>Raphidocelis subcapitata</i> exposta a diferentes concentrações de diuron padrão (A), diuron administrado como Diuron Nortox [®] 500 SC (B), carbofuran padrão (C) e carbofuran administrado como Furadan [®] 350 SC (D). O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle ($p \leq 0,05$). Os valores são expressos em unidades arbitrárias (u.a.)..	51
Figura 6. Isobolograma do efeito da mistura de diuron e carbofuran sobre a taxa de crescimento de <i>Raphidocelis subcapitata</i> a partir do desvio dependente da proporção da dose (DR) do modelo de Adição de Concentração (CA).....	53
Figura 7. Isobolograma do efeito da mistura de diuron e carbofuran sobre a taxa de crescimento de <i>Raphidocelis subcapitata</i> a partir do desvio sinergismo/antagonismo (S/A) do modelo de Ação Independente (IA).....	54

Capítulo 2 - Efeitos dos agrotóxicos diuron e carbofuran em suas formas padrão e comercial sobre *Paramecium caudatum*: o uso de protozoários em Ecotoxicologia

Figura 1. Faixa de sensibilidade de <i>Paramecium caudatum</i> (CL ₅₀ -6h) a substância de referência cloreto de sódio com base nos resultados de 20 testes de toxicidade aguda. Os limites superior e inferior correspondendo a intervalos de confiança de 95% foram 3,31 e 4,44 g L ⁻¹ , respectivamente.....	82
Figura 2. Mortalidade (%) de <i>Paramecium caudatum</i> em diferentes períodos de exposição (2, 3, 4 e 6 horas) nas diferentes concentrações de diuron padrão (A), diuron administrado como Diuron Nortox [®] 500 SC (B), carbofuran padrão (C) e carbofuran administrado como Furadan [®] 350 SC (D).....	84
Figura 3. Inibição de crescimento populacional (%) de <i>Paramecium caudatum</i> exposto a diferentes concentrações de diuron padrão (A), diuron administrado como Diuron Nortox [®] 500 SC (B), carbofuran padrão (C) e carbofuran administrado como Furadan [®] 350 SC (D). A linha representa a curva de ajuste logístico. O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle ($p \leq 0,05$).	86
Figura 4. Efeitos sobre o número de gerações de <i>Paramecium caudatum</i> exposto a diferentes concentrações de diuron padrão (A), diuron administrado como Diuron Nortox [®] 500 SC (B),	

carbofuran padrão (C) e carbofuran administrado como Furadan[®] 350 SC (D). O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle ($p \leq 0,05$)..... 87

Figura 5. Efeitos sobre a biomassa ($\mu\text{g C mL}^{-1}$) de *Paramecium caudatum* exposto a diferentes concentrações de diuron padrão (A), diuron administrado como Diuron Nortox[®] 500 SC (B), carbofuran padrão (C) e carbofuran administrado como Furadan[®] 350 SC (D). O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle ($p \leq 0,05$)..... 88

Figura 6. *Paramecium caudatum* no controle (A1 e A2) e exposto a 150 mg L^{-1} de carbofuran administrado como Furadan[®] 350 SC (B1 e B2) e a 112 mg L^{-1} de diuron administrado como Diuron Nortox[®] 500 SC (C1 e C2) após 4h de exposição. As setas indicam os agrotóxicos no interior dos vacúolos alimentares do protozoário..... 95

Capítulo 3 - Toxicidade dos agrotóxicos diuron e carbofuran ao cladócero neotropical *Ceriodaphnia silvestrii*

Figura 1. Box-plots representando os valores de $\text{CE}_{50-48\text{h}}$ para os ingredientes ativos nas formas padrão e comercial de diuron (A) e carbofuran (B) para o cladócero *Ceriodaphnia silvestrii*. 117

Figura 2. Porcentagem de sobrevivência das fêmeas de *Ceriodaphnia silvestrii* após 8 dias de exposição a diferentes concentrações de diuron padrão (A), diuron administrado como Diuron Nortox[®] 500 SC (B), carbofuran padrão (C) e carbofuran administrado como Furadan[®] 350 SC (D) nos testes de toxicidade crônica. O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle ($p \leq 0,05$, Teste de Dunnett). 118

Figura 3. Fertilidade de *Ceriodaphnia silvestrii* (média \pm DP do número de neonatos por fêmea) após 8 dias de exposição a diferentes concentrações de diuron padrão (A), diuron administrado como Diuron Nortox[®] 500 SC (B), carbofuran padrão (C) e carbofuran administrado como Furadan[®] 350 SC (D) nos testes de toxicidade crônica. O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle ($p \leq 0,05$, Teste de Dunnett). 119

Figura 4. Curva de distribuição da sensibilidade das espécies (SSD) construída com base nos valores de CE_{50} (círculos abertos) e de $\text{NOEC}/\text{CE}_{10}$ (círculos fechados) para diuron obtidos no presente estudo para *Ceriodaphnia silvestrii* (em negrito) e para outros invertebrados da literatura. 121

Figura 5. Curva de distribuição da sensibilidade das espécies (SSD) construída com base nos valores de CE₅₀ (círculos abertos) e de NOEC/ CE₁₀ (círculos fechados) para carbofuran obtidos no presente estudo para *Ceriodaphnia silvestrii* (em negrito) e para outros invertebrados da literatura. 122

Capítulo 4 - Efeitos da mistura dos agrotóxicos diuron e carbofuran em suas formas padrão e comercial aos invertebrados *Paramecium caudatum* e *Ceriodaphnia silvestrii*

Figura 1. *Design* experimental esquemático para as misturas dos agrotóxicos diuron e carbofuran utilizados nos testes de toxicidade aguda - *design* fatorial completo (A) e nos testes de toxicidade crônica - *design* de razão fixa parcial (B) 144

Figura 2. Isobogramas dos efeitos das misturas de diuron e carbofuran nas formas padrão e comercial sobre a sobrevivência de *Paramecium caudatum*. (A) Desvio dependente da proporção da dose (DR) a partir do modelo de CA para a mistura dos agrotóxicos padrões; (B) Ajuste ao modelo de IA sem desvio significativo para a mistura dos agrotóxicos padrões; (C) Desvio S/A mostrando antagonismo a partir do modelo CA para a mistura dos agrotóxicos comerciais; (D) Desvio S/A mostrando sinergismo a partir do modelo IA para a mistura dos agrotóxicos comerciais..... 151

Figura 3. Isobogramas dos efeitos das misturas de diuron e carbofuran nas formas padrão e comercial sobre o crescimento populacional de *Paramecium caudatum*. (A) Desvio S/A mostrando antagonismo a partir do modelo de CA para a mistura dos agrotóxicos padrões; (B) Desvio S/A mostrando antagonismo a partir do modelo de IA para a mistura dos agrotóxicos padrões; (C) Desvio dependente da proporção da dose (DR) a partir do modelo de CA para a mistura dos agrotóxicos comerciais; (D) Desvio DR a partir do modelo de IA para a mistura dos agrotóxicos comerciais..... 153

Figura 4. Isobogramas dos efeitos das misturas de diuron e carbofuran nas formas padrão e comercial sobre a mobilidade de *Ceriodaphnia silvestrii*. (A) Desvio dependente do nível da dose (DL) a partir do modelo de CA para a mistura dos agrotóxicos padrões; (B) Desvio dependente da proporção da dose (DR) a partir do modelo de IA para a mistura dos agrotóxicos padrões; (C) Desvio S/A mostrando antagonismo a partir do modelo CA para a mistura dos agrotóxicos comerciais; (D) Desvio S/A mostrando antagonismo a partir do modelo IA para a mistura dos agrotóxicos comerciais..... 156

Figura 5. Isobogramas dos efeitos das misturas de diuron e carbofuran nas formas padrão e comercial sobre a reprodução de *Ceriodaphnia silvestrii*. (A) Desvio S/A mostrando antagonismo a partir do modelo de CA para a mistura dos agrotóxicos padrões; (B) Ajuste ao modelo de IA sem desvio significativo para a mistura dos agrotóxicos padrões; (C) Desvio dependente do nível da dose (DL) a partir do modelo de CA para a mistura dos agrotóxicos comerciais; (D) Desvio DL a partir do modelo de IA para a mistura dos agrotóxicos comerciais..... 158

Capítulo 5 - Avaliação de risco preliminar dos agrotóxicos diuron e carbofuran para os corpos d'água brasileiros e distribuição da sensibilidade das espécies

Figura 1. Distribuição ambiental prevista (PED) do agrotóxico diuron com base no modelo de fugacidade MacKay Nível I..... 181

Figura 2. Distribuição ambiental prevista (PED) do agrotóxico carbofuran com base no modelo de fugacidade MacKay Nível I..... 182

Figura 3. Curva de distribuição da sensibilidade das espécies (SSD) para o agrotóxico diuron a partir de dados das espécies utilizadas no presente estudo (em negrito) e para outros organismos aquáticos publicados na literatura. (1) Ma et al. (2003); (2) Ma et al. (2002); (3) DeLorenzo et al. (2013); (4) Presente estudo; (5) Gatidou et al. (2015); (6) Masojidek et al. (2011); (7) Burns et al. (2015); (8) Bao et al. (2011); (9) Larras et al. (2012); (10) Karlsson et al. (2006); (11) Hernando et al. (2005); (12) Lazhar et al. (2012); (13) Bricheux et al. (2013); (14) Nebeker e Schuyttema (1998); (15) Bonnet et al. (2007). 183

Figura 4. Curva de distribuição da sensibilidade das espécies (SSD) para o agrotóxico carbofuran a partir de dados das espécies utilizadas no presente estudo (em negrito) e para outros organismos aquáticos publicados na literatura. (1) Presente estudo; (2) Bailey et al. (1996); (3) Pantani et al. (1997); (4) Ashauer et al. (2010); (5) Iwai et al. (2011); (6) Hernando et al. (2005); (7) Ibrahim et al. (1998); (8) Pessoa et al. (2011); (9) Kumar et al. (2004); (10) Grant et al. (1983); (11) Sucahyo et al. (2008); (12) Lee et al. (2014); (13) Tarkowski (2004); (14) Ma et al. (2006); (15) Arzul et al. (2006); (16) Moreira et al. (2015); (17) Iesce et al. (2006); (18) Fernández-Alba et al. (2002). 184

Lista de Tabelas

Contextualização e justificativa da pesquisa

Tabela 1. Concentrações máximas dos agrotóxicos diuron e carbofuran detectadas em ambientes de água doce no Brasil..... 19

Capítulo 1 - Efeitos dos agrotóxicos diuron e carbofuran em ação individual e em mistura sobre a microalga *Raphidocelis subcapitata*

Tabela 1. Parâmetros analíticos utilizados para a validação do método de análise de diuron e carbofuran nas soluções-teste utilizadas nos testes de toxicidade 40

Tabela 2. 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). 45

Tabela 3. Valores médios de CI₅₀-96h e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para cada composto testado para a microalga *Raphidocelis subcapitata*. 48

Tabela 4. Parâmetros e testes de ajuste dos modelos de referência utilizando o MIXTOX aplicado à taxa de crescimento de *Raphidocelis subcapitata* exposta durante 96h à mistura dos agrotóxicos diuron e carbofuran.. 53

Tabela 5. Valores de toxicidade (CI₅₀ ou CE₅₀) obtidos a partir da literatura para diferentes espécies autotróficas expostas aos agrotóxicos diuron e carbofuran..... 57

Capítulo 2 - Efeitos dos agrotóxicos diuron e carbofuran em suas formas padrão e comercial sobre *Paramecium caudatum*: o uso de protozoários em Ecotoxicologia

Tabela 1. Valores de CL₅₀ (2, 3, 4 e 6 horas de tempo de exposição) para a toxicidade aguda e valores de CI₁₀ e CI₅₀ 24h para a toxicidade crônica dos cinco compostos testados e intervalos de confiança de 95% (entre parênteses) obtidos para o protozoário ciliado *Paramecium caudatum*. 83

Tabela 2. Valores de toxicidade (CL₅₀, CI₅₀ ou CE₅₀) obtidos a partir da literatura para diferentes espécies expostas aos agrotóxicos diuron e carbofuran..... 92

Capítulo 3 - Toxicidade dos agrotóxicos diuron e carbofuran ao cladóceros neotropical *Ceriodaphnia silvestrii*

Tabela 1. Parâmetros analíticos utilizados para a validação do método de análise de diuron e carbofuran nas soluções-teste dos testes de toxicidade.	113
Tabela 2. Critérios de seleção para os dados de testes de toxicidade aguda e crônica (adaptado de Van den Brink et al., 2006; Brock e Van Wijngaarden, 2012).	115
Tabela 3. Valor médio da concentração perigosa para 5% (HC ₅) e 50% (HC ₅₀) da comunidade de invertebrados e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para diuron e carbofuran, calculada com base nas curvas de SSD geradas a partir dos dados ecotoxicológicos (CENO e CE ₅₀).	123

Capítulo 4 - Efeitos da mistura dos agrotóxicos diuron e carbofuran em suas formas padrão e comercial aos invertebrados *Paramecium caudatum* e *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).	146
Tabela 2. Valores médios das concentrações que causam toxicidade aguda e crônica para o protozoário <i>P. caudatum</i> e o cladóceros <i>C. silvestrii</i> obtidos para cada composto testado individualmente durante os testes de mistura.	148
Tabela 3. Resumo dos parâmetros e testes de ajuste dos modelos de referência para a toxicidade aguda e crônica das misturas de diuron e carbofuran nas formas padrão e comercial para o protozoário <i>Paramecium caudatum</i>	150
Tabela 4. Resumo dos parâmetros e testes de ajuste dos modelos de referência para a toxicidade aguda e crônica das misturas de diuron e carbofuran nas formas padrão e comercial para o cladóceros <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	155
Tabela 5. Resumo das análises obtidas a partir dos testes de toxicidade aguda e crônica das misturas de diuron e carbofuran (padrão e comercial) para as espécies <i>P. caudatum</i> e <i>C. silvestrii</i>	160

Capítulo 5 - Avaliação de risco preliminar dos agrotóxicos diuron e carbofuran para os corpos d'água brasileiros e distribuição da sensibilidade das espécies

Tabela 1. Dados de entrada utilizados para os cálculos de PED (<i>Predicted Environmental Distribution</i>) e PEC (<i>Predicted Environmental Concentration</i>) nos modelos matemáticos Mackay Nível I e FOCUS Passo 2. Fontes: PPDB – <i>Pesticide Properties DataBase</i> e DAR – <i>Draft Assessment Report</i> (EFSA – <i>Europe Food Safety Authority</i>).....	179
Tabela 2. Valores de PEC máxima (PEC max) e PEC média ponderada pelo tempo (PAC _{twa}) dos agrotóxicos diuron e carbofuran nos corpos d'água.	182
Tabela 3. Valor médio da concentração perigosa para 5% (HC ₅) e 50% (HC ₅₀) dos organismos aquáticos e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para diuron e carbofuran, calculada com base nas curvas de SSD.....	185
Tabela 4. Risco ecológico dos agrotóxicos diuron e carbofuran como quociente de risco (RQ), com base nos dados de toxicidade crônica dos organismos-teste selecionados.....	185
Tabela 5. Concentrações máximas dos agrotóxicos diuron e carbofuran detectadas em ambientes de água doce no Brasil.....	187

Sumário

Estruturação da tese	1
1. Introdução e justificativa	3
1.1. Agrotóxicos.....	3
1.2. Dinâmica dos agrotóxicos no ambiente	5
1.3. Misturas tóxicas	9
1.4. A ecotoxicologia na avaliação ambiental	12
1.5. Substâncias-teste: diuron e carbofuran	14
1.6. Justificativa	18
Referências Bibliográficas.....	21
2. Objetivos e hipóteses	33
2.1. Objetivo geral	33
2.2. Objetivos específicos	33
2.3. Hipóteses.....	34

Capítulo 1 - Efeitos dos agrotóxicos diuron e carbofuran em ação individual e em mistura sobre a microalga *Raphidocelis subcapitata*

Resumo	35
1. Introdução	36
2. Materiais e Métodos	38
2.1. Organismo-teste e condições de cultivo	38
2.2. Substâncias e soluções-teste	39
2.3. Testes de toxicidade com os compostos individuais	40
2.4. Análise por citometria de fluxo	41
2.5. Testes de toxicidade dos compostos em mistura	42
2.6. Análise de Dados	43
3. Resultados.....	46
3.1. Variáveis abióticas dos testes de toxicidade e análises químicas	46
3.2. Testes de toxicidade com os compostos individuais	46
3.3. Testes de toxicidade dos compostos em mistura	52

4. Discussão	55
4.1. Efeitos tóxicos dos compostos em ação individual	55
4.2. Efeitos tóxicos dos compostos em mistura	60
5. Conclusões	63
Referências Bibliográficas	63

Capítulo 2 - Efeitos dos agrotóxicos diuron e carbofuran em suas formas padrão e comercial sobre *Paramecium caudatum*: o uso de protozoários em Ecotoxicologia

Resumo	72
1. Introdução	73
2. Materiais e Métodos	76
2.1. Cultivo e manutenção de protozoários ciliados	76
2.2. Substâncias e soluções-teste	77
2.3. Testes de toxicidade aguda e crônica	78
2.4. Tratamento dos dados e análise estatística	80
3. Resultados	81
3.1. Variáveis abióticas dos testes de toxicidade e análises químicas	81
3.2. Toxicidade aguda	82
3.3. Toxicidade crônica	84
4. Discussão	89
5. Conclusões	97
Referências Bibliográficas	97

Capítulo 3 - Toxicidade dos agrotóxicos diuron e carbofuran ao cladóceros neotropical *Ceriodaphnia silvestrii*

Resumo	108
1. Introdução	109
2. Materiais e Métodos	111
2.1. Organismo-teste e condições de cultivo	111
2.2. Substâncias e soluções-teste	111

2.3. Testes de toxicidade aguda e crônica.....	113
2.4. Análise de Dados	114
3. Resultados.....	116
3.1. Variáveis abióticas dos testes de toxicidade e análises químicas	116
3.2. Toxicidade aguda e crônica	116
3.3. Distribuição da sensibilidade das espécies (SSD)	120
4. Discussão	123
5. Conclusões.....	128
Referências Bibliográficas.....	128

Capítulo 4 - Efeitos da mistura dos agrotóxicos diuron e carbofuran em suas formas padrão e comercial aos invertebrados *Paramecium caudatum* e *Ceriodaphnia silvestrii*

Resumo	138
1. Introdução	139
2. Materiais e Métodos	141
2.1. Organismos-teste e condições de cultivo.....	141
2.2. Substâncias-teste e análises químicas	141
2.3. Testes de toxicidade das misturas.....	142
2.4. Análise de Dados	144
3. Resultados.....	147
3.1. Variáveis abióticas dos testes de toxicidade e análises químicas	147
3.2. Testes de toxicidade das misturas.....	147
4. Discussão	161
5. Conclusões.....	167
Referências Bibliográficas.....	167

Capítulo 5 - Avaliação de risco preliminar dos agrotóxicos diuron e carbofuran para os corpos d'água brasileiros e distribuição da sensibilidade das espécies

Resumo	174
1. Introdução	175

2. Materiais e Métodos	178
2.1. Distribuição e concentração ambiental prevista	178
2.2. Distribuição da sensibilidade das espécies	179
2.3. Avaliação de risco preliminar	180
3. Resultados.....	181
3.1. Distribuição e concentração ambiental prevista	181
3.2. Distribuição da sensibilidade das espécies	183
3.3. Avaliação de risco preliminar	185
4. Discussão	186
5. Conclusões.....	190
Referências Bibliográficas.....	191
Conclusões Finais	199
Considerações Finais	201
APÊNDICE A	204
APÊNDICE B.....	209
APÊNDICE C.....	215
APÊNDICE D	220
APÊNDICE E.....	232

Estruturação da tese

Esta tese foi elaborada de forma a facilitar a publicação dos resultados e foi estruturada na forma de capítulos, os quais foram redigidos contemplando os itens Resumo, Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências Bibliográficas, além da inserção de apêndices, quando necessários para fornecer informações mais detalhadas sobre os resultados dos experimentos, que foram incluídos como elementos pós-textuais ao final da tese. Assim, além de um capítulo inicial no qual se contextualizou a pesquisa, discorrendo de forma ampla sobre os agrotóxicos (definição, processos, interações, efeitos tóxicos), as misturas e a Ecotoxicologia, foram elaborados mais cinco capítulos, os quais estão ordenados em função do período de desenvolvimento das diferentes etapas da pesquisa, conforme descrito abaixo:

Capítulo 1 - Efeitos dos agrotóxicos diuron e carbofuran em ação individual e em mistura sobre a microalga *Raphidocelis subcapitata* – neste capítulo avaliaram-se os efeitos dos agrotóxicos diuron e carbofuran e sua mistura sobre a microalga *Raphidocelis subcapitata*, utilizando-se testes de toxicidade crônica com os compostos individuais e em mistura, analisados por meio da citometria de fluxo. Foram avaliadas a taxa de crescimento, o conteúdo de clorofila *a*, a fluorescência da clorofila *a*, a complexidade e o tamanho celular, e nos testes de toxicidade das misturas a variável analisada foi a taxa de crescimento das algas.

Capítulo 2 – Efeitos dos agrotóxicos diuron e carbofuran em suas formas padrão e comercial sobre *Paramecium caudatum*: o uso de protozoários em Ecotoxicologia - neste estudo foi analisado os efeitos dos agrotóxicos diuron e carbofuran utilizando como organismo teste o protozoário *Paramecium caudatum*. O objetivo foi determinar a faixa de sensibilidade deste protozoário a uma substância de referência, tendo em vista a sua utilização rotineira em testes de laboratório, a determinação da CL₅₀ (2, 3, 4 e 6 horas) e os efeitos crônicos (24 horas) do diuron e do carbofuran (padrão e comercial) sobre as variáveis crescimento populacional, número de gerações e biomassa.

Capítulo 3 - Toxicidade dos agrotóxicos diuron e carbofuran ao cladócero neotropical *Ceriodaphnia silvestrii* - este capítulo teve o propósito de verificar a toxicidade do carbofuran e do diuron (padrão e comercial) ao cladócero *Ceriodaphnia silvestrii*. A sensibilidade de *C. silvestrii* aos agrotóxicos selecionados na pesquisa foi avaliada através de testes de toxicidade aguda e crônica para determinar os valores de CE₅₀-48h e valores de CENO-8d para a reprodução. Os parâmetros avaliados foram: imobilidade, sobrevivência e fertilidade.

Capítulo 4 - Efeitos da mistura dos agrotóxicos diuron e carbofuran em suas formas padrão e comercial aos invertebrados *Paramecium caudatum* e *Ceriodaphnia silvestrii* - considerando-se os estudos dos dois capítulos anteriores, no qual foram realizados testes ecotoxicológicos com os agrotóxicos individualmente, neste capítulo foi feita a avaliação dos efeitos tóxicos letais e subletais da mistura de diuron e carbofuran em suas formas padrão e comercial aos organismos-teste *Paramecium caudatum* e *Ceriodaphnia silvestrii*. Os *endpoints* avaliados para o protozoário foram a mortalidade e o crescimento populacional e para o cladóceros foram a imobilidade e a reprodução (fertilidade).

Capítulo 5 - Avaliação de risco preliminar dos agrotóxicos diuron e carbofuran para os corpos d'água brasileiros e distribuição da sensibilidade das espécies - este capítulo teve como objetivo realizar uma avaliação de risco preliminar dos agrotóxicos diuron e carbofuran para os corpos d' água brasileiros, bem como verificar por meio de modelos matemáticos a distribuição dos compostos selecionados e suas concentrações ambientais previstas e comparar a sensibilidade dos organismos-teste por meio de curvas de distribuição da sensibilidade das espécies (SSDs).

Com base nesses cinco capítulos, as conclusões gerais da tese e as considerações finais foram elaboradas.

Contextualização e justificativa da pesquisa

1. Introdução e justificativa

1.1. Agrotóxicos

Agrotóxicos, defensivos agrícolas, praguicidas, pesticidas e biocidas são denominações dadas as substâncias químicas, naturais ou sintéticas, destinadas a matar, controlar ou combater de algum modo tudo aquilo que ataca, lesa ou transmite enfermidade às plantas, aos animais e ao homem (Zambrone, 1986). De acordo com a Lei Federal 7.802, de 11 de julho de 1989, os agrotóxicos são produtos destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas e de outros ecossistemas, e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de organismos vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (Brasil, 1989).

A história dos agrotóxicos no mundo pode ser dividida em três fases. A primeira fase compreende o período antes de 1870, no qual eram utilizados os produtos naturais, por exemplo o enxofre na Grécia antiga para controlar as pragas. A segunda fase foi a era dos agrotóxicos sintéticos inorgânicos, entre os anos de 1870 a 1945. Os materiais naturais e os compostos inorgânicos foram utilizados principalmente durante este período. Na terceira fase, a partir de 1945, começaram a ser utilizados os agrotóxicos sintéticos orgânicos. A aplicação de agrotóxicos, em particular os sintetizados orgânicos, tem sido uma marca significativa da civilização humana. Mundialmente 4,6 milhões de toneladas de agrotóxicos são aplicados anualmente no meio ambiente (Zhang et al., 2011). O uso de agrotóxicos em todo o mundo indica claramente um aumento de cerca de US\$ 31 bilhões para US\$ 38 bilhões entre 2005 e 2010 (AGRAR, 2011).

No Brasil, as primeiras unidades produtivas de agrotóxicos datam de meados da década de 1940. Entretanto, apenas na segunda metade dos anos de 1970 foi constituído o parque industrial brasileiro de agrotóxicos (Terra e Pelaez, 2009). Uma série de políticas incentivaram a implementação da chamada “modernização da agricultura” no Brasil,

processo que resultou em altos custos sociais, ambientais e de saúde pública. Além da criação do Sistema Nacional de Crédito Rural (SNCR) em 1965 e o Programa Nacional de Defensivos Agrícolas em 1975, que tiveram papel central na expansão do comércio de agrotóxicos, isenções fiscais e tributárias foram concedidas pelo governo para compra destes produtos, como redução de ICMS (Imposto sobre Circulação e Mercadorias e Serviços) em 1997 e isenção de IPI (Impostos sobre Produtos Industrializados) em 2006 (Londres, 2011). Neste contexto, a indústria e a comercialização de agrotóxicos cresceu de forma significativa e desde 2008 o Brasil passou a ser o maior consumidor de agrotóxicos do mundo (Carneiro et al., 2015).

Segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), as vendas de agrotóxicos e afins no Brasil cresceram 194,09% entre os anos de 2000 e 2012 (IBAMA, 2013). Em 2013 (dados ainda não atualizados para os anos de 2014 e 2015), houve um aumento de 3,8% na venda de ingredientes ativos no país em relação a 2012, alcançando o valor de 495.764,55 toneladas vendidas no ano (IBAMA, 2014). De acordo com a classe de uso, os agrotóxicos mais vendidos foram os herbicidas (61,2%), seguido dos inseticidas (11,5%) e os fungicidas (10,9%). Do total de produtos comercializados, a grande maioria é pertencente às classes III (62,0%) e II (31,3%) quanto ao grau de periculosidade, e que correspondem a produtos perigosos ao meio ambiente e produtos muito perigosos ao meio ambiente, respectivamente. Ressalta-se ainda que 1% do total, ou seja, aproximadamente 5 mil toneladas de ingrediente ativos comercializados no Brasil, são altamente perigosos ao meio ambiente (IBAMA, 2014).

Os agrotóxicos podem ser classificados com base em diferentes critérios. Quanto a sua origem, estes produtos podem ser inorgânicos (produzidos a partir de compostos de mercúrio, bário, enxofre e cobre), orgânicos (possuem átomos de carbono em sua estrutura) ou de origem vegetal, bacteriana e fúngica (e.g. antibióticos) (Sanches et al., 2003). De acordo com seu modo de ação, os agrotóxicos podem ser divididos em 21 classes, sendo os maiores grupos formados pelos inseticidas, fungicidas, herbicidas, rodenticidas e fumigantes (Gavrilescu, 2005).

A toxicidade de um agrotóxico é distribuída em quatro classes que devem ser indicadas por cores nas embalagens dos produtos, sendo que no Brasil todos os agrotóxicos devem ser classificados de acordo com seu potencial tóxico (Lei nº 7802/1989, regulamentada pelo Decreto nº 4074/2002). Considerando a toxicidade aguda (expressa em DL_{50}), as cores indicam a seguinte classificação: vermelho para os produtos de Classe I

(extremamente tóxico), amarelo para os de Classe II (muito tóxico), azul para os de Classe III (moderadamente tóxico) e verde para os de Classe IV (pouco tóxico) (EMBRAPA, 2003).

Em relação ao potencial de periculosidade ambiental, os agrotóxicos são classificados em quatro classes: altamente perigoso (classe I); muito perigoso (classe II); perigoso (classe III) e pouco perigoso (classe IV). Esta classificação baseia-se em várias características dos produtos como, por exemplo, persistência no ambiente, características físicas e químicas, bioacumulação nos tecidos vivos, toxicidade a diferentes organismos e a capacidade de deslocamento do mesmo no ambiente (IBAMA, 2009).

Os agrotóxicos também podem ser classificados quanto a sua persistência no ambiente, sendo classificados em: compostos de vida curta (persistência < 5 dias no ambiente), pouco persistentes (de 5 a 15 dias no ambiente), moderadamente persistentes (de 16 a 30 dias) e persistentes (> 30 dias no ambiente) (Hassan, 1997). Esta classificação tem importância por demonstrar o potencial de contaminação do composto, já que determina seu tempo de disponibilidade aos organismos vivos presentes no ambiente.

1.2. Dinâmica dos agrotóxicos no ambiente

O uso contínuo e intensivo dos agrotóxicos durante as últimas décadas tem aumentado a preocupação sobre o comportamento, o destino ambiental e os efeitos adversos potenciais sobre os organismos não-alvo destes compostos (Gerónimo et al., 2014). A mobilidade e a persistência dos agrotóxicos nos diferentes compartimentos ambientais (ar, água, solo, sedimento) depende de uma variedade de complexos processos físicos, químicos e biológicos que ocorrem simultaneamente, incluindo retenção (sorção), transporte e transformação (Gavrilescu, 2005; Spadotto et al., 2010).

Os diferentes compostos utilizados na agricultura podem ser distribuídos no ambiente através de deriva, volatilização, escoamento superficial e lixiviação, sendo encontrados longe do ponto de aplicação (Aparicio et al., 2013; Gavrilescu, 2005; Sasal et al., 2010). Assim, uma quantidade significativa dos produtos aplicados nas culturas é dissipada para o ambiente. Segundo Gavrilescu (2005), 45% da quantidade de produto aplicada se mantém na área-alvo e os demais 55% se dissipam no ambiente.

Além do transporte, os agrotóxicos sofrem uma série de modificações durante sua permanência no ambiente. Transformações como fotólise, hidrólise, oxidação-redução, biodegradação, complexação e adsorção são recorrentes e podem transformar os compostos

químicos em subprodutos com características físico-químicas diferentes das do produto inicial (Costa et al., 2008). Muitas vezes, estes metabólitos são ainda mais tóxicos para certos organismos não-alvo que os compostos originais.

A dinâmica dos agrotóxicos é influenciada também pelas condições ambientais, como o clima (temperatura, pluviosidade, ventos), a topografia do terreno, a atividade microbiológica, as propriedades físicas e químicas do solo (teor de matéria orgânica e argila, pH, umidade) e do meio aquático (pH, potencial de oxiredução, ácidos húmicos dissolvidos e particulados em suspensão) (Brown et al., 2006; Dores e De-Lamonica-Freire, 1999; Gavrilescu, 2005).

Os agrotóxicos podem alcançar os ambientes aquáticos por diversas rotas (Figura 1), como, por exemplo, pela aplicação direta para o controle de macrófitas e insetos; transporte através da deriva, lixiviação e escoamento superficial a partir de áreas agrícolas; lançamento de esgoto municipal e industrial; e pelo descarte inadequado de embalagens de produtos usados (Brock et al., 2006; Silva e Santos, 2007). De acordo Schulz (2004), o escoamento superficial é a maior fonte de poluição difusa de agrotóxicos nas águas superficiais.

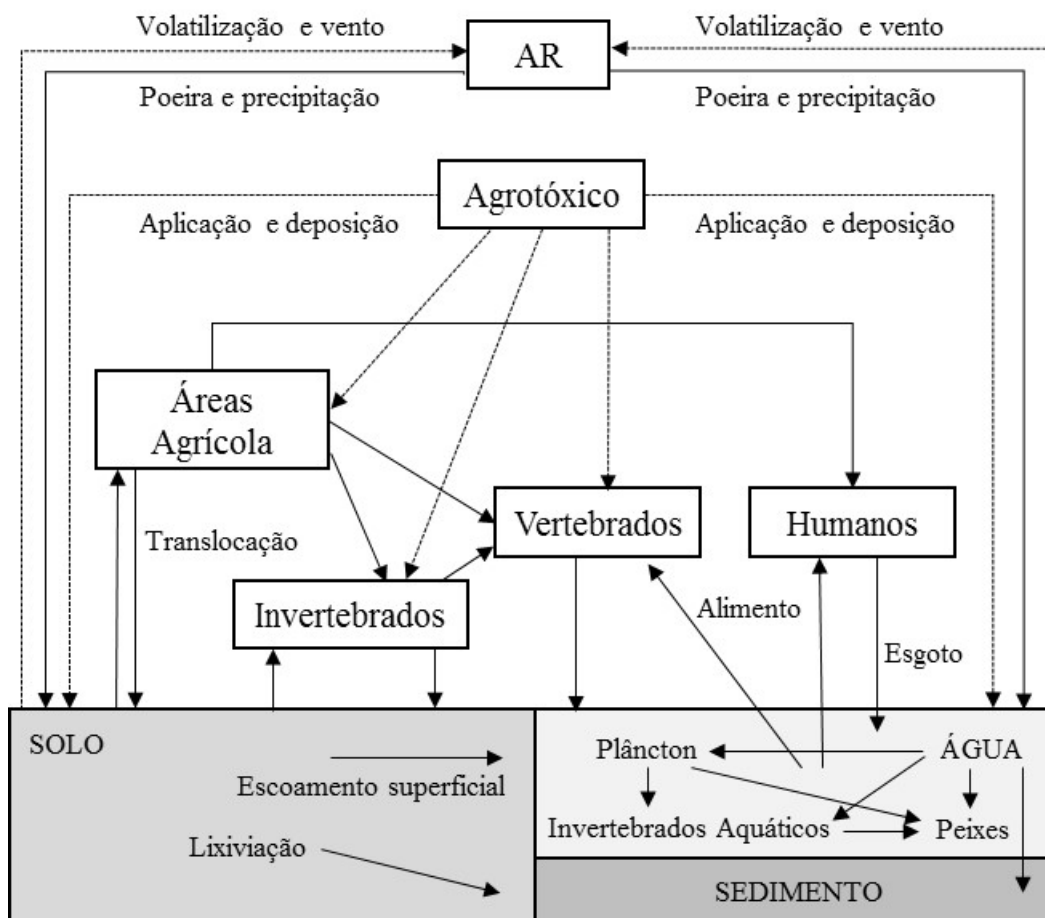


Figura 1. Transporte de agrotóxicos no ambiente. Fonte: Adaptado de Gavrilescu (2005).

A entrada dos agrotóxicos no ecossistema aquático a partir do uso na agricultura depende, em grande parte, da dinâmica destes compostos no solo. Se o agrotóxico apresenta alta solubilidade em água, o mesmo é facilmente carregado pela água da chuva, através do escoamento superficial ou infiltra no perfil do solo, vindo a contaminar águas subterrâneas por lixiviação. Se for insolúvel em água, o mesmo tende a ficar aderido ao solo e também aderido aos materiais orgânicos e inorgânicos que são arrastados pelo *runoff* (Rieder, 2005). Assim, as características físico-químicas destes produtos, como solubilidade em água, pressão de vapor, coeficiente de partição n-octanol-água (K_{ow}), constante de ionização ácido (pK_a), coeficiente de adsorção (K_{oc}), constante da lei de Henry e meia vida, são fatores importantes que determinam o transporte e definem o grau de lixiviação, fugacidade, capacidade de retenção a até o potencial de acumulação do composto em determinado compartimento ambiental ou no organismo de seres vivos (Deuber, 1992).

Diferenças na distribuição dos agrotóxicos podem ser observadas entre as regiões tropical e temperada. De acordo com Sanchez-Bayo e Hyne (2011), a elevada precipitação

pluviométrica nos trópicos aumenta a importância relativa dos processos de escoamento superficial e lixiviação do solo nessas regiões, o que potencializa o fluxo de partículas e compostos adsorvidos ou dissolvidos para os corpos d'água. Além disso, fatores como a qualidade do solo, que afeta a mobilidade dos compostos, e temperaturas mais elevadas, que aumentam a solubilidade dos produtos em água e a absorção por organismos não-alvo, aumentam os riscos ambientais nas regiões tropicais (Sanchez-Bayo e Hyne, 2011).

Após alcançarem os ecossistemas aquáticos, os agrotóxicos interagem continuamente com os sedimentos e a coluna de água, o que possibilita que os organismos sejam expostos aos compostos tóxicos por mais tempo. Nos ambientes aquáticos, estes compostos podem promover a eliminação de organismos benéficos, a redução da biodiversidade, a seleção biológica de organismos indesejáveis, e alterações na dinâmica bioquímica, induzindo a um desequilíbrio biológico (Chagnon et al., 2015; Hua e Relyea, 2014; Köhler e Triebkorn, 2013). Adicionam-se, ainda, os efeitos ocasionados à saúde humana como, por exemplo, os neurológicos (Meyer-Baron et al., 2015; Wesseling et al., 2002) e mutagênicos (Miligi et al., 2006; Saleem et al., 2014) e perda de qualidade da água como um recurso para o ser humano (Silva e Santos, 2007).

Os efeitos adversos ocasionados pela ação destes contaminantes nos organismos aquáticos se propagam pelos demais componentes dos ecossistemas. Esses efeitos podem provocar modificações nas características e dinâmica das populações (reprodução, migração, restabelecimento e mortalidade), na estrutura e função das comunidades (alteração na diversidade de espécies, modificações na relação predador-presa) e na função do ecossistema (alterações nos processos de respiração e fotossíntese e no fluxo de nutrientes) (Costa et al., 2008; Silva et al., 2013).

Portanto, os agrotóxicos podem causar efeitos nocivos a diferentes níveis de organização biológica. Em níveis de organização mais baixos (e.g. respostas moleculares e celulares, e alterações bioquímicas e fisiológicas), os efeitos acontecem de maneira mais rápida e, por isso, esse tipo de bioindicador é um importante sinalizador de exposição a contaminantes. Em níveis superiores de organização (indivíduo, população e comunidade), diversos estudos constataram impactos significativos dos agrotóxicos (e.g. Choung et al., 2013; Mansano et al., 2016; Novelli et al., 2012; Nunes e Espíndola, 2012).

1.3. Misturas tóxicas

A maior parte do conhecimento e compreensão dos efeitos dos agrotóxicos em organismos aquáticos baseia-se nos efeitos dos compostos individuais. No entanto, os organismos aquáticos raramente são expostos apenas a um único contaminante, mas frequentemente a misturas de vários agrotóxicos com diferentes concentrações e proporções (Faust et al., 2003; Liu et al., 2013). Apesar de alguns compostos individuais estarem presentes no ambiente em concentrações abaixo daquelas que causam um efeito visível nos organismos, eles podem, no entanto, contribuir para o efeito da mistura, provocando danos mais graves (Kortenkamp et al., 2009; Tang et al., 2013). Portanto, estudos ecotoxicológicos realizados somente com compostos isolados podem subestimar o risco dos agrotóxicos para o ambiente e para a saúde humana.

Alguns modelos teóricos têm sido desenvolvidos e utilizados para explicar o comportamento das misturas químicas (e.g. Barata et al., 2006; Cassee et al., 1998; Jonker et al., 2005). Estes modelos são baseados em dois conceitos de referência, sendo utilizados para prever a toxicidade da mistura esperada com base nas toxicidades individuais dos componentes da mistura. Tais conceitos de referência assumem que não há nenhuma interação entre os compostos. O modelo da Adição de Concentração (*Concentration Addition* - CA) (Loewe e Muischnek, 1926) assume que os compostos individuais com o mesmo modo de ação agem sobre o mesmo sistema biológico (i.e., sobre o mesmo alvo molecular) e contribuem para uma resposta comum em proporção a suas toxicidades relativas. Este modelo conceitual é definido como a soma das toxicidades relativas dos componentes individuais em uma mistura (Ferreira et al., 2008; Groten, 2000; Loureiro et al., 2010). O conceito de Adição de Concentração pode ser descrito matematicamente por (Berenbaum, 1985):

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

onde C_i é a concentração do químico i na mistura e ECx_i é a concentração de efeito do químico i que produz o mesmo efeito (x%) como a mistura toda.

Alternativamente, o modelo da Ação Independente (*Independent Action* - IA) (Bliss, 1939) assume que os compostos individuais afetam os organismos por meio de diferentes

modos de ação e seus efeitos são, portanto, independentes um do outro durante a exposição, a absorção e a ação tóxica (Ferreira et al., 2008; Loureiro et al., 2010; Olmstead e LeBlanc, 2005). A fórmula matemática é baseada na probabilidade das respostas e é expressa como:

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

onde Y é a resposta biológica, C_i é a concentração dos químicos na mistura, $q_i(C_i)$ é a probabilidade de não-resposta, u_{\max} é a resposta do controle para *endpoints* e Π é a função de multiplicação.

As misturas químicas podem ser também compostas por substâncias cujos modos de ação são desconhecidos ou ambíguos e, em tais casos, os modelos de CA e IA são aplicados para a predição do efeito da mistura (Loureiro et al., 2010). O modelo de CA é frequentemente preferido para o propósito de avaliação de risco (Cedergreen et al., 2007), por ser, em geral, mais conservativo. No entanto, são relatados na literatura exemplos de casos em que os modelos de Adição de Concentração e/ou de Ação Independente foram capazes de prever satisfatoriamente a toxicidade da mistura de determinados compostos químicos (e.g. Backhaus et al., 2004; Cleuvers, 2005; Faust et al., 2003; Loureiro et al., 2010).

Em condições naturais reais, os compostos podem interagir uns com os outros, modificando a amplitude e, por vezes, a natureza do efeito tóxico. Assim, as diferentes combinações de uma mistura podem causar um efeito tóxico mais severo (sinergismo) ou menos severo (antagonismo) do que aquele calculado pelos modelos de CA e IA. Ainda, os desvios podem ser dependentes do nível da dose (*Dose Level* - DL) ou da proporção da dose (*Dose Ratio* - DR). Em DL pode ser verificado diferentes desvios para altas ou baixas concentrações, e em DR pode ser observado desvios diferentes a partir da composição da mistura (Ferreira et al., 2008; Loureiro et al., 2010; Ferreira et al., 2010; Freitas et al., 2014). Tais desvios em relação aos modelos de referência podem ser de natureza física, química e/ou biológica e as interações podem ocorrer na fase de toxicocinética (processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção) ou na fase de toxicodinâmica (efeitos dos químicos nos receptores, sítios celulares ou órgãos) (Cassee et al., 1998; Ferreira et al., 2008). Entretanto, os desvios a partir dos modelos de referência das misturas podem ser caracterizados utilizando o modelo do MIXTOX (Jonker et al., 2005). O modelo MIXTOX

avalia se e como os dados observados desviam a partir dos modelos de CA e IA e testa se descrições significativamente melhores dos dados observados podem ser alcançadas utilizando um conjunto de funções de desvio por meio de uma avaliação passo a passo. Estas funções permitem uma diferenciação entre o sinergismo e o antagonismo, juntamente com os desvios baseados na dependência do nível da dose e da proporção do tóxico (Loureiro et al., 2010; Freitas et al., 2014).

A representação gráfica de doses isoladas, e em combinação, que causam X% de efeito (e.g. X = 50%, CE₅₀) de dois compostos é chamada de isoblograma, a qual é representada por isoboles de aditividade, sinergismo e antagonismo (Figura 2). No isoblograma, as doses do composto A são representadas nas abcissas e as doses do composto B nas ordenadas, sendo que cada ponto representa um par de doses que atingem o CE₅₀ quando estão associados. No isoblograma, os CE₅₀ provenientes da aplicação isolada de cada produto são unidos, gerando a isobole de aditividade ou linha teórica de aditividade. Os demais valores de CE₅₀ obtidos da associação em diferentes proporções dos produtos podem então ser analisados em relação à sua posição diante da isobole de aditividade. Se esses pontos se posicionarem em torno da isobole de aditividade, a ação é de aditividade; se estiverem localizados abaixo, a ação é de sinergismo e se estiverem localizados acima, a ação é de antagonismo. De modo geral, isoboles linear, côncava e convexa representam não-interação, sinergismo e antagonismo, respectivamente (Kruse et al., 2006; Ryall e Tan, 2015).

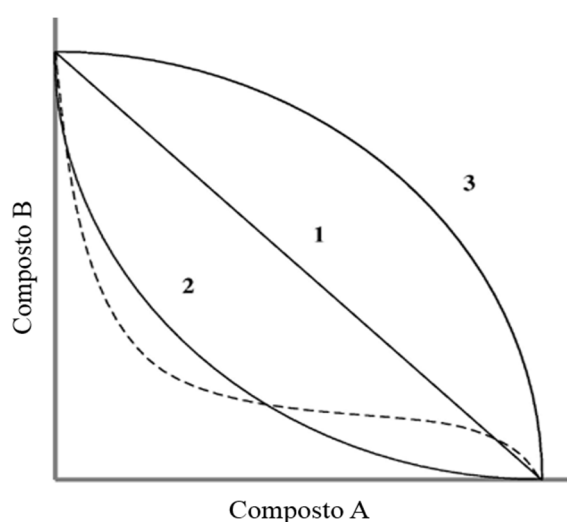


Figura 2. Isoblograma mostrando interações entre os compostos A e B. A curva 1 indica aditividade (sem interação), a curva 2 sinergismo e a curva 3 antagonismo. A linha

pontilhada apresenta um exemplo de uma isobole enviesada. Fonte: Modificado de Bell (2005).

1.4. A ecotoxicologia na avaliação ambiental

Diante da contaminação dos recursos hídricos por agrotóxicos e suas misturas, a ecotoxicologia surge como uma ferramenta necessária para avaliar a toxicidade destes aos organismos aquáticos. Por meio da utilização de organismos-teste é possível a identificação de compostos que afetam os sistemas biológicos, permitindo a avaliação do potencial de risco ambiental de determinados contaminantes (Costa et al., 2008; Zagatto e Bertoletti, 2006). Os ensaios de toxicologia aquática são realizados com a finalidade de regulamentação dos limites aceitáveis de contaminação ambiental, homologação e registro de produtos químicos comerciais usados no meio ambiente e testes com fármacos, que permitem avaliar a eficácia e também os efeitos deletérios de tais compostos químicos (Lombardi, 2004).

Diferentes organismos podem ser utilizados em estudos ecotoxicológicos, tais como bactérias, algas, protozoários, microcrustáceos, insetos, plantas e peixes. Para escolher quais desses organismos serão utilizados, devem ser considerados diversos fatores como seu valor ecológico e econômico, sensibilidade frente aos fatores envolvidos no estudo, abundância, distribuição geográfica e ciclo de vida (APHA, 2005). De acordo com Van den Brink et al. (2000), diferentes organismos-teste podem responder de maneiras distintas a um determinado fator de estresse devido à diferença na sensibilidade. Portanto, não é possível extrapolar o efeito tóxico de uma substância sobre organismos de determinada espécie para organismos de outras espécies (Castillo et al., 2000). Assim, é recomendável avaliar o efeito de um composto tóxico para espécies de diferentes grupos taxonômicos para que, por meio do resultado obtido com o organismo mais sensível, seja possível estimar com mais segurança o impacto do contaminante no ambiente aquático afetado (Gherardi-Goldstein et al., 1990).

As algas são amplamente recomendadas para serem usadas como organismos-teste, pois, como produtores primários, são a base da cadeia alimentar e qualquer alteração na dinâmica de suas populações pode afetar os níveis tróficos superiores do ecossistema (Rioboo et al., 2007). As vantagens na utilização das algas são o rápido ciclo de vida, a alta taxa de crescimento e a facilidade de cultivo e manutenção em laboratório. As algas podem ser mais sensíveis a determinados compostos (e.g. herbicidas) quando comparados a outros organismos-teste fornecendo assim, uma melhor compreensão do risco ambiental (Prado et

al., 2011; Liu et al., 2013). A espécie *Raphidocelis subcapitata* (Korshikov) Hindák, 1990 (anteriormente designada de *Selenastrum capricornutum* e *Pseudokirchneriella subcapitata*) é uma alga verde unicelular pertencente ao grupo das clorofíceas. Esta microalga ocorre em ambientes oligotróficos a eutróficos (Blaise e Vasseur, 2005).

Os protozoários são organismos eucarióticos componentes de comunidades microbianas planctônicas e bentônicas de ambientes aquáticos, onde desempenham papéis fundamentais nos ecossistemas (Fenchel, 1987). Estes organismos são importantes elos nas cadeias tróficas, onde medeiam o fluxo de substâncias e energia de um nível trófico ao seguinte (Sherr e Sherr, 1984), e são muito sensíveis a mudanças ambientais, sendo, portanto, bons indicadores de alerta precoce da deterioração de ambientes aquáticos (Logar e Vodovnik, 2007). Devido à sua alta sensibilidade a substâncias tóxicas ambientais, ao seu curto ciclo de vida, facilidade para cultivo e manutenção, os protozoários têm sido utilizados em estudos toxicológicos (e.g. Gomiero et al., 2013; Gomiero e Viarengo, 2014; Láng e Kohidai, 2012). Os protozoários mais utilizados em experimentos de toxicidade são os ciliados, especialmente os do gênero *Tetrahymena* (Mortimer et al., 2010; Zhang et al., 2010). Outro promissor organismo-teste é o *Paramecium caudatum*, um ciliado encontrado em uma grande variedade de ambientes de água doce e também em habitats semi-terrestres, lodo ou solo. Estudos demonstraram que *P. caudatum* apresenta alta sensibilidade a metais (e.g. Gong et al., 2014, Kvitek et al., 2009; Madoni, 2000; Wu et al., 2015) e a alguns agrotóxicos (Miyoshi et al., 2003).

Os cladóceros, principalmente os dafinídeos, são organismos-teste amplamente utilizados em ensaios de avaliação da toxicidade aquática (Walker et al., 2001). O uso destes organismos em testes ecotoxicológicos tem inúmeras vantagens, incluindo entre elas a sua ampla distribuição em ambientes de água doce; grande relevância ecológica nas cadeias alimentares, atuando como consumidores primários; fácil manuseio e cultivo em laboratório; um ciclo de vida relativamente curto, com reprodução partenogenética; alta fecundidade e sensibilidade a uma ampla gama de substâncias tóxicas, entre elas os agrotóxicos (Casali-Pereira et al., 2015; Moreira et al., 2014; Novelli et al., 2012). Dentre os cladóceros, *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 é uma espécie nativa neotropical com ampla distribuição geográfica na América do Sul, sendo comum em muitos corpos d'água brasileiros (Rocha et al., 2011; Santos et al., 2011; Brito et al., 2013; Silva, 2015). Esta espécie nativa é um organismo-teste padronizado pela Associação Brasileira de Normas Técnicas - NBR 13373 (ABNT, 2005).

Estudos ecotoxicológicos utilizando espécies e populações fornecem importantes informações ecológicas, mas não podem ser representativas dos possíveis efeitos de contaminantes sobre toda uma comunidade ou um ecossistema. Dessa forma, para prever os efeitos em escala ambiental, os dados obtidos em testes laboratoriais devem ser conectados a modelos populacionais (Costa et al., 2008). Assim, a associação de mais de um modelo de estudo contribui para a robustez das análises ambientais. Para isso, modelos matemáticos e computacionais são ótimos exemplos, pois são capazes de prever a distribuição de compostos químicos dentre os compartimentos ambientais, as possíveis concentrações presentes em situações reais de campo ou organizar informações e calcular índices que expressem um nível mais complexo de organização, permitindo interpretações mais realísticas (Plese et al., 2009). Portanto, modelos matemáticos podem constituir boas ferramentas que equilibram vantagens das análises laboratoriais com aquelas desenvolvidas no campo, permitindo a extrapolação de dados a níveis ecossistêmicos. Neste sentido, segundo Rand et al. (1995), análises estatísticas e modelagem matemática têm sido utilizadas como ferramentas importantes para quantificar e prever os efeitos biológicos e determinar sua probabilidade de ocorrência sobre diferentes condições ambientais.

1.5. Substâncias-teste: diuron e carbofuran

O diuron (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilureia) (Figura 3) pertence ao grupo químico das feniluréias, é parcialmente polar, não ionizável e apresenta baixa solubilidade em água (35,6 mg L⁻¹ a 25 °C). De acordo com o grau de toxicidade e periculosidade ambiental, é considerado mediantemente tóxico (classe III) e muito perigoso ao meio ambiente (classe II) (Giacomazzi e Cochet, 2004). Embora apresente baixa a moderada lixiviabilidade, este pode contaminar o lençol freático devido aos baixos valores de coeficiente de adsorção (Koc) que permitem eficiente movimentação no perfil do solo (Lapworth e Gooddy, 2006). Além do transporte para águas superficiais e subterrâneas, a degradação biótica e abiótica do diuron também pode ocorrer e neste caso, o principal produto gerado é a 3,4-dicloroanilina (3,4 DCA) que possui maior toxicidade e persistência no ambiente que o composto de origem (Giacomazzi e Cochet, 2004).

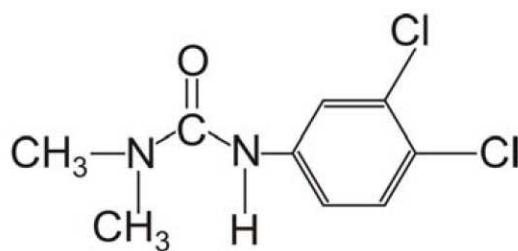


Figura 3: Estrutura química de diuron. Fonte: Araujo et al. (2012).

O diuron é considerado como sendo um dos herbicidas mais perigosos para o ambiente, uma vez que é muito persistente no ambiente (meia-vida > 30 dias) e bioacumulável (Kumar et al., 2011; Mhadhbi e Beiras, 2012). A sua persistência é atribuída principalmente à sua estabilidade química e baixa solubilidade em água (Wong et al., 2013).

O agrotóxico diuron pode ser usado de forma isolada ou combinada com outros herbicidas em culturas de cana de açúcar, citros, algodão, café, abacaxi, cacau, banana, entre outras (Rodrigues e Almeida, 2005). Este herbicida é aplicado nas plantações em pré e pós-emergência de ervas daninhas, agindo na planta por absorção, principalmente pelas raízes, de onde é deslocado através do xilema (Moncada, 2012). Seu mecanismo de ação é a inibição da fotossíntese através do bloqueio da cadeia de transporte de elétrons no fotossistema II (Giacomazzi e Cochet, 2004).

Vários estudos relataram efeitos do diuron sobre o fitoplâncton, no qual demonstraram que este herbicida pode afetar significativamente a produção primária (Knauer et al., 2010), a densidade (Knauer e Hommen, 2012) e a diversidade das comunidades (Knauert et al., 2009). Apesar de existir diversos estudos sobre a toxicidade de diuron sobre organismos e comunidades fotossintetizantes (e.g. Bao et al., 2011; DeLorenzo et al., 2013; Gatidou et al., 2015; Larras et al., 2013; Magnusson et al., 2012; Pesce et al., 2011; Tlili et al., 2011; Van Dam et al., 2012; Zhang et al., 2012), poucos são os trabalhos no qual consideram a toxicidade deste herbicida sobre microrganismos heterotróficos e organismos zooplânctônicos (e.g. Leboulanger et al., 2011; Neuwoehner et al., 2010). Segundo Rico-Martínez et al. (2012), herbicidas inibidores da fotossíntese, como o diuron, causam efeitos indiretos sobre o zooplâncton. Como esse herbicida causa efeitos tóxicos diretos sobre o fitoplâncton, reduzindo suas populações, conseqüentemente existe uma redução da oferta de alimentos ao zooplâncton, que pode causar efeitos indiretos, tais como diminuição da abundância de alguns *taxa* (efeito indireto negativo), aumento de alguns *taxa*

(efeito indireto positivo), diminuição da diversidade e mudanças na composição de espécies zooplanctônicas (Relyea, 2005, 2009; Chang et al., 2008).

Apesar do diuron ser específico para organismos fotossintetizantes, alguns estudos demonstraram que este composto pode causar efeitos tóxicos em organismos heterotróficos não-alvo (invertebrados, anfíbios e peixes) por diferentes modos de ação. Por exemplo, Luna-Acosta et al. (2012) relataram que diuron (exposição à $1 \mu\text{g L}^{-1}$) pode potencialmente afetar os parâmetros imunes na ostra *Crassostrea gigas*, pois observaram a repressão de diferentes genes implicados nos mecanismos de defesa imune dos hemócitos e a inibição de atividades enzimáticas, tais como a atividade de laccase-type phenoloxidase (PO) e superóxido dismutase (SOD) no plasma. Orton et al. (2009) verificaram a inibição dos níveis de testosterona e ovulação no anfíbio *Xenopus laevis* após a exposição ao diuron.

Para peixes, Bretaud et al. (2000) observaram inibições significativas de atividade da acetilcolinesterase cerebral de juvenis de *Carassius auratus* em resposta à exposição diuron. Lazhar et al. (2012) verificaram que diuron causa efeitos teratogênicos aos estágios de embrião-larva de *Psetta maxima*, onde observaram uma diminuição significativa no sucesso de eclosão, malformações (embriões), edema de pericárdio e deformação do esqueleto (larvas) nesta espécie.

Neuwoehner et al. (2010) observaram que, nos testes de toxicidade com algas e *Daphnia magna*, diuron e seus subprodutos MCPDMU (3-(3-chlorophenyl)-1,1-dimethylurea), DCPMU (1-(3,4-dichlorophenyl)3-methylurea), DCPU (1-(3,4-dichlorophenyl)ureia) e 3,4-dichloroaniline mostraram-se mais tóxicos para as algas do que para as dáfias, causando toxicidade específica para as algas e toxicidade *baseline* em *Daphnia magna*. No entanto, em relação ao subproduto 3,4-DCA (3,4-dichloroaniline) de diuron, este foi mais tóxico para as dáfias, apresentando um modo de ação específico para estes organismos.

O carbofuran (2,3-diidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil-N-metil carbamato) (Figura 4) é um inseticida, acaricida e nematicida do grupo dos carbamatos, largamente utilizado em culturas de cana de açúcar, arroz, soja, algodão, batata, milho, feijão, amendoim, café. No Brasil, o carbofuran é comercialmente encontrado pelo nome de Furadan, Carborano e Ralzer, vendidos em diferentes formulações.

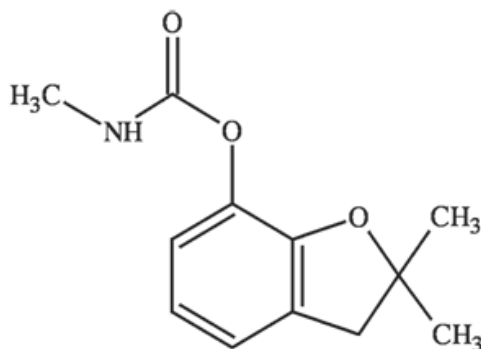


Figura 4: Estrutura química do carbofuran. Fonte: Valencia et al. (2008).

O carbofuran inibe a ação da enzima acetilcolinesterase (AChE), a qual desempenha uma função importante nas sinapses colinérgicas, hidrolisando o neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético (Kavitha e Rao, 2007). Este composto apresenta alta solubilidade em água (322 mg L^{-1} a 20°C), baixa tendência a volatilizar e é muito persistente em ambientes ácidos, mas dissipa rapidamente em meios alcalinos. A meia-vida de carbofuran por hidrólise é na ordem de semanas em pH 7 (28 dias) e dias em pH 8 (3 dias). Ele tem um baixo Koc (22 mL g^{-1}) e é um composto não iônico (baixa reatividade com o solo), o que demonstra ser altamente móvel em solos, podendo lixiviar para as águas subterrâneas ou atingir as águas superficiais através de escoamento superficial (Tarkowski, 2004).

Este agrotóxico apresenta curta persistência no ambiente e é classificado como muito tóxico para as abelhas, peixes e outros animais aquáticos e perigoso para animais e aves (COLLECTIVE SPA, 2002). De acordo com os estudos de Américo-Pinheiro (2015), o carbofuran foi extremamente tóxico para o cladóceros *Daphnia magna* ($\text{CE}_{50-48\text{h}} = 0,011 \text{ mg L}^{-1}$), altamente tóxico para o peixe *Oreochromis niloticus* ($\text{CL}_{50-48\text{h}} = 0,44 \text{ mg L}^{-1}$) e praticamente não tóxico para a macrófita *Lemna minor* ($\text{CI}_{50-7\text{d}} = 144,41 \text{ mg L}^{-1}$) e o caramujo *Pomacea canaliculata* ($\text{CE}_{50-48\text{h}} = 659,60 \text{ mg L}^{-1}$).

Bailey et al. (2005), em ensaios de contato residual, observaram que abelhas expostas a inflorescência de milho contaminado com carbofuran apresentaram mortalidade significativa após 2 e 3 dias do tratamento, sendo esta mortalidade de 73% a 100%. Azizullah et al. (2011) relataram que o flagelado *Euglena gracilis* exposto ao carbofuran diminuiu significativamente a densidade celular e alterou o formato das células, tornando-as arredondadas, após 24 e 72 h de exposição. Barata et al. (2004) verificaram que a

sobrevivência *D. magna* foi afetada em baixos níveis de inibição de AChE (<40%) sob exposição ao carbofuran.

Brethead et al. (2000) relataram inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase em cérebro de juvenis do peixe *Carassius auratus* após 12 horas de exposição à concentração de 5 µg L⁻¹ de carbofuran (8,6% de inibição em relação ao grupo controle). Charttejee et al. (2001) verificaram que a exposição a concentrações sub-letais de carbofuran (0,5; 1 e 2 mg L⁻¹) sobre o peixe *Heteropneustes fossilis* por 30 dias reduziu os níveis de vitelogênese ovariana na fase de pré-desova e afetou a liberação de gonadotrofinas (GnRH) do hipotálamo, sugerindo uma disrupção no eixo hipofiseal gonadal deste peixe.

1.6. Justificativa

O uso de agrotóxicos no mundo e, especialmente no Brasil, vem aumentando significativamente com o crescimento populacional e da produção agrícola. A introdução desenfreada destes compostos no ambiente aquático gera uma gama de misturas e interações com efeitos ainda pouco estudados e não previstos para a biota. Além disso, a interação dos ingredientes “inertes” das formulações comerciais com os ingredientes ativos e com outros compostos presentes no ambiente, permanecem desconhecidas quanto aos possíveis efeitos tóxicos sobre os organismos aquáticos.

No Brasil, os agrotóxicos diuron e carbofuran vêm sendo aplicados intensamente nas áreas agrícolas. Em 2013, estes compostos ocuparam a 13^a e 26^a posição no ranking de vendas, sendo que 6100,96 toneladas de ingrediente ativo de diuron e 1739,81 toneladas de ingrediente ativo de carbofuran foram vendidas (IBAMA, 2014). O estado de São Paulo foi a região que mais consumiu os agrotóxicos diuron e carbofuran, representando, respectivamente, 41% e 62% das vendas totais (IBAMA, 2014), sendo usados principalmente em plantações de cana de açúcar.

Diversos estudos no Brasil relataram a contaminação de águas superficiais e subterrâneas por diuron e carbofuran (Tabela 1). Em Ribeirão Preto (SP), os poços de abastecimentos da cidade que se encontravam próximos a plantações de cana de açúcar revelaram concentrações de diuron de 0,26 a 7,12 µg L⁻¹, demonstrando a contaminação das águas subterrâneas do Aquífero Guarani (Dantas et al., 2011). No alto da sub-bacia do Rio Poxim (SE), Britto et al. (2012) constataram a presença de diuron na água superficial dos rios Poxim-Mirim e Poxim, principalmente no período chuvoso, provocado possivelmente

pelo escoamento superficial. Já o agrotóxico carbofuran foi detectado em águas superficiais de área de nascente do Rio São Lourenço (Campo Verde, MT) em elevadas concentrações (valor máximo 35,25 $\mu\text{g L}^{-1}$) (Ribeiro et al., 2013). Caldas et al. (2011) verificaram a contaminação de águas subterrâneas em Quitéria (RS), região com intensa produção agrícola, e registraram a presença de carbofuran em concentrações de 9,75 e 10,4 $\mu\text{g L}^{-1}$. Grützmacher et al. (2008), ao monitorar a presença de agrotóxicos nas águas do canal São Gonçalo e do rio Piratini (Pelotas, RS) durante o cultivo do arroz irrigado, observaram resíduos de carbofuran com frequência nas amostras analisadas. Silva et al. (2009) detectaram a presença de carbofuran nas águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil, sendo a maior concentração média observada na Planície Costeira Interna à Lagoa dos Patos (Tabela 1).

Tabela 1. Concentrações máximas dos agrotóxicos diuron e carbofuran detectadas em ambientes de água doce no Brasil.

Diuron ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Carbofuran ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Área de estudo	Referência
0,90	-	Alto Rio Poxim, Aracaju, SE (água superficial)	Britto et al. (2012)
-	10,40	Quitéria, RS (água subterrânea)	Caldas et al. (2011)
0,78	68,80	Primavera do Leste, MT (água subterrânea)	Carbo et al. (2008)
7,12	-	Ribeirão Preto, SP (água subterrânea)	Dantas et al. (2011)
6,29	-	Região Centro-Oeste (água subterrânea)	Dores et al. (2009)
-	14,99	Canal São Gonçalo e Rio Piratini, RS (água superficial)	Grützmacher et al. (2008)
-	0,10	Região do médio rio Uruguai, RS (água superficial)	Loro et al. (2015)
-	0,80	Rios da Depressão Central, RS (água superficial)	Marchesan et al. (2010)
408,00	-	Rio Pardo, Ribeirão Preto, SP (água superficial)	Paschoalato et al. (2008)
-	35,25	Rio São Lourenço, MT (água superficial)	Ribeiro et al. (2013)
-	1,40	Sete regiões do sul do Brasil (água superficial)	Silva et al. (2009)

Assim, considerando-se que no ambiente aquático os agrotóxicos podem causar diversos efeitos adversos na comunidade biológica, como redução da densidade e diversidade de espécies, alteração na reprodução, alteração comportamental, bioacumulação e biomagnificação biológica, faz-se necessário o uso dos testes ecotoxicológicos para se avaliar os efeitos do diuron e carbofuran sobre a biota aquática.

No Brasil, o registro do agrotóxico é baseado nas características agronômicas, toxicológicas e ecotoxicológicas de cada substância/produto (Peres et al., 2003). Na formulação comercial é reconhecido que outros ingredientes, como surfactantes, são adicionados ao ingrediente ativo para aumentar a eficácia do agrotóxico. Muitos estudos

indicaram que esses ingredientes “inertes” podem aumentar significativamente a persistência dos agrotóxicos no ambiente e a toxicidade desses produtos para organismos não-alvo (Beggel et al., 2010; Cox e Sorgan, 2006; Novelli et al., 2012; Pereira et al., 2009). Apesar disso, esses ingredientes não são identificados nas bulas dos produtos comerciais e para esses compostos não são previstos testes de toxicidade convencionais como os realizados com o princípio ativo.

Além da inserção de compostos potencialmente tóxicos no ambiente, o uso simultâneo de diferentes tipos de agrotóxicos na agricultura agrava o cenário de riscos ecológicos. Estudos com diferentes agrotóxicos mostraram que as misturas de compostos, muitas vezes, potencializam os impactos sobre os organismos não-alvo alterando o equilíbrio dos ecossistemas (Schwarzenbach et al., 2006; Relyea, 2009).

Apesar de existir diversos estudos sobre a toxicidade de diuron e carbofuran nos ecossistemas aquáticos, poucos são os trabalhos que avaliaram os efeitos destes agrotóxicos em diferentes níveis tróficos e raros os estudos feitos com a formulação comercial do diuron (Diuron Nortox[®] 500 SC) e do carbofuran (Furadan[®] 350 SC). Além disso, não existem estudos sobre a toxicidade da mistura de diuron e carbofuran. Considerando que os agrotóxicos não estão presentes nos ambientes aquáticos de forma isolada, mas sim como misturas, é essencial que estudos sobre os efeitos combinados destes compostos sobre a biota aquática sejam realizados a fim de que seus resultados possam contribuir para uma avaliação de risco mais acurada e realística.

Diante deste contexto, faz-se necessário um estudo mais complexo da toxicidade dos ingredientes ativos diuron e carbofuran e de seus produtos comerciais (Diuron Nortox[®] 500 SC e Furadan[®] 350 SC, respectivamente), no qual envolva organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos e, aliado a isso, um estudo da toxicidade da mistura destes compostos, a qual poderá fornecer uma melhor compreensão das respostas dos organismos aquáticos frente à contaminação por estes agrotóxicos.

Referências Bibliográficas

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2005. Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade Crônica - Método de Ensaio com *Ceriodaphnia* spp. (Cladocera, Crustacea). NBR 13373. Rio de Janeiro, Brazil.

AGRAR, Industrieverband, 2011. Jahresbericht 2010/2011, Frankfurt am Main. Disponível em: http://www.iva.de/sites/default/files/benutzer/uid/publikationen/iva_jahresbericht_download_1404.pdf. Acesso em 10/01/2016.

Américo-Pinheiro, J.H.P., 2015. Toxicidade de imidacloprid e carbofuran para organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, São Paulo, 122 p.

Aparicio, V.C., Geronimo, E., Marino, D., Primost, J., Carriquiriborde, P., Costa, J.L., 2013. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. *Chemosphere* 93, 1866-1873.

APHA - American Public Health Association, 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater. (19th ed). Washington: DC. 1368 p.

Araujo, I.C.L., Melo, V.F., Abate, G., Dolatto, R.G., 2012. Sorção de diuron em minerais da fração argila. *Química Nova* 35 (7), 1312-1317.

Azizullah, A., Richter, P., Häder, D.P., 2011. Comparative toxicity of the pesticides carbofuran and malathion to the freshwater flagellate *Euglena gracilis*. *Ecotoxicology*, 20 (6), 1442-1454.

Backhaus, T., Scholze, M., Grimme, L.H., 2000. The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*. *Aquat. Toxicol.* 49, 49-61.

Bailey, H., Digiorgio, C., Kroll, K., Miller, J., Hinton, D., Starrett, G., 1996. Development of procedures for identifying pesticide toxicity in ambient waters: carbofuran, diazinon, chlorpyrifos. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 837-845.

Bao, V.W., Leung, K.M., Qiu, J.W., Lam, M.H., 2011. Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species. *Mar. Pollut. Bull.* 62 (5), 1147-1151.

Barata, C., Solayan, A., Porte, C., 2004. Role of B - esterases in assessing toxicity of organophosphorous (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 66, 125-139.

Barata, C., Baird, D.J., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M., Riva, M.C., 2006. Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for multi-substance risks assessment. *Aquat Toxicol.* 78, 1-14.

Beggel, S., Werner, I., Connon, R.E., Geist, J.P., 2010. Sublethal toxicity of commercial insecticide formulations and their active ingredients to larval fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Sci. Total Environ.* 408, 3169-3175.

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

Berenbaum, M.C., 1985. The expected effect of a combination of agents: The general solution. *J. Theor. Biol.* 114, 413-431.

Blaise, C., Vasseur, P., 2005. Algal microplate toxicity test. In: Blaise C, Féraud J-F (eds). *Small-scale freshwater toxicity investigations*. Vol 1. Springer, 137-179.

Bliss, C.I., 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann. Appl. Biol.* 26, 585-615.

BRASIL. Lei nº. 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm> Acesso em 10/01/2016.

Brethead, S., Toutant, J.P., Saglio, P., 2000. Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 47 (2), 117-124.

Britto, F.B., Vasco, A.N.D., Pereira, A.P.S., Júnior, M., Vieira, A., Nogueira, L.C., 2012. Herbicides in the upper Poxim River, Sergipe, and the risk of contamination of water resources. *Revista Ciência Agronômica* 43, 390-398.

Brock, T.C.M., Arts, G.H.P., Maltby, L. Van Den Brink, P.J., 2006. Aquatic risks of pesticides, ecological protection goals and common aims in European Union Legislation. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 2 (4), 20-46.

Brown, C. D., Turner, N., Hollis, J., Bellamy, P., Biggs, J., Williams, P., Arnold, D., Pepper, T., Maund, S., 2006. Morphological and physic-chemical properties of British aquatic habitats potentially exposed to pesticides. *Agric. Ecosyst. Environ.* 113, 307-319.

Caldas, S., Primel, E., Zanella, R., 2011. Risk estimate of water contamination and occurrence of pesticide in the South of Brazil. In *Herbicides and environment*. Kortekamp, A. (Ed.), INTECH Open Access Publisher, 471-492.

Carbo, L., Souza, V., Dores, E.F., Ribeiro, M.L., 2008. Determination of pesticides multiresidues in shallow groundwater in a cotton-growing region of Mato Grosso, Brazil. *J. Braz. Chem. Soc* 19 (6), 1111-1117.

Carneiro, F.F., Augusto, L.G.S., Rigotto, R.M., Friedrich, K., Búrigo, A.C. 2015. Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. São Paulo: Expressão Popular, 624 p.

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.

Cassee, F.R., Groten, J.P., Bladeren, P.J., Feron, V.J., 1998. Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures. Crit. Rev. Toxicol. 28, 73-101.

Castillo, G.C., Vila, I.C., Neild, E., 2000. Ecotoxicity assessment of metals and wastewater using multitrophic assays. Environ. Toxicol. 15 (5), 370-375.

Cedergreen, N., Kudsk, P., Mathiassen, S.K., Streibig, J.C., 2007. Combination effects of herbicides on plants and algae: do species and test systems matter? Pest Manag. Sci, 63 (3), 282-295.

Chagnon, M., Kreuzweiser, D., Mitchell, E.A.D., Morrissey, C.A., Noome, D.A., Van Der Sluijs, J.P., 2015. Risks of large-scale use of systemic insecticides to ecosystem functioning and services. Environ. Sci. Pollut. Res. 22, 119-134.

Chang, K.H., Sakamoto, M., Ha, J.Y., Murakami, T., Miyabara, Y., Nakano, S., Imai, H., Doi, H., Hanazato, T., 2008. Comparative study of pesticide effects (herbicide and fungicide) on zooplankton community. In: Interdisciplinary studies on environmental chemistry – biological responses to chemical pollutants, Murakami, Y. et al. (Eds.). TERRAPUB, p. 361-366.

Chatterjee, S., Dasmahapatra, A.K., Ghosh, R., 2001. Disruption of pituitary-ovarian axis by carbofuran in catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). Comp. Biochem. Phys. Part C: Toxicol. Pharmacol. 129 (3), 265-273.

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.

Cleuvers, M., 2005. Initial risk assessment for three β -blockers found in the aquatic environment. Chemosphere 59, 199-205.

Collective of authors SPA (State Phytosanitary Administration), 2002. List of the registered plant protection products. Agrospoj, SPA.

Costa, C.R., Olivi, P., Botta, C.M., Espindola, E.L., 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. Química Nova 31 (7), 1820-1830.

Cox, C., Surgan, M., 2006. Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. Environ. Health Perspect. 114, 1803-1806.

Dantas, A.D.B., Paschoalato, C.F., Martinez, M.S., Ballejo, R.R., Di Bernardo, L., 2011. Removal of diuron and hexazinone from Guarany Aquifer groundwater. *Braz. J. Chem. Eng.*, 28, 415-424.

DeLorenzo, M.E., Danese, L.E., Baird, T.D., 2013. Influence of increasing temperature and salinity on herbicide toxicity in estuarine phytoplankton. *Environ. Toxicol.* 28 (7), 35–371.

Deuber, R., 1992. *Ciência das plantas daninhas, fundamentos*. Jaboticabal. FUNEP. 43 p.

Dores, E.F.G.C.; De-Lamonica-Freire, E.M., 1999. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas: vias de contaminação e dinâmica dos pesticidas no ambiente aquático. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente* 9, 1-18.

Dores, E.F.G.C., Spadotto, C. A., Weber, O.L., Carbo, L., Vecchiato, A.B., Pinto, A.A., 2009. Environmental behaviour of metolachlor and diuron in a tropical soil in the central region of Brazil. *Water Air Soil Pollut.* 197, 175-183.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2003. Normas gerais para o uso de agrotóxicos. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Banana/BananaPara/agrotoxicos.htm>>. Acesso em 21/01/2016.

Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M., Grimme, L.H., 2003. Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquat. Toxicol.* 63, 43-63.

Fenchel, T., 1987. *Ecology of Protozoa: the biology of free-living Phagotrophic Protists*. Madison/Springer-Verlag, Berlin.

Ferreira, A.L.G., Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., 2008. Toxicity prediction of binary combinations of cadmium, carbendazim and low dissolved oxygen on *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 89, 28-39.

Ferreira, A.L.G., Serra, P., Soares, A.M.V.M., Loureiro, S., 2010. The influence of natural stressors on the toxicity of nickel to *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 17 (6), 1217-1229.

Freitas, E.C., Pinheiro, C., Rocha, O., Loureiro, S., 2014. 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* 31, 143-152.

Gatidou, G., Stasinakis, A.S., Iatrou, E.I., 2015. Assessing single and joint toxicity of three phenylurea herbicides using *Lemna minor* and *Vibrio fischeri* bioassays. *Chemosphere* 119, 69-74.

Gavrilescu, M., 2005. Fate of pesticides en the environment and its bioremediation. Eng. Life Sci. 5 (6), 497-526.

Gerónimo, E., Aparicio, V.C., Bárbaro, S., Portocarrero, R., Jaime, S., Costa, J.L., 2014. Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. Chemosphere 107, 423-431.

Gherardi-Goldstein, E., Bertoletti, E., Zagatto, P.A., Araújo, R.P.A., Ramos, M.L.L.C., 1990. Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, São Paulo.

Giacomazzi, S., Cochet, N., 2004. Environmental impact of diuron transformation: a review. Chemosphere 56, 1021-1032.

Gomiero, A., Dagnino, A., Nasci, C., Viarengo, A., 2013. The use of protozoa in ecotoxicology: application of multiple endpoint tests of the ciliate *E. crassus* for the evaluation of sediment quality in coastal marine ecosystems. Sci. Total Environ. 442, 534–544.

Gomiero, A., Viarengo, A., 2014. Effects of elevated temperature on the toxicity of copper and oxytetracycline in the marine model, *Euplotes crassus*: A climate change perspective. Environ. Pollut. 194, 262–271.

Gong, Z.L., Chen, Y., Yan, Y., Pei, S.Y., Wu, D., Zhang, M., Wang, Q., 2014. Toxicity of three heavy metal pollutants of the pharmaceutical wastewater to *Paramecium caudatum*. Adv. Mat. Res. 937, 571-577.

Groten, J.P., 2000. Mixtures and interactions. Food Chem. Toxicol. 38, 65-71.

Grützmacher, D.D., Grützmacher, A.D., Agostinetto, D., Loeck, A.E., Roman, R., Peixoto, S.C., Zanella, R., 2008. Monitoring of pesticides in two water sources in Southern Brazil. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental 12 (6), 632-637.

Hassan, S.A., Parra, J.R.P., Zucchi, R., 1997. 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: FEALQ, p.207-233.

Hua, J., Relyea, R., 2014. Chemical cocktails in aquatic systems: Pesticide effects on the response and recovery of >20 animal taxa. Environ. Pollut. 189, 18-26.

Jonker, M.J., Svendsen, C., Bedaux, J.J.M., Bongers, M., Kammenga, J.E., 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose-level dependent, or dose ratiodependent effects in mixture dose response analysis. Environ. Toxicol. Chem. 24, 2701-2713.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2009. Manual para requerimento de avaliação ambiental: agrotóxicos e afins. 180 p. Disponível em:

<http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/manual_de_procedimento_agrotoxicos_ibama_2009-11.pdf>. Acesso em 18/11/2015.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2012. Boletim de Comercialização de Agrotóxicos e Afins. Histórico de Vendas - 2000 a 2012. Disponível em: http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/boletim%20de%20comercializacao_2000_2012.pdf. Acesso em 18/11/2015.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2014. Boletim Anual de Produção, Importação, Exportação e Vendas de Agrotóxicos no Brasil - Ano 2013. Disponível em: <<http://ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3>>. Acesso em 18/11/2015.

Kavitha, P., Rao, J.V., 2007. Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. Pestic. Biochem. Phys. 87 (2), 182-188.

Knauer, K., Hommen, U., 2012. Sensitivity, variability, and recovery of functional and structural endpoints of an aquatic community exposed to herbicides. Ecotox. Environ. Saf. 78, 178-183.

Knauer, K., Leimgruber, A., Hommen, U., Knauert, S., 2010. Co-tolerance of phytoplankton communities to photosynthesis II inhibitors. Aquat. Toxicol. 96, 256-263.

Knauert, S., Dawo, U., Hollender, J., Hommen, U., Knauer, K., 2009. Effects of photosystem II inhibitors and their mixture on freshwater phytoplankton succession in outdoor mesocosms. Environ. Toxicol. Chem. 28, 836-845.

Köhler, H.R., Triebkorn, R., 2013. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? Science 341, 759-765.

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.

Kruse, N.D., Vidal, R.A., Trezzi, M.M., 2006. Curvas de resposta e isoblograma como forma de descrever a associação de herbicidas inibidores do fotossistema II e da síntese de carotenóides. Planta daninha 24 (3), 579-587.

Kumar, S., Thomas, A., Sahgal, A., Verma, A., Samuel, T., Pillai, M.K., 2004. Variations in the insecticide-resistance spectrum of *Anopheles stephensi* after selection with deltamethrin or a deltamethrin-piperonyl-butoxide combination. Trop. Med. Parasitol. 98 (8), 861-871.

Kvitek, L., Vanickova, M., Panacek, A., Soukupova, J., Dittrich, M., Valentova, E., Pucek, R., Bancirova, M., Milde, D., Zboril, R., 2009. Initial study on the toxicity of silver nanoparticles (NPs) against *Paramecium caudatum*. J. Phys. Chem. C 113, 4296-4300.

Láng, J., Kőhidai, L., 2012. Effects of the aquatic contaminant human pharmaceuticals and their mixtures on the proliferation and migratory responses of the bioindicator freshwater ciliate *Tetrahymena*. *Chemosphere* 89 (5), 592-601.

Lapworth, D.J., Gooddy, D.C., 2006. Source and persistence of pesticides in a semi-confined chalk aquifer of southeast England. *Environ. Pollut.* 144 (3), 1031-1044.

Larras, F., Montuelle, B., Bouchez, A., 2013. Assessment of toxicity thresholds in aquatic environments: Does benthic growth of diatoms affect their exposure and sensitivity to herbicides? *Sci. Total Environ.* 463, 469-477.

Lazhar, M., Hela, T., Moncef, B., Néji, A.A., 2012. Toxicity of three selected pesticides (alachlor, atrazine and diuron) to the marine fish (turbot *Psetta maxima*). *Afr. J. Biotechnol.* 11 (51), 11321-11328.

Leboulanger, C., Schwartz, C., Somville, P., Diallo, A.O., Pagano, M., 2011. Sensitivity of two *Mesocyclops* (Crustacea, Copepoda, Cyclopidae), from tropical and temperate origins, to the herbicides, diuron and paraquat, and the insecticides, temephos and fenitrothion. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 87 (5), 487-493.

Liu, S.S., Wang, C.L., Zhang, J., Zhu, X.W., Li, W.Y., 2013. Combined toxicity of pesticide mixtures on green algae and photobacteria. *Ecotox. Environ. Saf.* 95, 98-103.

Loewe, S., Muischnek, H., 1926. Combined effects I announcement–implements to the problem. *Naunyn-Schmiedebergs Arch.. Exp. Pathol. Pharmacol.* 114, 313-326.

Logar, R.M., Vodovnik, M., 2007. The application of microbes in environmental monitoring. *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*, 577-585.

Lombardi, J.V., 2004. Fundamentos de toxicologia aquática. In: Ranzani-Paiva, M.J.T.; Takemoto, R.M.; Lizama, M.A.P. (Ed). *Sanidade de organismos aquáticos*. São Paulo: Varela. p. 263-272.

Londres, F., 2011. *Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida*. Rio de Janeiro: AS-PTA. 190 p.

Loro, V.L., Murussi, C., Menezes, C., Leitemperger, J., Severo, E., Guerra, L., Guerra, L., Costa, M., Perazzo, G.X., Zanella, R., 2015. Spatial and temporal biomarkers responses of *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) (Characiformes: Characidae) from the middle rio Uruguai, Brazil. *Neotrop. Ichthyol.* 13 (3), 569-578.

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.

Luna-Acosta, A., Renault, T., Thomas-Guyon, H., Faury, N., Saulnier, D., Budzinski, H., Menach, K.L., Pardon, P., Fruitier-Arnaudin, I., Bustamante, P., 2012. Detection of early

effects of a single herbicide (diuron) and a mix of herbicides and pharmaceuticals (diuron, isoproturon, ibuprofen) on immunological parameters of Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Chemosphere*, 87 (11), 1335-1340.

Madoni, P., 2000. The acute toxicity of nickel to freshwater ciliates. *Environ. Pollut.* 109, 53-59.

Magnusson, M., Heimann, K., Ridd, M., Negri, A.P., 2012. Chronic herbicide exposures affect the sensitivity and community structure of tropical benthic microalgae. *Mar. Pollut. Bull.* 65, 363-372.

Mansano, A.S., Moreira, R.A., Pierozzi, M., Oliveira, T.M., Vieira, E.M., Rocha, O., Regali-Selegim, M.H., 2016. Effects of diuron and carbofuran pesticides in their pure and commercial forms on *Paramecium caudatum*: The use of protozoan in ecotoxicology. *Environ. Pollut.* 213, 160-172.

Marchesan, E., Sartori, G.M.S., Avila, L.A.D., Machado, S.L.D.O., Zanella, R., Primel, E.G., Macedo, V.V.R.M., Marchezan, M.G., 2010. Residues of pesticides in the water of the Depression Central Rivers in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Ciência Rural*, 40 (5), 1053-1059.

Meyer-Baron, M., Knapp, G., Schäper, M., Thriel, C.V., 2015. Meta-analysis on occupational exposure to pesticides - Neurobehavioral impact and dose-response relationships. *Environ. Res.* 136, 234-245.

Mhadhbi, L., Beiras, R., 2012. Acute toxicity of seven selected pesticides (alachlor, atrazine, dieldrin, diuron, pirimiphos-methyl, chlorpyrifos, diazinon) to the marine fish (turbot, *Psetta maxima*). *Water, Air, Soil Pollut.* 223 (9), 5917-5930.

Miligi, L., Costantini, A.S., Veraldi, A., Benvenuti, A., Vineis, P., 2006. Cancer and pesticides: an overview and some results of the Italian multicenter case-control study on hematology lymphoproliferative malignancies. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 366-377.

Miyoshi, N., Kawano, T., Tanaka, M., Kadono, T., Kosaka, T., Kunimoto, M., Hosoya, H., 2003. Use of *Paramecium* species in bioassays for environmental risk management: determination of IC₅₀ values for water pollutants. *J. Health Sci.* 49 (6), 429-435.

Moncada, A. 2012. Environmental fate of diuron. Environmental Monitoring Branch Department of Pesticide Regulation, CA 95812-4015.

Moreira, R.A., Mansano, A.S., Silva, L.C.D., 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), 1-8.

Mortimer, M., Kasemets, K., Kahru, A., 2010. Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*. *Toxicology* 269 (2), 182-189.

Neuwoehner, J., Zilberman, T., Fenner, K., Escher, B.I., 2010. QSAR-analysis and mixture toxicity as diagnostic tools: Influence of degradation on the toxicity and mode of action of diuron in algae and daphnids. *Aquat. Toxicol.* 97, 58-67.

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.

Nunes, M.E.T.; Espíndola, E.L.G., 2012. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. *Ecotoxicology* 21 (4), 1063-1071.

Olmstead, A.W., LeBlanc, G.A., 2005. Toxicity assessment of environmentally relevant pollutant mixtures using a heuristic model. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 1, 114-122.

Orton, F., Lutz, I., Kloas, W., Routledge, E.J., 2009. Endocrine disrupting effects of herbicides and pentachlorophenol: in vitro and in vivo evidence. *Environ. Sci. Technol.* 43 (6), 2144-2150.

Paschoalato, C., Dantas, A., Rosa, I., Faleiros, R., Bernardo, L.D., 2008. Use of activated carbon to remove the herbicides diuron and hexazinone from water. *Revista DAE* 179, 34-41.

Pereira, J.L., Antunes, S.C., Castro, B.B., Marques, C.R., Goncalves, A.M.M., Goncalves, F., Pereira, R., 2009. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. *Ecotoxicology* 18, 455-463.

Peres, F., Moreira, J.C., Dubois, G.S., 2003. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: Peres, F., Moreira, J.C. (Ed.). *É veneno ou remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente*. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ. p. 21-41.

Pesce, S., Bouchez, A., Montuelle, B., 2011. Effects of organic herbicides on phototrophic microbial communities in freshwater ecosystems. In *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Springer New York, 87-124.

Plese, L.P.M., Silva, C.L., Foloni, L.L., 2009. Distribuição nos compartimentos ambientais dos herbicidas utilizados nas culturas de algodão, café e citros. *Planta Daninha*, 27, 123-132.

Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á., 2011. Characterization of cell response in *Chlamydomonas moewusii* cultures exposed to the herbicide paraquat: Induction of chlorosis. *Aquat. Toxicol.* 102, 10-17.

Rand, P.S., Stewart, D.J., Lantry, B.F., Rudstam, L.G., Johansson, O.E.; Goyke, A. P., Brandt, S.B., Gorman, R. Eck, G.W., 1995. Effect of lake-wide planktivory by the pelagic community in lakes Ontario and Michigan. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 1546-1563.

Relyea, R.A., 2005. The Impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. *Ecol. Appl.* 15, 618-627.

Relyea, R.A., 2009. A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia* 159, 363-376.

Ribeiro, A.C.A., Dores, E.D.C., Amorim, R.S.S., Lourencetti, C., 2013. Pesticide residues in surface waters at the headwaters of São Lourenço River-MT, Brazil: validation of a method using solid-phase extraction and liquid chromatography. *Química Nova* 36 (2), 284-290.

Rico-Martínez, R., Arias-Almeida, J.C., Pérez-Legaspi, A., Alvarado-Flores, J., Retes-Pruneda, J.L., 2012. Adverse effects of herbicides on freshwater zooplankton. In: El-Ghany, M.N.A. (Ed). *Herbicides - properties, synthesis and control of weeds*. Publisher: InTech. p. 406-434.

Rieder, A., 2005. Aspectos da interação do homem com pesticidas no ambiente: focando a cotonicultura e com ênfase às bordas do Alto Pantanal, Mato Grosso, Brasil. 204 p. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

Rioboo, C., Prado, R., Herrero, C., Cid, A., 2007. Population growth study of the rotifer *Brachionus* sp. fed with triazine-exposed microalgae. *Aquat. Toxicol.* 83, 247-53.

Rocha, O., Santos-Wisniewski, M.J., Matsumura-Tundisi, T., 2011. Checklist of freshwater Cladocera from São Paulo State, Brazil. *Biota Neotropica*, 11, 571-592.

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

Ryall, K.A., Tan, A., 2015. Systems biology approaches for advancing the discovery of effective drug combinations. *J. Cheminform.* 7 (7), 1-15.

Saleem, U., Ejaz, S., Ashraf, M., Omer, M.O., Altaf, I., Batool, Z., Fatima, R., Afzal, M., 2014. Mutagenic and cytotoxic potential of Endosulfan and Lambda-cyhalothrin - In vitro study describing individual and combined effects of pesticides. *J. Environ. Sci.* 26, 1471-1479.

Sanches, S.M., Silva, C.H.T.P., Campos, S.X., Vieira, E.M., 2003. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente* 13, 53-58.

Sanchez-Bayo, F., Hyne, R.V., 2011. Comparison of environmental risks of pesticides between tropical and nontropical regions. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 7 (4), 577-586.

Santos-Wisniewski, M.J., Matsumura-Tundisi, T., Negreiros, N.F., Silva, L.C., Santos, R.M., Rocha, O., 2011. O estado atual do conhecimento da diversidade dos Cladocera (Crustacea, Branchiopoda) nas águas doces do estado de Minas Gerais. *Biota Neotropica* 11 (3), 287-301.

Sasal, M.C., Andriulo, A.E., Wilson, M.G., Portela, S.I., 2010. Glyphosate losses by drainage and runoff from Mollisols under no-till agriculture. *Inf. Tecnol.* 21, 135-142.

Schulz, R., 2004. Field studies on exposure, effects, and risk mitigation of aquatic nonpoint source insecticide pollution: a review. *J. Environ. Quality* 33, 419-448.

Schwarzenbach, R.P., Escher, B.I., Fenner, K., Hofstetter, T.B., Johnson, C.A., Von Gunten, U., Wehrli, B., 2006. The challenge of micropollutants in aquatic systems. *Science* 313, 1072-1077.

Sherr, B.F., Sherr, E.B., 1984. The role of heterotrophic protozoa in carbon and energy flow in aquatic ecosystems. In: Klug, M.J., Reddy, C.A. (Eds.). *Currents perspectives in microbial ecology*. American Society for Microbiology (Washington, DC), pp. 412-423.

Silva, D.R.O.D., Avila, L.A.D., Agostinetto, D., Dal Magro, T., Oliveira, E.D., Zanella, R., Noldin, J.A., 2009. Pesticides monitoring in surface water of rice production areas in Southern Brazil. *Ciência Rural* 39 (9), 2383-2389.

Silva, J.M., Santos, J.R., 2007. Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos. *Oecologia Brasiliensis* 11 (4), 565-573.

Silva, M.R., Campos, A.C.E., Bohm, F.Z., 2013. Agrotóxicos e seus impactos sobre ecossistemas aquáticos continentais. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, 8 (2), 46-58.

Silva, L.C., 2015. A comunidade zooplancônica de rios amazônicos na área de influência da Usina Hidrelétrica de Santo Antônio do Madeira, RO: diferentes abordagens no monitoramento. Tese de doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 335p.

Spadotto, C.A., Scorza Junior, R.P., Dores, E.D.C., Gebler, L., Moraes, D.D.C., 2010. Fundamentos e aplicações da modelagem ambiental de agrotóxicos. *Embrapa Monitoramento por Satélite. Documentos* 78, 47 p.

Tang, J.Y., McCarty, S., Glenn, E., Neale, P.A., Warne, M.S.J., Escher, B.I., 2013. Mixture effects of organic micropollutants present in water: towards the development of effect-based water quality trigger values for baseline toxicity. *Water Res.* 47 (10), 3300-3314.

Tarkowski, G.M., 2004. Triclopyr Butoxyethyl Ester: Analysis of Risks to Endangered and Threatened Salmon and Steelhead.

Terra, F.H.B., Pelaez, V.M., 2008. A evolução da indústria de agrotóxicos no Brasil de 2001 a 2007: a expansão da agricultura e as modificações na lei de agrotóxicos. In: 46 Congresso, Acre, Brasil. Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural.

Tlili, A., Montuelle, B., Bérard, A., Bouchez, A., 2011. Impact of chronic and acute pesticide exposures on periphyton communities. *Sci. Total Environ.* 409 (11), 2102-2113.

Van den Brink, P.J., Blake, N., Brock, T.C.M., Maltby, L., 2006 Predictive value of species sensitivity distributions for effects of herbicides in freshwater ecosystems. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 12, 645-674.

Valencia, E.M., Guerrero, J.A., Yunda, A., Martínez, M.J., 2008. Evaluation Of ¹⁴C-Carbofuran And Furadan 3SC® Adsorption-Desorption In Three Cundinamarca Soils (Colombia). *Revista Colombiana de Química* 37, 79-91.

Van Dam, J.W., Negri, A.P., Mueller, J.F., Uthicke, S., 2012. Symbiont-specific responses in foraminifera to the herbicide diuron. *Mar. Pollut. Bull.* 65, 373–383.

Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., Peakall, D.B., 2001. *Principles of Ecotoxicology*. Taylor & Francis, London.

Wesseling, C., Keifer, M., Ahlbom, A., Mcconnell, R., Moon, J.D., Rosenstock, L., Hogstedt, C., 2002. Long-term neurobehavioral effects of mild poisonings with organophosphate and n-methyl carbamate pesticides among banana workers. *Int. J. Occup. Environ. Health* 8 (1), 27-34.

Wong, A., Lanza, M.R.V., Sotomayor, M.D.P.T., 2013. Sensor for diuron quantitation based on the P450 biomimetic catalyst nickel (II) 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxy-29H,31H-phthalocyanine. *J. Electroan. Chem.* 690, 83-88.

Wu, D., Yan, Y., Pei, S.Y., Zhang, M., Wang, Q., Gong, Z.L., Chen, Y., 2015. Inhibitory effect of three heavy metal pollutants on antioxidant enzymes of *Paramecium caudatum*. *Adv. Mater. Res.* 1065, 3071-3076.

Zagatto, P.A., Bertoletti, E., 2006. *Ecotoxicologia*. In: Zagatto, P.A. *Ecotoxicologia aquática*. São Carlos: Rima. 1-12.

Zambrone, F.A.D., 1986. Perigosa família. *Agrotóxicos*. *Ciência Hoje* 4 (22), 44-47.

Zhang, L.J., Ying, G.G., Chen, F., Zhao, J.L., Wang, L., Fang, Y.X., 2012. Development and application of whole-sediment toxicity test using immobilized freshwater microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ. Toxicol. Chem.* 31 (2), 377–386.

Zhang, X.J., Qin, H.W., Su, L.M., Qin, W.C., Zou, M.Y., Sheng, L.X., Zhao, Y.H., Abraham, M.H., 2010. Interspecies correlations of toxicity to eight aquatic organisms: theoretical considerations. *Sci. Total Environ.* 408 (20), 4549-4555.

Zhang, W., Jiang, F., Ou, J., 2011. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences* 1 (2), 125-144.

Objetivos e Hipóteses

2. Objetivos e Hipóteses

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos do diuron e do carbofuran, isolados e em mistura, sobre organismos aquáticos e realizar uma avaliação de risco preliminar destes agrotóxicos para corpos d'água brasileiros.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar os efeitos da toxicidade crônica do diuron e do carbofuran (padrão e comercial), em ação individual e em mistura, sobre a alga *Raphidocelis subcapitata* utilizando citometria de fluxo;
- Avaliar os efeitos tóxicos agudos e crônicos do diuron e do carbofuran (padrão e comercial), isolados e em mistura, sobre o protozoário *Paramecium caudatum*;
- Analisar a toxicidade aguda e crônica do diuron e do carbofuran (padrão e comercial), isolados e em mistura, sobre o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*;
- Verificar se existe diferença significativa da toxicidade dos ingredientes ativos nas formas padrão (diuron e carbofuran) e comercial (Diuron Nortox[®] 500 SC e Furadan[®] 350 SC) para os organismos testados;
- Comparar a sensibilidade de diferentes organismos-teste por meio de curvas de SSD e verificar as espécies mais sensíveis aos agrotóxicos testados;
- Realizar uma avaliação de risco preliminar dos agrotóxicos diuron e carbofuran para corpos d'água brasileiros.

2.3. Hipóteses

1. Os agrotóxicos diuron e carbofuran (padrão e comercial) causam efeitos deletérios à alga *Raphidocelis subcapitata*, ao protozoário *Paramecium caudatum* e ao cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*;
2. Os agrotóxicos diuron e carbofuran em suas formulações comerciais (Diuron Nortox[®] 500 SC e Furadan[®] 350 SC) são mais tóxicos do que os ingredientes ativos padrões para todos os organismos-teste utilizados;
3. Os efeitos agudos e crônicos da mistura de diuron e carbofuran sobre os organismos-teste são diferentes dos efeitos observados para a exposição isolada a cada agrotóxico;
4. A mistura das formulações comerciais dos agrotóxicos selecionados causa efeitos tóxicos mais graves aos organismos-teste do que a mistura dos ingredientes ativos padrões;
5. A alga é o organismo-teste mais sensível ao diuron e o cladóceros é o mais sensível ao carbofuran, sendo que o protozoário é o organismo menos sensível a estes dois agrotóxicos;
6. Os agrotóxicos diuron e carbofuran representam potenciais riscos ecológicos para os corpos d'água brasileiros.

Capítulo 1

Efeitos dos agrotóxicos diuron e carbofuran em ação individual e em mistura sobre a microalga *Raphidocelis subcapitata*

Resumo

Nos ambientes aquáticos, os organismos são frequentemente expostos a misturas de vários agrotóxicos. Neste estudo, os efeitos dos agrotóxicos diuron e carbofuran e sua mistura sobre a microalga *Raphidocelis subcapitata* foram investigados. Para isso, testes de toxicidade crônica foram realizados com os compostos individuais (ingrediente ativos e produtos comerciais) e em mistura (ingrediente ativos) e analisados utilizando a citometria de fluxo. De acordo com os resultados, a toxicidade dos ingredientes ativos nas formas padrão e comercial para *R. subcapitata* não apresentaram diferenças significativas. A partir dos testes de toxicidade individuais, verificou-se que o diuron e o carbofuran inibiram significativamente o crescimento populacional de *R. subcapitata* e causaram alterações fisiológicas (conteúdo de clorofila *a*) e morfológicas (complexidade e tamanho celular) nas células. Em relação aos testes de toxicidade da mistura, os dados se ajustaram aos modelos de referência de adição de concentração (CA) e ação independente (IA) e apresentaram desvios significativos. Para o modelo CA, o desvio dependente da proporção da dose apresentou o melhor ajuste aos dados evidenciando sinergismo causado principalmente pelo diuron e antagonismo causado principalmente pelo carbofuran. Para o modelo de IA, o desvio sinergismo/antagonismo representou o melhor ajuste e indicou interações sinérgicas entre os agrotóxicos diuron e carbofuran quando combinados. De modo geral, os dois modelos evidenciaram a ocorrência do sinergismo na mistura destes compostos, principalmente quando o diuron é o produto químico dominante na mistura. O aumento da toxicidade sobre as algas causada pela mistura destes agrotóxicos poderia representar um risco ambiental maior para o fitoplâncton. Assim, a exposição ao diuron e carbofuran em mistura deve ser considerada nas avaliações de risco, uma vez que a mistura destes compostos pode resultar em efeitos mais graves sobre o crescimento populacional das algas do que as exposições individuais.

Palavras-chave: toxicidade; adição de concentração; ação independente; sinergismo; fitoplâncton.

1. Introdução

Os ambientes aquáticos são muitas vezes contaminados com agrotóxicos a partir de diferentes fontes, principalmente da agricultura, constituindo portanto um potencial risco para os organismos não-alvo. Estes organismos, no entanto, raramente são expostos a apenas um único contaminante, mas normalmente a misturas de vários agrotóxicos com diferentes componentes em diferentes concentrações e proporções (Faust et al., 2003; Schuler e Rand, 2008). Muitos agrotóxicos são persistentes e seu uso contínuo e crescente representa uma ameaça potencial para ambientes aquáticos através de exposição aguda e crônica (Faust et al., 2001; McClellan et al., 2008) e suas misturas podem levar a diferentes interações dos compostos (Magnusson et al., 2010; Liu et al., 2013).

A avaliação de risco para regulamentação de produtos químicos e a maioria dos estudos ecotoxicológicos nos ambientes aquáticos incidem principalmente sobre a toxicidade dos compostos isolados em condições controladas (Barata et al., 2006). No entanto, considerando que os organismos no ambiente são constantemente expostos a misturas complexas de substâncias tóxicas (Cedergreen et al., 2008; Ferreira et al., 2008; Pavlaki et al., 2011), alguns modelos teóricos foram desenvolvidos (Cassee et al., 1998; Jonker et al., 2005) para prever e avaliar de uma forma mais realista o comportamento de contaminantes quando estes ocorrem juntos no ambiente.

Os modelos teóricos utilizados para analisar a toxicidade de misturas baseiam-se em dois conceitos de referência, a Adição de Concentração (*Concentration Addition* - CA) (Loewe e Mechanik, 1926) e a Ação Independente (*Independent Action* - IA) (Bliss, 1939). O modelo CA assume que os tóxicos individuais apresentam o mesmo modo de ação e atuam sobre o mesmo alvo no organismo, contribuindo para uma resposta comum em proporção a suas toxicidades relativas (Ferreira et al., 2008; Loureiro et al., 2010; Freitas et al., 2014). Por outro lado, o modelo de IA assume que agentes tóxicos individuais têm modos de ação diferentes e, assim, não interferem uns com os outros durante a sua ação nos respectivos sítios-alvo (Ferreira et al., 2008; Loureiro et al., 2010; Freitas et al., 2014). Quando os modos de ação dos produtos químicos são desconhecidos, os dois modelos (CA e IA) são utilizados e aquele que melhor se ajustar aos dados é escolhido em detrimento do outro (Loureiro et al., 2010; Pavlaki et al., 2011).

Em cenários reais, os compostos podem interagir uns com os outros, modificando a amplitude e, por vezes, a natureza do efeito tóxico. Interações podem acontecer na fase

toxicocinética (processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção) ou na fase toxicodinâmica (efeitos de substâncias químicas no receptor, no alvo celular ou órgão; Cassee et al., 1998). Assim, a interação entre os agrotóxicos pode resultar em desvios dos modelos CA e IA. Os desvios esperados são aqueles que produzem um efeito sinérgico ou antagônico, ou aqueles que dependem dos níveis da dose dos produtos químicos (diferentes desvios a baixas e altas concentrações), ou da proporção da dose dos componentes na mistura (Jonker et al., 2005).

Os agrotóxicos diuron e carbofuran são comumente usados em várias culturas agrícolas, tais como algodão, café, cana de açúcar, milho, trigo, e frequentemente têm sido encontrados em corpos d'água em todo o mundo (e.g. Faggiano et al., 2010; Kaonga et al., 2015; Masiá et al., 2015; Papadakis et al., 2015) e também no Brasil (e.g. Caldas et al., 2011; Carbo et al., 2008; Loro et al., 2015; Ribeiro et al., 2013). O diuron (feniluréia) é um herbicida que inibe a fotossíntese pelo bloqueio da cadeia de transporte de elétrons no fotossistema II em microrganismos e plantas fotossintéticas (Giacomazzi e Cochet, 2004), enquanto que o carbofuran (carbamato) é um inseticida, acaricida e nematicida que age contra uma ampla variedade de organismos por ligar-se à enzima acetilcolinesterase, inibindo sua ação sobre a acetilcolina (Pessoa et al., 2011).

A contaminação dos ambientes aquáticos com os agrotóxicos diuron e carbofuran pode induzir efeitos adversos sobre os organismos, incluindo microalgas. As algas desempenham um papel fundamental nos ecossistemas aquáticos, pois, sendo produtores primários, são uma parte importante da base da teia alimentar e qualquer efeito sobre elas pode afetar os níveis tróficos mais elevados e, conseqüentemente, impactar a dinâmica e o funcionamento do ecossistema (DeLorenzo et al., 2002; Rioboo et al., 2007). Por esta razão, espécies de algas são muitas vezes utilizadas em avaliações de riscos de produtos químicos (Pérez et al., 2011; Ribeiro et al., 2014). Em adição ao seu papel ecológico, microalgas são fáceis de cultivar, possuem tempo de geração curto e são sensíveis a vários compostos (e.g. herbicidas), tornando-se ferramentas biológicas adequadas em testes de toxicidade com poluentes (e.g. Stachowski-haberkorn et al., 2013; Suman et al., 2015).

Respostas tóxicas de microalgas expostas a agrotóxicos são tipicamente medidas utilizando parâmetros populacionais, como por exemplo a taxa de crescimento, que geralmente envolve um método de contagem de células algais. Técnicas convencionais de contagem de células, como aquelas utilizando microscópio óptico, envolvem um trabalho intensivo e demorado (Jamers et al., 2009). A este respeito, a citometria de fluxo pode ser

uma ferramenta alternativa, uma vez que permite uma contagem rápida e precisa, permitindo a análise de milhares de células por segundo (Franklin et al., 2004). Além disso, a citometria de fluxo realiza a análise multiparamétrica de uma ampla gama de propriedades celulares por medição dos sinais de dispersão da luz e autofluorescência da clorofila *a* das algas (Franklin et al., 2004; Prado et al., 2011; Stachowski-Haberkorn et al., 2013). A citometria de fluxo tem sido reconhecida como sendo útil em diversos estudos envolvendo o fitoplâncton, tais como avaliações ecotoxicológicas em laboratório (e.g. Prado et al., 2011; Suman et al., 2015), em microcosmos *in situ* (e.g. Stachowski-Haberkorn et al., 2008, 2009) ou para monitorar as populações naturais no campo (e.g. Sarmiento et al., 2008; Schiaffino et al., 2013).

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos dos agrotóxicos diuron e carbofuran e sua mistura sobre a microalga *Raphidocelis subcapitata*. Para isso, testes de toxicidade crônica foram realizados com os compostos individuais (ingredientes ativos e produtos comerciais) e em mistura (ingredientes ativos) e analisados utilizando a citometria de fluxo. Os *endpoints* avaliados nos testes de toxicidade com os agrotóxicos individuais foram a taxa de crescimento, o conteúdo de clorofila *a*, a fluorescência da clorofila *a* e a complexidade e o tamanho celular, e nos testes de toxicidade de mistura o *endpoint* analisado foi a taxa de crescimento das algas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Organismo-teste e condições de cultivo

Os exemplares iniciais de *Raphidocelis subcapitata* foram obtidos de culturas-estoque do Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal de São Carlos. As culturas de *R. subcapitata* foram mantidas em meio LC Oligo (AFNOR, 1980), sob iluminação contínua (4306 lux), temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) e agitação manual três vezes ao dia. Nos testes de toxicidade, somente células algais em fase de crescimento exponencial com até 72h de idade foram utilizadas (Ver Figura 1, Apêndice A referente ao crescimento da *R. subcapitata* até o 12º dia nas condições de cultivo).

2.2. Substâncias e soluções-teste

Os compostos diuron (CAS n° 330-54-1) e carbofuran (CAS n° 1563-66-2) com pureza $\geq 98\%$ (padrão analítico) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O grau de pureza do produto comercial Diuron Nortox[®] 500 SC (adquirido de Nortox S/A, Brasil) é de 50% m/v de ingrediente ativo (69,4% m/v de ingredientes inertes) e do Furadan[®] 350 SC (adquirido de FMC, Brasil) é de 35% m/v de ingrediente ativo (65% m/v de ingredientes inertes). As soluções estoques de diuron administrado como Diuron Nortox[®] 500 SC (100 mg i.a. L⁻¹), carbofuran padrão (100 mg i.a. L⁻¹) e carbofuran administrado como Furadan[®] 350 SC (100 mg i.a. L⁻¹) foram preparadas pela diluição de uma quantidade específica de cada composto em água destilada imediatamente antes dos testes, com a exceção do diuron padrão, o qual foi preparado em acetonitrila grau HPLC (Merck[®]) devido à sua baixa solubilidade em água (35,6 mg L⁻¹ a 20 °C). Por sua vez, as concentrações nominais de cada composto testado foram obtidas pela diluição da solução-estoque em meio de cultura (água reconstituída).

Para confirmar as concentrações nominais utilizadas nos ensaios, as soluções-teste foram analisadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) (Agilent Technologies 1200, Waldbronn, Alemanha), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD). As condições cromatográficas de análise foram: coluna Zorbax ODS C18 (250mm \times 4,6mm \times 5 μ m) (Agilent Technologies, USA) e temperatura de forno de 25 °C. A fase móvel isocrática utilizada foi acetonitrila: água Milli-Q (70:30, v/v) durante 6 minutos, seguido de *post time* de 2 minutos, com volume de injeção de 20 μ L e taxa de fluxo de 1,0 mL min⁻¹. As análises foram realizadas em triplicatas. Com base nos sinais de absorbância observados no espectro DAD das soluções-padrão e a partir da literatura (Cappellini et al., 2012; Liyanage et al., 2006; Qun e Rohrer, 2012; Rocha et al., 2013), o diuron e o carbofuran foram detectados e quantificados a 254 nm e 280 nm, respectivamente. As soluções-teste de carbofuran foram analisadas por injeção direta em HPLC e as soluções-teste de diuron passaram por processo de extração em fase sólida (SPE) para concentração do composto antes da injeção em HPLC.

A SPE realizada foi adaptada do método descrito por Cappellini et al. (2012). Para a extração do analito carbofuran foram utilizados cartuchos Chromabond[®] C18ec (6 mL, 500 mg) (Macherey-Nagel, Duren, Alemanha) em um dispositivo para SPE tipo manifold. Os cartuchos foram inicialmente condicionados com 10 mL de acetonitrila e 10 mL de água ultra-pura Milli-Q, seguida da adição de 50 mL de amostra sob vácuo, em triplicata. O analito

foi eluído com 5 mL de acetonitrila, e posteriormente submetido à evaporação com nitrogênio e reconstituído em 0,5 mL de acetonitrila para as análises cromatográficas.

Os parâmetros utilizados para a validação do método foram seletividade, linearidade, limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), exatidão, precisão e recuperação (Lanças, 2004). Os cromatogramas gerados mostraram que o método de análise do diuron e do carbofuran em água foi seletivo para estes compostos (Figuras 2 e 3, Apêndice A). Os resultados para LD, LQ, coeficiente de correlação linear da curva (r), precisão, exatidão e recuperação para os agrotóxicos estudados são apresentados na Tabela 1. As curvas analíticas para diuron e para carbofuran são mostradas no Apêndice A (Figuras 4 e 5).

Tabela 1. Parâmetros analíticos utilizados para a validação do método de análise de diuron e carbofuran nas soluções-teste utilizadas nos testes de toxicidade.

	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r	Precisão média (%)	Exatidão média (%)	Recuperação média (%)
Diuron	1,58	4,80	0,9999	0,53±0,37	98,14±7,25	98,32±5,59
Carbofuran	10,44	31,65	0,9999	0,66±0,40	98,90±6,36	-

LD = Limite de Detecção; LQ = Limite de Quantificação; r = coeficiente de correlação. Os valores indicados como média correspondem a média aritmética de $n = 6$ (média \pm desvio padrão).

Considerando-se a pré concentração do diuron de 100 vezes, uma vez que empregou-se 50 mL de amostra para extração, resultando em 0,5 mL de extrato final, o método empregado possibilitou a quantificação do diuron em concentrações a partir de 0,048 $\mu\text{g L}^{-1}$.

2.3. Testes de toxicidade com os compostos individuais

Os testes de toxicidade crônica com *R. subcapitata* seguiram as diretrizes da Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA, 2002). Após os testes preliminares, a faixa de concentrações para cada composto foi estabelecida e os testes de toxicidade foram realizados com os seguintes intervalos de concentrações nominais: 1,25 a 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ de diuron e 400 a 25600 $\mu\text{g L}^{-1}$ de carbofuran. As concentrações nominais testadas para os ingredientes ativos nas formas padrão e comercial foram iguais.

Os ensaios foram realizados em frasco Erlenmeyer de vidro de 250 mL de capacidade contendo 100 mL de solução-teste ou meio de cultura (controle). No caso do diuron padrão, foi necessário adicionar um controle do solvente (meio de cultura + acetonitrila) com uma

concentração nominal de 0,01% de acetonitrila (v/v). Os frascos-teste foram inoculados com uma concentração inicial de 10^4 células mL^{-1} e mantidos sob as mesmas condições (iluminação, temperatura, agitação e meio) descritas para o cultivo das algas. Três réplicas foram usadas por tratamento. As células foram expostas aos compostos durante 96 horas e foram amostradas diariamente (24, 48, 72 e 96 h) a partir de cada frasco-teste após agitação manual. A contagem das células das amostras foi realizada por citometria de fluxo. Para cada tratamento, a taxa de crescimento relativa (TCR) foi calculada usando a equação descrita em Bao et al. (2011) e a inibição do crescimento (em percentagem) foi calculada pela comparação entre as taxas de crescimento dos controles (considerada 100%) com os diferentes tratamentos.

No final dos testes de toxicidade com os compostos selecionados, alíquotas das soluções-teste foram coletadas para determinação da concentração de clorofila *a*, a qual foi realizada segundo o método descrito em Golterman et al. (1978).

Testes de toxicidade crônica com a substância de referência cloreto de sódio (NaCl) foram realizados para avaliar as condições fisiológicas dos organismos e, por conseguinte, a validade dos ensaios. Além disso, as variáveis pH e temperatura da água foram medidos no início e no final de todos os testes de toxicidade.

Um teste de toxicidade preliminar comparando a contagem de células algais por citometria de fluxo e contagem direta usando microscopia óptica e um hemocítômetro foi realizado utilizando a substância de referência NaCl.

2.4. Análise por citometria de fluxo

Para contagem de células algais em citometria de fluxo, alíquotas do controle e dos diferentes tratamentos dos testes de toxicidade foram recolhidas em criotubos e fixadas imediatamente com formaldeído 10% tamponado com bórax (concentração final de 1%). Os criotubos foram deixados no escuro durante 10 min em temperatura ambiente e armazenados em nitrogênio líquido a -80 °C até a análise. As células de *R. subcapitata* foram contadas em um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson) equipado com laser de íon-argônio de 15 mW (emissão em 488 nm). Para análise, em 500 μL de subamostra foram adicionadas esferas fluorescentes (6 μm , microesferas de carboxilato Fluoresbrite[®], Polysciences Inc., Warrington, PA, EUA) como padrões internos. As células das algas foram identificadas em citogramas utilizando os parâmetros de *side scatter* (SSC-H) versus fluorescência vermelha

(FL3-H), conforme os procedimentos descritos em Sarmiento et al. (2008). A aquisição de dados foi realizada com o software BD CellQuest Pro 6 e a análise dos citogramas com o software FlowJo v.10.0.8. Foram também extraídos os valores médios de FL3-H (fluorescência da clorofila *a*), SSC-H (complexidade celular) e FSC-H (tamanho celular) da população de algas e das esferas e calculados valores de FL-3 relativo ($FL3-H_{\text{algas}}/FL3-H_{\text{esferas}}$), SSC-H relativo ($SSC-H_{\text{algas}}/SSC-H_{\text{esferas}}$) e FSC-H relativo ($SSC-H_{\text{algas}}/SSC-H_{\text{esferas}}$), expressos em unidades arbitrárias.

2.5. Testes de toxicidade dos compostos em mistura

Para os testes de toxicidade crônica (96h) da mistura de diuron e carbofuran, um design experimental que incluiu simultaneamente tanto testes para cada composto isolado como um conjunto de 23 combinações foi selecionadas para o ensaio. Um *design* experimental de razão fixa (Cassee et al., 1998) (Figura 1) foi utilizado para as misturas com o objetivo de obter uma cobertura mais confiável do efeito dos dois agrotóxicos. Concentrações nominais das misturas foram calculadas com base nas forças tóxicas esperadas de 0,375 (0,125 + 0,25; 0,25 + 0,125), 0,5 (0,125 + 0,375; 0,25 + 0,25; 0,375 + 0,125), 0,75 (0,125 + 0,625; 0,25 + 0,5; 0,375 + 0,375; 0,5 + 0,25; 0,625 + 0,125), 1 (0,125 + 0,875; 0,25 + 0,75; 0,375 + 0,625; 0,5 + 0,5; 0,625 + 0,375; 0,75 + 0,25; 0,875 + 0,125), 1,5 (0,5 + 1; 0,75 + 0,75; 1 + 0,5), 1,75 (0,75 + 1; 1 + 0,75) e 2 (1 + 1) unidades tóxicas (UT). Uma UT foi igual à CI_{50-96h} obtida a partir dos testes com cada agrotóxico individual. Os testes de mistura foram realizados segundo os mesmos protocolos utilizados nos testes de exposições individuais dos agrotóxicos, porém com duas réplicas por tratamento. O parâmetro avaliado nos experimentos de mistura foi o efeito sobre a taxa de crescimento das algas.

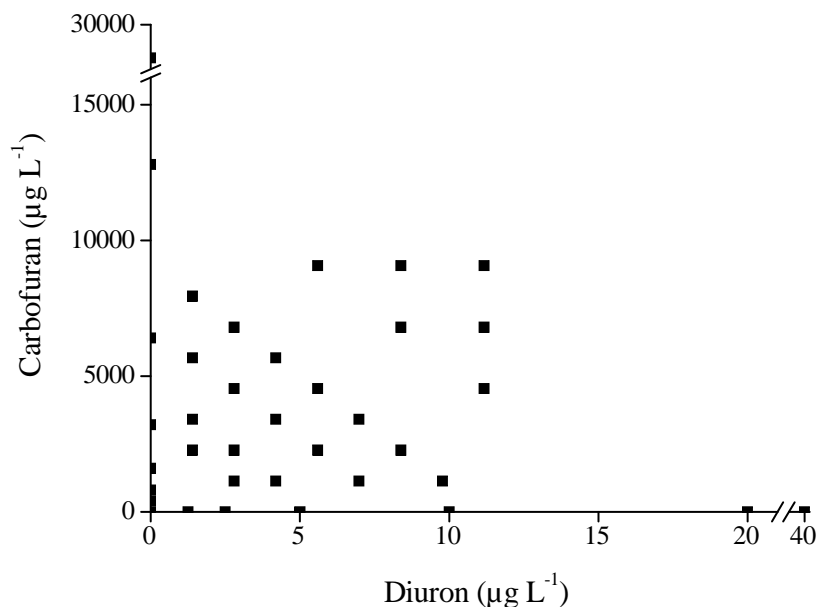


Figura 1. *Design* experimental esquemático das combinações estabelecidas para os testes de toxicidade das misturas dos agrotóxicos diuron e carbofuran.

2.6. Análise de Dados

Os valores de CI_{50-96h} dos testes de toxicidade crônica e seus respectivos valores de *slope* para as exposições individuais aos agrotóxicos selecionados foram calculados por regressão não linear, usando uma curva logística de três parâmetros (SYSTAT, 2008). Esta curva é descrita pela seguinte equação: $Y_i = \max / 1 + (C_i / CI50_i)^{\beta_i}$; em que Y_i é a resposta de um determinado parâmetro; \max é a sua resposta máxima; C_i é a concentração do produto químico i ; $CI50_i$ é a concentração de inibição do químico i e β_i é o *slope* para o químico i . Os valores de CENO e CEO para os testes crônicos foram obtidos pela análise de variância (ANOVA). O teste de Dunnett para comparações múltiplas com o controle foi realizado quando os dados seguiram uma distribuição normal. Nos testes estatísticos, diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SigmaPlot v. 11.0 (SYSTAT, 2008).

Os resultados obtidos para os testes de toxicidade com as misturas foram analisados por meio dos modelos conceituais de adição de concentração (CA) e ação independente (IA). Em primeiro lugar, os dados observados foram comparados com o efeito combinado esperado calculado a partir das exposições individuais, utilizando a ferramenta MIXTOX (Jonker et al., 2005). Em segundo lugar, o modelo foi estendido, tal como descrito por Jonker et al. (2005) e os três desvios dos modelos de referência, tais como interações sinérgicas/antagônicas (S/A), desvio dependente da proporção da dose (*dose ratio*

dependence - DR) e dependente do nível da dose (*dose level dependence* - DL) foram modelados pela adição de dois parâmetros (“a” e “b”). O parâmetro “a”, em desvios sinérgicos e antagônicos, torna-se, respectivamente, negativo ou positivo. Para o desvio dependente da proporção da dose (DR), um segundo parâmetro “b_{DR}” está incluído além do parâmetro “a”, permitindo que o papel de cada composto na mistura seja identificado. Para descrever o desvio dependente do nível da dose (DL), novamente um segundo parâmetro “b_{DL}” é incluído além do parâmetro “a”. O valor de “a” indica o desvio em baixas e altas doses e o valor de “b_{DL}” indica em que nível da dose o desvio muda. Mais detalhes sobre estas funções são apresentados em Jonker et al. (2005) e na Tabela 2. Os dados foram ajustados aos modelos conceituais e desvios, e o melhor ajuste foi escolhido pelo método de máxima verossimilhança. Após identificado um modelo estatisticamente mais descritivo do desvio, o padrão de efeitos foi deduzido diretamente dos valores dos parâmetros (Tabela 2) e o desvio máximo calculado em termos de nível de efeito (Jonker et al., 2005; Freitas et al., 2014).

Tabela 2. 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)	Parâmetro "b" (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 a < 0 - sinergismo, exceto para aquelas proporções de misturas onde um valor de b positivo significativo indica antagonismo	b _i > 0 - antagonismo onde a toxicidade da mistura é causada principalmente pelo toxicante <i>i</i> b _i < 0 - sinergismo onde a toxicidade da mistura é causada principalmente pelo toxicante <i>i</i>	
Dependente do nível da dose (DL)	a > 0 - antagonismo em nível da dose baixo e sinergismo em nível da dose alto a < 0 - sinergismo em nível da dose baixo e antagonismo em nível da dose alto	b _{DL} > 1 - mudança em nível da dose menor do que CE ₅₀ b _{DL} = 1 - mudança em CE ₅₀ 0 < b _{DL} < 1 - mudança em nível da dose maior do que CE ₅₀ b _{DL} < 0 - sem mudança, mas a magnitude do S/A é dependente do nível da dose	b _{DL} > 2 - mudança em nível da dose menor do que CE ₅₀ b _{DL} = 2 - mudança em CE ₅₀ 1 < b _{DL} < 2 - mudança em nível da dose maior do que CE ₅₀ b _{DL} < 1 - sem mudança, mas a magnitude do S/A é dependente do nível de efeito

3. Resultados

3.1. Variáveis abióticas dos testes de toxicidade e análises químicas

Durante os testes de toxicidade, os valores de pH das soluções-teste permaneceram dentro do intervalo de 7,4 e 8,2 e não variaram mais de 1,0 unidade. A temperatura da água em todos os testes de toxicidade variou entre 24,7 e 25,6 °C. Assim, todos os testes preencheram os critérios estabelecidos nas orientações da USEPA (2002).

Após análise das soluções-teste em HPLC-DAD, verificou-se que, tanto nos testes de toxicidade com os compostos individuais (padrão e comercial) (Figura 6, Apêndice A) como nos testes de toxicidade com as misturas (Tabela 1, Apêndice A), as concentrações reais do diuron e do carbofuran diferiram menos de 10% das concentrações nominais. Portanto, os resultados foram calculados com base nas concentrações nominais, como sugerido pela ISO 10706 (2000).

3.2. Testes de toxicidade com os compostos individuais

Para todos os compostos testados, o coeficiente de variação das réplicas nos controles dos testes de crescimento populacional não excedeu 10%, como recomendado pelas diretrizes da USEPA (2002). Em todos os experimentos com o diuron padrão, o controle e o controle do solvente não apresentaram diferença significativa, excluindo a possibilidade de efeitos do solvente (0,01% de acetonitrila, v/v) sobre os resultados de toxicidade. Os testes utilizando a substância de referência NaCl indicaram que a sensibilidade de *R. subcapitata* ($CE_{50-48h} = 2,80 \pm 0,45 \text{ g L}^{-1}$) estava dentro da faixa esperada (faixa de referência: 1,74 a 4,49 g L^{-1} , Vieira, 2010) após exposição de 96 horas a este composto.

A técnica de contagem de células algais por citometria de fluxo utilizada nos testes de toxicidade demonstrou boa concordância com a técnica de contagem direta usando microscopia óptica. Os dois métodos apresentaram uma correlação significativa ($r = 0,999$, $p < 0,001$, segundo correlação de Pearson) e um valor de r^2 de 0,998 para a regressão linear dos dados (dados brutos na Tabela 2, no Apêndice A).

As curvas de crescimento populacional (em número de células mL^{-1}) para *R. subcapitata* exposta aos agrotóxicos diuron e carbofuran (ingrediente ativo padrão e produto comercial) durante 96h mostraram uma forte diminuição no número de células nas maiores

concentrações testadas (Figura 2). Em comparação ao controle, as reduções na densidade de algas foram superiores a 82% na maior concentração testada dos compostos após 96h de exposição.

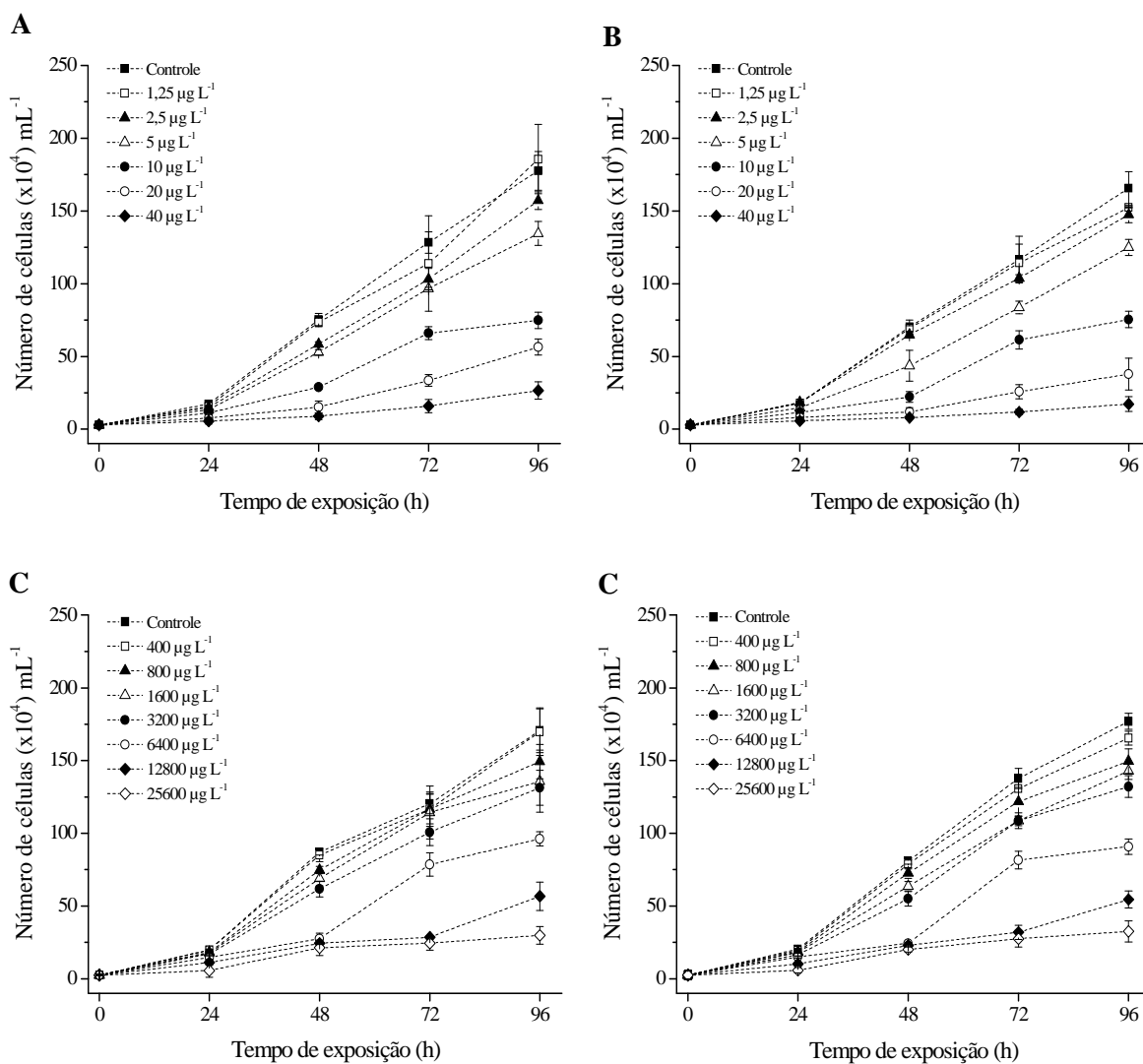


Figura 2. Curvas de crescimento populacional de *Raphidocelis subcapitata* (número de células $\times 10^4$ mL⁻¹) após 96 horas de exposição a diferentes concentrações de diuron padrão (A), diuron administrado como Diuron Nortox[®] 500 SC (B), carbofuran padrão (C) e carbofuran administrado como Furadan[®] 350 SC (D).

Os valores médios de IC₅₀-96h e seus respectivos intervalos de confiança de 95% para cada composto testado são apresentados na Tabela 3. De acordo com os resultados, tanto para o diuron como para o carbofuran, a toxicidade do ingrediente ativo na forma padrão e comercial foi similar para a espécie *R. subcapitata*, não havendo qualquer diferença

significativa entre eles ($p > 0,05$). Além disso, como esperado, o herbicida diuron foi mais tóxico do que inseticida carbofuran a microalga *R. subcapitata*.

Tabela 3. Valores médios de CI_{50-96h} e intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para cada composto testado para a microalga *Raphidocelis subcapitata*.

Compostos	CI_{50-96h} (IC 95%)
Diuron (ingrediente ativo padrão) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	10,4 (8,5 - 12,2)
Diuron (Diuron Nortox [®] 500 SC) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	9,3 (8,1 - 10,5)
Carbofuran (ingrediente ativo padrão) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	7426,5 (5618,9 - 9234,2)
Carbofuran (Furadan [®] 350 SC) ($\mu\text{g L}^{-1}$)	6974,7 (5810,4 - 8139,1)

Os testes de toxicidade crônica (96h) mostraram que todos os compostos apresentaram concentrações que inibiram significativamente a taxa de crescimento da microalga *R. subcapitata* (Figura 3). Para o diuron, tanto o ingrediente ativo padrão (Figura 3A) como o seu produto comercial (Figura 3B) inibiram significativamente o crescimento da alga nas concentrações de 5 a 40 $\mu\text{g L}^{-1}$, como evidenciado pelo teste de Dunnett (diuron padrão: $F_{7,16} = 152,4$, $p < 0,001$; diuron produto comercial: $F_{6,14} = 187,4$, $p < 0,001$). Em relação à inibição da taxa de crescimento, a maior concentração de diuron (ingrediente ativo padrão e produto comercial) sem qualquer efeito observável (CENO) foi 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto que a menor concentração que causou um efeito observável (CEO) foi 5 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para o carbofuran, uma inibição significativa do crescimento foi observada em populações de *R. subcapitata* expostas às concentrações de 1600 a 25600 $\mu\text{g L}^{-1}$ de carbofuran padrão (Figura 3C) e 800 a 25600 $\mu\text{g L}^{-1}$ de carbofuran administrado como Furadan[®] 350 SC (Figura 3D), tal como evidenciado teste de Dunnett (carbofuran padrão: $F_{7,16} = 46,8$, $p < 0,001$; carbofuran produto comercial: $F_{7,16} = 132,4$, $p < 0,001$). O valor de CENO e CEO para carbofuran padrão foi de 800 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 1600 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, enquanto que o CENO e CEO para carbofuran do produto comercial foi de 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 800 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.

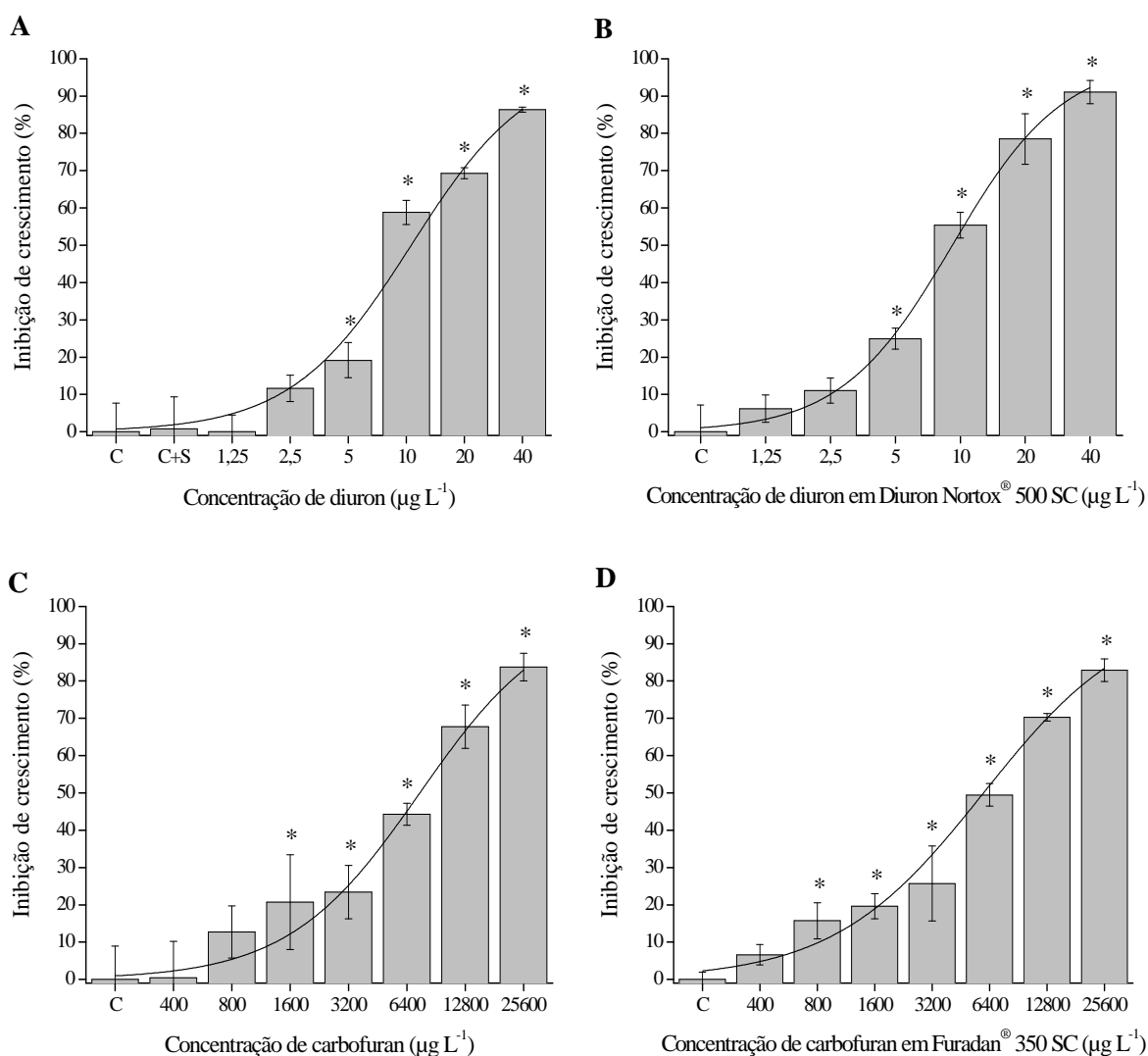


Figura 3. Inibição da taxa de crescimento (%) de *Raphidocelis subcapitata* exposta a diferentes concentrações de diuron padrão (A), diuron administrado como Diuron Nortox[®] 500 SC (B), carbofuran padrão (C) e carbofuran administrado como Furadan[®] 350 SC (D). A linha representa a curva de ajuste logístico. O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle ($p \leq 0,05$).

Em relação aos efeitos dos agrotóxicos sobre o conteúdo de clorofila *a*, todos os compostos testados resultaram em concentrações que aumentaram significativamente o conteúdo de clorofila *a* nas células algais, em comparação com o controle (diuron padrão: $F_{7,16} = 56,2$, $p < 0,001$; diuron produto comercial: $F_{6,14} = 7,2$, $p = 0,001$; carbofuran padrão: $F_{7,16} = 26,9$, $p < 0,001$; carbofuran produto comercial: $F_{7,16} = 15,8$, $p < 0,001$) (Figura 4). Para o diuron padrão (Figura 4A) e sua formulação comercial (Figura 4B), as concentrações que aumentaram o conteúdo de clorofila *a* celular foram 10, 20 e 40 $\mu\text{g L}^{-1}$, enquanto que

para o carbofuran padrão (Figura 4C) e formulação comercial (Figura 4D) foram 6400, 12800 e 25600 $\mu\text{g L}^{-1}$.

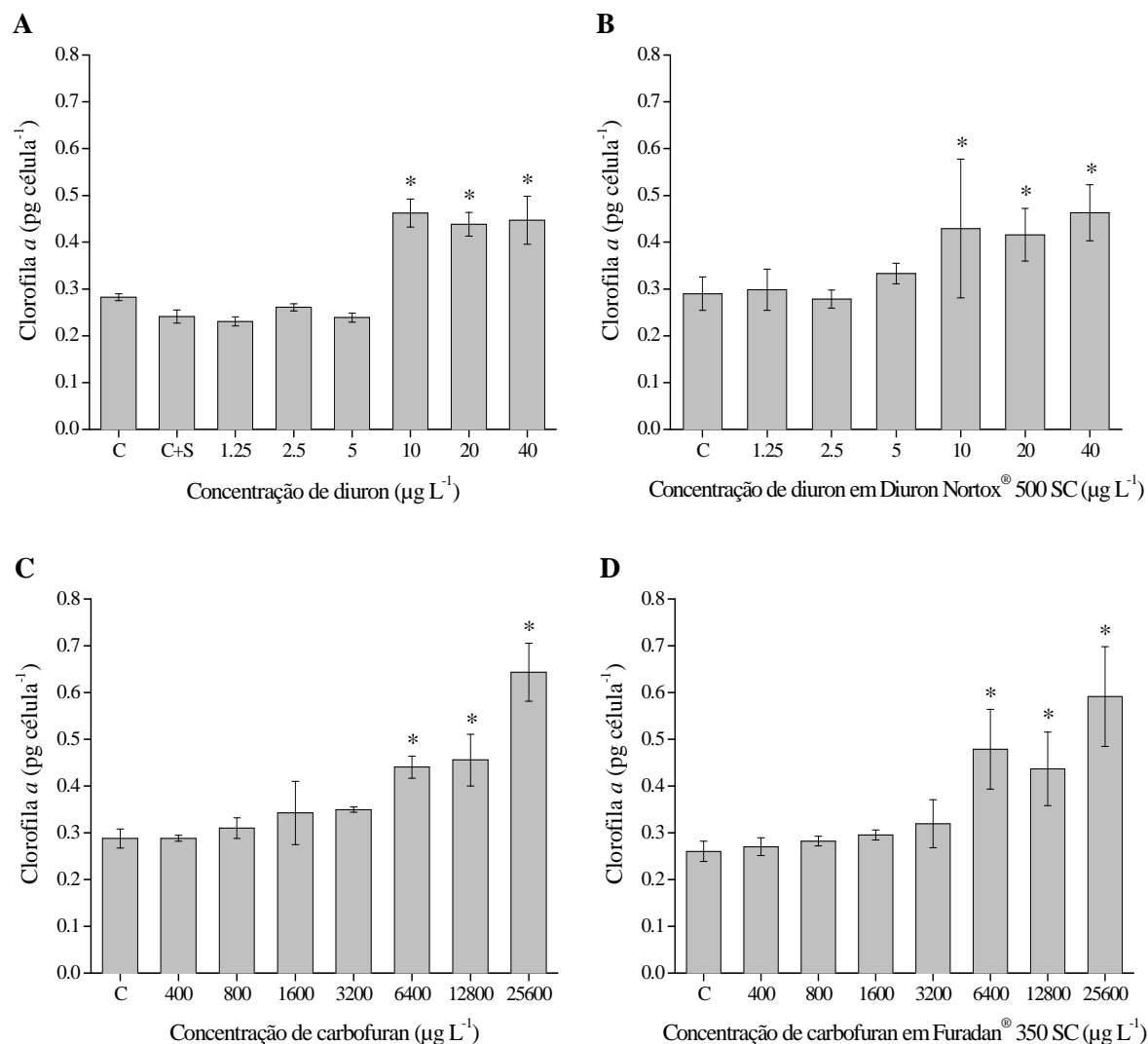


Figura 4. Concentração de clorofila *a* (pg célula^{-1}) em *Raphidocelis subcapitata* exposta a diferentes concentrações de diuron padrão (A), diuron administrado como Diuron Nortox[®] 500 SC (B), carbofuran padrão (C) e carbofuran administrado como Furdan[®] 350 SC (D). O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle ($p \leq 0,05$).

A partir dos dados de citometria de fluxo, alterações na fluorescência da clorofila *a* (FL3-H relativo), na complexidade (SSC-H relativo) e no tamanho celular (FSC-H relativo) das algas foram verificadas em comparação com o controle (Figura 5). O diuron, tanto na forma padrão como comercial (Figura 5A e 5B, respectivamente), causou um aumento significativo da fluorescência da clorofila *a* nas concentrações de 10 a 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ e também da complexidade e do tamanho celular nas concentrações de 5 e 40 $\mu\text{g L}^{-1}$. Carbofuran, tanto

na forma padrão como comercial (Figura 5C e 5D, respectivamente) apresentou efeitos similares sobre as algas, que também aumentaram significativamente a fluorescência da clorofila *a* (3200 a 25600 $\mu\text{g L}^{-1}$) e a complexidade e o tamanho celular das algas (12800 e 25600 $\mu\text{g L}^{-1}$).

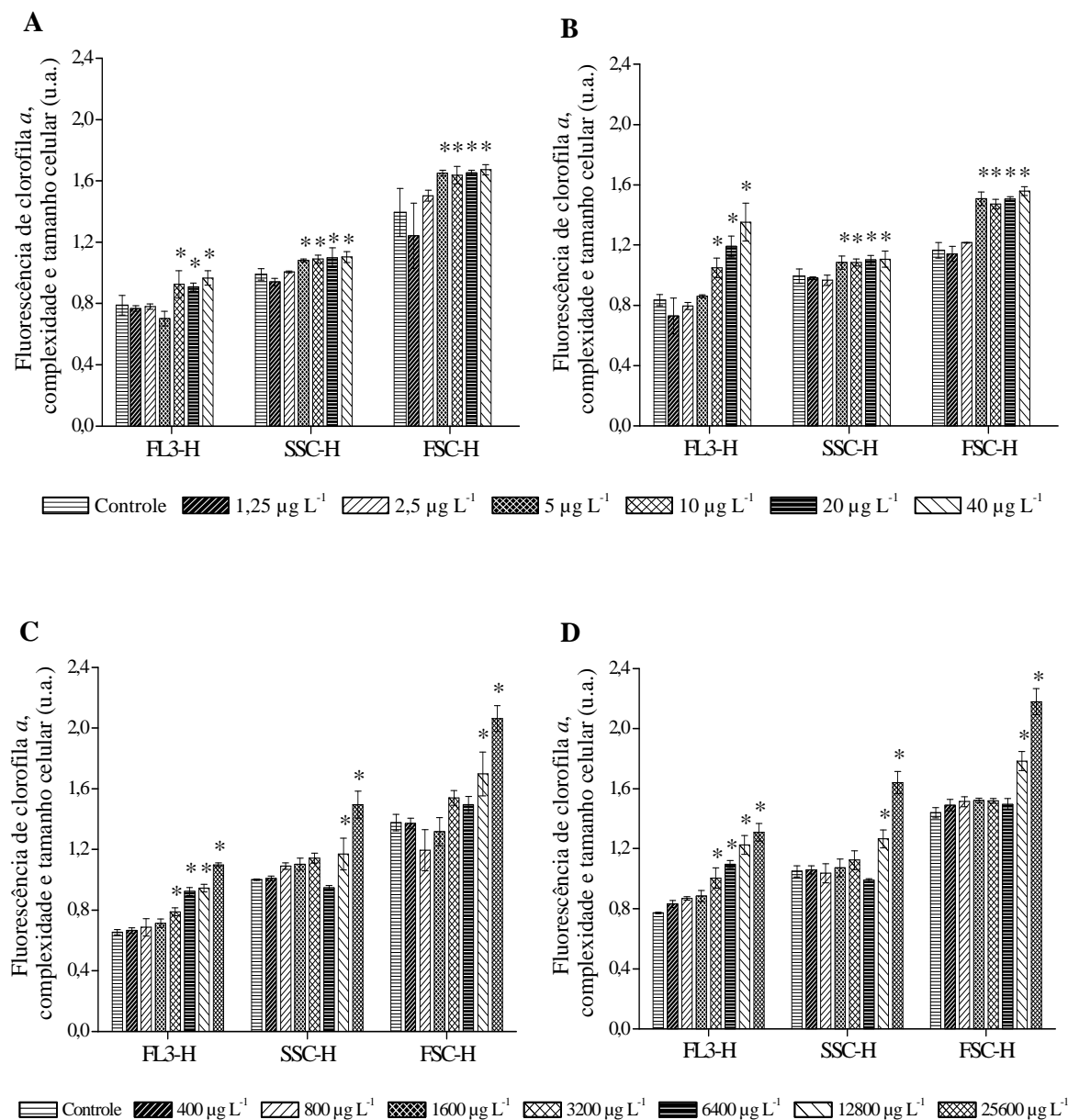


Figura 5. Valores médios de fluorescência da clorofila *a* (FL3-H), complexidade (SSC-H) e tamanho celular (FSC-H) da população de *Raphidocelis subcapitata* exposta a diferentes concentrações de diuron padrão (A), diuron administrado como Diuron Nortox[®] 500 SC (B), carbofuran padrão (C) e carbofuran administrado como Furadan[®] 350 SC (D). O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle ($p \leq 0,05$). Os valores são expressos em unidades arbitrárias (u.a.).

3.3. Testes de toxicidade dos compostos em mistura

Como os testes de toxicidade individuais mostraram que a toxicidade dos ingredientes ativos nas formas padrão e comercial não apresentaram diferenças significativas, optou-se por realizar os testes de mistura somente com os ingredientes ativos padrões. O valor de CI_{50-96h} para cada composto testado individualmente no curso dos testes de mistura foi $13,1 \pm 1,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para diuron padrão e $8333,2 \pm 1898,8 \mu\text{g L}^{-1}$ para o carbofuran padrão.

Embora o modo de ação do diuron (feniluréia) como inibidor de fotossíntese em algas seja bem conhecido, o modo de ação do carbofuran (carbamato) sobre as algas ainda não está bem estabelecido. Por isso, neste estudo optou-se por testar os dois modelos de referência (CA e IA) para avaliar a resposta de *R. subcapitata* quando exposta à mistura destes dois agrotóxicos.

Todos os parâmetros e resultados dos testes de significância obtidos pelos ajustes da ferramenta MIXTOX são mostrados na Tabela 4. O ajuste dos dados da mistura ao modelo de CA produziu uma soma dos quadrados dos resíduos (SS) de 0,62 ($p < 0,05$; $r^2 = 0,81$). Após a adição de parâmetro “a” para o modelo de CA, de modo a descrever o desvio S/A, o valor de SS diminuiu para 0,39 e foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$; $r^2 = 0,88$). Para o desvio dependente da dose (DR), quando os parâmetros “a” e “b_{DR}” foram adicionados, houve uma diminuição do valor de SS para 0,32 que foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$; $r^2 = 0,90$). O desvio dependente do nível da dose (DL) não foi significativo ($p = 0,854$) (Tabela 4). Assim, o desvio DR para o modelo de CA apresentou o melhor ajuste, e explicou 90% dos dados. Com isso, verificou-se que a interação dos agrotóxicos na mistura foi dependente da proporção da dose (DR), sendo que ocorreu antagonismo em altas concentrações de carbofuran e baixas de diuron e sinergismo em altas concentrações do diuron e baixas de carbofuran. O sinergismo da toxicidade da mistura foi causada principalmente pelo diuron (Figura 6).

Tabela 4. Parâmetros e testes de ajuste dos modelos de referência utilizando o MIXTOX aplicado à taxa de crescimento de *Raphidocelis subcapitata* exposta durante 96h à mistura dos agrotóxicos diuron e carbofuran.

	Adição de Concentração				Ação Independente			
	CA	S/A	DR	DL	IA	S/A	DR	DL
max	0,93	0,92	0,92	0,92	0,93	0,93	0,93	0,93
β_{Diuron}	2,13	2,90	2,79	3,40	3,22	4,04	4,16	2,87
$\beta_{\text{Carbofuran}}$	7,32	705,85	705,85	705,86	7,84	19,07	65,94	17,03
CI ₅₀ para Diuron	15,98	11,69	14,26	7126,41	9,63	13,21	12,81	14,19
CI ₅₀ para Carbofuran	12786,18	12773,73	12773,73	12773,96	10642,73	10642,78	10643,94	10642,81
a	-	0,90	2,36	-0,05	-	-4,50	-7,66	-1,83
b _{DR/DL}	-	-	-3,83	13,51	-	-	5,48	-4,97
SS	0,62	0,39	0,32	0,39	0,54	0,37	0,36	0,36
r ²	0,81	0,88	0,90	0,88	0,83	0,88	0,89	0,89
χ^2 ou teste F	33,84	17,21	7,33	0,03	40,05	13,60	1,58	1,56
df	-	1,00	1,00	1,00	-	1,00	1,00	1,00
p (χ^2/F)	4,45 x 10 ⁻¹¹	0,00003	0,007	0,854	5,00 x 10 ⁻¹²	0,0002	0,209	0,212

max é o valor máximo da resposta; β é o *slope* da curva de resposta à dose individual; CI₅₀ é a concentração mediana de inibição de crescimento; a, b_{DR} e b_{DL} são os parâmetros da função; SS é a soma dos quadrados dos resíduos; r² é o coeficiente de regressão; Teste χ^2 ou F é o teste estatístico; df é o grau de liberdade; p (χ^2/F) é o nível de significância do teste estatístico. CA é o modelo de adição de concentração e IA é o modelo de ação independente (ambos modelos de referência), S/A é o desvio sinergismo ou antagonismo, DR é o desvio dependente da proporção da dose e DL é o desvio dependente do nível da dose.

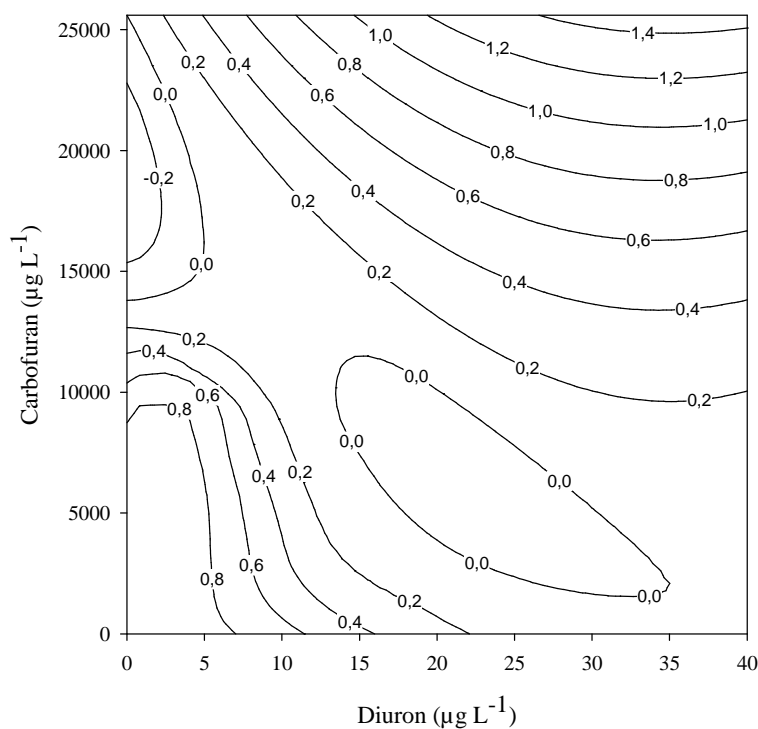


Figura 6. Isoblograma do efeito da mistura de diuron e carbofuran sobre a taxa de crescimento de *Raphidocelis subcapitata* a partir do desvio dependente da proporção da dose (DR) do modelo de Adição de Concentração (CA).

O ajuste dos dados da mistura de diuron e carbofuran ao modelo de IA produziu um valor de SS de 0,54 ($p < 0,05$; $r^2 = 0,83$). Após a adição de parâmetro “a” para o modelo de CA, de modo a descrever o desvio S/A, o valor de SS diminuiu para 0,37 e foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$; $r^2 = 0,88$). Os desvios DR e DL não foram estatisticamente significativos ($p = 0,209$ e $p = 0,212$, respectivamente) (Tabela 4). Portanto, o desvio S/A para o modelo de IA apresentou o melhor ajuste para os dados e indicou interações sinérgicas (aumento da toxicidade) entre os agrotóxicos diuron e carbofuran quando misturados (Figura 7). Apesar do desvio DR para o modelo de IA não ter sido significativo, a Figura 7 mostra que o sinergismo ocorreu quando o diuron foi o produto químico dominante na mistura, mas que o antagonismo tem a possibilidade de ocorrer quando o carbofuran estiver em altas concentrações na mistura.

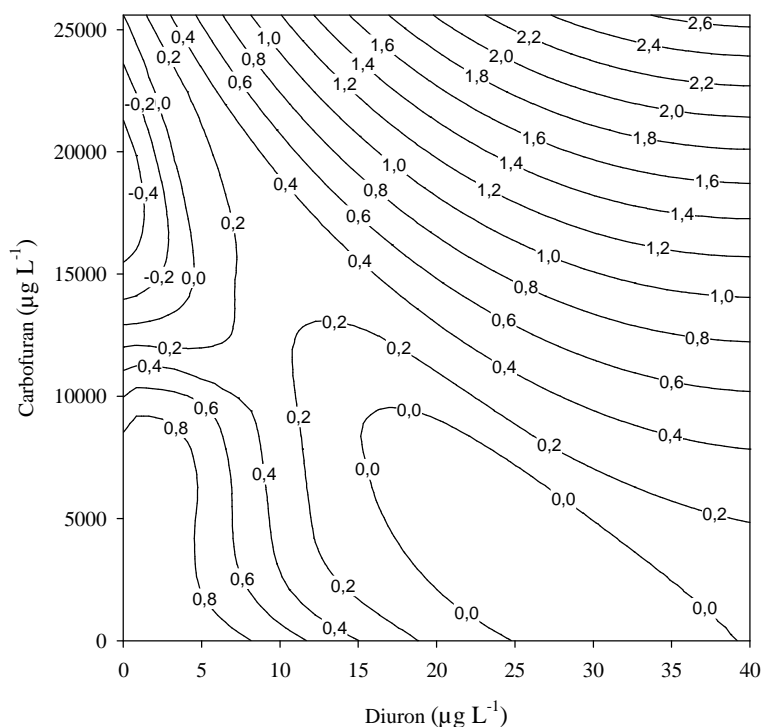


Figura 7. Isoblograma do efeito da mistura de diuron e carbofuran sobre a taxa de crescimento de *Raphidocelis subcapitata* a partir do desvio sinergismo/antagonismo (S/A) do modelo de Ação Independente (IA).

4. Discussão

4.1. Efeitos tóxicos dos compostos em ação individual

No presente estudo, a toxicidade do diuron e do carbofuran nas formas padrão e comercial sobre a alga *R. subcapitata* foi comparada. Como os produtos comerciais dos agrotóxicos contêm o ingrediente ativo misturado com os chamados ingredientes “inertes” e sabendo-se que estes compostos podem ser fisicamente, quimicamente e biologicamente ativos (Cox e Surgan, 2006), inicialmente acreditava-se na hipótese que a toxicidade dos ingredientes ativos testados seria alterada por estas substâncias inertes. No entanto, especificamente para esta espécie e produtos comerciais, a toxicidade dos ingredientes ativos nas formas padrão e comercial não apresentaram diferenças significativas. Estes resultados diferem da maioria das pesquisas, que relatam uma toxicidade maior do produto comercial quando comparada à do ingrediente ativo (e.g. Cedergreen e Streibig, 2005; Pereira et al., 2009; Beggel et al., 2010; Mullin, 2015; Kroon et al., 2015). Entretanto, Pessoa et al. (2011), ao compararem a toxicidade do carbofuran e a de seu produto comercial Furadan® 350 SC para larvas de peixe *Oreochromis niloticus*, encontraram valores similares de CL₅₀-96h para estes compostos, indicando que a potência tóxica do ingrediente ativo não foi afetada pelas substâncias “inertes” adicionadas na formulação comercial, como ocorrido no presente estudo. Testes de toxicidade com outras espécies de algas utilizando o ingrediente ativo padrão e sua formulação comercial são necessários, pois podem revelar respostas tóxicas diferentes das obtidas neste estudo, tanto devido aos ingredientes inertes associados como pelas respostas de toxicidade serem normalmente espécie-específicas.

Como esperado, o herbicida diuron foi altamente tóxico à microalga *R. subcapitata*, enquanto que o inseticida/ acaricida/ nematicida carbofuran foi somente levemente tóxico a esta espécie. A alta toxicidade do diuron sobre algas e plantas aquáticas deve-se ao modo de ação específico deste composto sobre organismos autotróficos. Este herbicida liga-se ao sítio da plastoquinona (QB) na proteína D1, bloqueando o transporte de elétrons no fotossistema II e, conseqüentemente, inibindo o processo da fotossíntese (Krieger-Liszkay, 2005). Já o carbofuran é um inibidor da acetilcolinesterase, considerado muito tóxico para peixes e invertebrados aquáticos (Ibrahim e Harabawy, 2014), porém não possui um modo de ação específico em organismos autotróficos.

Neste estudo, o diuron e o carbofuran causaram efeitos tóxicos significativos sobre o crescimento populacional de *R. subcapitata*. As curvas de crescimento das algas após 96h de exposição aos agrotóxicos mostraram reduções da densidade de células em comparação ao controle nas maiores concentrações dos compostos. Além disso, os agrotóxicos apresentaram concentrações que inibiram significativamente a taxa de crescimento das algas. Estes dados estão coerentes com os de outros autores, os quais relataram os efeitos destes agrotóxicos sobre o crescimento celular de microalgas (e.g. Arzul et al., 2006; Ma et al., 2006a, 2006b; Zhang et al., 2012).

Magnusson et al. (2008) estudaram o efeito de três herbicidas (diuron, hexazinona e atrazina) sobre duas microalgas bentônicas, a *Navicula* sp. (Heterokontophyta) e *Nephroselmis pyriformis* (Chlorophyta) e observaram que o diuron causou alta inibição da taxa de crescimento e foi, dentre os três, o que apresentou maior toxicidade para ambas as algas. Ma et al. (2006b) avaliaram a toxicidade de 40 herbicidas sobre a alga *R. subcapitata* e, considerando o parâmetro inibição de crescimento, o herbicida diuron foi o mais tóxico. Larras et al. (2013) analisaram a sensibilidade de 11 espécies de diatomáceas bentônicas para diuron e demonstraram através de curvas de sensibilidade das espécies (SSDs) que diuron foi altamente tóxico para as algas. Reduções na densidade e taxa de crescimento podem alterar a composição de comunidades de algas planctônicas e bentônicas. Vários estudos revelaram efeitos negativos da exposição de diuron sobre a biomassa (em níveis de clorofila *a*) e a produção primária em comunidades de fitoplâncton (Perschbacher e Ludwig, 2004; Knauert et al., 2008, 2009; Knauer et al., 2010) e perifiton (McClellan et al., 2008; Tlili et al., 2008, 2010; Ricart et al., 2009; López-Doval et al., 2010).

O valor de CI_{50-96h} para *R. subcapitata* exposta ao diuron (ingrediente ativo padrão) encontrado neste estudo foi próximo ao verificado por Fai et al. (2007), menor do que o registrado por Zhang et al. (2012) e maior do que o valor observado por Ma et al. (2006b) (Tabela 5). Em comparação com outros organismos autotróficos, *R. subcapitata* foi mais sensível ao diuron do que a cianobactéria *Synechococcus* sp., as algas *Achnanthydium minutissimum*, *Chaetoceros gracilis*, *Craticula accomoda*, *Desmodesmus subspicatus* e *Navicula forcipata* e a macrófita *Lemna minor*, embora menos sensível do que outras 8 espécies de algas, como pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5. Valores de toxicidade (CI₅₀ ou CE₅₀) obtidos a partir da literatura para diferentes espécies autotróficas expostas aos agrotóxicos diuron e carbofuran.

	Parâmetro	Valor (µg L ⁻¹)	Referência
DIURON			
<i>Synechococcus sp.</i>	CE ₅₀ 96h	110,0	Bao et al. (2011)
<i>Achnantheidium minutissimum</i>	CI ₅₀ 96h	108,0	Larras et al. (2012)
<i>Chaetoceros gracilis</i>	CI ₅₀ 72h	36,0	Koutsafitis e Aoyama (2006)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	CI ₅₀ 96h	2,3	Ma et al. (2002b)
<i>Chlorella vulgaris</i>	CI ₅₀ 96h	4,3	Ma et al. (2002a)
<i>Craticula accomoda</i>	CI ₅₀ 96h	1734,0	Larras et al. (2012)
<i>Desmodesmus subspicatus</i>	CI ₅₀ 72h	46,3	Masojidek et al. (2011)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	CE ₅₀ 96h	9,2	DeLorenzo et al. (2013)
<i>Navicula forcipata</i>	CI ₅₀ 96h	27,0	Gatidou e Thomaidis (2007)
<i>Nephroselmis pyriformis</i>	CI ₅₀ 72h	4,7	Magnusson et al. (2008)
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	CI ₅₀ 96h	10,4	Presente estudo
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	CI ₅₀ 72h	10,5	Fai et al. (2007)
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	CI ₅₀ 96h	0,4	Ma et al. (2006b)
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	CI ₅₀ 72h	22,3	Zhang et al. (2012)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	CI ₅₀ 96h	4,1	Ma (2002)
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	CI ₅₀ 96h	2,7	Ma et al. (2003)
<i>Skeletonema costatum</i>	CI ₅₀ 96h	5,9	Bao et al. (2011)
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	CI ₅₀ 96h	4,3	Bao et al. (2011)
<i>Lemna minor</i>	CI ₅₀ 168h	28,3	Gatidou et al. (2015)
CARBOFURAN			
<i>Anabaena flos-aquae</i>	CI ₅₀ 96h	7926,3	Ma et al. (2006a)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	CI ₅₀ 96h	4649,7	Ma et al. (2006a)
<i>Microcystis flosaquae</i>	CI ₅₀ 96h	11260,5	Ma et al. (2006a)
<i>Chaetoceros gracilis</i>	CE ₅₀ 72h	5110,0	Arzul et al. (2006)
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	CI ₅₀ 96h	14633,3	Ma et al. (2006a)
<i>Chlorella vulgaris</i>	CI ₅₀ 96h	7864,6	Ma et al. (2006a)
<i>Chlorella vulgaris</i>	CE ₅₀ 72h	9960,0	Arzul et al. (2006)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	CE ₅₀ 72h	7130,0	Arzul et al. (2006)
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	CI ₅₀ 96h	7426,5	Presente estudo
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	CE ₅₀ 72h	2600,0	Iesce et al. (2006)
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	CI ₅₀ 72h	158,2	Dobšíková (2003)
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	CI ₅₀ 96h	6219,1	Ma et al. (2006a)
<i>Scenedesmus acutus</i>	CI ₅₀ 96h	6774,5	Ma et al. (2006a)
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	CI ₅₀ 96h	37875,6	Ma et al. (2006a)

O diuron também causou alterações fisiológicas (conteúdo de clorofila *a*) e morfológicas (complexidade e tamanho celular) nas células algais de *R. subcapitata*. Após 96h de exposição, verificou-se neste estudo que o diuron aumentou significativamente o conteúdo de clorofila *a* nas células algais (observado tanto pela concentração celular como pela fluorescência) e também a complexidade e o tamanho celular das algas, em comparação com o controle. Efeitos similares sobre o teor de clorofila *a* já foram observados em outros estudos onde microalgas foram expostas a inibidores de fotossíntese como a atrazina (Adler et al., 2007), o isoproturon e terbutrina (Rioboo et al., 2002) e também ao diuron (Magnusson et al., 2008; Stachowski-Haberkorn et al., 2013). Magnusson et al. (2008) sugeriram que este efeito poderia ser uma estratégia para compensar a ação do diuron. À medida que o herbicida inibe a fotossíntese, as células podem produzir mais clorofila, a fim de maximizar a captação de luz. Em relação à complexidade e o tamanho celular relativo, Stachowski-Haberkorn et al. (2013) observaram uma diminuição significativa nestes parâmetros quando as células da microalga *Tetraselmis suecica* foram expostas ao diuron, apresentando assim resultados contrários aos observados para *R. subcapitata* no presente estudo.

Para o carbofuran, alguns estudos ecotoxicológicos foram realizados com microalgas (e.g. Arzul et al., 2006; Dobšíková, 2003; Iesce et al., 2006; Ma et al., 2006a). Ma et al. (2006a) examinaram os efeitos de cinco inseticidas carbamatos, entre eles o carbofuran, sobre três cianobactérias e cinco algas verdes, e observaram que a cianobactéria *Microcystis aeruginosa* e a alga *R. subcapitata* (nomeada neste estudo de *Selenastrum capricornutum*) foram as espécies mais sensíveis ao carbofuran. Arzul et al. (2006), ao avaliarem a taxa de crescimento de algas expostas ao carbofuran, verificaram que este agrotóxico causou efeitos horméticos significativos na alga *Chlorella vulgaris*, em que a concentração de 880 µg L⁻¹ de carbofuran estimulou o crescimento e concentrações a partir de 4620 µg L⁻¹ de carbofuran reduziram a taxa de crescimento desta alga. Além disso, estes mesmos autores observaram inibições significativas nas taxas de crescimento das algas marinhas *Chaetoceros gracilis* e *Phaeodactylum tricornutum*. Azizullah et al. (2011) em um trabalho realizado com *Euglena gracilis* mostrou que o carbofuran pode influenciar na motilidade e orientação deste organismo.

No presente estudo, o valor de CI₅₀-96h para *R. subcapitata* exposta ao carbofuran (ingrediente ativo padrão) foi próximo ao registrado por Ma et al. (2006a), porém maior do que os valores observados por Dobšíková (2003) e Iesce et al. (2006) (Tabela 5). Em comparação com outros organismos autotróficos, *R. subcapitata* foi mais sensível ao

carbofuran do que a cianobactéria *Microcystis flosaquae* e as algas *Chlorella pyrenoidosa*, *C. vulgaris* e *Scenedesmus quadricauda*, como pode ser observado pela Tabela 5.

O carbofuran causou alterações fisiológicas (conteúdo de clorofila *a*) e morfológicas (complexidade e tamanho celular) nas células algais de *R. subcapitata*. Similarmente ao observado para o diuron, o carbofuran também aumentou significativamente o conteúdo de clorofila *a* nas células algais, além da complexidade e do tamanho celular, em comparação com o controle. No estudo de Megharaj et al. (1993), a concentração de clorofila *a* ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de *Chlorella vulgaris* aumentou em concentrações de 2 e 5 mg L^{-1} e diminuiu em concentrações acima de 10 mg L^{-1} de carbofuran. Segundo estes autores, o aparelho fotossintético desta alga foi grandemente perturbado em células cultivadas na presença de carbofuran. No presente estudo, provavelmente o aumento do conteúdo de clorofila *a* pode ser uma estratégia para compensar a ação do carbofuran sobre o aparelho fotossintético de *R. subcapitata*. De acordo com Azizullah et al. (2011), um produto químico pode afetar o tamanho e formato da célula por exercer stress osmótico ou interagir com a membrana plasmática da célula. Estes mesmos autores demonstraram em seu trabalho que o carbofuran afetou a forma da célula de *Euglena gracilis*. A interação do carbofuran com propriedades da membrana (Azizullah et al., 2011; Megharaj et al., 1993) pode ser uma possível explicação para as alterações sobre a complexidade e o tamanho celular de *R. subcapitata* no presente estudo.

No Brasil, os agrotóxicos diuron e carbofuran foram detectados em altas concentrações nos ambientes aquáticos, sendo estas de 0,9 a 408 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o diuron (e.g. Britto et al., 2012; Dantas et al., 2011; Dores et al., 2009; Paschoalato et al., 2008) e de 0,1 a 68,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o carbofuran (e.g. Caldas et al., 2011; Carbo et al., 2008; Loro et al., 2015; Ribeiro et al., 2013). De acordo com estas concentrações reais, o diuron apresenta alto risco ecológico de causar efeitos tóxicos sobre as algas nos corpos d'água brasileiros, podendo alterar a composição e estrutura das comunidades e o funcionamento dos ecossistemas aquáticos. No caso do carbofuran, se este composto ocorresse isoladamente no ambiente, os organismos autotróficos estariam aparentemente protegidos. No entanto, como o carbofuran ocorre em misturas com outros agrotóxicos, como por exemplo o diuron, interações sinérgicas podem ocorrer, afetando diretamente as populações de algas. Além disso, as concentrações ambientais observadas para o carbofuran podem causar efeitos tóxicos sobre consumidores primários sensíveis (e.g. microcrustáceos e larvas de peixes) e indiretamente afetar as microalgas pela redução de seu predador.

4.2. Efeitos tóxicos dos compostos em mistura

Neste estudo, os resultados dos testes de toxicidade da mistura de diuron e carbofuran foram analisados utilizando os dois modelos de referência, a Adição de Concentração (CA) e a Ação Independente (IA). A priori, considerando somente o modo de ação específico de cada composto sobre os organismos, o modelo IA deveria ser selecionado. No entanto, em relação ao agrotóxico diuron, o modo de ação sobre espécies autotróficas está bem definido, mas o mecanismo de ação de carbofuran sobre as microalgas ainda não está claro. Segundo Walter et al. (2002), para a maioria dos compostos químicos que ocorrem no ambiente, frequentemente não existem informações suficientes sobre os seus modos de ação que permitiriam classificá-los em grupos de ação similares ou diferentes. Assim, quando os modos de ação dos produtos químicos são desconhecidos, alguns autores (e.g. Loureiro et al., 2010; Pavlaki et al., 2011) sugerem que os dois modelos (CA e IA) sejam utilizados e o que melhor se ajustar aos dados seja selecionado.

Faust et al. (2003) testaram misturas de 16 biocidas com mecanismos de ação diferentes sobre a alga *Scenedemus vacuolatus* e demonstraram que o modelo conceitual IA apresentou uma melhor previsão quando comparado ao modelo CA. O efeito da mistura de níquel e clorpirifós foi testado ao cladóceros *Daphnia magna* e neste estudo ambos os modelos (CA e IA) foram igualmente bem ajustáveis aos dados, mostrando o mesmo padrão de desvio (Loureiro et al., 2010). Backhaus et al. (2004) investigaram a toxicidade da mistura de 12 feniluréias a alga *S. vacuolatus*. Estes autores, reconhecendo que os compostos apresentavam modos de ação similares, esperavam que apenas o modelo CA teria um bom poder preditivo para os efeitos das misturas, no entanto, o conceito de IA provou ter um igual poder para prever as toxicidades das misturas de feniluréias (Backhaus et al., 2004).

No presente estudo, os dados dos testes de toxicidade da mistura dos agrotóxicos se ajustaram bem em ambos os modelos de referência (CA e IA), mas apresentaram desvios diferentes. Para o modelo CA, o desvio dependente da proporção da dose (DR) apresentou o melhor ajuste e indicou antagonismo em altas concentrações de carbofuran e baixas de diuron e sinergismo em altas concentrações do diuron e baixas de carbofuran, sendo que o sinergismo da toxicidade da mistura foi causada principalmente pelo diuron. Para o modelo de IA, o desvio sinergismo/antagonismo (S/A) apresentou o melhor ajuste para os dados e indicou interações sinérgicas entre os agrotóxicos diuron e carbofuran quando misturados.

De modo geral, os dois modelos evidenciaram a ocorrência do sinergismo na mistura destes compostos, principalmente quando o diuron é o produto químico dominante na mistura. Além disso, considerando que as concentrações de diuron testadas são ambientalmente relevantes e que somente baixas concentrações de carbofuran podem ocorrer no ambiente, o efeito de sinergismo da mistura destes compostos é mais provável ocorrer nos ecossistemas aquáticos.

De acordo com dos dados da literatura, este é o primeiro estudo feito para avaliar os efeitos da mistura do diuron e do carbofuran sobre a microalga *R. subcapitata*. Para esta espécie, estudos de misturas foram realizados utilizando outros agrotóxicos. Como exemplo, podem ser citadas as pesquisas de Perez et al. (2011), que analisaram os efeitos de misturas binárias de herbicidas (atrazina, simazina, terbutilazina e metolacoloro) sobre a taxa de crescimento de *R. subcapitata* e de Fernández-Alba et al. (2002), que avaliaram os efeitos de misturas binárias de herbicidas (diuron, irgarol, tributilestanho e Kathon 5287) e fungicidas (clorotalonil, diclofluanida e TCMTB) sobre *R. subcapitata* (nomeada como *Selenastrum capricornotum*). As misturas binárias de herbicidas (irgarol e diuron) e um herbicida e fungicida (irgarol e clorotalonil; irgarol e TCMTB) causaram interações sinérgicas no estudo de Fernández-Alba et al. (2002).

DeLorenzo e Serrano (2003) analisaram a toxicidade de duas misturas (atrazina e clorpirifós; atrazina e clorotalonil) para a alga marinha *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta). A mistura de atrazina (herbicida) e clorpirifós (inseticida) exibiu uma toxicidade aditiva, enquanto que a mistura de atrazina e clorotalonil (fungicida) causou um efeito sinérgico, sendo que a toxicidade da mistura foi aproximadamente 2 vezes maior do que a dos produtos químicos individuais (DeLorenzo e Serrano, 2003).

Em uma recente revisão feita por Cedergreen et al. (2014), estes autores encontraram que em 95% dos 69 casos sinérgicos descritos para agrotóxicos, as misturas sinérgicas incluíam inibidores da colinesterase ou fungicidas azólicos. Segundo estes pesquisados, ambos os grupos de agrotóxicos são conhecidos por interferirem na degradação metabólica de outros xenobióticos. No entanto, casos de sinergia envolvendo um inibidor de colinesterase nas misturas binárias de agrotóxicos para organismos autotróficos não foram ainda relatados (Cedergreen et al., 2014). Assim, ressalta-se a importância do presente estudo, que mostra um caso de interação sinérgica da mistura de um inibidor de colinesterase (carbofuran) com uma feniluréia (diuron) para uma microalga.

No que se refere à toxicidade ao organismo, as interações entre os produtos químicos podem afetar diversos processos, tais como biodisponibilidade, adsorção, distribuição, metabolismo (biotransformação), ligação ao sítio alvo e excreção (Cedergreen et al., 2014). De acordo com Cedergreen et al. (2014), as interações sinérgicas são provavelmente causados pelas interações em torno de um ou mais destes processos. Belden e Lydy (2000) verificaram que a mistura de uma trazina (atrazina) com um organofosforado (clorpirifós) causou interações sinérgicas em larvas de *Chironomus tentans*. O aumento da toxicidade destes compostos em mistura foi explicado pelo fato da atrazina aumentar as taxas de biotransformação do composto organofosforado, convertendo-o num metabólito mais tóxico (Belden e Lydy, 2000). Cedergreen et al. (2014) propuseram que a interação sinérgica entre metais e herbicidas inibidores de fotossíntese em organismos autotróficos poderia ser devido à interação de metais com enzimas responsáveis pela reparação, o que impediria a reparação do fotossistema II danificado e também dos danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas pela inibição da fotossíntese e pelos próprios metais. Embora existam exemplos de mecanismos que causam sinergia em espécies de invertebrados e organismos autotróficos, não existe na literatura informações sobre um mecanismo semelhante que possa explicar as interações sinérgicas da mistura do diuron e do carbofuran sobre a alga *R. subcapitata*.

Segundo Neuwoehner et al. (2010), para a alga *R. subcapitata*, os produtos de degradação de diuron (3,4-DCA, DCPU, MCPDMU) são menos tóxicos do que o composto parental. Assim, talvez o aumento das taxas de biotransformação de diuron não explicariam o aumento da toxicidade em *R. subcapitata*. Para trabalhos futuros, são importantes estudos sobre os mecanismos responsáveis pelo sinergismo entre o diuron e o carbofuran.

Estudos realizados no Brasil (e.g. Carbo et al., 2008; Souza, 2006) e em outros lugares do mundo (Bacigalupo e Meroni, 2007; Faggiano et al., 2010; Masiá et al., 2015) revelaram a presença simultânea de diuron e carbofuran nos ambientes aquáticos analisados. De acordo com os resultados deste estudo, a presença de diuron e carbofuran em mistura no ambiente aquático pode levar a um aumento de toxicidade para as algas e, portanto, causar efeitos mais devastadores nos ecossistemas. Assim, para uma melhor proteção dos ecossistemas aquáticos, faz-se necessário que as agências reguladoras considerem a toxicidade de misturas e não apenas as concentrações seguras para compostos individuais, uma vez que a mistura de diversas substâncias químicas é comum nos ambientes aquáticos.

5. Conclusões

Os resultados dos efeitos da mistura dos agrotóxicos diuron e carbofuran sobre a alga *R. subcapitata* obtidos neste estudo são inéditos. De acordo com o ajuste dos dados aos modelos de referência CA e IA, interações sinérgicas entre estes agrotóxicos podem ocorrer, principalmente quando o diuron é o produto químico dominante na mistura. Casos de sinergia envolvendo um inibidor de colinesterase em misturas binárias de agrotóxicos para organismos autotróficos não foram relatados na literatura até o presente momento, o que revela a importância deste estudo. Para esta espécie especificamente e produtos comerciais, a toxicidade dos ingredientes ativos nas formas padrão e comercial não apresentaram diferenças significativas, indicando que a potência tóxica do ingrediente ativo não foi afetada pelas substâncias “inertes” adicionadas na formulação comercial. A partir dos resultados dos testes de toxicidade individuais, ambos os agrotóxicos causaram efeitos tóxicos adversos sobre a microalga *R. subcapitata*. Concentrações ambientalmente relevantes de diuron inibiram significativamente o crescimento populacional das algas e causaram alterações fisiológicas (conteúdo de clorofila a) e morfológicas (complexidade e tamanho celular) nas células. Apesar dos efeitos tóxicos de carbofuran ocorrerem em altas concentrações, este agrotóxico em baixas concentrações pode interagir com o diuron, e aumentar a toxicidade deste sobre as algas. O aumento da toxicidade sobre o crescimento das algas causada pela mistura de diuron e carbofuran poderia representar um risco ambiental maior para o fitoplâncton. Assim, uma vez que o diuron e o carbofuran são encontrados em mistura nos ambientes naturais, nossos resultados reforçam que as avaliações de risco ecológicos devem considerar a toxicidade de misturas, a fim de evitar sub ou sobre-estimação dos seus efeitos sobre a comunidade fitoplanctônica.

Referências Bibliográficas

Adler, N.E., Schmitt-Jansen, M., Altenburger, R., 2007. Flow cytometry as a tool to study phytotoxic modes of action. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 297-306.

AFNOR - Association Française de Normalisation. 1980. Essais des eaux. Détermination de l'inhibition de *Scenedesmus subspicatus* par une substance. Norme expérimentale T90-304.

Arzul, G., Quiniou, F., Carrie, C., 2006. In vitro test-based comparison of pesticide-induced sensitivity in marine and freshwater phytoplankton. *Toxicol. Mech. Methods* 16 (8), 431-437.

Azizullah, A., Richter, P., Häder, D.P., 2011. Comparative toxicity of the pesticides carbofuran and malathion to the freshwater flagellate *Euglena gracilis*. *Ecotoxicology* 20 (6), 1442-1454.

Bacigalupo, M.A., Meroni, G., 2007. Quantitative determination of diuron in ground and surface water by time-resolved fluoroimmunoassay: seasonal variations of diuron, carbofuran, and paraquat in an agricultural area. *J. Agric. Food Chem.* 55 (10), 3823-3828.

Backhaus, T., Arrhenius, A., Blanck, H. 2004. Toxicity of a mixture of dissimilarly acting substances to natural algal communities: predictive power and limitations of independent action and concentration addition. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6363-6370.

Bao, V.W., Leung, K.M., Qiu, J.W., Lam, M.H., 2011. Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1147-1151.

Barata, C., Baird, D.J., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M., Riva, M.C., 2006. Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for multi-substance risks assessment. *Aquat Toxicol.* 78, 1-14.

Beggel, S., Werner, I., Connon, R.E., Geist, J.P., 2010. Sublethal toxicity of commercial insecticide formulations and their active ingredients to larval fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Sci. Total Environ.* 408 (16), 3169-3175.

Belden, J.B., Lydy, M.J., 2000. Impact of atrazine on organophosphate insecticide toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2266-2274.

Bliss, C.I., 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann. Appl. Biol.* 26, 585-615.

Britto, F.B., Vasco, A.N.D., Pereira, A.P.S., Júnior, M., Vieira, A., Nogueira, L.C., 2012. Herbicides in the upper Poxim River, Sergipe, and the risk of contamination of water resources. *Revista Ciência Agronômica* 43, 390-398.

Caldas, S., Primel, E., Zanella, R., 2011. Risk estimate of water contamination and occurrence of pesticide in the South of Brazil. In *Herbicides and environment*. Kortekamp, A. (Ed.), INTECH Open Access Publisher, 471-492.

Cappelini, L.T.D., Cordeiro, D., Brondi, S.H.G., Prieto, K.R., Vieira, E.M., 2012. Development of methodology for determination of pesticides residue in water by SPE/HPLC/DAD. *Environ. Tech.* 33 (20), 2299-2304.

Carbo, L., Souza, V., Dores, E.F., Ribeiro, M.L., 2008. Determination of pesticides multiresidues in shallow groundwater in a cotton-growing region of Mato Grosso, Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* 19 (6), 1111-1117.

Cassee, F.R., Groten, J.P., Bladeren, P.J., Feron, V.J., 1998. Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures. *Crit. Rev. Toxicol.* 28, 73-101.

Cedergreen, N., Streibig, J.C., 2005. The toxicity of herbicides to non-target aquatic plants and algae: Assessment of predictive factors and hazard. *Pest Manag. Sci.* 61, 1152-1160.

Cedergreen, N., Christensen, A.M., Kamper, A., Kudsk, P., Mathiassen, S.K., Streibig, J.C., Sorensen, H., 2008. A review of independent action compared to concentration addition as reference models for mixtures of compounds with different molecular target sites. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1621-1632.

Cedergreen, N., 2014. Quantifying synergy: a systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PloS One*, 9 (5), e96580.

Cox, C., Surgan, M., 2006. Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. *Environ. Health Perspect.* 114, 1803-1806.

Dantas, A.D.B., Paschoalato, C.F., Martinez, M.S., Ballejo, R.R., Di Bernardo, L., 2011. Removal of diuron and hexazinone from Guarany Aquifer groundwater. *Braz. J. Chem. Eng.* 28, 415-424.

DeLorenzo, M.E., Danese, L.E., Baird, T.D., 2013. Influence of increasing temperature and salinity on herbicide toxicity in estuarine phytoplankton. *Environ. Toxicol.* 28 (7), 35-371.

DeLorenzo, M.E., Serrano, L., 2003. Individual and mixture toxicity of three pesticides; atrazine, chlorpyrifos, and chlorothalonil to the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*. *J. Environ. Sci. Health Part B* 38 (5), 529-538.

Dobsikova, R., 2003. Acute toxicity of carbofuran to selected species of aquatic and terrestrial organisms. *Plant Protection Science-UZPI (Czech Republic)*.

Dores, E.F., Spadotto, C. A., Weber, O.L., Carbo, L., Vecchiato, A.B., Pinto, A.A., 2009. Environmental behaviour of metolachlor and diuron in a tropical soil in the central region of Brazil. *Water Air Soil Pollut.* 197, 175-183.

Fai, P.B., Grant, A., Reid, B., 2007. Chlorophyll a fluorescence as a biomarker for rapid toxicity assessment. *Environ. Toxicol. Chem.* 26 (7), 1520-1531.

Faggiano, L., de Zwart, D., García-Berthou, E., Lek, S., Gevrey, M., 2010. Patterning ecological risk of pesticide contamination at the river basin scale. *Sci. Total Environ.* 408 (11), 2319-2326.

Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Grimme, L.H., 2001. Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquat. Toxicol.* 56, 13-32.

Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Grimme, L.H., 2003. Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquat. Toxicol.* 63, 43-63.

Fernandez-Alba, A.R., Guil, M.D.H., Lopez, G.D., Chisti, Y., 2002. Comparative evaluation of the effects of pesticides in acute toxicity luminescence bioassays. *Anal. Chim. Acta.* 451, 195-202.

Ferreira, A.L.G., Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., 2008. Toxicity prediction of binary combinations of cadmium, carbendazim and low dissolved oxygen on *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 89, 28-39.

Franklin, N.M., Stauber, J. L., Lim, R.P., 2004. Development of multispecies algal bioassays using flow cytometry. *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (6), 1452-1462.

Freitas, E.C., Pinheiro, C., Rocha, O., Loureiro, S., 2014. 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* 31, 143-152.

Gatidou, G., Thomaidis, N.S., 2007. Evaluation of single and joint toxic effects of two antifouling biocides, their main metabolites and copper using phytoplankton bioassays. *Aquat. Toxicol.* 85, 184-191.

Gatidou, G., Stasinakis, A.S., Iatrou, E.I., 2015. Assessing single and joint toxicity of three phenylurea herbicides using *Lemna minor* and *Vibrio fischeri* bioassays. *Chemosphere* 119, 69-74.

Giacomazzi, S., Cochet, N., 2004. Environmental impact of diuron transformation: a review. *Chemosphere* 56, 1021-1032.

Golterman, H.L. Clymo, R.S., Ohnstad, M.A.M., 1978. Methods for physical and chemical analysis of freshwater. Oxford: BlackwellScientific Publications, 213p.

Jamers, A., Lenjou, M., Deraedt, P., Bockstaele, D.V., Blust, R., Coen, W.D., 2009. Flow cytometric analysis of the cadmium-exposed green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). *Eur. J. Phycol.* 44 (4), 541-550.

Jonker, M.J., Svendsen, C., Bedaux, J.J.M., Bongers, M., Kammenga, J.E., 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose-level dependent, or dose ratiodependent effects in mixture dose response analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2701-2713.

Ibrahim, A.T.A., Harabawy, A.S., 2014. Sublethal toxicity of carbofuran on the African catfish *Clarias gariepinus*: Hormonal, enzymatic and antioxidant responses. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 106, 33-39.

Iesce, M.R., Della Greca, M., Cermola, F., Rubino, M., Isidori, M., Pascarella, L., 2006. Transformation and ecotoxicity of carbamic pesticides in water. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 13 (2), 105-109.

ISO 10706, 2000. Water quality - determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.

Kaonga, C.C., Takeda, K., Sakugawa, H., 2015. Diuron, Irgarol 1051 and Fenitrothion contamination for a river passing through an agricultural and urban area in Higashi Hiroshima City, Japan. *Sci. Total Environ.* 518-519, 450-458.

Knauer, K., Leimgruber, A., Hommen, U., Knauert, S., 2010. Co-tolerance of phytoplankton communities to photosynthesis II inhibitors. *Aquat. Toxicol.* 96, 256-263.

Knauert, S., Dawo, U., Hollender, J., Hommen, U., Knauer, K., 2009. Effects of photosystem II inhibitors and their mixture on freshwater phytoplankton succession in outdoor mesocosms. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 836-845.

Knauert, S., Escher, B., Singer, H., Hollender, J., Knauer, K., 2008. Mixture toxicity of three photosystem II inhibitors (atrazine, isoproturon, and diuron) toward photosynthesis of freshwater phytoplankton studied in outdoor mesocosms. *Environ. Sci. Technol.* 42, 6424-6430.

Koutsaftis, A., Aoyama, I., 2006. The interactive effects of binary mixtures of three antifouling biocides and three heavy metals against the marine algae *Chaetoceros gracilis*. *Environ. Toxicol.* 21 (4), 432-439.

Krieger-Liszkay, A., 2005. Singlet oxygen production in photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 56, 337-346.

Kroon, F.J., Hook, S.E., Metcalfe, S., Jones, D., 2015. Altered levels of endocrine biomarkers in juvenile barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), following exposure to commercial herbicide and surfactant formulations. *Environ. Toxicol. Chem.* 34 (8), 1881-1890.

Lanças, F.L., 2004. Validação de métodos cromatográficos de análise. Ed. Rima, São Carlos.

Larras, F., Bouchez, A., Rimet, F., Montuelle, B., 2012. Using bioassays and species sensitivity distributions to assess herbicide toxicity towards benthic diatoms. *PloS One* 7 (8), e44458.

Larras, F., Montuelle, B., Bouchez, A., 2013. Assessment of toxicity thresholds in aquatic environments: Does benthic growth of diatoms affect their exposure and sensitivity to herbicides? *Sci. Total Environ.* 463, 469-477.

Liyanage, J.A., Watawala, R.C., Aravinna, A.P., Smith, L., Kookana, R.S., 2006. Sorption of carbofuran and diuron pesticides in 43 tropical soils of Sri Lanka. *J. Agri. Food Chem.* 54 (5), 1784-1791.

Liu, S.S., Wang, C.L., Zhang, J., Zhu, X.W., Li, W.Y., 2013. Combined toxicity of pesticide mixtures on green algae and photobacteria. *Ecotox. Environ. Saf.* 95, 98-103.

Loewe, S., Muischnek, H., 1926. Combined effects I announcement–implements to the problem. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 114, 313-326.

López-Doval, J.C., Ricart, M., Guasch, H., Romaní, A.M., Sabater, S., Muñoz, I., 2010. Does grazing pressure modify diuron toxicity in a biofilm community? *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 955-962.

Loro, V.L., Murussi, C., Menezes, C., Leitemperger, J., Severo, E., Guerra, L., Guerra, L., Costa, M., Perazzo, G.X., Zanella, R., 2015. Spatial and temporal biomarkers responses of *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) (Characiformes: Characidae) from the middle rio Uruguai, Brazil. *Neotrop. Ichthyol.* 13 (3), 569-578.

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.

Ma, J., 2002. Differential sensitivity to 30 herbicides among populations of two green algae *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 68 (2), 275-281.

Ma, J., Xu, L., Wang, S., Zheng, R., Jin, S., Huang, S., Huang, Y., 2002a. Toxicity of 40 herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51 (2), 128-132.

Ma, J., Zheng, R., Xu, L., Wang, S., 2002b. Differential sensitivity of two green algae, *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*, to 12 pesticides. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 52, 57-61.

Ma, J., Lin, F., Wang, S., Xu, L., 2003. Toxicity of 21 herbicides to the green alga *Scenedesmus quadricauda*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71, 594-601.

Ma, J., Lu, N., Qin, W., Xu, R., Wang, Y., Chen, X., 2006a. Differential responses of eight cyanobacterial and green algal species, to carbamate insecticides. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63 (2), 268-274.

Ma, J., Wang, S., Wang, P., Ma, L., Chen, X., Xu, R., 2006b. Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64, 456-462.

Magnusson, M., Heimann, K., Negri, A.P., 2008. Comparative effects of herbicides on photosynthesis and growth of tropical estuarine microalgae. *Mar. Pollut. Bull.* 56 (9), 1545-1552.

Magnusson, M., Heimann, K., Quayle, P., Negri, A.P., 2010. Additive toxicity of herbicide mixtures and comparative sensitivity of tropical benthic microalgae. *Mar. Pollut. Bull.* 60 (11), 1978-1987.

Masiá, A., Campo, J., Navarro-Ortega, A., Barceló, D., Picó, Y., 2015. Pesticide monitoring in the basin of Llobregat River (Catalonia, Spain) and comparison with historical data. *Sci. Total Environ.* 503-504, 58-68.

Masojídek, J., Souček, P., Máchová, J., Frolík, J., Klem, K., Malý, J., 2011. Detection of photosynthetic herbicides: Algal growth inhibition test vs. electrochemical photosystem II biosensor. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 117-122.

McClellan, K., Altenburger, R., Schmitt-Jansen, M., 2008. Pollution-induced community tolerance as a measure of species interaction in toxicity assessment. *J. Appl. Ecol.* 45, 1514-1522.

Megharaj, M., Pearson, H.W., Venkateswarlu, K., 1993. Toxicity of carbofuran to soil isolates of *Chlorella vulgaris*, *Nostoc linckia* and *N. muscorum*. *Appl. Microbiol. Biot.*, 39 (4-5), 644-648.

Mullin, C.A., 2015. Effects of inactive ingredients on bees. *Curr. Opin. Insect Sci.* 10, 194-200.

Neuwoehner, J., Zilberman, T., Fenner, K., Escher, B.I., 2010. QSAR-analysis and mixture toxicity as diagnostic tools: Influence of degradation on the toxicity and mode of action of diuron in algae and daphnids. *Aquat. Toxicol.* 97, 58-67.

Papadakis, E.N., Tsaboula, A., Kotopoulou, A., Kintzikoglou, K., Vryzas, Z., Papadopoulou-Mourkidou, E., 2015. Pesticides in the surface waters of Lake Vistonis Basin, Greece: Occurrence and environmental risk assessment. *Sci. Total Environ.* 536, 793-802.

Paschoalato, C., Dantas, A., Rosa, I., Faleiros, R., Bernardo, L.D., 2008. Use of activated carbon to remove the herbicides diuron and hexazinone from water. *Revista DAE* 179, 34-41.

Pavlaki, M.D., Pereira, R., Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., 2011. Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 99-110.

Pérez, J., Domingues, I., Soares, A. M., Loureiro, S., 2011. 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* 20 (6), 1167-1175.

Pereira, J.L., Antunes, S.C., Castro, B.B., Marques, C.R., Goncalves, A.M.M., Goncalves, F., Pereira, R., 2009. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. *Ecotoxicology* 18, 455-463.

Perschbacher, P.W., Ludwig, G.M., 2004 Effects of diuron and other aerially-applied cotton herbicides and defoliant on the plankton communities of aquaculture ponds. *Aquaculture* 233, 197-203.

Pessoa, P.C., Luchmann, K.H., Ribeiro, A.B., Veras, M.M., Correa, J.R.M.B., Nogueira, A.J., Bainy, A.C.D., Carvalho, P.S.M., 2011. Cholinesterase inhibition and behavioral toxicity of carbofuran on *Oreochromis niloticus* early life stages. *Aquat. Toxicol.* 105 (3), 312-320.

Prado, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, Á., 2011. Characterization of cell response in *Chlamydomonas moewusii* cultures exposed to the herbicide paraquat: Induction of chlorosis. *Aquat. Toxicol.* 102, 10-17.

Qun, X., Rohrer, J., 2012. Rapid HPLC determination of carbofuran and carbaryl in tap and environmental waters using on-line SPE. *Thermo Scientific Application Update*, 186.

Ribeiro, A.C.A., Dores, E.F.G.C., Amorim, R.S.S., Lourencetti, C., 2013. Resíduos de pesticidas em águas superficiais de área de nascente do Rio São Lourenço-MT: Validação de método por extração em fase sólida e cromatografia líquida. *Química Nova* 36 (2), 284-290.

Ribeiro, F., Gallego-Urrea, J. A., Goodhead, R. M., Van Gestel, C. A., Moger, J., Soares, A. M., Loureiro, S., 2014. Uptake and elimination kinetics of silver nanoparticles and silver nitrate by *Raphidocelis subcapitata*: The influence of silver behaviour in solution. *Nanotoxicology* 1, 1-10.

Ricart, M., Barceló, D., Geiszinger, A., Guasch, H., Alda, M.L.D., Romaní, A.M., Vidal, G., Villagrasa, M., Sabater, S., 2009. Effects of low concentrations of the phenylurea herbicide diuron on biofilm algae and bacteria. *Chemosphere* 76, 1392-1401.

Rioboo, C., Gonzalez, O., Herrero, C., Cid, A., 2002. Physiological response of freshwater microalga (*Chlorella vulgaris*) to triazine and phenylurea herbicides. *Aquat. Toxicol.* 59, 225-235.

Rioboo, C., Prado, R., Herrero, C., Cid, A., 2007. Population growth study of the rotifer *Brachionus* sp. fed with triazine-exposed microalgae. *Aquat. Toxicol.* 83, 247-53.

Rocha, P.R.R., Faria, A.T., G.S., Queiroz, M.E.L.R., Guimarães, F.C.N., Tironi, S.P., Silva, A.A., 2013. Half-life of diuron in soils with different physical and chemical attributes. *Ciência Rural* 43 (11), 1961-1966.

Sarmiento, H., Unrein, F., Isumbisho, M., Stenuite, S., Gasol, J. M., DESCY, J. P., 2008. Abundance and distribution of picoplankton in tropical, oligotrophic Lake Kivu, eastern Africa. *Freshwater Biol.* 53 (4), 756-771.

Schiaffino, M.R., Gasol, J.M., Izaguirre, I., Unrein, F., 2013. Picoplankton abundance and cytometric group diversity along a trophic and latitudinal lake gradient. *Aquat. Microb. Ecol.* 68, 231-250.

Schuler, L.J., Rand, G.M., 2008. Aquatic risk assessment of herbicides in freshwater ecosystems of south Florida. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 54 (4), 571-583.

Souza, V., 2006. Avaliação da contaminação de águas por resíduos de pesticidas em área de cultura de algodão: região de Primavera do Leste – MT. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, 125 p.

Stachowski-Haberkorn, S., Beker, B., Marie, D., Haberkorn, H., Coroller, L., Broise, D., 2008. Impact of Roundup on the marine microbial community, as shown by an in situ experiment. *Aquat. Toxicol.* 89, 232-241.

Stachowski-Haberkorn, S., Beker, B., Marie, D., Haberkorn, H., Quiniou, L., Broise, D., 2009. Comparative study of three analysis methods (TTGE, flow cytometry and HPLC) for xenobiotic impact assessment on phytoplankton communities. *Ecotoxicology* 18, 364-376.

Stachowski-Haberkorn, S., Jérôme, M., Rouxel, J., Khelifi, C., Rincé, M., Burgeot, T., 2013. Multigenerational exposure of the microalga *Tetraselmis suecica* to diuron leads to spontaneous long-term strain adaptation. *Aquat. Toxicol.* 140, 380-388.

Suman, T. Y., Rajasree, S. R., Kirubakaran, R., 2015. Evaluation of zinc oxide nanoparticles toxicity on marine algae *Chlorella vulgaris* through flow cytometric, cytotoxicity and oxidative stress analysis. *Ecotox. Environ. Saf.* 113, 23-30.

Systat, 2008. Systat Software, Incorporation SigmaPlot for Windows version 11.0.

Tlili, A., Dorigo, U., Montuelle, B., Margoum, C., Carlier, N., Gouy, V., Bouchez, A., Bérard, A., 2008. Responses of chronically contaminated biofilms to short pulses of diuron: An experimental study simulating flooding events in a small river. *Aquat. Toxicol.* 87, 252-263.

Tlili, A., Bérard, A., Roulier J.L, Volat, B., Montuelle, B., 2010. PO⁴³ - dependence of the tolerance of autotrophic and heterotrophic biofilm communities to copper and diuron. *Aquat. Toxicol.* 98, 165-77.

USEPA - US Environmental Protection Agency, 2002. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. Washington, DC.

Walter, H., Consolaro, F., Gramatica P., Scholze, M., Altenburger, R., 2002. Mixture toxicity of priority pollutants at no observed effect concentrations (NOECs). *Ecotoxicology* 11 (5), 299-310.

Zhang, L.J., Ying, G.G., Chen, F., Zhao, J.L., Wang, L., Fang, Y.X., 2012. Development and application of whole-sediment toxicity test using immobilized freshwater microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ. Toxicol. Chem.* 31 (2), 377-386.

Efeitos dos agrotóxicos diuron e carbofuran em suas formas padrão e comercial sobre *Paramecium caudatum*: o uso de protozoários em Ecotoxicologia**Resumo**

Os efeitos tóxicos dos agrotóxicos diuron e carbofuran sobre o protozoário de água doce *Paramecium caudatum* foram avaliados. Para isso, testes de toxicidade aguda e crônica foram realizados com diuron e carbofuran, nas suas formas padrão e formulações comerciais, Diuron Nortox[®] 500 SC e Furadan[®] 350 SC, respectivamente. A faixa de sensibilidade de *P. caudatum* à substância de referência cloreto de sódio também foi estabelecida. Os testes indicaram que a toxicidade do diuron padrão e de sua formulação comercial foi semelhante, enquanto que o carbofuran comercial foi mais tóxico do que a sua forma padrão. Nos testes de toxicidade aguda, as leituras foram realizadas em 2, 3, 4 e 6 horas e evidenciaram um aumento da mortalidade com o aumento do tempo de exposição. A sensibilidade de *P. caudatum* ao NaCl variou de 3,31 a 4,44 g L⁻¹, com média de 3,88 g L⁻¹. Para o diuron, a CL_{50-6h} foi de 64,6 ± 3,3 mg L⁻¹ para a sua forma padrão e 62,4 ± 2,5 mg L⁻¹ para a sua formulação comercial. O carbofuran foi menos tóxico do que diuron, apresentando uma CL_{50-6h} de 142,0 ± 2,4 mg L⁻¹ para a sua forma padrão e 70,4 ± 2,2 mg L⁻¹ para o seu produto comercial. Os testes de toxicidade crônica demonstraram que estes agrotóxicos causam uma diminuição significativa no crescimento populacional, no número de gerações e na biomassa de *P. caudatum*. O valor de CI_{50-24h} foi de 7,10 ± 0,58 mg L⁻¹ para o diuron padrão, 6,78 ± 0,92 mg L⁻¹ para o diuron comercial, 22,95 ± 3,57 mg L⁻¹ para o carbofuran padrão e 4,98 ± 0,62 mg L⁻¹ para o carbofuran comercial. Nossos resultados indicaram que *P. caudatum* foi um organismo-teste adequado e sensível para avaliar a toxicidade dos agrotóxicos diuron e carbofuran para o protozooplâncton de água doce e, tendo em conta o papel relevante dos protozoários nos ambientes aquáticos continentais, recomendamos fortemente a sua inclusão em estudos ecotoxicológicos.

Palavras-chaves: Ciliado; organismo-teste; toxicidade; herbicida; inseticida

1. Introdução

Os agrotóxicos têm por objetivo aumentar a produtividade agrícola, mas seu uso indiscriminado pode causar problemas graves devido à contaminação ambiental, que pode levar a grandes perdas de biodiversidade (Carvalho, 2006), e problemas de saúde pública (Daam e Van den Brink, 2010). Um dos principais problemas com a utilização destes compostos é que, como não são totalmente seletivos, eles podem causar efeitos tóxicos em organismos não-alvo, o que representa uma ameaça para o funcionamento dos ecossistemas terrestres e aquáticos (Schreinemachers e Tipraqsa, 2012). Quando aplicado ao solo e/ ou plantas, e, dependendo da persistência do composto no ambiente, os agrotóxicos são submetidos a uma série de processos bióticos e abióticos que podem envolver a degradação e/ ou transporte através de deriva, lixiviação e escoamento superficial a diferentes matrizes ambientais (e.g. água, sedimento, solo) (Wilson e Foos, 2006). Assim, o risco de contaminação da água no ambiente é bastante evidente, especialmente quando um ecossistema agrícola e corpos d'água estão em estreita proximidade (Abhilash e Singh, 2009).

Condições geoclimáticas de cada ecossistema influenciam diretamente os efeitos tóxicos dos agrotóxicos aos organismos não-alvo. Assim, avaliações de risco ambiental dessas substâncias em condições tropicais são essencialmente recomendadas (Daam e Van den Brink, 2010), considerando-se que nos trópicos, devido à mobilidade relativamente elevada dos agrotóxicos no solo e às chuvas torrenciais frequentes no verão, muitos defensivos aplicados nas culturas são lixiviados e, seus resíduos podem ser encontrados em águas superficiais e subterrâneas (Pinheiro et al., 2010; Wightwick e Allinson, 2007). Além disso, fatores tais como a qualidade do solo, que afetam a mobilidade dos compostos, e temperaturas mais elevadas que aumentam a solubilidade dos produtos em água e a absorção por organismos não-alvo, contribuem para o aumento dos riscos ambientais (Sanchez-Bayo e Hyne, 2011).

Atualmente, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos no mundo, seguido pelos EUA (Pelaez et al., 2013). Entre os pesticidas, diuron e carbofuran ocuparam em 2013 a 13ª e 26ª posição no ranking de vendas, respectivamente, sendo que 6100,96 toneladas de ingrediente ativo de diuron e 1739,81 toneladas de ingrediente ativo de carbofuran foram vendidas (IBAMA, 2014). O estado de São Paulo é a região que mais consome os agrotóxicos diuron e carbofuran, representando, respectivamente, 41% e 62% das vendas

totais, sendo usados principalmente em plantações de cana de açúcar. No entanto, em várias outras regiões do Brasil já foi relatada a contaminação de águas superficiais e subterrâneas por estes compostos. As concentrações máximas detectadas para diuron estiveram na faixa de 0,9 a 408,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Britto et al., 2012; Dantas et al., 2011; Dores et al., 2009; Paschoalato et al., 2008) e para carbofuran foram na faixa de 0,1 a 68,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Caldas et al., 2011; Carbo et al., 2008; Loro et al., 2015; Ribeiro et al., 2013).

O diuron é um herbicida pertencente à família fenilamida e da subclasse feniluréia. Este composto inibe a fotossíntese pelo bloqueio da cadeia de transporte de elétrons no fotossistema II em microrganismos e plantas fotossintéticas (Giacomazzi e Cochet, 2004). É amplamente utilizado em muitas culturas agrícolas, como cana de açúcar, citros, algodão, café, dentre outras, e sua dispersão pode levar à poluição do ambiente aquático principalmente por lixiviação do solo, conforme indicado pelo seu índice de vulnerabilidade de águas subterrâneas (*Groundwater Ubiquity Score* - GUS) de 2,58 (Cerdeira et al., 2015; Gooddy et al., 2002). Devido à sua elevada persistência (um mês a um ano), o diuron pode ser encontrado em muitas matrizes ambientais, tais como solo, sedimento e água (Field et al., 2003). O herbicida diuron é conhecido por ser ligeiramente tóxico para os mamíferos e aves, moderadamente tóxico para os peixes e pouco tóxico para os invertebrados aquáticos (Giacomazzi e Cochet, 2004).

O carbofuran é um inseticida, acaricida e nematicida conhecido por ligar-se à enzima acetilcolinesterase, inibindo a sua ação sobre a acetilcolina (Pessoa et al., 2011). Este carbamato é usado em quantidades crescentes em campos de arroz, algodão, café, cana de açúcar, feijão e milho (Ehler, 2004). Ambientes aquáticos são particularmente propensos à contaminação por carbofuran como indicado pelo seu índice de GUS de 4,52, caracterizando um risco relativamente alto de ser transportado do solo de áreas de aplicação aos corpos de água adjacentes após eventos de chuva (Carbo et al., 2008; Ribeiro et al., 2013). O agrotóxico carbofuran é considerado altamente tóxico para aves, abelhas e animais aquáticos, como peixes e invertebrados (Coletiva SPA, 2002; Ibrahim e Harabawy, 2014).

Uma avaliação aprofundada dos efeitos do diuron e do carbofuran para a vida aquática exigiria, evidentemente, uma investigação mais sistemática, envolvendo uma variedade de organismos-teste. Entre os organismos não-alvo, os protozoários ciliados são importantes componentes do ecossistema aquático e desempenham um papel crucial no funcionamento das teias alimentares (Madoni, 2006; Rehman et al., 2008). Os ciliados agem como um elo entre a produção bacteriana e os produtores secundários (Fenchel, 1987) e

desempenham funções importantes, tais como: aumento do processo de remineralização (Sherr e Sherr, 1984), controle da densidade bacteriana (Mansano et al., 2014) e mudanças na morfologia e composição taxonômica das comunidades bacterianas por predação (Corno et al., 2008). Além disso, protozoários são presas de organismos superiores e, como consequência, os contaminantes podem ser potencialmente transferidos ao longo das cadeias alimentares e afetarem organismos de níveis tróficos superiores (Mortuza et al., 2005; Gerhardt et al., 2010). Assim, os efeitos de substâncias tóxicas sobre o componente protista de comunidades microbianas podem alterar a cadeia trófica e significativamente afetar o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos (Trielli et al., 2007).

Somando-se aos atributos ecológicos, os protozoários ciliados também têm as vantagens de ter ciclos de vida curtos, distribuição cosmopolita, simplicidade estrutural, alto grau de reprodutibilidade e respostas rápidas às perturbações ambientais de forma integrada e contínua, cumprindo todos os requisitos para ser usado como organismos-teste em avaliações de risco e impacto ambiental (Tan et al., 2010). Além disso, várias espécies de protozoários podem ser cultivadas em laboratório sob condições muito semelhantes àquelas na natureza, tornando suas respostas biológicas mais confiáveis (Delmonte Corrado et al., 2006).

Estudos sobre as interações de protozoários com poluentes ambientais são escassos em comparação com outros microrganismos (por exemplo, bactérias e algas), apesar do fato dos ciliados serem fáceis de manter em cultura e serem considerados modelos biológicos confiáveis e, portanto bons candidatos para utilização em bioensaios (Delmonte Corrado et al., 2006; Gomiero et al., 2013). Os protozoários não possuem parede celular e, assim, respondem mais rápido aos estímulos externos que a maioria dos outros microrganismos. Testes realizados com a célula eucariótica de *Tetrahymena pyriformis* mostraram significativamente maior sensibilidade a diferentes metais e xenobióticos, como por exemplo aos inseticidas, em comparação com testes bacterianos, tais como o teste Microtox[®] (Bogaerts et al., 2001; Bonnet et al., 2007).

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos tóxicos dos agrotóxicos diuron e carbofuran, utilizando o protozoário ciliado *Paramecium caudatum* como organismo-teste. Os objetivos específicos foram: (I) determinar a faixa de sensibilidade deste protozoário a uma substância de referência, tendo em vista a sua utilização rotineira em testes de laboratório; (II) Determinar a CL₅₀ (2, 3, 4 e 6 horas) do diuron e do carbofuran testando tanto o ingrediente ativo padrão como o produto comercial; (III) Avaliar os efeitos crônicos

(24 horas) do diuron e do carbofuran (padrão e comercial) sobre as variáveis crescimento populacional, número de gerações e biomassa.

2. Materiais e Métodos

2.1. Cultivo e manutenção de protozoários ciliados

Paramecium caudatum Ehrenberg, 1833 (Protozoa, Ciliophora) foi inicialmente isolado do Reservatório do Monjolinho, São Carlos, SP, Brasil e mantido em culturas estoque por mais de cinco anos na Coleção de Culturas do Laboratório de Ecologia de Microrganismos Aquáticos da Universidade Federal de São Carlos.

Este ciliado foi cultivado em tubos de ensaio contendo ágar inclinado (2%), um grão de arroz com casca estéril e água mineral Minalba[®] suplementado com a bactéria *Enterobacter aerogenes* na concentração de 10^6 células mL⁻¹ (Madoni e Romeo, 2006; Rao et al., 2007; Wickham e Gugenberger, 2008). A bactéria *E. aerogenes* que serviu como alimento para o protozoário foi cultivada em meio ágar nutriente (pH $6,8 \pm 0,2$) à temperatura constante de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 h (Difco e BBL, 2009). As características químicas da água mineral utilizada como meio de cultura foram: 97,51 mg L⁻¹ de bicarbonatos, 16,11 mg L⁻¹ de cálcio, 9,08 mg L⁻¹ de magnésio, 1,02 mg L⁻¹ de potássio, 0,92 mg L⁻¹ de sódio, 0,70 mg L⁻¹ de nitratos, 0,13 mg L⁻¹ de sulfatos, 0,11 mg L⁻¹ de cloretos, 0,05 mg L⁻¹ de fluoretos, 0,02 mg L⁻¹ de bário, 0,02 mg L⁻¹ de estrôncio e pH 7,89.

As culturas de *P. caudatum* foram mantidas em uma incubadora com temperatura controlada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$; fotoperíodo de 12 h luz: 12 h escuro e pH de 7,5-8,0 (adaptado de Rao et al., 2007). Os ciliados foram repicados para meio de cultura novo pelo menos a cada duas semanas para a sua manutenção. Novas culturas foram iniciadas inoculando-se 10 mL do meio com 200 µL de uma cultura em fase estacionária de *P. caudatum* contendo 50 organismos. Somente os indivíduos de populações em fase de crescimento logarítmico (cultura estoque < 72h com base em um experimento de crescimento preliminar) foram utilizados para os testes.

2.2. Substâncias e soluções-teste

Os cinco produtos químicos testados nos ensaios de toxicidade foram: cloreto de sódio (NaCl) da Lafan Química Fina Ltda (Brasil), diuron (N-(3,4-dichlorophenyl)-N,N-dimethyl-urea) da Sigma-Aldrich, Diuron Nortox[®] 500 SC da Nortox S/A (Brasil), carbofuran (2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranyl N-methylcarbamate) da Sigma-Aldrich e Furadan[®] 350 SC da FMC (Brasil). O primeiro composto foi escolhido porque é uma substância de referência adequada para uso rotineiro em testes de sensibilidade (Environmental Canada, 1990) e foi utilizada para estabelecer a faixa de sensibilidade de *P. caudatum*. Os seguintes compostos foram os agrotóxicos utilizados nos testes de toxicidade aguda e crônica.

Os produtos químicos cloreto de sódio, diuron e carbofuran apresentaram alta pureza ($\geq 99\%$, $\geq 98\%$ e $\geq 98\%$, respectivamente). O grau de pureza da formulação comercial Diuron Nortox[®] 500 SC é de 50% m/v de ingrediente ativo (69,4% m/v de ingredientes inertes) e do Furadan[®] 350 SC é de 35% m/v de ingrediente ativo (65% m/v de ingredientes inertes). As soluções estoque de cloreto de sódio (100 g L^{-1}), de diuron administrado como Diuron Nortox[®] 500 SC (1000 mg L^{-1}), de carbofuran padrão (300 mg L^{-1}) e de carbofuran administrado como Furadan[®] 350 SC (1000 mg L^{-1}) foram preparadas pela diluição de uma quantidade específica de cada composto em água destilada imediatamente antes dos testes, com a exceção do diuron padrão, o qual foi preparado em acetona grau analítico ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$; LabSynth) devido à sua baixa solubilidade em água ($35,6 \text{ mg L}^{-1}$ à 20°C). Por sua vez, as concentrações nominais de cada composto testado foram obtidas pela diluição da solução estoque em meio de cultura (água mineral Minalba[®]).

Para confirmar as concentrações nominais iniciais utilizadas nos ensaios, as soluções-teste foram analisadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) (Agilent Technologies series 1200, Waldbronn, Alemanha), equipado com um detector de arranjo de diodos (DAD). As condições cromatográficas de análise foram: coluna C18 Zorbax ODS ($250\text{mm} \times 4,6\text{mm} \times 5\mu\text{m}$) (Agilent Technologies, USA) e temperatura de forno de 25°C . A fase móvel isocrática utilizada foi acetonitrila: água Milli-Q (70:30, v/v) durante 6 minutos, seguido de *post time* de 2 minutos, com volume de injeção de $20 \mu\text{L}$ e taxa de fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. A acetonitrila grau HPLC foi obtida da Merck (Alemanha). As análises foram realizadas em triplicatas. Com base nos sinais de absorvância observados no espectro DAD das soluções-padrão e a partir da literatura (Cappelini et al., 2012; Liyanage et al., 2006; Qun

e Rohrer, 2012; Rocha et al., 2013), o diuron e o carbofuran foram detectados e quantificados a 254 nm e 280 nm, respectivamente. Os tempos de retenção médios encontrados para o carbofuran e o diuron foram 3,620 e 4,271 minutos, respectivamente. Os limites de detecção e quantificação foram de 1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 4,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ para o diuron, respectivamente, e para o carbofuran foram de 10,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 32,3 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. A precisão em termos de repetibilidade, expressa como desvio padrão relativo, foi de 0,76% para o diuron e de 1,38% para o carbofuran. No Apêndice B, são mostrados alguns cromatogramas (Figuras 1 e 2) e as curvas analíticas juntamente com as equações utilizadas para a quantificação dos compostos (Figuras 3 a 6).

2.3. Testes de toxicidade aguda e crônica

Os testes de toxicidade aguda foram realizados com base no design experimental desenvolvido por Moreira et al. (2015) para o rotífero *Philodina roseola*, com as alterações necessárias para o estudo toxicológico utilizando protozoário (período de exposição e volume da solução-teste). Para os testes de toxicidade aguda, 5 concentrações mais um controle foram utilizadas, enquanto que para os testes de toxicidade crônica foram estabelecidas 6 concentrações, além de um controle. Após uma série de testes preliminares, a faixa de concentrações para cada um dos compostos foi estabelecida e testes de toxicidade aguda foram realizados com os seguintes intervalos de concentração nominais: 3,0 a 5,5 g L^{-1} de cloreto de sódio; 40 a 140 mg L^{-1} de diuron padrão, 14 a 224 mg L^{-1} de diuron administrado como Diuron Nortox[®] SC 500; 120 a 240 mg L^{-1} de carbofuran padrão e 60 a 180 mg L^{-1} de carbofuran administrado como Furadan[®] 350 SC.

Os testes de toxicidade aguda com o cloreto de sódio foram repetidos 20 vezes, em intervalos variando entre 30 e 60 dias, para estabelecer a faixa de sensibilidade (ou carta controle) de *P. caudatum* para este composto. Para o diuron e o carbofuran, utilizando-se tanto o ingrediente ativo padrão como a formulação comercial, os testes de toxicidade aguda foram repetidos cinco vezes, a fim de determinar a toxicidade aguda destes produtos a *P. caudatum*.

Os ensaios de toxicidade aguda foram realizados em vidros de relógio (80 mm de diâmetro) mantidos individualmente dentro de placas de Petri (110 mm de diâmetro), por um período de exposição máximo de 6h. Este tempo de exposição foi escolhido considerando o tempo de replicação de *P. caudatum* determinado experimentalmente em

boas condições de saúde (tempo médio de 9,2 h). O tempo de exposição deve ser menor do que o tempo de replicação do protozoário, a fim de se avaliar a toxicidade em nível de indivíduo (*endpoint* mortalidade).

O controle para todos os testes consistiu de água mineral. No caso do diuron padrão, um controle adicional (água mineral mais acetona) foi necessário para determinar o efeito do solvente sobre a sobrevivência dos organismos. A quantidade de solvente adicionado nos testes foi sempre igual a 0,5% (v/v), concentração esta que não causou quaisquer efeitos tóxicos sobre os organismos. Para cada concentração-teste e controle, quatro réplicas foram feitas, contendo 1 mL de solução-teste e 10 organismos em cada réplica. Os ciliados foram transferidos da cultura estoque em fase logarítmica para cada vidro de relógio por meio de uma micropipeta de vidro (capilar), sob um microscópio estereoscópico Leica MZ6, em aumento de 50x. Para evitar a diluição da solução-teste, o meio de cultura transferido com o protozoário foi drenado do vidro de relógio com uma pipeta capilar, e em seguida foi adicionada a solução-teste.

Os experimentos de toxicidade aguda foram mantidos a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, sem adição de alimento e na ausência de luz. O pH, a condutividade elétrica, a temperatura da água e a dureza foram medidos nas soluções-teste e controle no início e no final de cada teste. Para cada teste de toxicidade, copos de plástico não tóxicos contendo 100 mL de cada solução-teste e controle foram preparados antes do ensaio. As alíquotas de 1 mL utilizadas em cada teste foram obtidas a partir desse volume de 100 mL e o volume restante, que era suficiente para as variáveis a serem medidas, foi colocado na incubadora em conjunto com os testes. Durante o período de 6 horas, leituras foram realizadas nos tempos de exposição de 2, 3, 4 e 6 horas e o número de indivíduos mortos nas quatro réplicas foi contado sob microscópio estereoscópico. Para cada tempo de exposição, a concentração letal mediana (CL_{50}) foi calculada. Neste estudo, as células lisadas, deformadas ou desaparecidas foram consideradas indivíduos mortos.

Para os ensaios de toxicidade crônica, adaptações foram feitas a partir de métodos já descritos na literatura (e.g. Bonnet et al., 2007; Rao et al., 2007; Gomiero et al., 2013). Três testes de toxicidade crônica completos foram realizados com o diuron e o carbofuran utilizando o ingrediente ativo padrão e o produto comercial. Os bioensaios foram realizados nos seguintes intervalos de concentrações nominais: 0,88 a 28 mg L⁻¹ de diuron e de diuron administrado como Diuron Nortox[®] 500 SC; 1,88 a 60 mg L⁻¹ de carbofuran e 0,47 a 15 mg

L⁻¹ de carbofuran administrado como Furadan[®] 350 SC. Estes níveis foram escolhidos com base nos testes preliminares e de toxicidade aguda.

Os testes de toxicidade crônica tiveram a duração de 24 horas e foram realizados em tubos de ensaio (tamanho 15x100mm) contendo 5 ml de solução-teste e 50 protozoários provenientes de uma cultura em fase logarítmica de crescimento. O controle consistiu de água mineral Minalba[®] acrescido de bactérias *E. aerogenes* (concentração final de 10⁶ células mL⁻¹) e um grão de arroz estéril. Os diferentes tratamentos consistiram de meio de cultura igual ao do controle, mas contaminados com os agrotóxicos selecionados. Quatro réplicas foram realizadas tanto para o controle como para cada concentração-teste. Os experimentos foram mantidos sob a mesma temperatura e fotoperíodo das culturas-estoques: 25 ± 1 °C e 12h luz: 12h escuro, respectivamente.

Após 24 h de exposição, os protozoários foram fixados com Lugol ácido 0,4% e as células foram quantificadas e medidas sob microscópio óptico (aumento de 100x) em câmara de Sedgwick-Rafter. O número de protozoários em cada concentração após 24 h foi utilizado para determinar a concentração de pesticida requerida para uma inibição de crescimento de 50% (CI₅₀). Os biovolumes foram determinados medindo-se as dimensões das células de *P. caudatum* ($n = 30$) e utilizando a equação apropriada para a forma geométrica esferóide prolato (Hillebrand et al., 1999). A biomassa do protozoário foi calculada usando o biovolume da célula convertido em carbono usando o fator de conversão específico para ciliados fixados com Lugol (0,19 pg C μm⁻³) de acordo com Putt e Stoecker (1989), multiplicado pelo número de indivíduos de *P. caudatum*. Baseado nas densidades celulares, o número de gerações (fissões) foi estimado pela seguinte fórmula (Rao et al., 2007): $n = (\text{Log } N_1 - \text{Log } N_0) / \text{Log } 2$, onde n é o número de gerações; N_1 é o número de células em 24 h e N_0 é o número de células em 0 h.

2.4. Tratamento dos dados e análise estatística

A CL₅₀ para os testes de toxicidade aguda e CI₅₀ para testes de inibição de crescimento foram calculadas por regressão não linear, utilizando a curva logística de três parâmetros no software Statistica 7.0 (Statsoft, 2004). Dado que o uso de valores de CE₁₀ para expressar a toxicidade nos testes de toxicidade crônica tem aumentado ao longo dos últimos anos (e.g. Landis e Chapman, 2011; Jager, 2012), valores de CE₁₀ ou CI₁₀ foram também calculados neste estudo, utilizando-se a curva logística de três parâmetros.

A faixa de sensibilidade de *P. caudatum* ao cloreto de sódio foi estabelecida por meio de um modelo desenvolvido pela USEPA (1985). A carta controle consistiu de um plot dos valores CL_{50-6h} calculados para cada um dos 20 ensaios. Os limites superior e inferior da faixa são mostrados como duas linhas que correspondem a dois desvios-padrão acima e abaixo do valor médio, respectivamente.

Os dados dos testes de toxicidade crônica (inibição de crescimento, número de gerações e biomassa) foram primeiro testados para normalidade (Teste Qui-quadrado) e homogeneidade de variâncias (Teste de Bartlett), e em seguida submetidos à análise de variância (ANOVA). O teste de Dunnett para comparações múltiplas foi aplicado quando as diferenças foram reveladas em dados que seguiram uma distribuição normal. Quando o teste de normalidade falhou, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas foram realizadas pelo método de Dunn. Nos testes estatísticos, as diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistica versão 7.0 (Statsoft, 2004).

3. Resultados

3.1. Variáveis abióticas dos testes de toxicidade e análises químicas

Durante os testes de toxicidade aguda e crônica a medida do pH das soluções-teste permaneceu dentro do intervalo de 7,6 e 8,4 e não variou mais do que 1,0 unidade no decorrer do teste. A temperatura da água das soluções-teste em todos os testes de toxicidade variou entre 24 e 25°C, a condutividade elétrica variou de 151,6 a 157,9 $\mu\text{S cm}^{-1}$ e a dureza da água variou entre 76 e 80 mg CaCO₃ L⁻¹.

Após análise das soluções-teste em HPLC-DAD, os resultados mostraram que as concentrações reais de exposição nos testes de toxicidade aguda e crônica de diuron e carbofuran (padrão e comercial) diferiram menos de 10% das concentrações nominais (Figuras 7 e 8, do Apêndice B). Portanto, os resultados são expressos nas concentrações nominais, como sugerido pela ISO 10706 (2000).

3.2. Toxicidade aguda

No final dos testes, a mortalidade no controle e no controle do solvente (no caso do diuron padrão) não excedeu 10%, como recomendado pelas diretrizes da OECD (2008). A Figura 1 mostra a faixa de sensibilidade de *P. caudatum* ao cloreto de sódio (NaCl). Os valores de CL₅₀-6h variaram de 3,31 a 4,44 g L⁻¹, com média de 3,88 g L⁻¹.

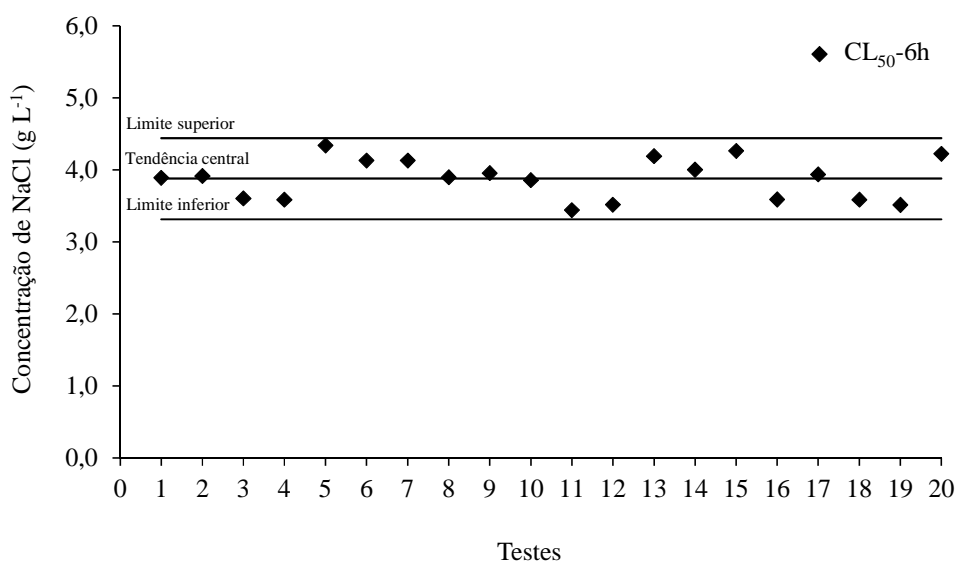


Figura 1. Faixa de sensibilidade de *Paramecium caudatum* (CL₅₀-6h) a substância de referência cloreto de sódio com base nos resultados de 20 testes de toxicidade aguda. Os limites superior e inferior correspondendo a intervalos de confiança de 95% foram 3,31 e 4,44 g L⁻¹, respectivamente.

Os valores médios de CL₅₀ em 2, 3, 4 e 6 horas e os seus respectivos intervalos de confiança de 95%, para cada um dos cinco compostos analisados são apresentados na Tabela 1. A mortalidade (%) para os protozoários expostos à forma padrão e a comercial do diuron e do carbofuran nos diferentes períodos de exposição são apresentados na Figura 2.

Tabela 1. Valores de CL_{50} (2, 3, 4 e 6 horas de tempo de exposição) para a toxicidade aguda e valores de CI_{10} e CI_{50} 24h para a toxicidade crônica dos cinco compostos testados e intervalos de confiança de 95% (entre parênteses) obtidos para o protozoário ciliado *Paramecium caudatum*.

Compostos	Toxicidade Aguda				Toxicidade Crônica	
	CL_{50-2h}	CL_{50-3h}	CL_{50-4h}	CL_{50-6h}	CI_{10-24h}	CI_{50-24h}
Cloreto de sódio ($g L^{-1}$)	5,05 (4,94 - 5,15)	4,79 (4,59 - 5,00)	4,42 (4,22 - 4,61)	3,88 (3,31 - 4,44)	-	-
Diuron (ingrediente ativo padrão) ($mg L^{-1}$)	94,6 (84,9 - 104,4)	81,0 (70,8 - 91,2)	73,6 (66,4 - 80,8)	64,6 (57,7 - 71,6)	0,61 (0,35 - 0,87)	7,10 (5,90 - 8,29)
Diuron (Diuron Nortox [®] 500 SC) ($mg L^{-1}$)	154,6 (138,0 - 171,2)	112,7 (101,5 - 123,8)	78,3 (71,6 - 84,9)	62,4 (57,1 - 67,7)	0,33 (0,09 - 0,58)	6,78 (4,88 - 8,67)
Carbofuran (ingrediente ativo padrão) ($mg L^{-1}$)	239,3 (233,7 - 244,9)	200,6 (191,4 - 209,7)	174,0 (163,3 - 184,8)	142,0 (136,9 - 147,0)	0,30 (0,02 - 0,58)	22,95 (15,60 - 30,30)
Carbofuran (Furadan [®] 350 SC) ($mg L^{-1}$)	170,0 (167,7 - 172,4)	119,7 (116,4 - 123,0)	98,5 (95,0 - 102,0)	70,4 (65,9 - 75,0)	0,21 (0,06 - 0,35)	4,98 (3,70 - 6,27)

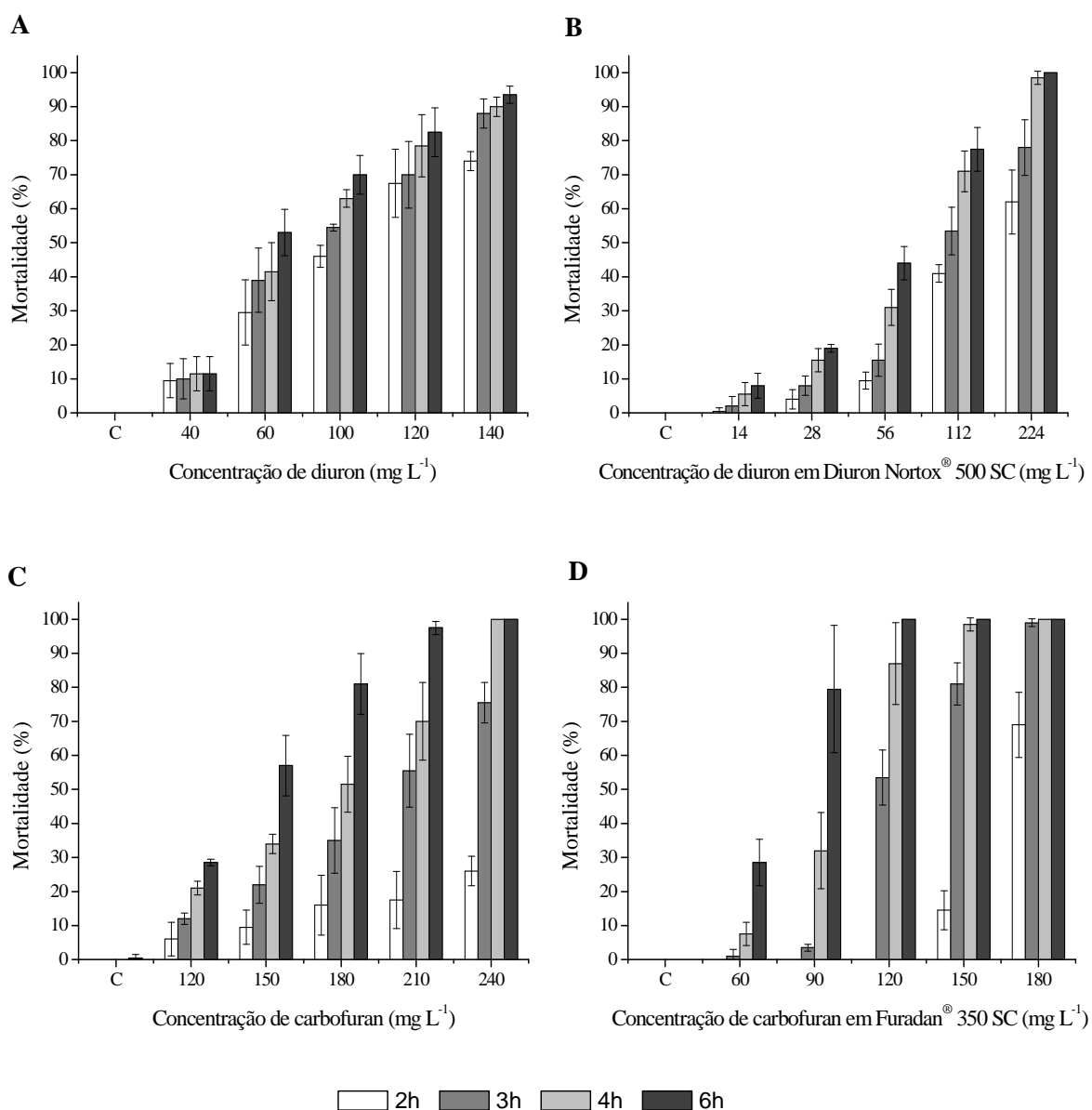


Figura 2. Mortalidade (%) de *Paramecium caudatum* em diferentes períodos de exposição (2, 3, 4 e 6 horas) nas diferentes concentrações de diuron padrão (A), diuron administrado como Diuron Nortox® 500 SC (B), carbofuran padrão (C) e carbofuran administrado como Furadan® 350 SC (D).

3.3. Toxicidade crônica

Para todos os compostos testados, o coeficiente de variação das réplicas no controle e nos tratamentos dos testes de crescimento populacional não excedeu 10%, como recomendado pelas diretrizes da OECD (2008). Em um experimento preliminar sobre o crescimento de *P. caudatum* (Figura 9, Apêndice B) observou-se que o tempo médio de replicação é de 9,2 horas e o número de gerações em 24 horas é de 2,6 gerações para culturas

saudáveis a 25°C. Isto foi confirmado no grupo controle dos presentes testes de toxicidade crônica.

Os valores médios de CI_{10} e CI_{50} 24h e seus respectivos intervalos de confiança de 95% para cada um dos agrotóxicos analisados são também apresentados na Tabela 1. A Figura 3 mostra o efeito de inibição do crescimento (%) em *P. caudatum* exposto aos compostos selecionados. Para o diuron, tanto para o ingrediente ativo (Figura 3A) como para o produto comercial (Figura 3B), uma inibição significativa do crescimento foi observada em populações expostas a concentrações de 1,75 a 28 mg L⁻¹, como evidenciado pelos resultados do teste de Dunnett (diuron padrão: $F_{6,21} = 352,9$, $p = 0,00002$; diuron produto comercial: $F_{6,21} = 810,8$, $p = 0,00002$). Em relação à inibição de crescimento, a maior concentração de diuron (ingrediente ativo padrão e produto comercial) de efeito não observado (CENO) foi de 0,88 mg L⁻¹, enquanto que a menor concentração que causou um efeito observável (CEO) foi de 1,75 mg L⁻¹. Para o carbofuran, uma inibição de crescimento significativa foi observada em populações de *P. caudatum* expostas a concentrações de 1,88 a 60 mg L⁻¹ de carbofuran padrão (Figura 3C) e 0,94 a 15 mg L⁻¹ de carbofuran administrado como Furadan[®] 350 SC (Figura 3D), tal como evidenciado pelos resultados do teste de Dunnett (carbofuran padrão: $F_{6,21} = 236,8$, $p = 0,00002$; carbofurano produto comercial: $F_{6,21} = 426,5$, $p = 0,00002$). A CENO de carbofuran foi <1,88 mg L⁻¹ e 0,47 mg L⁻¹ para o ingrediente ativo padrão e produto comercial, respectivamente. A CEO de carbofuran foi 1,88 mg L⁻¹ e 0,94 mg L⁻¹ para o ingrediente ativo padrão e o produto comercial, respectivamente.

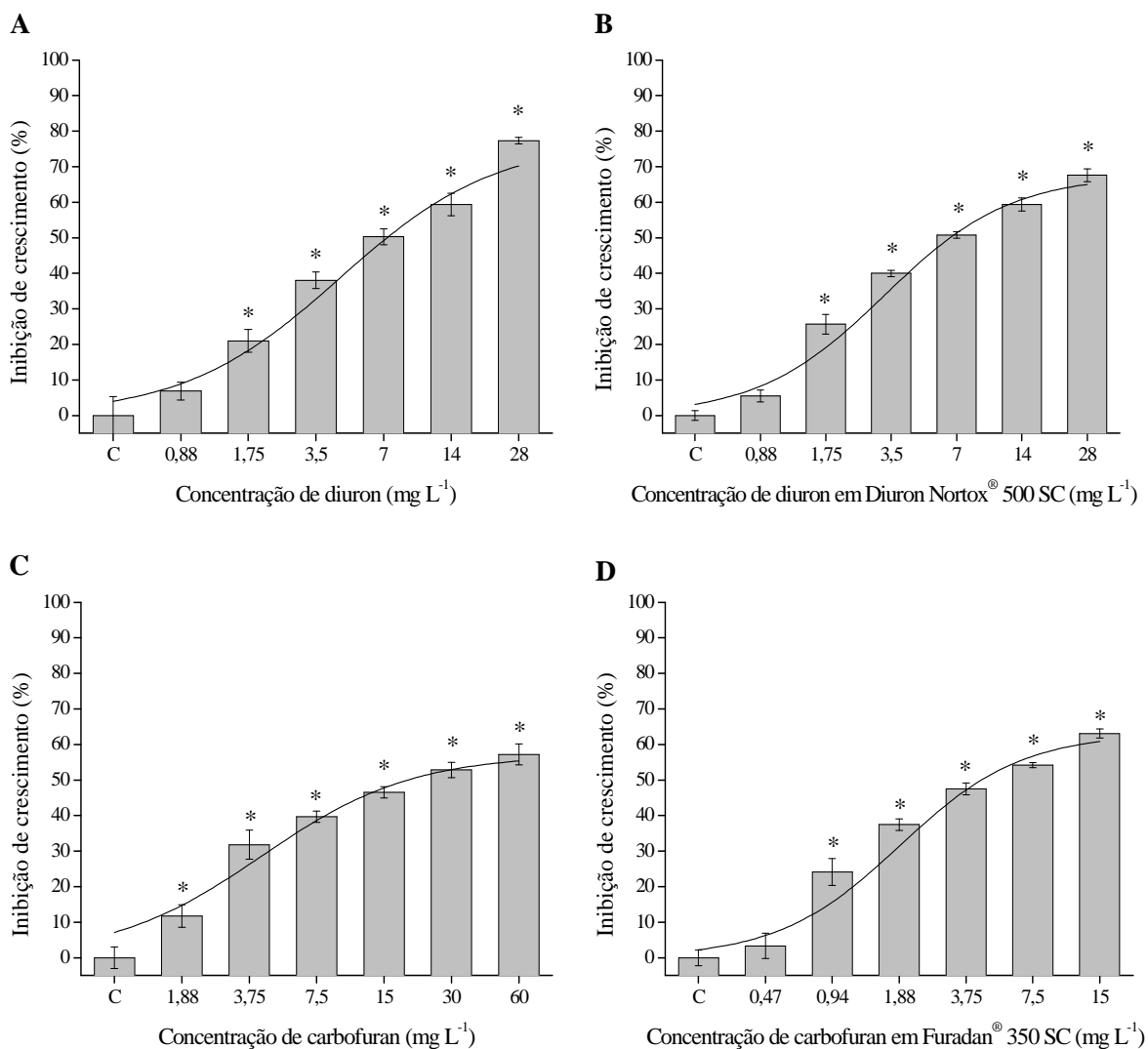


Figura 3. Inibição de crescimento populacional (%) de *Paramecium caudatum* exposto a diferentes concentrações de diuron padrão (A), diuron administrado como Diuron Nortox[®] 500 SC (B), carbofuran padrão (C) e carbofuran administrado como Furadan[®] 350 SC (D). A linha representa a curva de ajuste logístico. O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle ($p \leq 0,05$).

Os resultados dos efeitos dos pesticidas sobre o número de gerações de *P. caudatum* são apresentados na Figura 4. Todos os compostos testados apresentaram concentrações que reduziram significativamente o número de gerações, em comparação com o controle (diuron padrão: $F_{6,21} = 494,6$, $p < 0,05$; diuron produto comercial: $F_{6,21} = 659,9$, $p < 0,05$; carbofuran padrão: $F_{6,21} = 192,6$, $p < 0,05$; carbofuran produto comercial: $F_{6,21} = 521,0$, $p < 0,05$). Para o diuron, tanto para o ingrediente ativo padrão (Figura 4A) como para o produto comercial (Figura 4B), a menor concentração que causou uma redução significativa do número de gerações foi 1,75 mg L⁻¹. Para o carbofuran, a menor concentração testada que causou uma redução significativa do número de gerações foi 1,88 mg L⁻¹ de carbofuran padrão (Figura

4C) e $0,94 \text{ mg L}^{-1}$ de carbofuran do produto comercial (Figura 4D). Com base na curva de ajuste logístico, os valores de CE_{10} para o número de gerações foram: $1,54 \pm 0,61 \text{ mg L}^{-1}$ de diuron padrão; $0,62 \pm 0,32 \text{ mg L}^{-1}$ de diuron produto comercial; $0,77 \pm 0,59 \text{ mg L}^{-1}$ de carbofuran padrão e $0,40 \pm 0,20 \text{ mg L}^{-1}$ de carbofuran produto comercial.

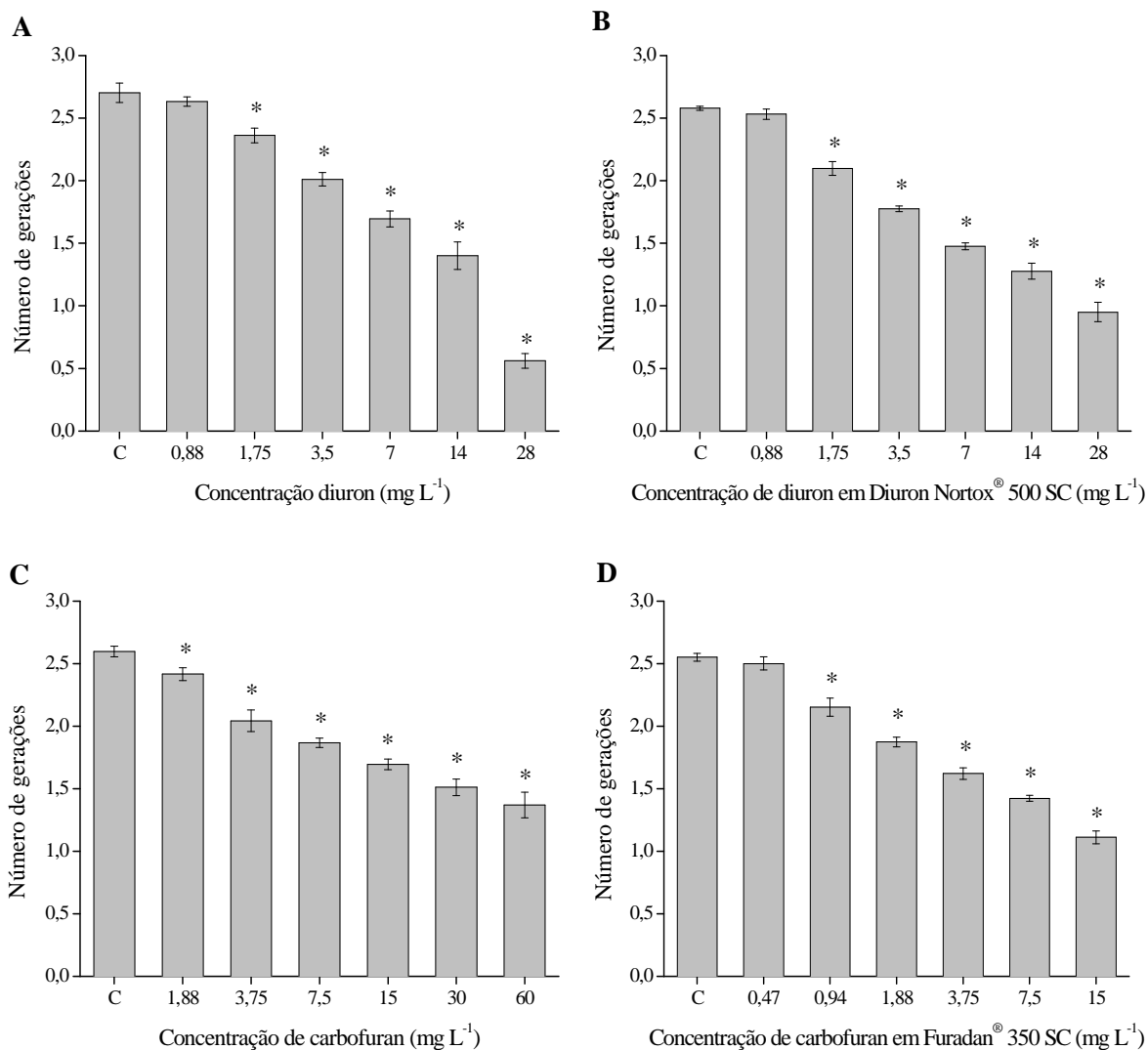


Figura 4. Efeitos sobre o número de gerações de *Paramecium caudatum* exposto a diferentes concentrações de diuron padrão (A), diuron administrado como Diuron Nortox® 500 SC (B), carbofuran padrão (C) e carbofuran administrado como Furadan® 350 SC (D). O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle ($p \leq 0,05$).

A Figura 5 mostra o efeito dos agrotóxicos sobre a biomassa de *P. caudatum*. Todos os compostos testados apresentaram concentrações que reduziram significativamente a biomassa, em comparação com o controle (diuron padrão: $F_{6,203} = 512,6$, $p < 0,05$; diuron produto comercial: $F_{6,203} = 533,7$, $p < 0,05$; carbofuran padrão: $F_{6,203} = 438,7$, $p < 0,05$;

carbofuran produto comercial: $F_{6,203} = 661,6$, $p < 0,05$). Para o diuron, tanto para o ingrediente ativo padrão (Figura 5A) como para o produto comercial (Figura 5B), a menor concentração que causou uma diminuição significativa da biomassa foi $1,75 \text{ mg L}^{-1}$. Para o carbofuran, a menor concentração que causou uma redução significativa de biomassa foi $1,88 \text{ mg L}^{-1}$ de carbofuran padrão (Figura 5C) e $0,47 \text{ mg L}^{-1}$ de carbofuran do produto comercial (Figura 5D). A partir do ajuste da curva logística, os valores de CE_{10} para a redução da biomassa do protozoário foram: $1,08 \pm 0,23 \text{ mg L}^{-1}$ de diuron padrão; $0,52 \pm 0,14 \text{ mg L}^{-1}$ de diuron produto comercial; $1,43 \pm 0,41 \text{ mg L}^{-1}$ de carbofuran padrão e $0,14 \pm 0,05 \text{ mg L}^{-1}$ de carbofuran produto comercial.

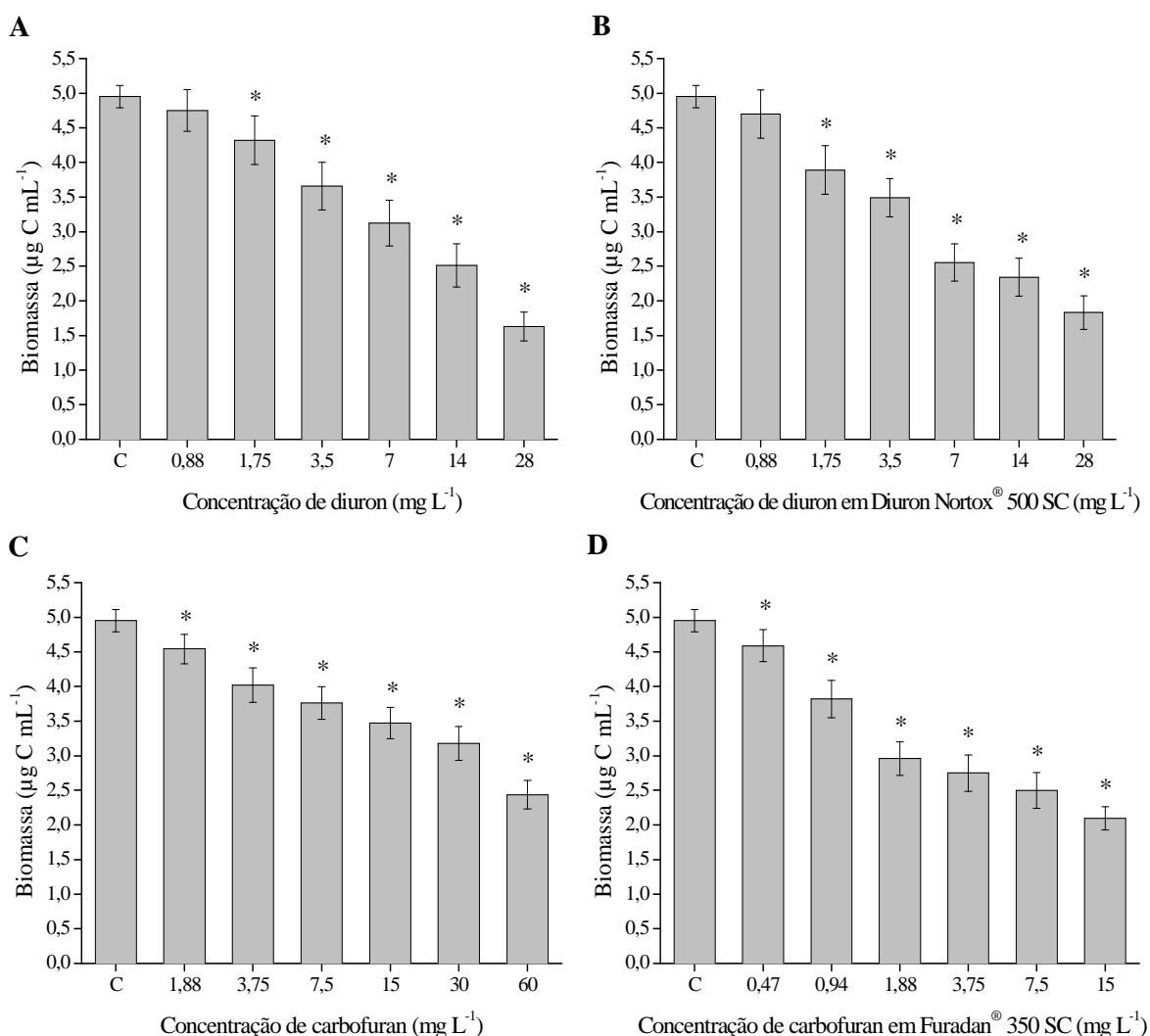


Figura 5. Efeitos sobre a biomassa ($\mu\text{g C mL}^{-1}$) de *Paramecium caudatum* exposta a diferentes concentrações de diuron padrão (A), diuron administrado como Diuron Nortox[®] 500 SC (B), carbofuran padrão (C) e carbofuran administrado como Furadan[®] 350 SC (D). O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle ($p \leq 0,05$).

4. Discussão

Os resultados deste estudo mostraram que *P. caudatum* foi consideravelmente sensível ao cloreto de sódio, uma substância de referência comumente utilizada em testes ecotoxicológicos (Environmental Canada, 1990; USEPA, 2002), sendo mais sensível do que a alga *Chlamydomonas reinhardtii* (CI_{50} 96h = 4,74 g L⁻¹; Moser and Bell, 2011), o cladóceros *Daphnia pulex* (CE_{50} 48h = 4,05 g L⁻¹; Bezirci et al. 2012), o anfípoda *Gammarus roeseli* (CE_{50} 72h = 9,28 g L⁻¹; Sornom et al., 2010) e a larva de inseto *Chironomus dilutes* (CL_{50} 96h = 5,87 g L⁻¹; Elphick et al., 2011). Diferenças de sensibilidade são esperados devido às características intrínsecas das espécies e diferenças nas condições de ensaio (e.g. tempo de exposição, temperatura, fotoperíodo e dureza da água), como relatado por outros autores (e.g. Freitas e Rocha, 2012; Moreira et al., 2014).

O protozoário de água doce *P. caudatum* possui vacúolos contrácteis, responsáveis por controlar a osmolaridade citosólica e a permeabilidade da água na membrana plasmática, permitindo a osmoregulação sob condições hipertônicas (Allen e Naitoh, 2002; Stock et al., 2002). De acordo com Smurov e Fokin (1999), cílios de água doce são capazes de regular a composição iônica de sal interno, provavelmente até 5,0 g L⁻¹. No presente estudo, a concentração de NaCl de 5,05 g L⁻¹ causou a mortalidade de 50% dos indivíduos de *P. caudatum* após 2 horas de exposição e este valor foi reduzido para 3,88 g L⁻¹ após 6 horas de exposição. Com base nos resultados, essa substância de referência foi considerada adequada para avaliar o estado de saúde dos protozoários antes de realizar os testes de toxicidade.

Embora o tempo de exposição adotado em estudos ecotoxicológicos seja previamente determinado, os resultados deste estudo evidenciaram que a variação do tempo de exposição (2, 3, 4 e 6 h) alterou consideravelmente a resposta de *P. caudatum* aos agrotóxicos testados, e que a mortalidade aumentou progressivamente com o aumento do tempo de exposição (Figura 2). A toxicidade do diuron e do carbofuran (ingrediente ativo padrão) foi, respectivamente, 1,5 e 1,7 vezes maior após 6 horas de exposição do que após 2 horas. Para diuron e carbofuran em formulações comerciais, a toxicidade foi 2,5 e 2,4 vezes, respectivamente, maior após 6 horas de exposição do que após 2 horas (Tabela 1). Alguns autores também mostraram variação da toxicidade dependente do tempo de exposição para protozoários (Zhou et al., 2011) e outros organismos, como cladóceros (Gama-Flores et al., 2008) e peixes (Mohanty et al., 2013).

Ao comparar a toxicidade do diuron em sua forma padrão com o de sua formulação comercial, os valores médios de CL_{50-6h} e CI_{50-24h} mostraram que, considerando o intervalo de confiança de 95%, suas toxicidades para *P. caudatum* foram similares, indicando que o potencial tóxico do ingrediente ativo no produto comercial Diuron Nortox[®] 500 SC não foi afetado pelas substâncias adicionadas. No entanto, a sensibilidade desta espécie ao carbofuran em sua formulação comercial, o Furadan[®] 350 SC, foi maior do que ao seu ingrediente ativo padrão (mortalidade e inibição de crescimento foram 2,0 e 4,6 vezes maiores, respectivamente), sugerindo que o aumento da toxicidade do produto comercial resultou provavelmente de efeitos sinérgicos do carbofuran com os ingredientes adicionados.

As formulações comerciais dos agrotóxicos contêm o ingrediente ativo misturado com outros produtos químicos (geralmente chamados ingredientes “inertes”) que atuam como solventes, emulsionantes, tensoativos e/ ou conservantes (Cox e Surgan, 2006). Vários autores (e.g. Krogh et al., 2003; Oakes and Pollak, 2000; Solomon and Thompson, 2003) demonstraram que os ingredientes “inertes” podem contribuir para a toxicidade da formulação, quer por exercer atividade tóxica por si próprios, ou por interação com o ingrediente ativo. Em muitos estudos a toxicidade do produto comercial é maior do que a do ingrediente ativo padrão (e.g. Beggel et al., 2010; Cedergreen and Streibig, 2005; Pereira et al., 2009), assim como observado no presente estudo para o carbofuran comercial. No entanto, este não é sempre o caso, como foi verificado para a toxicidade da formulação comercial de diuron a *P. caudatum* e também por outros autores. Pessoa et al. (2011), ao comparar a toxicidade do carbofuran e Furadan[®] 350 SC para larvas de peixe *Oreochromis niloticus*, encontraram valores similares de CL_{50-96h} para estes compostos, o que indicou que a potência tóxica do ingrediente ativo não foi afetada pelas substâncias “inertes” adicionadas na formulação comercial. Kroon et al. (2015) verificaram que os biomarcadores estrogênicos em juvenis do peixe *Lates calcarifer* aumentaram após a exposição à formulação comercial do diuron (Diurex[®] WG), mas não para o composto padrão, sugerindo uma resposta estrogênica para os aditivos. Portanto, os testes com o ingrediente ativo em sua forma padrão e também com a sua formulação comercial são importantes para fornecer informações mais realistas sobre a toxicidade dos agrotóxicos que podem causar diferentes respostas, tanto devido aos ingredientes inertes associados como pelas respostas de toxicidade serem normalmente espécie-específicas.

A comparação dos valores de CL_{50-6h} de *P. caudatum* com os de uma ampla variedade de espécies mostrou que este protozoário é menos sensível ao diuron (ingrediente

ativo padrão) do que todos os organismos apresentados na Tabela 2. No entanto, quando os valores de CI_{50-24h} foram comparados, *P. caudatum* foi mais sensível do que a bactéria *Vibrio fischeri*, o protozoário *Tetrahymena pyriformis*, a anêmona *Aiptasia* sp., o poliqueta *Hydroides elegans*, o cladóceros *Daphnia magna*, o anostraca *Artemia salina*, a craca *Balanus amphitrite* e o peixe *Psetta maxima* (embrião-larva) (Tabela 2). Devido ao modo de ação específico do herbicida diuron, os organismos fotossintéticos (cianobactérias, algas e macrófitas) foram os mais sensíveis. No entanto, diuron também pode causar efeitos tóxicos em organismos heterotróficos não-alvo (invertebrados, anfíbios e peixes) por diferentes modos de ação, como por exemplo inibição da atividade da AChE (Ahmed et al., 2012; Bretaud et al., 2000), efeitos teratogênicos (Lazhar et al., 2012), desregulação do sistema endócrino (Noguerol et al., 2006; Orton et al., 2009) e efeitos imunotóxicos (Luna-Acosta et al., 2012).

Tabela 2. Valores de toxicidade (CL₅₀, CI₅₀ ou CE₅₀) obtidos a partir da literatura para diferentes espécies expostas aos agrotóxicos diuron e carbofuran.

	Valor do Parâmetro (mg L ⁻¹)	Referência
DIURON		
<i>Vibrio fischeri</i>	58,07 (CE ₅₀ -30 min)	Bonnet et al. (2007)
<i>Achnantheidium minutissimum</i>	0,108 (CI ₅₀ -96h)	Larras et al. (2012)
<i>Craticula accomoda</i>	1,734 (CI ₅₀ -96h)	Larras et al. (2012)
<i>Skeletonema costatum</i>	0,006 (CI ₅₀ -96h)	Bao et al. (2011)
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	0,009 (CE ₅₀ -96h)	DeLorenzo et al. (2013)
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	0,022 (CI ₅₀ -72h)	Zhang et al. (2012)
<i>Lemma minor</i>	0,028 (CI ₅₀ -168h)	Gatidou et al. (2015)
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	13,80 (CI ₅₀ -15h)	Bricheux et al. (2013)
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	7,84 (CI ₅₀ -9h)	Bonnet et al. (2007)
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	>100 (CI ₅₀ -1h)	Bogaerts et al. (2001)
<i>Aiptasia sp.</i>	19,00 (CL ₅₀ -96h)	Bao et al. (2011)
<i>Acropora tumida</i>	4,80 (CL ₅₀ -24h)	Bao et al. (2011)
<i>Hydroides elegans</i>	16,00 (CL ₅₀ -48h)	Bao et al. (2011)
<i>Daphnia magna</i>	8,60 (CE ₅₀ -48h)	Hernando et al. (2005)
<i>Nitocra spinipes</i>	4,00 (CE ₅₀ -96h)	Karlsson et al. (2006)
<i>Artemia salina</i>	12,01 (CL ₅₀ -24h)	Koutsaftis e Aoyama (2007)
<i>Balanus amphitrite</i>	21,00 (CL ₅₀ -24h)	Bao et al. (2011)
<i>Arrenurus sp.</i>	7,00 (CE ₅₀ -96h)	James (2008)
<i>Psetta maxima</i>	7,83 (CL ₅₀ -96h)	Mhadhbi et al. (2012)
CARBOFURAN		
<i>Vibrio fischeri</i>	28,90 (CE ₅₀ -30 min)	Fernández-Alba et al. (2002)
<i>Anabaena flos-aquae</i>	7,93 (CI ₅₀ -96h)	Ma et al. (2006)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	4,65 (CI ₅₀ -96h)	Ma et al. (2006)
<i>Chlorella vulgaris</i>	7,86 (CI ₅₀ -96h)	Ma et al. (2006)
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	6,22 (CI ₅₀ -96h)	Ma et al. (2006)
<i>Paramecium caudatum</i>	210,0 (CL ₅₀ -3h)	Hussain et al. (2008)
<i>Brachionus calyciflorus</i>	14,10 (CL ₅₀ -24h)	Iesce et al. (2006)
<i>Philodina roseola</i>	13,36 (CE ₅₀ -48h)	Moreira et al. (2015)
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	0,003 (CL ₅₀ -96h)	Bailey et al. (1996)
<i>Daphnia magna</i>	0,018 (CE ₅₀ -48h)	Hernando et al. (2005)
<i>Daphnia magna</i>	0,059 (CE ₅₀ -48h)	Herbrandson et al. (2003)
<i>Gammarus pulex</i>	0,009 (CL ₅₀ -24h)	Ashauer et al. (2010)
<i>Anopheles stephensi</i>	0,26 (CL ₅₀ -24h)	Kumar et al. (2004)
<i>Chironomus riparius</i>	0,027 (CL ₅₀ -24h)	Ibrahim et al. (1998)
<i>Clarias batrachus</i>	23,0 (CL ₅₀ -96h)	Begum (2008)
<i>Danio rerio</i>	1,34 (CL ₅₀ -24h) - embrião	Lee et al. (2014)
<i>Oreochromis niloticus</i>	0,21 (CL ₅₀ -96h) - larva	Pessoa et al. (2011)
<i>Pimephales promelas</i>	1,99 (CL ₅₀ -96h)	Tarkowski (2004)

Embora o modo de ação do diuron seja bem estabelecido para uma variedade de espécies, o seu modo de ação para protozoários ainda não está claro. A partir dos resultados relativos à toxicidade aguda de diuron a *P. caudatum*, verificou-se que este composto lisou a membrana plasmática deste protozoário nas maiores concentrações testadas. Alguns estudos demonstraram que o diuron exerce efeitos tóxicos nos microrganismos heterotróficos, tais como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, bloqueando a cadeia respiratória mitocondrial (Dragone et al., 2015; Estève et al., 2009) e gerando espécies reativas de oxigênio (Tenda et al., 2012). Espécies reativas de oxigênio (ROS) são naturalmente geradas como consequência do metabolismo celular, mas quando ele entra em contato com agentes exógenos tais como herbicidas, o nível de ROS pode aumentar com subsequente indução de estresse oxidativo. ROS reagem com lipídios e, neste caso, levam à formação de aldeído causando a desintegração da membrana celular e a consequente morte celular (Catalá, 2006; Tenda et al., 2012). Assim, no presente estudo, a toxicidade do diuron sobre *P. caudatum* foi provavelmente devido à inibição da respiração e aumento do nível de ROS com consequente lise celular.

O diuron causou redução significativa no crescimento populacional de *P. caudatum* a partir da concentração de 1,75 mg L⁻¹. Bricheux et al. (2013), utilizando a técnica da microcalorimetria, observaram que a atividade metabólica e o crescimento do protozoário *T. pyriformis* foram progressivamente inibidos com o aumento nas concentrações de diuron e que o estado geral da célula viva foi bastante alterada a uma concentração de 56,0 mg L⁻¹. O valor de CI₅₀ de *T. pyriformis* estimado por estes pesquisadores foi de 13,8 mg L⁻¹ por microcalorimetria e 18,6 mg L⁻¹ por citometria de fluxo.

Neste estudo, o teste de inibição de crescimento (CI₅₀) respondeu potencialmente melhor do que o teste de toxicidade aguda que foi baseado na mortalidade (CL₅₀), pois o teste de crescimento populacional integra todos os efeitos em vários níveis do metabolismo celular e, assim, torna possível avaliar um efeito global sobre uma série de processos implicados na divisão celular. Assim, a determinação da toxicidade de um composto em protozoários ciliados usando a inibição de crescimento em comparação com a mortalidade parece ser de grande importância, como também evidenciado por Gomiero et al. (2013).

Uma comparação da sensibilidade de *P. caudatum* ao carbofuran (ingrediente ativo padrão) com outras espécies utilizando os valores de CL_{50-6h} mostrou que este protozoário é menos sensível do que todos os organismos apresentados na Tabela 2. Quando foi comparado o valor de CI_{50-24h}, *P. caudatum* foi mais sensível do que a bactéria *Vibrio*

fischeri e o peixe *Clarias batrachus* (Tabela 2). Hussain et al. (2008) relataram que o agrotóxico carbofuran induziu efeito inibitório sobre a fagocitose (redução de 19,71% na formação de vacúolo alimentar em 135 mg L⁻¹) e sobre a atividade do vacúolo pulsátil (87 a 135 mg L⁻¹) de *P. caudatum*. O valor CL₅₀-3h encontrado por estes autores para carbofuran foi de 210 mg L⁻¹, enquanto em nosso estudo o valor encontrado foi de 200,6 ± 9,2 mg L⁻¹ (Tabela 1).

A baixa sensibilidade de *P. caudatum* aos agrotóxicos testados evidenciada pelos dados de mortalidade (CL₅₀) poderia ser explicada pela bioacumulação dos compostos na célula como um mecanismo de resistência. Muitos estudos reconhecem que os microrganismos têm uma alta afinidade para metais e xenobióticos tóxicos e que estes podem acumular-se nas células por uma variedade de mecanismos (e.g. Lal et al., 1987; Mortimer et al., 2010; Pas et al., 2004; Rehman et al., 2008; Yilmaz, 2003). Martín-González et al. (2005) e Mortimer et al. (2010) mostraram que os protozoários ciliados podem sequestrar os metais pela ingestão e armazenamento nos vacúolos alimentares ou pelo acúmulo de íons de metal em grânulos citoplasmáticos densos. Em nosso estudo, durante os testes de toxicidade aguda, observou-se que *P. caudatum* provavelmente acumulou os agrotóxicos diuron e carbofuran nos vacúolos alimentares (Figura 6).

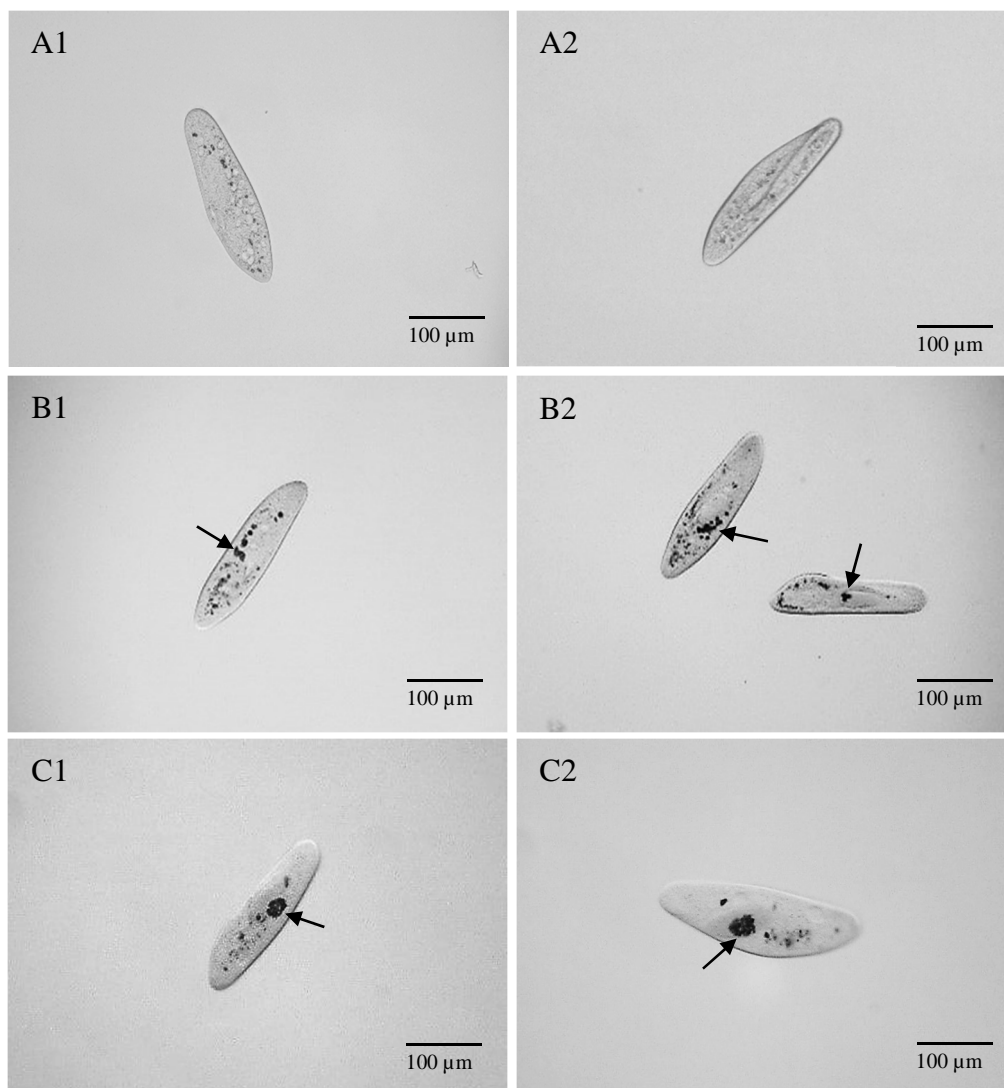


Figura 6. *Paramecium caudatum* no controle (A1 e A2) e exposto a 150 mg L⁻¹ de carbofuran administrado como Furadan® 350 SC (B1 e B2) e a 112 mg L⁻¹ de diuron administrado como Diuron Nortox® 500 SC (C1 e C2) após 4h de exposição. As setas indicam os agrotóxicos no interior dos vacúolos alimentares do protozoário.

Os resultados deste estudo mostraram que tanto o diuron como o carbofuran reduziram significativamente o crescimento (Figura 3) e o número de gerações (Figura 4) de *P. caudatum*. Sob condições estressantes, como a exposição a poluentes, reservas de energia são utilizadas em processos de desintoxicação, e consequentemente, os protozoários que habitam ambientes poluídos podem exibir reduzidas taxas de crescimento e replicação (Gomiero et al., 2013). A ocorrência de concentrações de poluentes capazes de induzir alterações nos mecanismos de reprodução, tais como a taxa de replicação, podem modificar severamente a estrutura da comunidade natural em termos de ocorrência de espécies e abundância relativa da população (Gomiero e Viarengo, 2014). Trielli et al. (2007) encontraram que 9,66 mg L⁻¹ de basudin (organofosforado) e 3,3 mg L⁻¹ de AFD25

(organoclorado) diminuíram significativamente as taxas de replicação do protozoário ciliado *Euplotes crassus*, enquanto Gomiero et al. (2012) relataram que células de *E. crassus* tratadas com $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Cu e 20 ng mL^{-1} de benzo(a)pireno tiveram suas taxas de replicação significativamente inibidas.

Efeitos tóxicos de contaminantes no componente protozoário das comunidades microbianas podem alterar a cadeia trófica e afetar significativamente o balanço ambiental (Gomiero et al., 2013; Trielli et al., 2007). Neste estudo, os resultados mostraram que os agrotóxicos diuron e carbofuran reduziram significativamente a biomassa do protozoário nas baixas concentrações testadas (Figura 5) devido a efeitos sobre o crescimento e a reprodução de *P. caudatum*. Li et al. (2015) relataram que a biomassa de *Tetrahymena thermophila* diminuiu em altas concentrações de tris (1,3-dicloro-2-propil) fosfato (100, 1000 e 10000 μM) após 8h de exposição, mas quando o tempo de exposição foi aumentado para 5 dias, baixas concentrações (0,1 e 1 μM) provocaram efeitos similares. Estes autores sugeriram que os contaminantes podem causar efeitos tóxicos em protozoários ciliados em concentrações mais baixas por exposição a multi-gerações, possivelmente ameaçando a microbiota após exposição a concentrações ambientalmente relevantes.

No presente estudo, informações ecológicas relevantes foram obtidas combinando os resultados de mortalidade, inibição de crescimento populacional, diminuição do número de gerações e biomassa, uma vez que estes efeitos sobre os protozoários estão relacionados a importantes mecanismos estruturais e funcionais que podem trazer efeitos adversos aos ecossistemas aquáticos. Portanto, a incorporação de múltiplos *endpoints* ecologicamente relevantes nos testes ecotoxicológicos utilizados em programas de gestão ambiental de rotina parece ser uma forma pragmática de conectar destinos ambientais com suas causas (Galloway et al., 2004).

O ciclo de vida curto de *P. caudatum* permitiu a análise dos efeitos tóxicos crônicos dos agrotóxicos em um número notável de células e por várias gerações ($\pm 2,6$ gerações), com alto grau de reprodutibilidade e respostas rápidas (24 horas). Muitos estudos têm demonstrado que o protozoário *P. caudatum* é um bom organismo-teste para avaliar os efeitos tóxicos causados por metais (Gong et al., 2014; Kvitek et al., 2009; Madoni, 2011; Wu et al, 2015). No entanto, pesquisas utilizando este organismo para avaliar o efeito de agrotóxicos ainda são escassos (e.g. Miyoshi et al., 2003). No presente estudo, verificou-se que *P. caudatum* é mais sensível ao agrotóxico diuron do que outras espécies comumente utilizadas em estudos ecotoxicológicos, tais como *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* e *Artemia*

salina. Portanto, este protozoário ciliado preencheu vários requisitos necessários para ser utilizado como organismo-teste em estudos ecotoxicológicos e confirmou que é um organismo-teste adequado para avaliar a toxicidade de agrotóxicos em ambientes aquáticos.

5. Conclusões

Este estudo revelou que os agrotóxicos diuron e carbofuran causam efeitos deletérios sobre protozoários ciliados como evidenciado pelas respostas de *P. caudatum*. Nas condições e concentrações testadas e para este organismo-teste particular, um protozoário ciliado unicelular, a toxicidade do diuron padrão e de sua formulação comercial foi similar, evidenciando, assim, que os ingredientes "inertes" não causaram efeitos sinérgicos. Por outro lado, a toxicidade aguda do carbofuran em sua formulação comercial foi duas vezes maior do que o seu ingrediente ativo padrão, sugerindo a ocorrência de interações sinérgicas com os ingredientes "inertes" e corroborando a conclusão geral de que a toxicidade é composto-específica. As respostas subletais adotadas para avaliar a toxicidade crônica, tais como inibição de crescimento populacional, número de gerações e biomassa foram sensíveis e adequadas para mostrar a extensão em que esses agrotóxicos podem afetar os organismos aquáticos não-alvo. Apesar de sua simplicidade estrutural, os protozoários ciliados como *P. caudatum* são sensíveis e exibem um conjunto de respostas identificáveis à toxicidade de agrotóxicos, em nível individual e populacional, sendo assim organismos-teste adequados. Embora as concentrações que causaram efeitos crônicos deletérios tenham sido relativamente altas em exposição curta, com tempos de exposição prolongados envolvendo múltiplas gerações, os efeitos tóxicos podem ocorrer em concentrações muito menores aproximando-se de condições ambientais mais realistas.

Referências Bibliográficas

Abhilash, P.C., Singh, N., 2009. Pesticide use and application: an Indian scenario. *J. Hazard. Mater.* 165, 1-12.

Allen, R.D., Naitoh, Y., 2002. Osmoregulation and contractile vacuoles of protozoa. *Int. Rev. Cytol.* 215, 351-394.

Ahmed, M., Latif, N., Khan, R.A., Ahmad, A., 2012. Toxicological effect of herbicides (diuron and bentazon) on snake venom and electric eel acetylcholinesterase. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 89, 229-233.

Ashauer, R., Caravatti, I., Hintermeister, A., Escher, B.I., 2010. Bioaccumulation kinetics of organic xenobiotic pollutants in the freshwater invertebrate *Gammarus pulex* modeled with prediction intervals. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 1625-1636.

Bailey, H., Digiorgio, C., Kroll, K., Miller, J., Hinton, D., Starrett, G., 1996. Development of procedures for identifying pesticide toxicity in ambient waters: carbofuran, diazinon, chlorpyrifos. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 837-845.

Bao, V.W., Leung, K.M., Qiu, J.W., Lam, M.H., 2011. Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1147-1151.

Beggel, S., Werner, I., Connon, R.E., Geist, J.P., 2010. Sublethal toxicity of commercial insecticide formulations and their active ingredients to larval fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Sci. Total Environ.* 408 (16), 3169-3175.

Begum, G., 2008. Assessment of biochemical markers of carbofuran toxicity and recovery response in tissues of the freshwater teleost, *Clarias batrachus* (Linn). *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* 81 (5), 480-484.

Bezirci, G., Akkas, S.B., Rinke, K., Yildirim, F., Kalaylioglu, Z., Severcan, F., Beklioglu, M., 2012. Impacts of salinity and fish-exuded kairomone on the survival and macromolecular profile of *Daphnia pulex*. *Ecotoxicology* 21 (2), 601-614.

Bogaerts, P., Bohatier, J., Bonnemoy, F., 2001. Use of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis* for the assessment of toxicity and quantitative structure-activity relationships of xenobiotics: Comparison with the microtox test. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 49, 293-301.

Bonnet, J.L., Bonnemoy, F., Dusser, M., Bohatier, J., 2007. Assessment of the potential toxicity of herbicides and their degradation products to nontarget cells using two microorganisms, the bacteria *Vibrio fischeri* and the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *Environ. Toxicol.* 22, 78-91.

Bretaud, S., Toutant, J.P., Saglio, P., 2000. Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 47, 117-124.

Bricheux, G., Bonnet, J., Bohatier, J., Morel, J., Desrosiers, N.M., 2013. Microcalorimetry: a powerful and original tool for tracking the toxicity of a xenobiotic on *Tetrahymena pyriformis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 98, 88-94.

Britto, F.B., Vasco, A.N.D., Pereira, A.P.S., Júnior, M., Vieira, A., Nogueira, L.C., 2012. Herbicides in the upper Poxim River, Sergipe, and the risk of contamination of water resources. *Revista Ciência Agronômica* 43, 390-398.

Caldas, S., Primel, E., Zanella, R., 2011. Risk estimate of water contamination and occurrence of pesticide in the South of Brazil. In *Herbicides and environment*. Kortekamp, A. (Ed.), INTECH Open Access Publisher, 471-492.

Cappelini, L.T.D., Cordeiro, D., Brondi, S.H.G., Prieto, K.R., Vieira, E.M., 2012. Development of methodology for determination of pesticides residue in water by SPE/HPLC/DAD. *Environ. Tech.* 33 (20), 2299-2304.

Carbo, L., Souza, V., Dores, E.F., Ribeiro, M.L., 2008. Determination of pesticides multiresidues in shallow groundwater in a cotton-growing region of Mato Grosso, Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* 19 (6), 1111-1117.

Carvalho, F.P., 2006. Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environ. Sci. Policy* 9, 685-692.

Catalá A., 2006. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 38, 1482-1495.

Cedergreen, N., Streibig, J.C., 2005. The toxicity of herbicides to nontarget aquatic plants and algae: assessment of predictive factors and hazard. *Pest. Manag. Sci.* 61, 1152-1160.

Cerdeira, A.L., Paraíba, L.C., Queiroz, S.C.N.D., Matallo, M.B., Ferracini, V.L., 2015. Estimation of herbicide bioconcentration in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Ciência Rural* 45 (4), 591-597.

Collective of authors SPA (State Phytosanitary Administration), 2002. List of the registered plant protection products. Agrospoj, SPA.

Corno, G., Caravati, E., Callieri, C., Bertoni, R., 2008. Effects of predation pressure on bacterial abundance, diversity, and size-structure distribution in an oligotrophic system. *J. Limnol.* 67 (2), 107-119.

Cox, C., Surgan, M., 2006. Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. *Environ. Health Perspect.* 114, 1803-1806.

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.

Dantas, A.D.B., Paschoalato, C.F., Martinez, M.S., Ballejo, R.R., Di Bernardo, L., 2011. Removal of diuron and hexazinone from Guarany Aquifer groundwater. *Braz. J. Chem. Eng.* 28, 415-424.

Delmonte Conrado, M.U., Amaroli, A., Trielli, F., Falugi, C., 2006. Cholinesterase enzyme activity in protists and environmental biomonitoring. *Current Trends Microbiology* 2, 123-136.

DeLorenzo, M.E., Danese, L.E., Baird, T.D., 2013. Influence of increasing temperature and salinity on herbicide toxicity in estuarine phytoplankton. *Environ. Toxicol.* 28 (7), 35-371.

Difco & BBL Manual, 2009. Manual of Microbiological Culture Media. Zimbro, M.J.O., Power, D.A., Miller, S.H.M., Wilson, G.E., Julie, A., Johnson, B.A. (Eds.). 2th edition. Maryland, USA.

Dragone, R., Cheng, R., Grasso, G., Frazzoli, C., 2015. Diuron in water: functional toxicity and intracellular detoxification patterns of active concentrations assayed in tandem by a yeast-based probe. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12 (4), 3731-3740.

Dores, E.F., Spadotto, C. A., Weber, O.L., Carbo, L., Vecchiato, A.B., Pinto, A.A., 2009. Environmental behaviour of metolachlor and diuron in a tropical soil in the central region of Brazil. *Water Air Soil Pollut.* 197, 175-183.

Ehler, L.E., 2004. An evaluation of some natural enemies of *Spodoptera exigua* on sugarbeet in Northern California. *BioControl* 49 (2), 121-135.

Elphick, J.R., Bergh, K.D., Bailey, H.C., 2011. Chronic toxicity of chloride to freshwater species: effects of hardness and implications for water quality guidelines. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 239-246.

Environmental Canada, 1990. Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants. Report EPS 1/RM/12.

Estève, K., Poupot, C., Dabert, P., Mietton-Peuchot, M., Milisic, V., 2009. A *Saccharomyces cerevisiae*-based bioassay for assessing pesticide toxicity. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36 (12), 1529-1534.

Fenchel, T., 1987. Ecology of Protozoa: the Biology of Free-living Phagotrophic Protists. Madison/Springer-Verlag, Berlin.

Fernandez-Alba, A.R., Guil, M.D.H., Lopez, G.D., Chisti, Y., 2002. Comparative evaluation of the effects of pesticides in acute toxicity luminescence bioassays. *Anal. Chim. Acta.* 451, 195-202.

Field, J.A., Reed, R.L., Sawyer, T.E., Griffith, S.M., Wigington, P.J., 2003. Diuron occurrence and distribution in soil and surface and ground water associated with grass seed production. *J. Environ. Qual.* 32, 171-179.

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.

Galloway, T.S., Brown, R.J., Browne, M.A., Dissanayake, A., Lowe, D., Jones, M.B., 2004. A multibiomarker approach to environmental assessment. *Environ. Sci. Technol.* 38 (6), 1723-31.

Gama-Flores, J.L., Sarma, S.S.S., Nandini, S., 2008. Combined effects of exposure time and copper toxicity on the demography of *Moina macrocopa* (Crustacea: Cladocera). *J. Environ. Sci. Health* 44, 86-93.

Gatidou, G., Stasinakis, A.S., Iatrou, E.I., 2015. Assessing single and joint toxicity of three phenylurea herbicides using *Lemna minor* and *Vibrio fischeri* bioassays. *Chemosphere* 119, 69-74.

Gerhardt, A., Ud-Daula, A., Schramm, K. W., 2010. *Tetrahymena* spp. (Protista, Ciliophora) as test species in rapid multilevel ecotoxicity tests. *Acta Protozoologica* 49 (4), 271-280.

Giacomazzi, S., Cochet, N., 2004. Environmental impact of diuron transformation: a review. *Chemosphere* 56, 1021-1032.

Gomiero, A., Sforzini, S., Dagnino, A., Nasci, C., Viarengo, A., 2012. The use of multiple endpoints to assess cellular responses to environmental contaminants in the interstitial marine ciliate *Euplotes crassus*. *Aquat. Toxicol.* 114-115, 206-216.

Gomiero, A., Dagnino, A., Nasci, C., Viarengo, A., 2013. The use of protozoa in ecotoxicology: application of multiple endpoint tests of the ciliate *E. crassus* for the evaluation of sediment quality in coastal marine ecosystems. *Sci. Total Environ.* 442, 534-544.

Gomiero, A., Viarengo, A., 2014. Effects of elevated temperature on the toxicity of copper and oxytetracycline in the marine model, *Euplotes crassus*: A climate change perspective. *Environ. Pollut.* 194, 262-271.

Gong, Z.L., Chen, Y., Yan, Y., Pei, S.Y., Wu, D., Zhang, M., Wang, Q., 2014. Toxicity of Three Heavy Metal Pollutants of the Pharmaceutical Wastewater to *Paramecium caudatum*. *Adv. Mat. Res.* 937, 571-577.

Goody, D.C., Chilton, P.J., Harrison, I., 2002. A field study to assess the degradation and transport of diuron and its metabolites in a calcareous soil. *Sci. Total Environ.* 297, 67-83.

Herbrandson, C., Bradbury, S.P., Swackhamer, D.L., 2003. Influence of suspended solids on acute toxicity of carbofuran to *Daphnia magna*: I. Interactive effects. *Aquat. Toxicol.* 63 (4), 333-342.

Hernando, M.D., Fernández-Alba, A.R., Tauler, R., Barceló, D., 2005. Toxicity assays applied to wastewater treatment. *Talanta* 65 (2), 358-366.

Hillebrand, H., Dürselen, C.D., Kirschtel, D., Pollinger, U., Zohary, T., 1999. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae. *J. Phycol.* 35 (2), 403-424.

Hussain, M.M., Amanchi, N.R., Solanki, V.R., Bhagavathi, M., 2008. Low cost microbioassay test for assessing cytopathological and physiological responses of ciliate model *Paramecium caudatum* to carbofuran pesticide. *Pest Biochem. Phys.* 90, 66-70.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2014. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3>> (Acesso em 07/01/2015).

Ibrahim, H., Kheir, R., Helmi, S., Lewis, J., Crane, M. 1998. Effects of organophosphorus, carbamate, pyrethroid and organochlorinepesticides, and a heavy metal on survival and cholinesterase activity of *Chironomus riparius* Meigen. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 60 (3), 448-455.

Ibrahim, A.T.A., Harabawy, A.S., 2014. Sublethal toxicity of carbofuran on the African catfish *Clarias gariepinus*: Hormonal, enzymatic and antioxidant responses. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 106, 33-39.

Iesce, M.R., Della Greca, M., Cermola, F., Rubino, M., Isidori, M., Pascarella, L., 2006. Transformation and ecotoxicity of carbamic pesticides in water. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 13 (2), 105-109.

ISO 10706, 2000. Water quality - determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). International Organisation for Standardisation, Geneva, Switzerland.

James-Yi, S., 2008. Systematics, ecology, and distribution of water mites (Acari: Parasitengonina). Ph.D. Thesis, University of Illinois at Urbana-Champaign, Champaign.

Jager, T., 2012. Bad habits die hard: The NOEC's persistence reflects poorly on ecotoxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 228-229.

Karlsson, J., Breitholtz, M., Eklund, B., 2006. A practical ranking system to compare toxicity of anti-fouling paints. *Mari. Pollut. Bull.* 52 (12), 1661-1667.

Koutsaftis, A., Aoyama, I., 2007. Toxicity of four antifouling biocides and their mixtures on the brine shrimp *Artemia salina*. *Sci. Total Environ.* 387, 166-174.

Krogh, K.A., Halling-Sørensen, B., Morgensen, B.B., Vejrup, K.V., 2003. Environmental properties and effects of non-ionic surfactant adjuvants in pesticides: a review. *Chemosphere* 50, 871-901.

Kroon, F. J., Hook, S. E., Metcalfe, S., Jones, D., 2015. Altered levels of endocrine biomarkers in juvenile barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), following exposure to commercial herbicide and surfactant formulations. *Environ. Toxicol. Chem.* 34 (8), 1881-1890.

Kumar, S., Thomas, A., Sahgal, A., Verma, A., Samuel, T., Pillai, M.K., 2004. Variations in the insecticide-resistance spectrum of *Anopheles stephensi* after selection with

deltamethrin or a deltamethrin-piperonyl-butoxide combination. *Trop. Med. Parasitol.* 98 (8), 861-871.

Kvitek, L., Vanickova, M., Panacek, A., Soukupova, J., Dittrich, M., Valentova, E., Pucek, R., Bancirova, M., Milde, D., Zboril, R., 2009. Initial study on the toxicity of silver nanoparticles (NPs) against *Paramecium caudatum*. *J. Phys. Chem. C* 113, 4296-4300.

Lal, S., Saxena, D. M., Lal, R., 1987. Uptake, metabolism and effects of DDT, fenitrothion and chlorpyrifos on *Tetrahymena pyriformis*. *Pest. Sci.* 21 (3), 181-191.

Landis, W.G., Chapman, P.M., 2011. Well past time to stop using NOELs and LOELs. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 7, 6-8.

Larras, F., Bouchez, A., Rimet, F., Montuelle, B., 2012. Using bioassays and species sensitivity distributions to assess herbicide toxicity towards benthic diatoms. *PloS One* 7 (8), e44458.

Lazhar, M., Hela, T., Moncef, B., Néji, A.A., 2012. Toxicity of three selected pesticides (alachlor, atrazine and diuron) to the marine fish (turbot *Psetta maxima*). *Afr. J. Biotechnol.* 11 (51), 11321-11328.

Lee, H.C., Lu, P.N., Huang, H.L., Chu, C., Li, H.P., Tsai, H.J., 2014. Zebrafish transgenic line huORFZ is an effective living bioindicator for detecting environmental toxicants. *PloS one* 9 (3), 149-160.

Li, J., John, P., Giesy, J. P., Yu, L., Li, G., Liu, C., 2015. Effects of Tris (1, 3-dichloro-2-propyl) Phosphate (TDCPP) in *Tetrahymena thermophila*: Targeting the Ribosome. *Sci. Rep.* 5.

Liyana, J.A., Watawala, R.C., Aravinna, A.P., Smith, L., Kookana, R.S., 2006. Sorption of carbofuran and diuron pesticides in 43 tropical soils of Sri Lanka. *J. Agri. Food Chem.* 54 (5), 1784-1791.

Loro, V.L., Murussi, C., Menezes, C., Leitemperger, J., Severo, E., Guerra, L., Guerra, L., Costa, M., Perazzo, G.X., Zanella, R., 2015. Spatial and temporal biomarkers responses of *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) (Characiformes: Characidae) from the middle rio Uruguai, Brazil. *Neotrop. Ichthyol.* 13 (3), 569-578.

Luna-Acosta, A., Renault, T., Thomas-Guyon, H., Fauray, N., Saulnier, D., Budzinski, H., Menach, K.L., Pardon, P., Fruitier-Arnaudin, I., Bustamante, P., 2012. Detection of early effects of a single herbicide (diuron) and a mix of herbicides and pharmaceuticals (diuron, isoproturon, ibuprofen) on immunological parameters of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Chemosphere*, 87 (11), 1335-1340.

Ma, J., Lu, N., Qin, W., Xu, R., Wang, Y., Chen, X., 2006. Differential responses of eight cyanobacterial and green algal species, to carbamate insecticides. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63 (2), 268-274.

- Madoni, P., 2006. Benthic ciliates in Adriatic Sea lagoons. *Eur. J. Protistol.* 42, 165-73.
- Madoni, P., 2011. Protozoa in wastewater treatment processes: a mini review. *Ital. J. Zool.* 78, 3-11.
- Madoni, P., Romeo, M.G., 2006. Acute toxicity of heavy metals towards freshwater ciliated protists. *Environ. Pollut.* 141 (1), 1-7.
- Mansano, A.S., Hisatugo, K.F., Hayashi, L.H., Regali-Selegim, M.H., 2014. The importance of protozoan bacterivory in a subtropical environment (Lobo-Broa Reservoir, SP, Brazil). *Braz. J. Biol.* 74 (3), 569-578.
- Martín-González, A., Borniquel, S., Díaz, S., Ortega, R., Gutiérrez, J.C., 2005. Ultrastructural alterations in ciliated protozoa under heavy metal exposure. *Cell Biol. Int.* 29 (2), 11-126.
- Mhadhbi, L., Beiras, R., 2012. Acute toxicity of seven selected pesticides (alachlor, atrazine, dieldrin, diuron, pirimiphos-methyl, chlorpyrifos, diazinon) to the marine fish (turbot, *Psetta maxima*). *Water Air Soil Pollut.* 223 (9), 5917-5930.
- Miyoshi, N., Kawano, T., Tanaka, M., Kadono, T., Kosaka, T., Kunimoto, M., Hosoya, H., 2003. Use of *Paramecium* species in bioassays for environmental risk management: determination of IC50 values for water pollutants. *J. Health Sci.* 49 (6), 429-435.
- Mohanty, B., Mahananda, M., 2013. Cadmium induced toxicity and antioxidant activities in *Labeo Rohita* (Hamilton). *Environ. Ecol. Res.* 1 (2), 41-47.
- Moreira, R.A., Mansano, A.S., Silva, L.C.D., 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), 1-8.
- Moreira, R.A., Mansano, A.S., Rocha, O., 2015. The toxicity of carbofuran to the freshwater rotifer, *Philodina roseola*. *Ecotoxicology* 24 (3), 604-615.
- Mortimer, M., Kasemets, K., Kahru, A., 2010. Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*. *Toxicology* 269 (2), 182-189.
- Mortuza, M.G., Takahashi, T., Ueki, T., Kosaka, T., Michibata, H., Hosoya, H., 2005. Toxicity and bioaccumulation of hexavalent chromium in green paramecium, *Paramecium bursaria*. *J. Health Sci.* 51 (6), 676-682.
- Moser, C., Bell, G., 2011. Genetic correlation in relation to differences in dosage of a stressor. *J. Evol. Biol.*, 24, 219-223.
- Noguerol, T.N., Boronat, S., Casado, M., Raldúa, D., Barceló, D., Piña, B., 2006. Evaluating the interactions of vertebrate receptors with persistent pollutants and antifouling pesticides using recombinant yeast assays. *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 1012-1019.

Oakes, D.J., Pollak, J.K., 2000. The in vitro evaluation of the toxicities of three related herbicide formulations containing ester derivatives of 2,4,5-T and 2,4-D using sub-mitochondrial particles. *Toxicology* 151, 1-9.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development, 2008. Guidelines for testing of chemicals. *Daphnia magna* reproduction test. OECD 211, Paris.

Orton, F., Lutz, I., Kloas, W., Routledge, E.J., 2009. Endocrine disrupting effects of herbicides and pentachlorophenol: in vitro and in vivo evidence. *Environ. Sci. Technol.* 43 (6), 2144-2150.

Pas, M., Milacic, R., Drasllar, K., Polllak, N., Raspor, P., 2004. Uptake of chromium (III) and chromium (VI) compounds in the yeast cell structure. *Biometals* 17, 25-33.

Paschoalato, C., Dantas, A., Rosa, I., Faleiros, R., Bernardo, L.D., 2008. Use of activated carbon to remove the herbicides diuron and hexazinone from water. *Revista DAE* 179, 34-41.

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

Pereira, J.L., Antunes, S.C., Castro, B.B., Marques, C.R., Goncalves, A.M.M., Goncalves, F., Pereira, R., 2009. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. *Ecotoxicology* 18, 455-463.

Pessoa, P.C., Luchmann, K.H., Ribeiro, A.B., Veras, M.M., Correa, J.R.M.B., Nogueira, A.J., Bainy, A.C.D., Carvalho, P.S.M., 2011. Cholinesterase inhibition and behavioral toxicity of carbofuran on *Oreochromis niloticus* early life stages. *Aquat. Toxicol.* 105 (3), 312-320.

Pinheiro, A., Silva, M.R., Kraisch, R., 2010. Presença de pesticidas em águas superficiais e subterrâneas na bacia do Itajaí, SC. *REGA* 7 (2), 17-26.

Putt, M., Stoecker, D.K., 1989. An experimentally determined carbon: volume ratio for marine "oligotrichous" ciliates from estuarine and coastal waters. *Limnol. Oceanog.* 34 (6), 1097-1103.

Qun, X., Rohrer, J., 2012. Rapid HPLC determination of carbofuran and carbaryl in tap and environmental waters using on-line SPE. *Thermo Scientific Application Update*, 186.

Rao, V.J., Gunda, V.G., Srikanth, K., Arepalli, S.K., 2007. Acute toxicity bioassay using *Paramecium caudatum*, a key member to study the effects of monocrotophos on swimming behaviour, morphology and reproduction. *Toxicol. Environ. Chem.* 89 (2), 307-317.

Rehman, A., Shakoori, F.R., Shakoori, A.R., 2008. Heavy metal resistant freshwater ciliate, *Euplotes mutabilis*, isolated from industrial effluents has potential to decontaminate wastewater of toxic metals. *Bioresour. Technol.* 99 (9), 3890-3895.

Ribeiro, A.C.A., Dores, E.F.G.C., Amorim, R.S.S., Lourencetti, C., 2013. Resíduos de pesticidas em águas superficiais de área de nascente do Rio São Lourenço-MT: Validação de método por extração em fase sólida e cromatografia líquida. *Química Nova* 36 (2), 284-290.

Rocha, P.R.R., Faria, A.T., G.S., Queiroz, M.E.L.R., Guimarães, F.C.N., Tironi, S.P., Silva, A.A., 2013. Half - life of diuron in soils with different physical and chemical attributes. *Ciência Rural* 43 (11), 1961-1966.

Sanches-Bayo, F., Hyne, R.V., 2011. Comparison of environmental risks of pesticides between tropical and nontropical regions. *Helth Ecol. Risk Asse.* 7 (4), 577-586.

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

Sherr, B.F., Sherr, E.B., 1984. The role of heterotrophic protozoa in carbon and energy flow in aquatic ecosystems. In: Klug, M.J., Reddy, C.A. (Eds.). *Currents perspectives in microbial ecology*. American Society for Microbiology (Washington, DC), 412-423.

Smurov, A.O., Fokin, S.I., 1999. Resistance of *Paramecium* species (Ciliophora, Peniculia) to salinity of environment. *Protistology* 1, 43-53.

Solomon, K.R., Thompson, D.G., 2003. Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. *J. Toxicol. Environ. Health B.* 6, 289-324.

Sornom, P., Felten, V., Médoc, V., Sroda, S., Rousselle, P., Beisel, J.N., 2010. Effect of gender on physiological and behavioural responses of *Gammarus roeseli* (Crustacea Amphipoda) to salinity and temperature. *Environ. Pollut.* 158 (5), 1288-1295.

Statsoft Inc, 2004. STATISTICA, Versão 07. www.statsoft.com. Accessed 16 May 2015.

Stock, C., Grønlien, H.K., Allen, R.D., Naitoh, Y., 2002. Osmoregulation in *Paramecium*: in situ ion gradients permit water to cascade through the cytosol to the contractile vacuole. *J. Cell Sci.* 115 (11), 2339-2348.

Tan, X., Shi, X., Liu, G., Xu, H., Nie, P., 2010. An approach to analyzing taxonomic patterns of protozoan communities for monitoring water quality in Songhua River, northeast China. *Hydrobiology* 638, 193-201.

Tarkowski, G.M., 2004. Carbofuran analysis of risks to endangered and threatened salmon and steelhead. U.S. Environmental Protection Agency Environmental Field Branch Office of Pesticide Programs.

Tenda, H., Alves-Pereira, I., Ferreira, R., 2012. Diuron determines *Saccharomyces cerevisiae* UE-ME3 survival at beginning of exponential phase. In: Mendez-Vilas, A. (Ed.), *Microbes in applied research: current advances and challenges*. World Scientific, Singapore, pp. 80-83.

Trielli, F., Amaroli, A., Sifredi, F., Marchi, B., Falugi, C., Corrado, M.U.D., 2007. Effects of xenobiotic compounds on the cell activities of *Euplotes crassus*, a single-cell eukaryotic test organism for the study of the pollution of marine sediments. *Aquat. Toxicol.* 83 (4), 272-283.

USEPA - US Environmental Protection Agency, 1985. *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms*. Washington, DC.

USEPA - US Environmental Protection Agency, 2002. *Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms*. Washington, DC.

Wickham, S.A., Gugenberger, E., 2008. Evaluating inducible morphological defences in the common freshwater ciliate, *Coleps hirtus*. *J. Plank. Res.* 30 (11), 1315-1321.

Wightwick, A., Allinson, G., 2007. Pesticide residues in Victorian waterways: a review. *Australas J. Ecotoxicol.* 3, 91-112.

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.

Wu, D., Yan, Y., Pei, S.Y., Zhang, M., Wang, Q., Gong, Z.L., Chen, Y., 2015. Inhibitory effect of three heavy metal pollutants on antioxidant enzymes of *Paramecium caudatum*. *Adv. Mater. Res.* 1065, 3071-3076.

Yilmaz, E.I., 2003. Metal tolerance and biosorption capacity of *Bacillus circulans* strain EB1. *Res. Microbiol.* 154, 409-41.

Zhang, L.J., Ying, G.G., Chen, F., Zhao, J.L., Wang, L., Fang, Y.X., 2012. Development and application of whole-sediment toxicity test using immobilized freshwater microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ. Toxicol. Chem.* 31 (2), 377-386.

Zhou, L., Li, J., Lin, X., Al-Rasheid, K.A., 2011. Use of RAPD to detect DNA damage induced by nitrofurazone in marine ciliate, *Euplotes vannus* (Protozoa, Ciliophora). *Aquat. Toxicol.* 103 (3), 225-232.

Toxicidade dos agrotóxicos diuron e carbofuran ao cladóceros neotropical *Ceriodaphnia silvestrii*

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar a toxicidade dos agrotóxicos diuron e carbofuran ao cladóceros neotropical *Ceriodaphnia silvestrii*. Para isso, testes de toxicidade aguda e crônica foram realizados com diuron e carbofuran, nas suas formas padrão e formulações comerciais, Diuron Nortox[®] 500 SC e Furadan[®] 350 SC, respectivamente. Os testes indicaram que o diuron comercial foi mais tóxico do que o seu ingrediente ativo padrão, enquanto que o carbofuran comercial foi menos tóxico do que a sua forma padrão. Para o diuron, a CE_{50-48h} foi de $7436,40 \pm 697,50 \mu\text{g L}^{-1}$ para a sua forma padrão e $1029,80 \pm 64,70 \mu\text{g L}^{-1}$ para a sua formulação comercial. Carbofuran foi mais tóxico do que diuron, apresentando uma CE_{50-48h} de $0,86 \pm 0,09 \mu\text{g L}^{-1}$ para a sua forma padrão e $1,31 \pm 0,12 \mu\text{g L}^{-1}$ para o seu produto comercial. Em relação à toxicidade crônica, o herbicida diuron, tanto na forma padrão como comercial, causou efeitos horméticos sobre a fertilidade das fêmeas de *C. silvestrii*. Já o carbofuran reduziu significativamente a reprodução desta espécie em concentrações a partir de $0,38 \mu\text{g L}^{-1}$. De acordo com as curvas de distribuição da sensibilidade das espécies (SSDs), a espécie tropical *C. silvestrii* foi mais sensível a estes agrotóxicos do que cladóceros comumente utilizados em regiões temperadas e, além disso, para o carbofuran, esta espécie foi o invertebrado aquático mais sensível já registrado na literatura até o presente momento. De acordo com as concentrações verificadas nos corpos d'água brasileiros, estes compostos representam riscos ecológicos por causarem efeitos tóxicos diretos e indiretos sobre o cladóceros *C. silvestrii* e, portanto, potencialmente a muitos outros invertebrados aquáticos. Com base nestes resultados, ressaltamos a importância de se utilizar espécies nativas em avaliações ambientais e o potencial de *C. silvestrii* como organismo-teste em estudos ecotoxicológicos nos ecossistemas aquáticos tropicais.

Palavras-chave: microcrustáceo; ecotoxicologia; formulação comercial; herbicida; inseticida.

1. Introdução

Os ecossistemas tropicais constituem os principais reservatórios de biodiversidade, os quais estão sujeitos a diversas ameaças, incluindo a expansão agrícola (Lacher e Goldstein, 1997). Nas últimas décadas, o uso de agrotóxicos em sistemas agrícolas aumentou consideravelmente, especialmente em regiões tropicais (Silva e Van Gestel, 2009), como é o caso do Brasil, que desde 2008 é o maior consumidor mundial destes produtos químicos (Pelaez et al., 2011; Gomes e Barizon, 2014) e seu consumo excessivo continua em ascensão desde então (Ferreira et al., 2010; IBAMA, 2012). Um dos principais problemas do uso destes compostos, é que eles podem causar efeitos tóxicos graves sobre organismos não-alvo, representando uma ameaça para a biodiversidade e o funcionamento dos ecossistemas aquáticos e terrestres (Schreinemachers e Tipraqsa, 2012).

Nos trópicos, devido à mobilidade relativamente elevada de agrotóxicos no solo e chuvas torrenciais frequentes, muitos agrotóxicos são transportados por lixiviação e escoamento superficial e, conseqüentemente, os seus resíduos são encontrados em vários ambientes, especialmente em águas superficiais e subterrâneas que representam o destino final desses compostos (Wightwick e Allinson 2007). Carbofuran e diuron são agrotóxicos comumente usados em várias culturas e frequentemente têm sido encontrados em corpos d'água em todo o mundo (e.g. Faggiano et al., 2010; Kaonga et al., 2015; Masiá et al., 2015; Papadakis et al., 2015) e também no Brasil (e.g. Caldas et al., 2011; Carbo et al., 2008; Loro et al., 2015; Ribeiro et al., 2013).

O diuron (*N*-(3,4-dichlorophenyl)-*N,N*-dimethyl-urea) é um herbicida que inibe a fotossíntese pelo bloqueio da cadeia de transporte de elétrons no fotossistema II em microrganismos e plantas fotossintéticas (Giacomazzi e Cochet, 2004). Entretanto, o diuron também pode causar efeitos aos organismos heterotróficos não-alvo (invertebrados, anfíbios e peixes) por diferentes modos de ação, como por exemplo: inibição da atividade da AChE (Ahmed et al., 2012; Bretaud et al., 2000), efeitos teratogênicos (Lazhar et al., 2012), desregulação do sistema endócrino (Noguerol et al., 2006; Orton et al., 2009) e efeitos imunotóxicos (Luna-Acosta et al., 2012). O carbofuran (2,3-dihydro-2,2-dimethyl-7-benzofuranyl-*N*-methylcarbamate) é usado na agricultura como um inseticida, acaricida e nematicida sistêmico e de contato e age sobre uma ampla variedade de organismos por se ligar à enzima acetilcolinesterase, inibindo sua ação sobre a acetilcolina (Pessoa et al., 2011).

Este composto é considerado muito tóxico para as aves, abelhas e animais aquáticos, como os invertebrados e peixes (Ibrahim e Harabawy, 2014).

A maioria dos estudos sobre os efeitos ecotoxicológicos de agrotóxicos nos ecossistemas aquáticos tem se concentrado em países de regiões temperadas (Lacher e Goldstein, 1997; Racke, 2003). Por isso, as avaliações de riscos de ambientes aquáticos em países tropicais muitas vezes dependem de dados de toxicidade de clima temperado (Kwok et al., 2007), embora o destino e os efeitos dos agrotóxicos possam ser diferentes entre as regiões climáticas (Daam e Van den Brink, 2010). As inadequações do uso de organismos modelos de regiões temperadas (e.g. *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia*) para aplicação em regiões subtropicais e tropicais são bem reconhecidas (Kwok et al., 2007; Del Sarto et al., 2014) e há uma crescente preocupação no contexto da ecotoxicologia para que sejam selecionadas novas espécies nativas a serem incluídas na avaliação de risco ambiental de produtos químicos (Menchaca et al., 2010). Como relativamente pouco se sabe sobre a sensibilidade de espécies tropicais, em comparação com as de regiões temperadas, novos estudos sobre a sensibilidade dos organismos a partir de várias origens são necessários (Daam e Van den Brink, 2010).

Alguns estudos ecotoxicológicos utilizando espécies nativas já demonstraram que estas são igualmente ou mais sensíveis do que espécies de ambientes temperados (e.g. Freitas e Rocha, 2012; Moreira et al., 2014). Algumas espécies tropicais substitutas para os cladóceros de ambientes temperados têm sido utilizadas em estudos ecotoxicológicos, e.g., *Ceriodaphnia cornuta* e *Daphnia lumholtzi* (Vietnã: Bui et al., 2016), *Moina micrura* (Burkina Faso: Leboulanger et al., 2009; Tailândia: Iwai et al., 2011), *Moinodaphnia macleayi* (Norte da Austrália: Van Dam et al., 2004), *Ceriodaphnia silvestrii* (Brasil: Casali-Pereira et al., 2015), *Diaphanosoma brachyurum* (Brasil: Lopes et al., 2007) e *Pseudosida ramosa* (Brasil: Freitas e Rocha, 2012). Para proteger a importante biodiversidade em ambientes aquáticos tropicais, faz-se necessário estabelecer um quadro amplo e consistente de espécies para a avaliação e gestão de riscos ecológicos de um número cada vez maior de produtos químicos que ocorrem nessas regiões (Kwok et al, 2007).

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a toxicidade do carbofuran e do diuron (ingrediente ativo padrão e produto comercial) ao cladóceros neotropical *Ceriodaphnia silvestrii*. Esta espécie apresenta ampla distribuição geográfica na América do Sul, possui ciclo de vida curto, procedimentos de cultivo simples, pertence a um dos grupos de organismos mais sensíveis para uma ampla gama de substâncias tóxicas, além de ocupar

uma posição central dentro das cadeias alimentares em águas doces (Fonseca e Rocha, 2004). O método para cultivo em laboratório como organismo-teste e o protocolo padronizado para sua utilização em testes de toxicidade foram previamente desenvolvidos (ABNT NBR 13373, 2005; Fonseca e Rocha, 2004; Santos et al., 2006). Neste estudo, a sensibilidade de *C. silvestrii* aos agrotóxicos carbofuran e diuron foi avaliada por meio de testes de toxicidade aguda e crônica para determinar os valores de CE_{50-48h} e valores de CENO-8d para a reprodução.

2. Materiais e Métodos

2.1. Organismo-teste e condições de cultivo

O cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, Daday, 1902 (Crustacea, Cladocera, Daphnidae) uma espécie nativa e endêmica da região Neotropical (Coelho e Rocha, 2010), foi inicialmente isolado do reservatório do Lobo-Broa, Itirapina, SP, Brasil e mantido em cultivo no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal de São Carlos.

Culturas de *C. silvestrii* foram mantidas sob temperatura (25 ± 1 °C) e fotoperíodo (12 de luz:12 h de escuro) constantes em água reconstituída com pH 7,0 - 7,6, condutividade de $160 \mu S \text{ cm}^{-1}$ e dureza 40 - 48 mg $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$, como recomendado pela Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTM, 2001). Os organismos foram 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 foi fornecida como suplemento alimentar (1 ml L^{-1}) (ABNT NBR 13373, 2005).

2.2. Substâncias e soluções-teste

Os compostos diuron (CAS nº 330-54-1) e carbofuran (CAS nº 1563-66-2) com pureza $\geq 98\%$ (padrão analítico) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O grau de pureza do produto comercial Diuron Nortox[®] 500 SC (adquirido de Nortox S/A, Brasil) é de 50% m/v de ingrediente ativo (69,4% m/v de ingredientes inertes) e do Furadan[®] 350 SC (adquirido de FMC, Brasil) é de 35% m/v de ingrediente ativo (65% m/v de ingredientes inertes). As soluções-estoque de diuron administrado como Diuron Nortox[®] 500 SC ($100 \text{ mg i.a. L}^{-1}$), carbofuran padrão ($100 \text{ mg i.a. L}^{-1}$) e carbofuran administrado como Furadan[®] 350 SC (100

mg i.a. L⁻¹) foram preparadas pela diluição de uma quantidade específica de cada composto em água destilada imediatamente antes dos testes, com a exceção do diuron padrão, que foi preparado em acetona grau analítico (C₃H₆O; LabSynth) devido à sua baixa solubilidade em água (35,6 mg L⁻¹ a 20 °C). Por sua vez, as concentrações nominais de cada composto testado foram obtidas pela diluição da solução-estoque em meio de cultura (água reconstituída).

Para confirmar as concentrações nominais utilizadas nos ensaios, as soluções-teste foram analisadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) (Agilent Technologies 1200, Waldbronn, Alemanha), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD). As condições cromatográficas de análise foram: coluna C18 Zorbax ODS (250mm × 4,6mm × 5µm) (Agilent Technologies, USA) e temperatura de forno de 25 °C. A fase móvel isocrática utilizada foi acetonitrila: água Milli-Q (70:30, v/v) durante 6 minutos, seguida de *post time* de 2 minutos, com volume de injeção de 20 µL e taxa de fluxo de 1,0 mL min⁻¹. A acetonitrila grau HPLC foi obtida da Merck (Alemanha). As análises foram realizadas em triplicatas. Com base nos sinais de absorbância observados no espectro DAD das soluções-padrão e a partir da literatura (Cappelini et al., 2012; Liyanage et al., 2006; Qun e Rohrer, 2012; Rocha et al., 2013), o diuron e o carbofuran foram detectados e quantificados a 254 nm e 280 nm, respectivamente. As soluções-teste de diuron foram analisadas por injeção direta em HPLC e de carbofuran passaram por processo de extração em fase sólida (SPE) para concentração do composto antes da injeção em HPLC.

O método de extração em fase sólida realizado neste estudo foi adaptado do método descrito por Cappelini et al. (2012). Para a extração do analito carbofuran foram utilizados cartuchos Chromabond[®] C18ec (6 mL, 500 mg) (Macherey-Nagel, Duren, Alemanha) em um dispositivo para SPE tipo manifold. Os cartuchos foram inicialmente condicionados com 10 mL de acetonitrila e 10 mL de água Milli-Q, seguida da adição de 200 mL de amostra sob vácuo, em triplicata. O analito foi eluído com 5 mL de acetonitrila, e posteriormente submetido à evaporação com nitrogênio e reconstituído em 0,5 mL de acetonitrila para as análises cromatográficas.

Os parâmetros utilizados para a validação do método foram seletividade, linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), exatidão, precisão e recuperação (Lanças, 2004). Os cromatogramas gerados mostraram que o método de análise do diuron e do carbofuran em água foi seletivo para estes compostos (Figuras 1 e 2, Apêndice C). Os resultados para LD, LQ, coeficiente de correlação linear da curva (r), precisão, exatidão e

recuperação do diuron e do carbofuran são apresentados na Tabela 1. As curvas analíticas para os compostos estudados são mostradas no Apêndice C (Figuras 3 e 4).

Tabela 1. Parâmetros analíticos utilizados para a validação do método de análise de diuron e carbofuran nas soluções-teste dos testes de toxicidade.

	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r	Precisão média (%)	Exatidão média (%)	Recuperação média (%)
Diuron	1,51	4,56	0,9990	0,51 \pm 0,19	99,71 \pm 5,37	-
Carbofuran	10,60	32,13	0,9998	1,23 \pm 0,71	98,96 \pm 8,15	99,15 \pm 7,46

LD = Limite de Detecção; LQ = Limite de Quantificação; r = coeficiente de correlação. Os valores indicados como média correspondem a média aritmética de $n = 6$ (média \pm desvio padrão).

Considerando-se a pré concentração do carbofuran de 400 vezes, uma vez que empregou-se 200 mL de amostra para extração, resultando em 0,5 mL de extrato final, o método empregado possibilitou a quantificação do carbofuran em concentrações a partir de 0,08 $\mu\text{g L}^{-1}$.

2.3. Testes de toxicidade aguda e crônica

Os testes de toxicidade aguda e crônica com *C. silvestrii* seguiram as diretrizes da Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD, 2004, 2008). Após os testes preliminares, a faixa de concentrações para cada composto foi estabelecida e testes de toxicidade aguda foram realizados com os seguintes intervalos de concentrações nominais: 2000 a 32000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de diuron e 400 a 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de diuron administrado como Diuron Nortox[®] 500 SC; 0,16 a 2,60 $\mu\text{g L}^{-1}$ de carbofuran e 0,60 a 3,93 $\mu\text{g L}^{-1}$ de carbofuran administrado como Furadan[®] 350 SC.

Nos testes de toxicidade aguda, quatro réplicas foram usadas por tratamento. Cada réplica continha cinco neonatos (6-24 h de idade) em um copo de polipropileno atóxico com 10 mL de solução-teste ou 10 mL de água reconstituída (controle). No caso do diuron padrão, foi necessário adicionar um controle do 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 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ e no escuro, como recomendado pela OECD (2004). Após 48 horas 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}).

Os testes de toxicidade crônica foram realizados utilizando dez réplicas, cada uma contendo um neonato (6-24h de idade) em 15 mL de solução-teste ou 15 mL de água reconstituída (controle). No caso do diuron padrão, um controle do solvente (0,01% de acetona, v/v) foi adicionado. 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 (temperatura, fotoperíodo e meio) descritas para o cultivo. Durante oito dias, os organismos foram observados sob microscópio estereoscópico, a fim de verificar diariamente a sobrevivência das fêmeas e o número de descendentes, que foram contados e descartados a cada renovação.

Para considerar a variabilidade e, conseqüentemente, a reprodutibilidade dos valores de toxicidade, dez testes definitivos de toxicidade aguda e três testes de toxicidade crônica foram realizados. Testes de toxicidade aguda com a substância de referência cloreto de sódio (NaCl) foram realizados mensalmente para avaliar as condições fisiológicas dos organismos e, por conseguinte, a validade dos ensaios. Além disso, as variáveis pH, temperatura da água, condutividade elétrica, dureza e oxigênio dissolvido foram medidos no início e no final dos testes de toxicidade.

2.4. Análise de Dados

Os valores de CE_{50-48h} e seus 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). 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). O teste de Dunnett foi utilizado 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* Statistica.

Curvas da distribuição da sensibilidade das espécies (*Species Sensitivity Distribution* - SSD) foram construídas para comparar os valores de toxicidade aguda (CE_{50}) e crônica (CENO) obtidos para *Ceriodaphnia silvestrii* exposta aos agrotóxicos diuron e carbofuran

com valores correspondentes para outras espécies de invertebrados. Dados de toxicidade para os invertebrados foram compilados a partir do banco de dados USEPA ECOTOX (<http://cfpub.epa.gov/ecotox/>), suplementado com dados da literatura aberta e relatórios de avaliação de diuron e carbofuran (European Commission, 2006) para as espécies não incluídas neste banco de dados. Neste estudo, apenas dados laboratoriais de toxicidade para invertebrados aquáticos foram considerados. Além disso, somente os dados que pudessem ser confirmados a partir de publicações originais e que aderem aos critérios de seleção fornecidos na Tabela 2 foram incluídos nas SSDs. Médias geométricas foram calculadas quando mais de um valor de toxicidade foi relatado para uma dada espécie.

Tabela 2. Critérios de seleção para os dados de testes de toxicidade aguda e crônica (adaptado de Van den Brink et al., 2006; Brock e Van Wijngaarden, 2012).

	Teste de toxicidade aguda	Teste de toxicidade crônica
<i>Endpoint</i>	CE ₅₀ ; CL ₅₀	CENO; CE ₁₀
Parâmetros do teste	Mortalidade, imobilização	Crescimento, alimentação, reprodução, desenvolvimento, mortalidade ou imobilização
Duração do teste (d)	2 - 4	> 6

Distribuições log-normal dos valores foram construídas utilizando o software ETX, versão 2.0 (Van Vlaardingen et al., 2004). O gráfico resultante traz no eixo Y a PAF (*Potentially Affected Fraction* - fração potencialmente afetada) que se refere ao HC_p (*Hazardous concentration* - concentração perigosa) onde p é a porcentagem de espécies ameaçadas pelo contaminante. As porcentagens mais comumente utilizadas são 5% e 50%, ou seja, HC₅ e HC₅₀ (Maltby et al., 2005; Kwok et al., 2007). Os valores de HC₅ e HC₅₀ e seus respectivos limites de confiança foram calculados com este software com base na metodologia descrita por Aldenberg e Jaworska (2000). Uma vez que o modelo assume uma distribuição log-normal dos dados, a log-normalidade foi testada com o teste de Anderson-Darling incluídos no pacote do software ETX, que foi avaliada no nível de significância de 5%.

3. Resultados

3.1. Variáveis abióticas dos testes de toxicidade e análises químicas

Durante os testes de toxicidade aguda e crônica, os valores de pH das soluções-teste permaneceram dentro do intervalo de 7,1 e 7,6 e não variaram mais que 1,0 unidade. A temperatura da água em todos os testes de toxicidade variou entre 24,2 - 25,8 °C, a condutividade elétrica entre 142,7 - 164,2 $\mu\text{S cm}^{-1}$, a dureza da água entre 40 - 48 mg $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ e o oxigênio dissolvido entre 6,5 - 7,3 mg L^{-1} . Assim, todos os testes preencheram os critérios de validade estabelecidos nas orientações da OECD (2004, 2008).

As análises das soluções-teste em HPLC-DAD mostraram que as concentrações iniciais reais de diuron e carbofuran (Figuras 5 e 6, no Apêndice C) nos testes de toxicidade aguda e crônica (ingrediente ativo padrão e produto comercial) diferiram menos de 10% das concentrações nominais. Portanto, os resultados foram calculados com base nas concentrações nominais, como sugerido pela ISO 10706 (2000).

3.2. Toxicidade aguda e crônica

No final dos testes de toxicidade aguda e crônica, a sobrevivência nos controles foi de 100%. Em todos os experimentos com o diuron padrão, não houve diferença significativa entre os resultados do controle e do controle com o solvente, excluindo a possibilidade de efeitos do solvente (0,01% de acetona) sobre os resultados de toxicidade. Os testes utilizando a substância de referência NaCl também indicaram que a sensibilidade de *C. silvestrii* ($\text{CE}_{50-48\text{h}}$ variou de 1,00 a 1,32 g L^{-1}) estava dentro da faixa esperada (faixa de referência: 1,00 a 1,83 g L^{-1} , Casali-Pereira et al., 2015) após exposição de 48 horas (Figura 7, no Apêndice C).

Nos testes de toxicidade aguda, os valores de $\text{CE}_{50-48\text{h}}$ para diuron e carbofuran (padrão e comercial) foram calculados separadamente para cada um dos dez testes realizados. Os resultados são apresentados em Box Plot na Figura 1. De acordo com os dados, a toxicidade dos ingredientes ativos dos compostos padrões testados foi significativamente diferente ($p < 0,05$) das suas formulações comerciais. No caso do diuron, o produto comercial foi 7,2 vezes mais tóxico do que o seu ingrediente ativo padrão, enquanto que para o carbofuran, o produto comercial foi 1,5 vezes menos tóxico do que o

seu ingrediente ativo padrão. Os valores médios de CE_{50-48h} e seus respectivos intervalos de confiança de 95% são também mostrados na Figura 1. Como esperado, o inseticida carbofuran foi mais tóxico do que o herbicida diuron ao cladótero *C. silvestrii*.

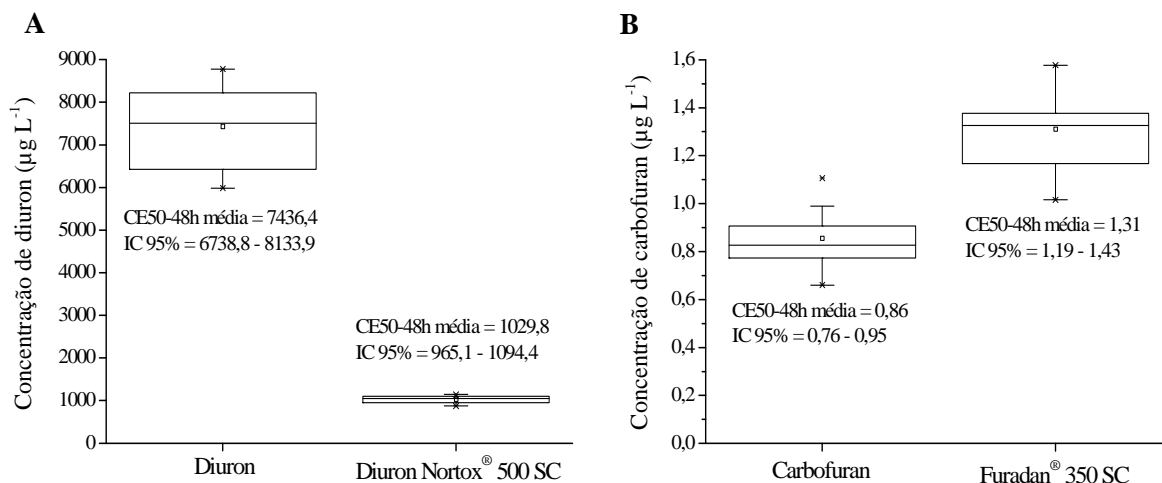


Figura 1. Box-plots representando os valores de CE_{50-48h} para os ingredientes ativos nas formas padrão e comercial de diuron (A) e carbofuran (B) para o cladótero *Ceriodaphnia silvestrii*.

Nos testes de toxicidade crônica, a porcentagem de sobrevivência das fêmeas de *C. silvestrii* após 8 dias de exposição em $8000 \mu\text{g L}^{-1}$ de diuron foi significativamente menor do que no controle. Nos experimentos com diuron administrado como Diuron Nortox[®] 500 SC, as diferentes concentrações testadas e o controle não apresentaram diferenças significativas com relação a sobrevivência. Para carbofuran, tanto na forma padrão como comercial, a porcentagem de sobrevivência das fêmeas na concentração de $0,96 \mu\text{g L}^{-1}$ foi significativamente menor do que no controle (Figura 2).

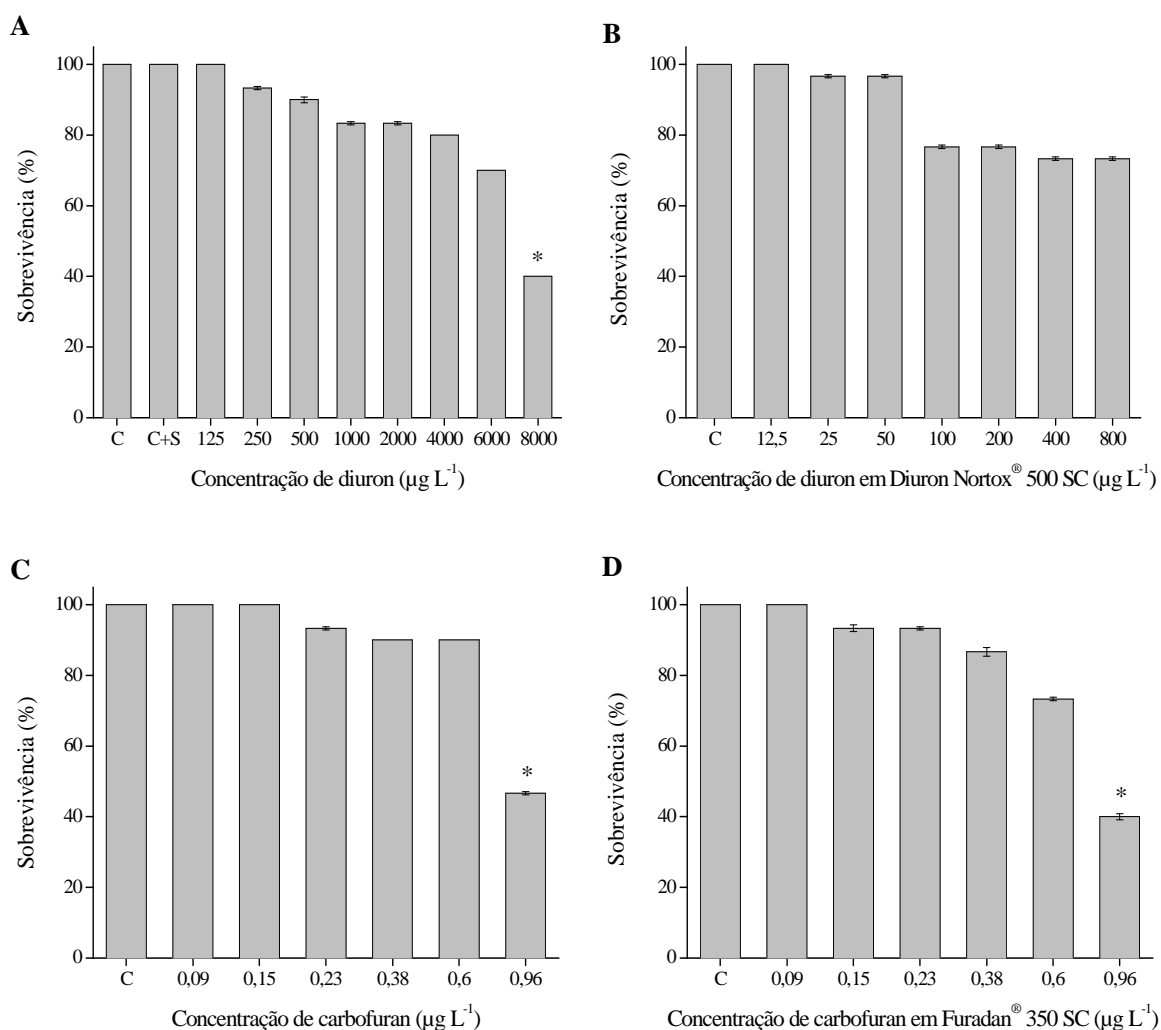


Figura 2. Porcentagem de sobrevivência das fêmeas de *Ceriodaphnia silvestrii* após 8 dias de exposição a diferentes concentrações de diuron padrão (A), diuron administrado como Diuron Nortox[®] 500 SC (B), carbofuran padrão (C) e carbofuran administrado como Furadan[®] 350 SC (D) nos testes de toxicidade crônica. O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle ($p \leq 0,05$, Teste de Dunnett).

Os dados obtidos nos testes de toxicidade crônica mostraram que os agrotóxicos diuron e carbofuran causam efeitos de redução na fertilidade das fêmeas de *C. silvestrii* nas altas concentrações testadas. No entanto, efeitos estimulantes (hormesis) em baixas concentrações de diuron também foram observados (Figura 3). Diuron causou um aumento significativo na fertilidade de fêmeas de *C. silvestrii* expostas às concentrações de 250 a 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de diuron na sua forma padrão (Figura 3A) e de 25 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ de diuron na sua forma comercial (Figura 3B). Contudo, uma diminuição significativa na fertilidade foi observada nos organismos-teste expostos as concentrações de 6000 e 8000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de diuron padrão e de 400 e 800 $\mu\text{g L}^{-1}$ de diuron comercial. Todos estes resultados foram evidenciados

pelo teste de Dunnett (diuron padrão: $F_{9,75} = 39,8$, $p < 0,001$; diuron produto comercial: $F_{7,59} = 51,4$, $p < 0,001$). Em relação à variável fertilidade, a maior concentração sem qualquer efeito observável (CENO) foi de $125 \mu\text{g L}^{-1}$ para diuron padrão e de $12,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para diuron comercial, enquanto que a menor concentração de diuron que causou um efeito observável (CEO) foi $250 \mu\text{g L}^{-1}$ e $25 \mu\text{g L}^{-1}$ para o ingrediente ativo padrão e para o produto comercial, respectivamente.

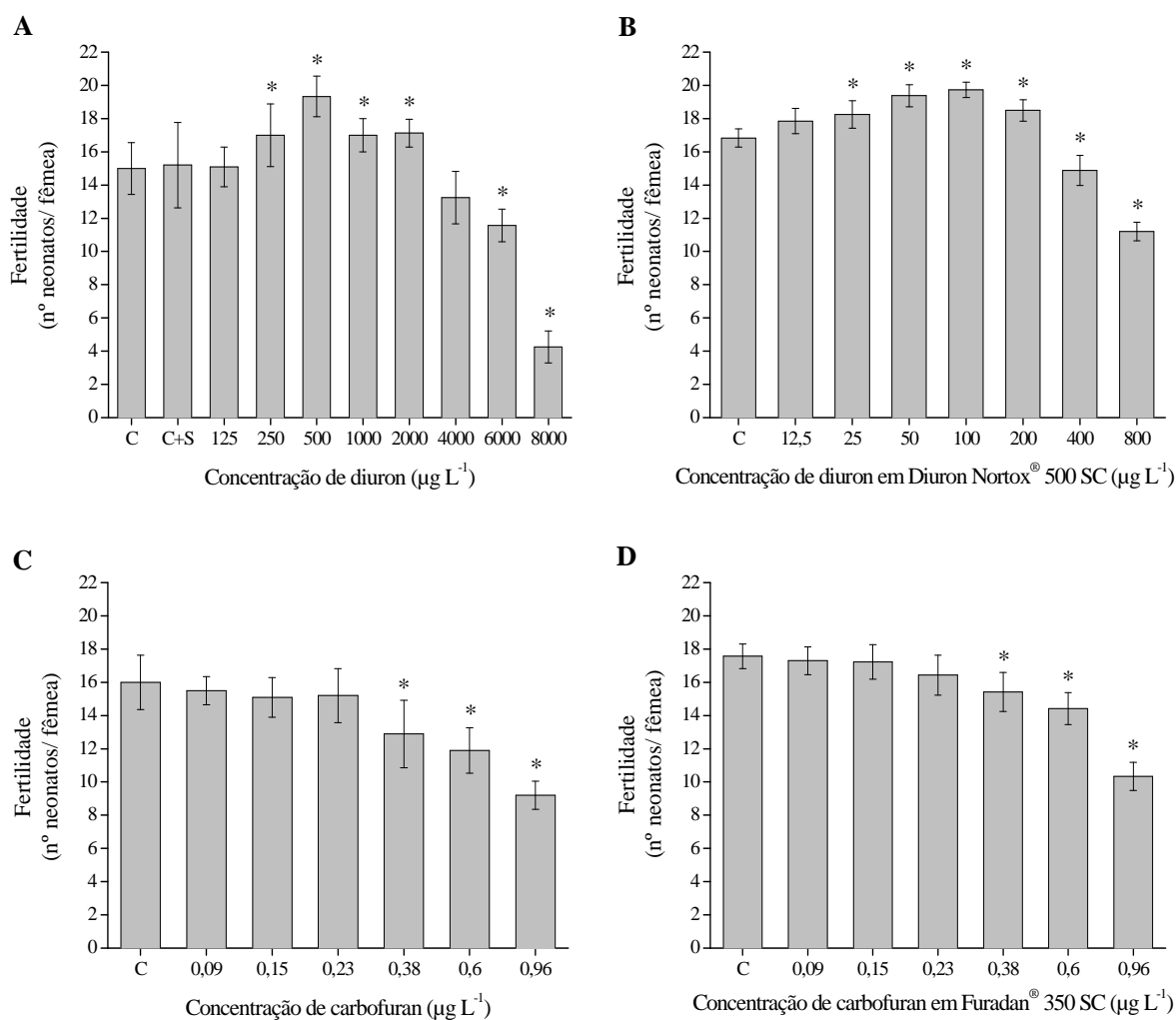


Figura 3. Fertilidade de *Ceriodaphnia silvestrii* (média \pm DP do número de neonatos por fêmea) após 8 dias de exposição a diferentes concentrações de diuron padrão (A), diuron administrado como Diuron Nortox® 500 SC (B), carbofuran padrão (C) e carbofuran administrado como Furadan® 350 SC (D) nos testes de toxicidade crônica. O asterisco (*) indica valor significativamente diferente do controle ($p \leq 0,05$, Teste de Dunnett).

Para o carbofuran, tanto o ingrediente ativo padrão (Figura 3C) como o seu produto comercial (Figura 3D) causaram uma diminuição significativa na fertilidade de fêmeas de

C. silvestrii expostas às concentrações de 0,38, 0,60 e 0,96 $\mu\text{g L}^{-1}$, como evidenciado pelo teste de Dunnett (carbofuran padrão: $F_{6,56} = 20,2$, $p < 0,001$; carbofuran produto comercial: $F_{6,56} = 40,5$, $p < 0,001$). Os valores de CENO e CEO para o carbofuran foram 0,23 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 0,38 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, tanto para o ingrediente ativo padrão como para seu produto comercial.

3.3. Distribuição da sensibilidade das espécies (SSD)

Pela análise das curvas de distribuição da sensibilidade das espécies (SSDs) obtidas para diuron (Figura 4) e carbofuran (Figura 5), a espécie neotropical *C. silvestrii*, quando comparada com outros invertebrados, foi um organismo-teste sensível aos agrotóxicos selecionados, principalmente para o carbofuran. Em relação a toxicidade aguda de diuron, *C. silvestrii* foi mais sensível do que o cladóceros *D. magna*, o copépodo *Tigriopus japonicus*, o branquiópodo *Artemia salina*, o poliqueta *Hydroides elegans*, o cnidário *Aiptasia* sp. e a craca *Balanus amphitrite*. Ao comparar os valores de toxicidade crônica (CENO ou EC10), *C. silvestrii* foi mais sensível ao diuron do que todas as espécies representadas na SSD (por exemplo, *D. magna*, *Hyella azteca* e *Chironomus tentans*) (Figura 4).

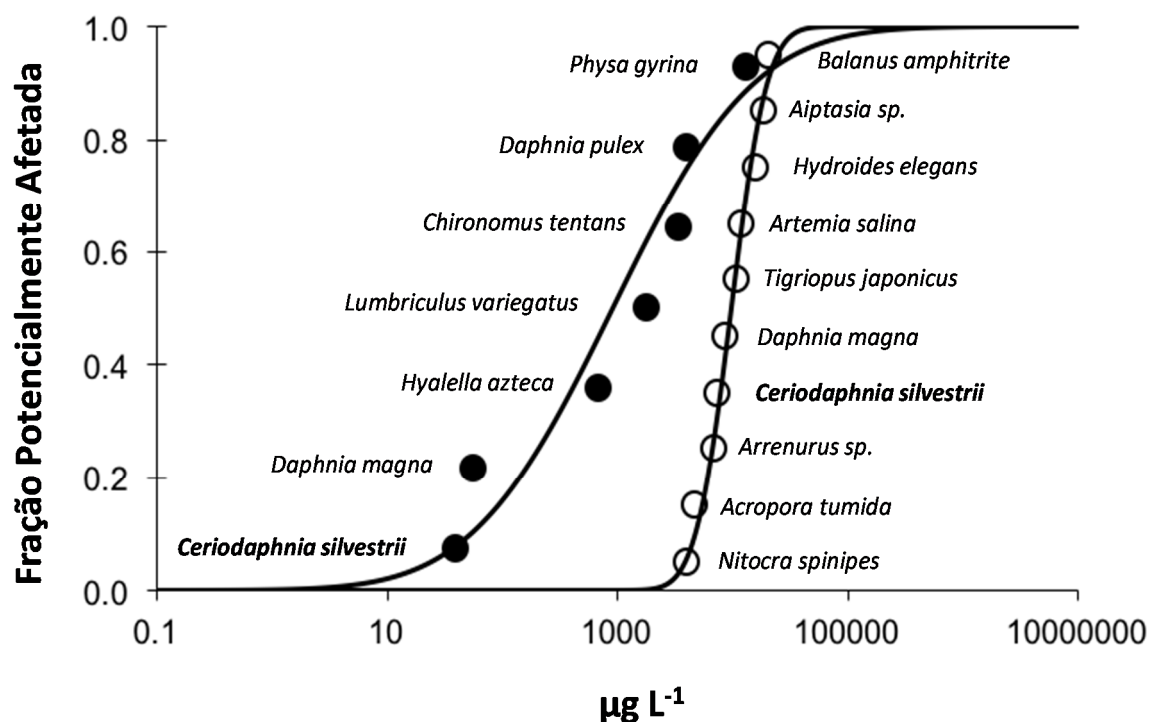


Figura 4. Curva de distribuição da sensibilidade das espécies (SSD) construída com base nos valores de CE_{50} (círculos abertos) e de $NOEC/CE_{10}$ (círculos fechados) para diuron obtidos no presente estudo para *Ceriodaphnia silvestrii* (em negrito) e para outros invertebrados da literatura.

De acordo com a curva SSD para carbofuran (Figura 5), o cladóceros *C. silvestrii* foi o invertebrado mais sensível já registrado na literatura até o presente momento. Em relação aos valores de EC_{50} , *C. silvestrii* foi mais sensível do que muitas espécies comumente usadas em estudos ecotoxicológicos, como por exemplo os cladóceros *C. dubia*, *D. magna* e *D. pulex*, os anfípodas *Gammarus fasciatus* e *G. pulex*, o quironomídeo *Chironomus riparius* e o rotífero *Brachionus calyciflorus*. Ao comparar os valores de toxicidade crônica ($CENO$ ou CE_{10}), *C. silvestrii* foi mais sensível ao carbofuran do que *Americamysis bahia*, *C. dubia* e *D. magna*.

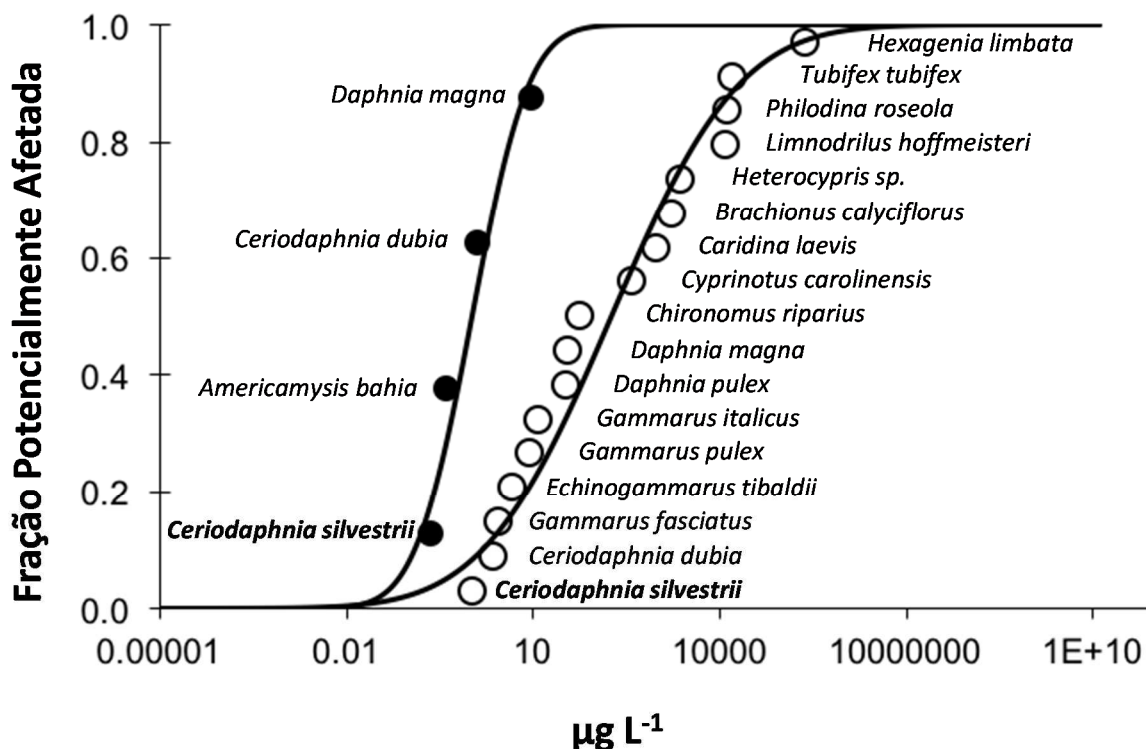


Figura 5. Curva de distribuição da sensibilidade das espécies (SSD) construída com base nos valores de CE_{50} (círculos abertos) e de $NOEC/CE_{10}$ (círculos fechados) para carbofuran obtidos no presente estudo para *Ceriodaphnia silvestrii* (em negrito) e para outros invertebrados da literatura.

A partir das curvas de SSD para diuron e carbofuran, os valores da concentração perigosa para 5% (HC_5) e 50% (HC_{50}) da comunidade de invertebrados foram calculados para os agrotóxicos selecionados (Tabela 3). De acordo com os valores de HC_5 e seus intervalos de confiança de 95% calculados, *C. silvestrii* estaria protegida contra os efeitos tóxicos do diuron, porém o carbofuran ainda poderia causar toxicidade crônica e aguda a esta espécie (ver limite superior de IC 95% para HC_5). Além disso, o baixo valor da razão entre a toxicidade aguda-a-crônica (*acute-to-chronic ratio* - ACR; sendo $ACR = CE_{50-48h}/CENO-8d$) para carbofuran neste estudo ($ACR = 3,7$) indica pequeno intervalo entre a concentração “segura” (CENO) e o aparecimento de efeitos em *C. silvestrii* (geralmente um ACR de 10 é assumido como padrão).

Tabela 3. Valor médio da concentração perigosa para 5% (HC₅) e 50% (HC₅₀) da comunidade de invertebrados e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para diuron e carbofuran, calculada com base nas curvas de SSD geradas a partir dos dados ecotoxicológicos (CENO e CE₅₀).

	HC ₅		HC ₅₀	
	HC ₅ (µg L ⁻¹)	IC 95% (µg L ⁻¹)	HC ₅₀ (µg L ⁻¹)	IC 95% (µg L ⁻¹)
Diuron				
Toxicidade crônica (CENO)	19,7	0,5 - 118,4	905,7	178,6 - 4593,0
Toxicidade aguda (EC50)	3728,0	1892,0 - 5473,0	9683,0	6995,0 - 13400,0
Carbofuran				
Toxicidade crônica (CENO)	0,07	0,0005 - 0,38	1,20	0,20 - 7,10
Toxicidade aguda (EC50)	0,35	0,017 - 2,60	181,00	37,00 - 876,00

4. Discussão

No presente estudo, a toxicidade de diuron padrão e carbofuran padrão à espécie *C. silvestrii* foi significativamente diferente da toxicidade dos seus produtos comerciais (Diuron Nortox[®] 500 SC e Furadan[®] 350 SC, respectivamente). As formulações comerciais dos agrotóxicos contêm o ingrediente ativo, cuja função é afetar o organismo-alvo, misturado com os chamados ingredientes “inertes”, que agem como solventes, emulsionantes, surfactantes, dentre outros (Cox e Surgan, 2006) e muitas vezes são mantidos em sigilo pelas empresas fabricantes. Estes ingredientes “inertes” podem contribuir para a toxicidade da formulação, quer por exercer atividade tóxica por si próprios, ou por interação com o ingrediente ativo, facilitando a sua absorção pelos organismos vivos, o transporte e a volatilização do composto, além de tornar o agrotóxico mais persistente no ambiente (Baynes e Rivieri, 1998; Huston e Pignatello, 1999).

Na maioria das pesquisas e também como verificado no presente estudo para o diuron, a toxicidade da formulação comercial é maior do que a do ingrediente ativo padrão (e.g. Pereira et al., 2009; Beggel et al., 2010; Mullin, 2015). Kroon et al. (2015), ao comparar a toxicidade do ingrediente ativo diuron e seu produto comercial, verificaram que os biomarcadores estrogênicos em juvenis do peixe *Lates calcarifer* aumentaram após a exposição à formulação comercial do diuron (Diurex[®] WG), mas não para o composto químico padrão, sugerindo uma resposta estrogênica para os aditivos. Diferentemente da tendência frequentemente relatada, em alguns casos, como o ocorrido com o carbofuran neste estudo, a toxicidade do produto comercial é menor do que a do seu ingrediente ativo padrão, sendo provável que os compostos “inertes” adicionados nas formulações tenham

contribuído para um efeito antagônico (e.g. Guilherme et al., 2012). Moreira et al. (2015), ao comparar a toxicidade do ingrediente ativo carbofuran padrão com o seu produto comercial Furadan® 350 SC ao rotífero *Philodina roseola* também verificou maior toxicidade do carbofuran em sua forma padrão. Portanto, testes com o ingrediente ativo padrão e também com a sua formulação comercial são importantes, pois fornecem informações mais realísticas sobre a toxicidade de agrotóxicos, que podem ter respostas tóxicas diferentes, tanto devido aos ingredientes inertes associados como ao fato das respostas de toxicidade serem normalmente espécie-específicas.

Comparando-se os valores médios de CE_{50-48h} dos ingredientes ativos carbofuran ($0,86 \mu\text{g L}^{-1}$) e diuron ($7436,4 \mu\text{g L}^{-1}$) verificou-se que o carbofuran é aproximadamente 8647 vezes mais tóxico. A alta toxicidade do carbofuran é provavelmente devida ao seu modo de ação específico. Este inseticida carbamato inibe a ação da enzima acetilcolinesterase que atua nas sinapses colinérgicas, hidrolisando o neurotransmissor acetilcolina em colina e ácido acético (Kavitha e Rao, 2007). O mecanismo de inibição da acetilcolinesterase por carbofuran ocorre por meio da formação de um complexo enzima-inibidor (reversível) e posterior carbamilação (Maxwell et al., 2008). Já o herbicida diuron é um potente inibidor da fotossíntese, não sendo um agrotóxico específico para organismos heterotróficos. No entanto, apesar da relativamente baixa sensibilidade de *C. silvestrii* ao diuron, este composto causou efeitos tóxicos sobre este organismo-teste. Poucos são os estudos de toxicidade de diuron sobre cladóceros disponíveis na literatura (e.g. Fernández-Alba et al., 2002; Hernando et al., 2005; Neuwoehner et al., 2010), razão pela qual seu modo de ação sobre estes organismos ainda não está claro. De acordo com Neuwoehner et al. (2010), em dafinídeos (e.g. *Daphnia magna*), o diuron foi um agente tóxico *baseline*. Segundo Nendza et al. (2014), a toxicidade *baseline* (ou nível-narcole) denota os efeitos mínimos causados por interações não-covalentes inespecíficas de xenobióticos com componentes da membrana, isto é, perturbações da membrana. Kao et al. (1995) observaram que o herbicida atrazina induziu o citocromo P450 e a atividade esterase não-específica em insetos. Estas enzimas induzidas quebram agrotóxicos, com o efeito de aumentar ou diminuir a toxicidade, dependendo se os metabolitos resultantes são mais ou menos tóxicos do que os seus compostos precursores. Como os herbicidas atrazina e diuron apresentam modos de ação similares e crustáceos e insetos compartilham propriedades fisiológicas importantes, o diuron pode similarmente induzir o citocromo P450 e a atividade esterase não-específica em *C. silvestrii*.

Quando os dados de sensibilidade de *C. silvestrii* para o diuron e o carbofuran registrados neste estudo foram representados em curvas SSDs em conjunto com os dados da literatura para a toxicidade aguda e crônica destes compostos a outras espécies (Figura 4 e 5), verificou-se que a espécie neotropical *C. silvestrii* foi mais sensível do que cladóceros comumente usados em regiões temperadas, como por exemplo *Ceriodaphnia dubia*, *Daphnia magna* e *D. pulex*, e muitos outros invertebrados utilizados como organismos-teste. Em alguns estudos, as espécies tropicais nativas selecionadas também foram mais sensíveis aos compostos do que as de clima temperado (e.g. Do Hong et al 2004; Freitas e Rocha, 2012; Moreira et al., 2014). Kwok et al. (2007) compararam a sensibilidade das espécies temperadas com as tropicais para 18 substâncias químicas utilizando as SSDs. Os resultados indicaram que as sensibilidades relativas das espécies tropicais e temperadas são visivelmente diferentes para alguns produtos químicos, sendo que para alguns agrotóxicos, como por exemplo para o clorpirifós, espécies tropicais são mais sensíveis (Kwok et al., 2007).

Ao comparar os valores de toxicidade aguda, *C. silvestrii* foi mais sensível ao diuron do que seis invertebrados, dentre eles o cladóceros *D. magna* ($EC_{50-48h} = 8600,0 \mu\text{g L}^{-1}$, Hernando et al., 2005) e o copépodo *Tigriopus japonicus* ($EC_{50-48h} = 11000,0 \mu\text{g L}^{-1}$, Bao et al., 2011) (Figura 4). Para o ingrediente ativo carbofuran, a espécie *C. silvestrii* foi o organismo aquático mais sensível registrado na literatura até o presente momento (Figura 5). Considerando a média geométrica (g) dos dados para comparações, visto a grande quantidade de valores disponíveis na literatura, *C. silvestrii* foi aproximadamente 2,7 vezes mais sensível ao carbofuran do que a *C. dubia* ($gEC_{50-48h} = 2,3 \mu\text{g L}^{-1}$, e.g. Bailey et al., 1996; Norberg-King et al., 1991) e 43,3 vezes mais sensível do que a *D. magna* ($gEC_{50-48h} = 37,2 \mu\text{g L}^{-1}$, e.g. Herbrandson et al., 2003; Hernando et al., 2005). Em relação aos valores de CENO, a *C. silvestrii* também apresentou o menor valor, sendo este aproximadamente 42,6 vezes menor do que o de *D. magna* (CENO-21d = $9,8 \mu\text{g L}^{-1}$, USEPA, 1992). No entanto, as comparações diretas dos dados ecotoxicológicos deste estudo com outros invertebrados devem ser vistas com cautela, pois diferenças de sensibilidade observadas para estes compostos podem ser devido às características intrínsecas das espécies (e.g. tamanho, idade) e diferenças nas condições de ensaio (e.g. temperatura, fotoperíodo, composição do meio, dureza da água), como relatado por outros autores (e.g. Freitas e Rocha, 2012; Moreira et al., 2014).

Em relação à toxicidade crônica, os agrotóxicos selecionados apresentaram efeitos sub-letais sobre a reprodução. O carbofuran, tanto na forma padrão como em seu produto comercial, reduziu significativamente a fertilidade das fêmeas de *C. silvestrii* em concentrações a partir de $0,38 \mu\text{g L}^{-1}$. O número de descendentes por fêmea de *Moina micrura* também foi reduzido significativamente por carbofuran ($2,5 \mu\text{g L}^{-1}$), além de outros agrotóxicos como malation, clorpirifós e glifosato (Iwai et al., 2011). Casali-Pereira et al. (2015) verificou a redução da fertilidade de *C. silvestrii* em fêmeas expostas à abamectina (169 ng L^{-1}). De modo geral, vários autores têm relatado que agrotóxicos agem sobre a reprodução de cladóceros, diminuindo o número de descendentes, além de aumentar a taxa de anormalidades em embriões (e.g. Freitas e Rocha, 2012; Palma et al., 2009).

O herbicida diuron, tanto na forma padrão como em seu produto comercial, causou um aumento na fertilidade das fêmeas de *C. silvestrii* expostas a baixas concentrações deste herbicida e uma redução na fertilidade das fêmeas nas maiores concentrações testadas. Este resultado se deve ao fenômeno hormesis, que é definido como uma relação dose-resposta bifásica caracterizada por estimulação em baixas doses e inibição em altas doses (Calabrese e Baldwin, 2002). Segundo estes autores, a resposta de estimulação em baixas concentrações é devida à estimulação direta ou o resultado de processos biológicos de compensação após uma perturbação inicial na homeostase (sobrecompensação). O efeito hormesis tem sido relatado para muitas espécies de invertebrados expostos a diferentes produtos químicos (Calabrese e Baldwin, 2003; Gama-Flores et al., 2007; Garaventa et al., 2010; Guo et al. 2012; Huang et al., 2013; Moreira et al., 2015). Li e Tan (2011) relataram que *D. magna* após exposição crônica aos agrotóxicos triazofós ($1,5 \mu\text{g L}^{-1}$) e clorpirifós ($0,1 \mu\text{g L}^{-1}$) apresentou resposta hormética na atividade da colinesterase. Em *D. carinata*, o inseticida clorpirifós causou um efeito hormesis na 1ª e 2ª geração de descendentes de adultos expostos, mas indivíduos a partir da 3ª geração foram mais sensíveis a este agrotóxico (Zalizniak e Nugegoda, 2006). Para herbicidas, o potencial para o efeito hormesis sobre plantas terrestres, macrófitas e algas é bem reconhecido (e.g. Cedergreen, 2008, Cedergreen et al., 2007; Belza e Duke, 2014), no entanto, este efeito também tem sido observado para espécies de invertebrados expostos a herbicidas (e.g. Bonilla-Ramirez et al., 2013; Tyne et al., 2015).

Vários estudos (e.g. Calabrese e Baldwin, 2002; Forbes, 2000; Jager et al., 2013) sugerem diferentes mecanismos que podem provocar o efeito hormesis, como por exemplo aumento na aquisição de energia, mudanças na alocação de recursos energéticos ou medicação (quando o estressor é um elemento essencial ou atua como uma cura para uma

doença ou infecção) (Jager et al., 2013). Neste estudo, o aumento do número de neonatos por fêmea de *C. silvestrii* exposta a baixas concentrações de diuron pode ter sido causado por uma mudança na alocação de energia, favorecendo o aumento na reprodução. No entanto, esta hipótese não foi comprovada neste estudo, visto que uma diminuição em outro *endpoint* (e.g. crescimento somático, sobrevivência) nas baixas concentrações não foi observado durante os testes de toxicidade crônica. No entanto, pode-se inferir que a alta fertilidade observada nas baixas concentrações subletais do diuron provavelmente pode ter futuros efeitos adversos sobre o desempenho reprodutivo e na sua própria sobrevivência, como consequência da canalização de muita energia para a reprodução sob o estresse causado por este agrotóxico. O estudo da hormesis em ecotoxicologia é particularmente relevante para os agrotóxicos, pois estes compostos são geralmente encontrados em baixas concentrações no ambiente (Tyne et al., 2015; Konstantinou et al., 2006).

No Brasil, em várias regiões foram relatadas a contaminação de águas superficiais e subterrâneas pelos agrotóxicos diuron e carbofuran. As concentrações máximas detectadas para o diuron variaram de 0,9 a 408 $\mu\text{g L}^{-1}$ (e.g. Britto et al., 2012; Dantas et al., 2011; Dores et al., 2009; Paschoalato et al., 2008) e para o carbofuran, de 0,1 a 68,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ (e.g. Caldas et al., 2011; Carbo et al., 2008; Loro et al., 2015; Ribeiro et al., 2013). De acordo com as concentrações reais encontradas nos corpos d'água do Brasil, o carbofuran pode causar efeitos tóxicos crônicos e agudos para o cladóceros *C. silvestrii* ($\text{CEO} = 0,38 \mu\text{g L}^{-1}$ e $\text{CE}_{50} = 0,86 \mu\text{g L}^{-1}$). No caso do diuron, esta espécie pode estar aparentemente protegida, embora as baixas concentrações deste agrotóxico podem causar efeitos horméticos sobre a reprodução de *C. silvestrii* e afetar a estrutura e funcionamento dos ecossistemas aquáticos. Além disso, as concentrações ambientais observadas para o herbicida diuron podem ter efeitos tóxicos em comunidades de algas (DeLorenzo et al., 2013; Pesce et al., 2011; Tlili et al., 2011) e, assim, indiretamente afetarem o cladóceros aqui estudado pela redução de sua fonte de alimento. Para um cenário mais realístico da toxicidade do diuron e do carbofuran, sugerimos para estudos futuros a avaliação dos efeitos tóxicos destes agrotóxicos em mistura e também a realização de estudos experimentais *in situ* (mesocosmos), os quais poderão fornecer as informações necessárias para uma compreensão mais aprofundada dos efeitos dos mesmos e de suas interações com fatores ambientais nos sistemas aquáticos.

5. Conclusões

Os resultados deste estudo revelaram que os agrotóxicos diuron e carbofuran causam efeitos tóxicos letais e subletais ao cladóceros neotropical *Ceriodaphnia silvestrii*. Esta espécie apresentou elevada sensibilidade a estes compostos, sendo para o carbofuran o organismo-teste mais sensível já registrado na literatura. De acordo com as curvas de distribuição da sensibilidade das espécies (SSDs), a espécie tropical *C. silvestrii* foi mais sensível a estes agrotóxicos do que cladóceros comumente utilizados em regiões temperadas, como por exemplo *Ceriodaphnia dubia* e *Daphnia magna*. Nas condições testadas e para este organismo-teste particular, a toxicidade dos ingredientes ativos padrões foi significativamente diferente das suas formulações comerciais, sendo possível observar maior e menor toxicidade do produto comercial para o diuron e carbofuran, respectivamente, sugerindo que os ingredientes “inertes” adicionados nas formulações comerciais podem causar interações sinérgicas ou antagônicas com os ingredientes ativos. O herbicida diuron, tanto na forma padrão como em seu produto comercial, causou efeitos horméticos sobre a fertilidade das fêmeas de *C. silvestrii*, enquanto o carbofuran reduziu significativamente a reprodução desta espécie em concentrações a partir de 0,38 $\mu\text{g L}^{-1}$. De acordo com as concentrações reais verificadas nos corpos d'água do Brasil, o carbofuran apresenta alto risco de causar efeitos tóxicos agudos e crônicos para o cladóceros *C. silvestrii* e no caso do diuron, esta espécie pode estar aparentemente protegida, embora as concentrações ambientais observadas possam ter efeitos tóxicos em comunidades de algas afetando assim, indiretamente a espécie. Com base neste estudo, destacamos o potencial da espécie *C. silvestrii* como organismo-teste em estudos ecotoxicológicos com agrotóxicos e ressaltamos a importância da utilização de organismos-teste nativos para tornar ecologicamente relevante a avaliação de risco desses e de outros produtos tóxicos aos ecossistemas aquáticos tropicais.

Referências Bibliográficas

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2005. Ecotoxicologia Aquática—Toxicidade Crônica—Método de Ensaio com *Ceriodaphnia* spp. (Cladocera, Crustacea). NBR 13373. Rio de Janeiro, Brazil.

Ahmed, M., Latif, N., Khan, R.A., Ahmad, A., 2012. Toxicological effect of herbicides (diuron and bentazon) on snake venom and electric eel acetylcholinesterase. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 89, 229-233.

Aldenberg, T., Jaworska, J.S., 2000. Uncertainty of hazardous concentrations and fraction affected for normal species sensitivity distributions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46, 1-18.

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.

Bailey, H., Digiorgio, C., Kroll, K., Miller, J., Hinton, D., Starrett, G., 1996. Development of procedures for identifying pesticide toxicity in ambient waters: carbofuran, diazinon, chlorpyrifos. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 837-845.

Bao, V.W., Leung, K.M., Qiu, J.W., Lam, M.H., 2011. Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 1147-1151.

Baynes, R.E.; Riviere, J.E. 1998. Influence of inert ingredients in pesticide formulations on dermal absorption of carbaryl. *Am. J. Vet. Res.*, 59 (2), 168-175.

Beggel, S., Werner, I., Connon, R.E., Geist, J.P., 2010. Sublethal toxicity of commercial insecticide formulations and their active ingredients to larval fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Sci. Total Environ.* 408 (16), 3169-3175.

Belza, R.G., Duke, S.O., 2014. Herbicides and plant hormesis. *Pest Manag. Sci.* 70 (5), 698-707.

Bonilla-Ramirez, L., Jimenez-Del-Rio, M., Velez-Pardo, C., 2013. Low doses of paraquat and polyphenols prolong life span and locomotor activity in knock-down parkin *Drosophila melanogaster* exposed to oxidative stress stimuli: implication in autosomal recessive juvenile Parkinsonism. *Gene* 512, 355-363.

Brethead, S., Toutant, J.P., Saglio, P., 2000. Effects of carbofuran, diuron, and nicosulfuron on acetylcholinesterase activity in goldfish (*Carassius auratus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 47, 117-124.

Britto, F.B., Vasco, A.N.D., Pereira, A.P.S., Júnior, M., Vieira, A., Nogueira, L.C., 2012. Herbicides in the upper Poxim River, Sergipe, and the risk of contamination of water resources. *Revista Ciência Agronômica* 43, 390-398.

Brock, T.C.M., Van Wijngaarden, R.P.A., 2012 Acute toxicity tests with *Daphnia magna*, *Americamysis bahia*, *Chironomus riparius* and *Gammarus pulex* and implications of new EU requirements for the aquatic effect assessment of insecticides. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 19, 3610-3618.

Bui, T.K.L., DoHong, 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.

Calabrese, E. J., Baldwin, L. A., 2002. Defining hormesis. *Hum Exp Toxicol* 21 (2), 91-97.

Calabrese, E.J., Baldwin, L.A., 2003. Hormesis: the dose-response revolution. *Annual Rev. Pharmac. Toxicol.* 43 (1), 175-197.

Caldas, S., Primel, E., Zanella, R., 2011. Risk estimate of water contamination and occurrence of pesticide in the South of Brazil. In *Herbicides and environment*. Kortekamp, A. (Ed.), INTECH Open Access Publisher, 471-492.

Cappelini, L.T.D., Cordeiro, D., Brondi, S.H.G., Prieto, K.R., Vieira, E.M., 2012. Development of methodology for determination of pesticides residue in water by SPE/HPLC/DAD. *Environ. Tech.* 33 (20), 2299-2304.

Carbo, L., Souza, V., Dores, E.F., Ribeiro, M.L., 2008. Determination of pesticides multiresidues in shallow groundwater in a cotton-growing region of Mato Grosso, Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* 19 (6), 1111-1117.

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.

Cedergreen, N., 2008. Herbicides can stimulate plant growth. *Weed Res.* 48 (5), 429-438.

Cedergreen, N., Streibig, J., Kudsk, P., Mathiassen, S.K., Duke, S.O., 2007. The occurrence of hormesis in plants and algae. *Dose-response* 5, 150-162.

Coelho, K.S., Rocha, O., 2010 Assessment of the potential toxicity of a linear alkylbenzene sulfonate (LAS) to freshwater animal life by means of cladoceran bioassays. *Ecotoxicology* 19, 812-818.

Cox, C., Surgan, M., 2006. Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. *Environ. Health Perspect.* 114, 1803-1806.

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.

Dantas, A.D.B., Paschoalato, C.F., Martinez, M.S., Ballejo, R.R., Di Bernardo, L., 2011. Removal of diuron and hexazinone from Guarany Aquifer groundwater. *Braz. J. Chem. Eng.* 28, 415-424.

DeLorenzo, M.E., Danese, L.E., Baird, T.D., 2013. Influence of increasing temperature and salinity on herbicide toxicity in estuarine phytoplankton. *Environ. Toxicol.* 28 (7), 35-371.

Del Sarto, M.C.L., Oliveira, E.E., Guedes, R.N.C., Campos, L.A.O., 2014. Differential insecticide susceptibility of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* and the honey bee *Apis mellifera*. *Apidologie*, 45 (5), 626-636.

Do Hong, L.C., Becker-Van Slooten, K., Tarradellas, J., 2004 Tropical ecotoxicity testing with *Ceriodaphnia cornuta*. *Environ Toxicol* 19, 497-504.

Dores, E.F., Spadotto, C. A., Weber, O.L., Carbo, L., Vecchiato, A.B., Pinto, A.A., 2009. Environmental behaviour of metolachlor and diuron in a tropical soil in the central region of Brazil. *Water Air Soil Pollut.* 197, 175-183.

European Commission, 2006. Draft Assessment Report (DAR) - Public Version - Initial risk assessment provided by the Rapporteur Member State Belgium for the existing active substance carbofuran of the second stage of the review programme referred to in Article 8 (2) of Council Directive 91/414/EEC.

Faggiano, L., de Zwart, D., García-Berthou, E., Lek, S., Gevrey, M., 2010. Patterning ecological risk of pesticide contamination at the river basin scale. *Sci. Total Environ.* 408 (11), 2319-2326.

Fernandez-Alba, A.R., Guil, M.D.H., Lopez, G.D., Chisti, Y., 2002. Comparative evaluation of the effects of pesticides in acute toxicity luminescence bioassays. *Anal. Chim. Acta.* 451, 195-202.

Ferreira, C.R.P.T., Vegro, C.L.R., Camargo, M.L.B., 2010. Defensivos agrícolas: expectativas de aumento de vendas em 2010. *Análises e Indicadores do Agronegócio* 5, 1-5.

Fonseca, A. L., Rocha, O., 2004. The life-cycle of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902, a neotropical endemic species (Crustacea, Cladocera, Daphnidae). *Acta Limnol. Brasil.* 16 (4), 319-328.

Forbes, V.E., 2000. Is hormesis an evolutionary expectation? *Funct. Ecol.* 14, 12-24.

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.

Gama-Flores, J. L., Castellanos-Paez, M. E., Sarma, S. S. S., Nandini, S., 2007. Life table demography of *Ceriodaphnia dubia* (Cladocera) exposed to copper at different levels and periods. *J Environ Biol* 28 (3), 691-696.

Garaventa, F., Gambardella, C., Di Fino, A., Pittore, M., Faimali, M., 2010. Swimming speed alteration of *Artemia* sp. and *Brachionus plicatilis* as a sub-lethal behavioural endpoint for ecotoxicological surveys. *Ecotoxicology* 19 (3), 512-519.

Giacomazzi, S., Cochet, N., 2004. Environmental impact of diuron transformation: a review. *Chemosphere* 56, 1021-1032.

Guilherme, S., Santos, M. A., Barroso, C., Gaivão, I., Pacheco, M., 2012. Differential genotoxicity of Roundup® formulation and its constituents in blood cells of fish (*Anguilla anguilla*): considerations on chemical interactions and DNA damaging mechanisms. *Ecotoxicology* 21 (5), 1381-1390.

Gomes, M.A.F., Barizon, R.R.M., 2014. Panorama da contaminação ambiental por agrotóxicos e nitrato de origem agrícola no Brasil: Cenário 1992/2011, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 36 p.

Guo, R.X., Ren, X.K., Ren, H.Q., 2012. Effects of dimethoate on rotifer *Brachionus calyciflorus* using multigeneration toxicity tests. *J Environ Sci Health* 47, 883-890.

Herbrandson, C., Bradbury, S.P., Swackhamer, D.L., 2003. Influence of suspended solids on acute toxicity of carbofuran to *Daphnia magna*: I. Interactive effects. *Aquat. Toxicol.* 63 (4), 333-342.

Hernando, M.D., Fernández-Alba, A.R., Tauler, R., Barceló, D., 2005. Toxicity assays applied to wastewater treatment. *Talanta* 65 (2), 358-366.

Huang, L., Xi, Y., Zha, C., Wen, X., 2013. Responses in the population growth and reproduction of freshwater rotifer *Brachionus calyciflorus* to four organochlorine pesticides. *Ann. Limnol. Int. J. Lim.* 49, 79-85.

Huston, P.L., Pignatello, J.J., 1999. Degradation of selected pesticide active ingredients and commercial formulations in water by the photo-assisted fenton reaction. *Water Res.* 33 (5), 1238-1246.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2012. Disponível em: http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Amiental/boletim%20de%20comercializacao_2000_2012.pdf. Acesso em 07/09/2015.

Ibrahim, A.T.A., Harabawy, A.S., 2014. Sublethal toxicity of carbofuran on the African catfish *Clarias gariepinus*: Hormonal, enzymatic and antioxidant responses. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 106, 33-39.

ISO 10706, 2000. Water quality - determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). International Organisation for Standardisation, Geneve, Switzerland.

Iwai, C. B., Somparn, A., Noller, B., 2011. Using zooplankton, moina micrura kurz to evaluate the ecotoxicology of pesticides used in paddy fields of Thailand. INTECH Open Access Publisher.

Jager, T., Barsi, A., Ducrot, V., 2013., Hormesis on life-history traits: is there such thing as a free lunch? *Ecotoxicology* 22 (2), 263-270.

Kao, L.M., Wilkinson, C.F., Brattsten, L.B., 1995. In vivo effects of 2, 4-d and atrazine on cytochrome p-450 and insecticide toxicity in southern armyworm (*Spodoptera eridania*) larvae. Pestic. Sci. 45, 331-334.

Kaonga, C.C., Takeda, K., Sakugawa, H., 2015. Diuron, Irgarol 1051 and Fenitrothion contamination for a river passing through an agricultural and urban area in Higashi Hiroshima City, Japan. Sci. Total Environ. 518-519, 450-458.

Kavitha, P., Rao, J.V., 2007. Oxidative stress and locomotor behaviour response as biomarkers for assessing recovery status of mosquito fish, *Gambusia affinis* after lethal effect of an organophosphate pesticide, monocrotophos. Pestic. Biochem. Phys. 87 (2), 182-188.

Konstantinou, I.K., Hela, D.G., Albanis, T.A., 2006. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. Environ. Pollut. 141 (3), 555-570.

Kroon, F. J., Hook, S. E., Metcalfe, S., Jones, D., 2015. Altered levels of endocrine biomarkers in juvenile barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), following exposure to commercial herbicide and surfactant formulations. Environ. Toxicol. Chem. 34 (8), 1881-1890.

Kwok, K.W., Leung, K.M., Lui, G.S., Chu, V.K., Lam, P.K., Morrirt, D., Crane, M., 2007. Comparison of tropical and temperate freshwater animal species' acute sensitivities to chemicals: Implications for deriving safe extrapolation factors. Integrated Environ. Assess. Manag. 3, 49-67.

Lacher, T.E., Goldstein, M.I., 1997. Tropical ecotoxicology: Status and needs. Environ. Toxicol. Chem. 16, 100-111.

Lanças, F.L., 2004. Validação de métodos cromatográficos de análise. Ed. Rima, São Carlos.

Lazhar, M., Hela, T., Moncef, B., Néji, A.A., 2012. Toxicity of three selected pesticides (alachlor, atrazine and diuron) to the marine fish (turbot *Psetta maxima*). Afr. J. Biotechnol. 11 (51), 11321-11328.

Leboulanger, C., Schwartz, C., Somville, P., Diallo, A.O., Pagano, M., 2011. Sensitivity of two Mesocyclops (Crustacea, Copepoda, Cyclopidae), from tropical and temperate origins, to the herbicides, diuron and paraquat, and the insecticides, temephos and fenitrothion. Bull. Environ. Contamin. Toxicol. 87 (5), 487-493.

Li, S., Tan, Y., 2011. Hormetic response of cholinesterase from *Daphnia magna* in chronic exposure to triazophos and chlorpyrifos. J. Environ. Sci. 23 (5), 852-859.

Liyanage, J.A., Watawala, R.C., Aravinna, A.P., Smith, L., Kookana, R.S., 2006. Sorption of carbofuran and diuron pesticides in 43 tropical soils of Sri Lanka. J. Agri. Food Chem. 54 (5), 1784-1791.

Loro, V.L., Murussi, C., Menezes, C., Leitemperger, J., Severo, E., Guerra, L., Guerra, L., Costa, M., Perazzo, G.X., Zanella, R., 2015. Spatial and temporal biomarkers responses of *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) (Characiformes: Characidae) from the middle rio Uruguai, Brazil. *Neotrop. Ichthyol.* 13 (3), 569-578.

Lopes, I., Moreira-Santos, M., Silva, E.M., Sousa, J.P., Guilhermino, L., Soares, A.M., Ribeiro, R., 2007. In situ assays with tropical cladocerans to evaluate edge-of-field pesticide runoff toxicity. *Chemosphere* 67, 2250-2256.

Luna-Acosta, A., Renault, T., Thomas-Guyon, H., Faury, N., Saulnier, D., Budzinski, H., Menach, K.L., Pardon, P., Fruitier-Arnaudin, I., Bustamante, P., 2012. Detection of early effects of a single herbicide (diuron) and a mix of herbicides and pharmaceuticals (diuron, isoproturon, ibuprofen) on immunological parameters of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) spat. *Chemosphere*, 87 (11), 1335-1340.

Maltby, L., Blake, N., Brock, T.C.M., Van den Brink, P.J., 2005. Insecticide species sensitivity distributions: Importance of test species selection and relevance to aquatic ecosystems. *Environ Toxicol Chem* 24, 379-288.

Masiá, A., Campo, J., Navarro-Ortega, A., Barceló, D., Picó, Y., 2015. Pesticide monitoring in the basin of Llobregat River (Catalonia, Spain) and comparison with historical data. *Sci. Total Environ.* 503-504, 58-68.

Maxwell, D.M., Koplovitz, I., Worek, F., Sweeney, R.E., 2008. A structure-activity analysis of the variation in oxime efficacy against nerve agents. *Toxicol. Appl. Pharm.* 231 (2) 57-164.

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. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 84, 390-394.

Moreira, R.A., Mansano, A.S., Silva, L.C.D., 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), 1-8.

Moreira, R.A., Mansano, A.S., Rocha, O., 2015. The toxicity of carbofuran to the freshwater rotifer, *Philodina roseola*. *Ecotoxicology* 24 (3), 604-615.

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

Mullin, C. A., 2015. Effects of inactive ingredients on bees. *Curr. Opin. Insect Sci.* 10, 194-200.

Nendza, M., Müller, M., Wenzel, A., 2014. Discriminating toxicant classes by mode of action: 4. Baseline and excess toxicity. *SAR QSAR Environ. Res.* 25 (5), 393-405.

Neuwoehner, J., Zilberman, T., Fenner, K., Escher, B.I., 2010. QSAR-analysis and mixture toxicity as diagnostic tools: Influence of degradation on the toxicity and mode of action of diuron in algae and daphnids. *Aquat. Toxicol.* 97, 58-67.

Noguerol, T.N., Boronat, S., Casado, M., Raldúa, D., Barceló, D., Piña, B., 2006. Evaluating the interactions of vertebrate receptors with persistent pollutants and antifouling pesticides using recombinant yeast assays. *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 1012-1019.

Norberg-King, T.J., Durhan, E.J., Ankley, G.T., Robert, E., 1991. Application of toxicity identification evaluation procedures to the ambient waters of the Colusa Basin Drain, California. *Environ. Toxicol. Chem.* 10 (7), 891-900.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development, 2004. Guideline for testing of chemicals. *Daphnia* sp., acute immobilisation test. OECD 202, Paris

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development, 2008. Guidelines for testing of chemicals. *Daphnia magna* reproduction test. OECD 211, Paris.

Orton, F., Lutz, I., Kloas, W., Routledge, E.J., 2009. Endocrine disrupting effects of herbicides and pentachlorophenol: in vitro and in vivo evidence. *Environ. Sci. Technol.* 43 (6), 2144-2150.

Palma, P., Palma, V.L., Matos, C., Fernandes, R.M., Bohn, A., Soares, A.M.V.M., Barbosa, I.R., 2009. Effects of atrazine and endosulfan sulphate on the ecdysteroid system of *Daphnia magna*. *Chemosphere* 74, 676-681.

Papadakis, E.N., Tsaboula, A., Kotopoulou, A., Kintzikoglou, K., Vryzas, Z., Papadopoulou-Mourkidou, E., 2015. Pesticides in the surface waters of Lake Vistonis Basin, Greece: Occurrence and environmental risk assessment. *Sci. Total Environ.* 536, 793-802.

Paschoalato, C., Dantas, A., Rosa, I., Faleiros, R., Bernardo, L.D., 2008. Use of activated carbon to remove the herbicides diuron and hexazinone from water. *Revista DAE* 179, 34-41.

Pelaez, V., Terra, F.H.B. And Silva, L.R., 2011. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. *Revista de Economia* 36 (1), 27-48.

Pereira, J.L., Antunes, S.C., Castro, B.B., Marques, C.R., Goncalves, A.M.M., Goncalves, F., Pereira, R., 2009. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. *Ecotoxicology* 18, 455-463.

Pesce, S., Bouchez, A., Montuelle, B., 2011. Effects of organic herbicides on phototrophic microbial communities in freshwater ecosystems. In *Reviews of environmental contamination and toxicology*. Springer New York, 87-124.

Pessoa, P.C., Luchmann, K.H., Ribeiro, A.B., Veras, M.M., Correa, J.R.M.B., Nogueira, A.J., Bairy, A.C.D., Carvalho, P.S.M., 2011. Cholinesterase inhibition and

behavioral toxicity of carbofuran on *Oreochromis niloticus* early life stages. *Aquat. Toxicol.* 105 (3), 312-320.

Qun, X., Rohrer, J., 2012. Rapid HPLC determination of carbofuran and carbaryl in tap and environmental waters using on-line SPE. Thermo Scientific Application Update, 186.

Racke, K.D., 2003. What do we know about the fate of pesticides in tropical ecosystems? Environmental fate and effects of pesticides. ACS symposium series. 853, 96-123.

Ribeiro, A.C.A., Dores, E.F.G.C., Amorim, R.S.S., Lourencetti, C., 2013. Resíduos de pesticidas em águas superficiais de área de nascente do Rio São Lourenço-MT: Validação de método por extração em fase sólida e cromatografia líquida. *Química Nova* 36 (2), 284-290.

Rocha, P.R.R., Faria, A.T., G.S., Queiroz, M.E.L.R., Guimarães, F.C.N., Tironi, S.P., Silva, A.A., 2013. Half-life of diuron in soils with different physical and chemical attributes. *Ciência Rural* 43 (11), 1961-1966.

Santos, M.A.P.F., Melão, M.G., Lombardi, A.T., 2006. Life history characteristics and production of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera) under different experimental conditions. *Acta Limnol. Brasil.* 18 (3), 199-212.

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

Silva, P.M.C.S., Van Gestel, C.A.M., 2009. Comparative sensitivity of *Eisenia andrei* and *Perionyx excavatus* in earthworm avoidance tests using two soil types in the tropics. *Chemosphere* 77, 1609-1613.

Statsoft Inc, 2004. STATISTICA, Versão 07. www.statsoft.com. Acesso em Maio de 2015.

Tlili, A., Montuelle, B., Bérard, A., Bouchez, A., 2011. Impact of chronic and acute pesticide exposures on periphyton communities. *Sci. Total Environ.* 409 (11), 2102-2113.

Tyne, W., Little, S., Spurgeon, D.J., Svendsen, C., 2015. Hormesis depends upon the life-stage and duration of exposure: Examples for a pesticide and a nanomaterial. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 120, 117-123.

USEPA - US Environmental Protection Agency, 1992. Pesticide environmental fate one line summary. Environmental Fate and Effects Division, USEPA, Washington, D.C.

Van Dam, J.W., Negri, A.P., Mueller, J.F., Uthicke, S., 2012. Symbiont-specific responses in foraminifera to the herbicide diuron. *Mar. Pollut. Bull.* 65, 373-383.

Van den Brink, P.J., Blake, N., Brock, T.C.M., Maltby, L., 2006 Predictive value of species sensitivity distributions for effects of herbicides in freshwater ecosystems. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 12, 645-674.

Van Vlaardingen, P., Traas, T.P., Wintersen, A.M., Aldenberg, T., 2004. ETX 2.0. A program to calculate hazardous concentrations and fraction affected, based on normally distributed toxicity data. RIVM Report No. 601501028/2004. National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, the Netherlands.

Wightwick, A., Allinson, G., 2007. Pesticide residues in Victorian waterways: a review. *Australas J. Ecotoxicol.* 3, 91-112.

Zalizniak, L., Nugegoda, D., 2006. Effect of sublethal concentrations of chlorpyrifos on three successive generations of *Daphnia carinata*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 64 (2), 207-214.

Efeitos da mistura dos agrotóxicos diuron e carbofuran em suas formas padrão e comercial aos invertebrados *Paramecium caudatum* e *Ceriodaphnia silvestrii***Resumo**

Neste estudo, os efeitos tóxicos da mistura de diuron e carbofuran sobre os invertebrados *Paramecium caudatum* e *Ceriodaphnia silvestrii* foram avaliados. Para isso, testes de toxicidade aguda e crônica foram realizados com as misturas dos agrotóxicos diuron e carbofuran, nas suas formas padrão e formulações comerciais, Diuron Nortox[®] 500 SC e Furadan[®] 350 SC, respectivamente. Os resultados obtidos nos testes com as misturas foram comparados com os previstos pelos modelos de Adição de Concentração (CA) e Ação Independente (IA). De acordo com os resultados, as exposições agudas e crônicas das misturas de diuron e carbofuran sobre os organismos-teste causaram desvios significativos da toxicidade prevista pelos modelos de referência CA e IA. Para o protozoário *P. caudatum*, o desvio dependente da proporção da dose (sinergismo causado pelo carbofuran e antagonismo causado pelo diuron) foi observado em exposições agudas (mortalidade) e o desvio para o antagonismo foi verificado para o crescimento populacional em concentrações subletais das misturas dos ingredientes ativos. Para o cladóceros *C. silvestrii*, observou-se o antagonismo em baixas doses e o sinergismo em altas doses, prevalecendo o sinergismo nas exposições agudas das misturas dos ingredientes ativos, enquanto que para a reprodução foi encontrado o desvio para o antagonismo. As misturas dos agrotóxicos comerciais apresentaram efeitos significativamente diferentes e mais graves do que as misturas de diuron e carbofuran padrão para as duas espécies testadas, provavelmente devido aos ingredientes “inertes” das formulações. De acordo com os resultados, o diuron e o carbofuran em mistura podem interagir e causar respostas tóxicas diferentes das previstas para os compostos individuais. Assim, as avaliações de risco ecológico devem considerar além dos efeitos isolados, a toxicidade da mistura, a fim de evitar sub ou sobre-estimação dos efeitos do diuron e do carbofurano sobre o protozooplâncton e zooplâncton de água doce, uma vez que estes agrotóxicos são também encontrados em mistura nos ambientes naturais.

Palavras-chaves: Protozoário; cladóceros; toxicidade; sinergismo; antagonismo.

1. Introdução

Grandes quantidades de substâncias tóxicas relacionadas às atividades industriais, agrícolas e urbanas são liberadas no meio ambiente, contaminando o ar, o solo e a água (Ferreira et al., 2008). Entre os inúmeros compostos que atingem os corpos de água doce, os agrotóxicos podem causar efeitos graves sobre a biota aquática. A maioria das avaliações da toxicidade de agrotóxicos para os ecossistemas aquáticos são baseadas na exposição de organismos a compostos individuais (Barata et al., 2006). No entanto, um agrotóxico raramente ocorre como um único contaminante no ambiente e os organismos são frequentemente expostos a misturas de agrotóxicos (Belden et al., 2007; Chèvre et al., 2006; Chung et al., 2013). A interação entre componentes de uma mistura pode provocar maior (sinergismo) ou menor toxicidade (antagonismo) a um organismo do que pode ocorrer quando cada substância está presente sozinha. Conseqüentemente, as avaliações de riscos ecológicos e critérios de qualidade ambiental com base em exposições individuais de agrotóxicos podem não proteger adequadamente os ecossistemas aquáticos (Phyu et al., 2011).

Em toxicologia aquática, dois conceitos de referência têm sido utilizados para analisar os efeitos tóxicos dos compostos em misturas, a Adição de Concentração (*Concentration Addition* - CA) (Loewe e Mechanik, 1926) e a Ação Independente (*Independent Action* - IA) (Bliss, 1939). O modelo de CA assume que os agentes tóxicos individuais apresentam o mesmo modo de ação e atuam sobre o mesmo alvo no organismo, contribuindo para uma resposta comum em proporção à somatória de suas respectivas toxicidades (Ferreira et al., 2008; Freitas et al., 2014). Por outro lado, o modelo de IA assume que agentes tóxicos individuais têm modos de ação diferentes e, assim, não interferem uns com os outros durante a sua ação nos respectivos sítios-alvo (Loureiro et al., 2010; Freitas et al., 2014). Em condições ambientais reais, os compostos podem interagir uns com os outros e esta interação pode resultar em desvios dos modelos de CA e IA, tais como efeitos sinérgicos ou antagônicos, ou aqueles que dependem dos níveis da dose dos produtos químicos (diferentes desvios a baixas e altas concentrações), ou da proporção da dose dos componentes na mistura (Jonker et al., 2005).

Em estudos realizados no Brasil (e.g. Carbo et al., 2008; Souza, 2006) e em outros lugares do mundo (Bacigalupo e Meroni, 2007; Faggiano et al., 2010; Masiá et al., 2015) registraram a presença simultânea dos agrotóxicos diuron e carbofuran nos ambientes

aquáticos analisados. O diuron é um herbicida do grupo das feniluréias amplamente utilizado em muitas culturas agrícolas, como cana de açúcar, citros, algodão e café. Este composto inibe a fotossíntese pelo bloqueio da cadeia de transporte de elétrons no fotossistema II em microrganismos e plantas fotossintéticas (Giacomazzi e Cochet, 2004). Devido à sua elevada persistência (um mês a um ano), o diuron pode ser encontrado em muitas matrizes ambientais, tais como solo, sedimento e água (Field et al., 2003). Já o carbofuran é um inseticida, acaricida e nematocida conhecido por inibir a enzima acetilcolinesterase nos organismos (Pessoa et al., 2011). Este carbamato é usado em quantidades crescentes em culturas de arroz, algodão, café, cana de açúcar, feijão e milho (Ehler, 2004). Os ambientes aquáticos são particularmente propensos à contaminação por carbofuran como indicado pelo seu índice de GUS (*Groundwater Ubiquity Score*) de 4,52, caracterizando um risco relativamente alto de ser transportado do solo de áreas de aplicação aos corpos de água adjacentes após eventos de chuva (Carbo et al., 2008; Ribeiro et al., 2013).

A mistura de diuron e carbofuran nos ambientes aquáticos pode causar efeitos tóxicos sobre organismos não-alvo, tais como os protozoários e os cladóceros. Os protozoários desempenham importantes funções nos ecossistemas aquáticos, pois agem como um elo entre a produção bacteriana e os produtores secundários (Fenchel, 1987), aumentam os processos de remineralização (Sherr e Sherr, 1984), controlam as comunidades bacterianas por predação (Corno et al., 2008) e são presas de organismos de níveis tróficos superiores. Já os cladóceros ocupam uma posição central na cadeia alimentar, sendo um componente importante das interações fitoplâncton-zooplâncton-larvas de peixes (Dettmers e Stein, 1992). Assim, efeitos de agentes tóxicos sobre os protozoários e os cladóceros podem alterar a cadeia trófica e afetar significativamente o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos.

Além dos atributos ecológicos, os protozoários e os cladóceros apresentam facilidade de cultivo e manutenção laboratorial, altas taxas de reprodução e são sensíveis a vários compostos, como os agrotóxicos (protozoários: Saib et al., 2014; Trielli et al., 2007; cladóceros: Casali-Pereira et al., 2015; Novelli et al., 2012), características que os tornam organismos-teste adequados para bioensaios de toxicidade. Em relação à toxicidade de misturas, raros são os estudos que utilizaram os protozoários como organismos-teste (e.g. Gomiero e Viarengo, 2014; Láng e Kohidai, 2012) e apesar de existirem diversas pesquisas com cladóceros (e.g. 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 de agrotóxicos.

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos tóxicos letais e subletais da mistura de diuron e carbofuran em suas formas padrão e comercial aos invertebrados aquáticos *Paramecium caudatum* e *Ceriodaphnia silvestrii*. Para isso, testes de toxicidade aguda e crônica foram realizados com a mistura dos ingredientes ativos padrões diuron e carbofuran e também com a mistura de suas formulações comerciais, Diuron Nortox[®] 500 SC e Furadan[®] 350 SC. Os *endpoints* avaliados para o protozoário *P. caudatum* foram a mortalidade e o crescimento populacional e para o cladóceros *C. silvestrii* foram a imobilidade e a reprodução (fertilidade).

2. Materiais e Métodos

2.1. Organismos-teste e condições de cultivo

Os indivíduos de *Paramecium caudatum* Ehrenberg, 1833 (Protozoa, Ciliophora) foram cultivados em tubos de ensaio contendo ágar inclinado (2%), um grão de arroz com casca estéril e água mineral Minalba[®] suplementada com a bactéria *Enterobacter aerogenes* na concentração final de 10^6 células mL⁻¹ (adaptado de Rao et al., 2007). Os organismos foram mantidos em incubadora com temperatura controlada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$; fotoperíodo de 12 h luz: 12 h escuro e pH 7,5-8,0.

As culturas de *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Crustacea, Cladocera, Daphnidae) foram mantidas sob temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) e fotoperíodo (12 h luz: 12 h escuro) em água reconstituída com pH 7,0 - 7,6, condutividade de $160 \mu\text{S cm}^{-1}$ e dureza 40 - 48 mg CaCO₃ L⁻¹, como recomendado pela Sociedade Americana de Testes e Materiais (ASTM, 2001). Os organismos foram 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 (1 ml L⁻¹).

2.2. Substâncias-teste e análises químicas

Os compostos diuron e carbofuran adquiridos da Sigma-Aldrich apresentam alto grau de pureza ($\geq 98\%$). O produto comercial Diuron Nortox[®] 500 SC (adquirido de Nortox S/A, Brasil) possui 50% m/v do ingrediente ativo diuron (69,4% m/v de ingredientes inertes) e o Furadan[®] 350 SC (adquirido de FMC, Brasil) apresenta 35% m/v de ingrediente ativo

carbofuran (65% m/v de ingredientes inertes). As soluções-estoque dos compostos foram preparadas pela diluição de uma quantidade específica de cada composto em água destilada imediatamente antes dos testes, com a exceção do diuron padrão, o qual foi preparado em acetona grau analítico (C₃H₆O; LabSynth) devido à sua baixa solubilidade em água (35,6 mg L⁻¹ a 20 °C). Por sua vez, as concentrações nominais de cada composto testado foram obtidas pela diluição da solução-estoque em meio de cultura (água mineral para o protozoário e água reconstituída para o cladóceros).

Para confirmar as concentrações nominais utilizadas nos ensaios, as soluções-teste foram analisadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) (Agilent Technologies 1200, Waldbronn, Alemanha), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD). As condições cromatográficas de análise e métodos de quantificação dos analitos foram iguais as descritas anteriormente nos capítulos 2 e 3 para protozoário e cladóceros, respectivamente.

2.3. Testes de toxicidade das misturas

Os testes de toxicidade aguda e crônica com misturas de diuron e carbofuran em suas formas padrão e comercial foram realizados com os organismos-teste selecionados. Os testes de toxicidade com *P. caudatum* foram realizados de acordo com o método descrito em Mansano et al. (2016) e os testes com *C. silvestrii* seguiram as diretrizes da OECD (2004, 2008).

Para o protozoário *P. caudatum*, os ensaios de toxicidade aguda (4h) foram realizados em vidros de relógio mantidos individualmente dentro de placas de Petri. Para cada tratamento e controle, três réplicas foram feitas, contendo 1 mL de solução-teste e dez organismos em cada réplica. Os experimentos foram mantidos a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, sem adição de alimento e na ausência de luz. O número de indivíduos vivos nas três réplicas foi contado sob microscópio estereoscópico (aumento de 50x). Os testes de toxicidade crônica (24 horas) foram realizados em tubos de ensaio (tamanho 15x100mm) contendo 5 mL de solução-teste e 50 protozoários provenientes de uma cultura em fase logarítmica (> 72h). Os experimentos foram realizados em triplicatas e mantidos sob as mesmas condições (temperatura, fotoperíodo, meio, alimentação) descritas para o cultivo. Após 24h de exposição, os protozoários foram fixados com lugol ácido 0,4% e a densidade de células foi quantificada sob microscópio óptico (aumento de 100x) usando câmara de Sedgwick-Rafter.

Para o cladóceros *C. silvestrii*, os testes de toxicidade aguda (48h) foram realizados utilizando três réplicas, cada uma contendo cinco neonatos (6-24 h de idade) em 10 mL de solução-teste. Os organismos expostos não foram alimentados no decorrer dos experimentos e foram mantidos sob temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) e ausência de luz. Após 48 horas de exposição, os organismos foram observados sob microscópio estereoscópico e o número de indivíduos móveis foi contado. Os testes de toxicidade crônica foram realizados utilizando seis 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 (temperatura, fotoperíodo e meio) descritas para o cultivo. Durante oito dias, os cladóceros foram observados sob microscópio estereoscópico, a fim de verificar diariamente a sobrevivência das fêmeas e o número de descendentes, que foram contados e descartados a cada renovação.

Os experimentos de misturas foram realizados utilizando os dados provenientes dos testes de toxicidade aguda e crônica obtidos a partir dos estudos de exposição individual dos compostos ao protozoário e cladóceros, como apresentado nos capítulos 2 e 3, respectivamente. Para os testes de toxicidade aguda de mistura foi selecionado para o ensaio um *design* experimental que incluiu simultaneamente um teste para cada composto individual e um conjunto de 25 combinações de ambos. Os testes com os compostos individuais foram realizados simultaneamente com os de mistura, para que as diferenças nas respostas dos organismos devido às variações de sensibilidade pudessem ser controladas e não invalidassem a análise. Nos testes de toxicidade aguda, um *design* fatorial completo (Figura 1A) foi utilizado, pois não havia preocupação com a mortalidade ocorrendo em misturas com altas concentrações dos compostos.

Para os testes de toxicidade crônica da mistura de diuron e carbofuran, um *design* experimental que incluiu simultaneamente tanto um teste para cada composto individual e um conjunto de 23 combinações foi selecionado para o ensaio. Um *design* experimental de razão fixa parcial (Cassee et al., 1998) (Figura 1B) foi utilizado para as misturas com o objetivo de evitar a inclusão de tratamentos com altas concentrações dos compostos que poderiam levar à mortalidade. As concentrações nominais das misturas foram calculadas com base nas forças tóxicas esperadas de 0,375 (0,125 + 0,25; 0,25 + 0,125), 0,5 (0,125 + 0,375; 0,25 + 0,25; 0,375 + 0,125), 0,75 (0,125 + 0,625; 0,25 + 0,5; 0,375 + 0,375; 0,5 + 0,25; 0,625 + 0,125), 1 (0,125 + 0,875; 0,25 + 0,75; 0,375 + 0,625; 0,5 + 0,5; 0,625 + 0,375;

0,75 + 0,25; 0,875 + 0,125), 1,5 (0,5 + 1; 0,75 + 0,75; 1 + 0,5), 1,75 (0,75 + 1; 1 + 0,75) e 2 (1 + 1) unidades tóxicas (UT). Uma UT foi igual ao valor da CI_{50} (para protozoário) ou CE_{50} (para cladócero) obtido a partir dos testes de toxicidade crônica com cada agrotóxico individual.

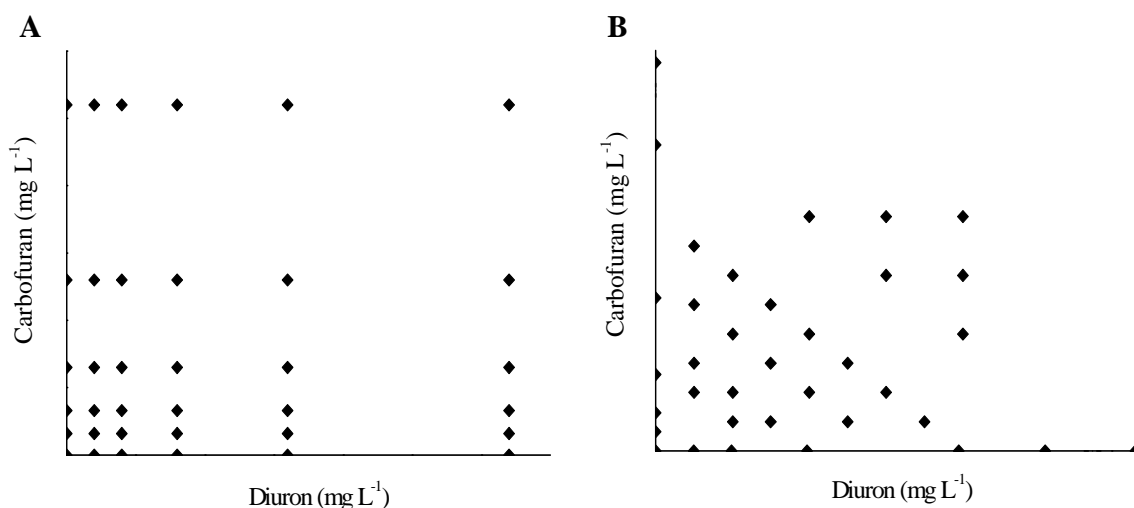


Figura 1. *Design* experimental esquemático para as misturas dos agrotóxicos diuron e carbofuran utilizados nos testes de toxicidade aguda - *design* fatorial completo (A) e nos testes de toxicidade crônica - *design* de razão fixa parcial (B).

2.4. Análise de Dados

Os valores de CL_{50-4h} e CE_{50-48h} obtidos nos testes de toxicidade aguda e os valores de CI_{50-24h} e CE_{50-8d} dos testes de toxicidade crônica e seus respectivos valores de *slope* para as exposições individuais aos agrotóxicos selecionados foram calculados por regressão não linear, utilizando uma curva logística de três parâmetros (Systat, 2008). Esta curva é descrita pela seguinte equação: $Y_i = \max / 1 + (C_i / CL_{50_i})^{\beta_i}$; em que Y_i é a resposta de um determinado parâmetro; \max é a sua resposta máxima; C_i é a concentração do produto químico i ; CL_{50_i} (CI_{50} ou CE_{50}) é a concentração letal do produto químico i (concentração de inibição ou efetiva) e β_i é o *slope* para o produto químico i .

Os dados dos testes de toxicidade de mistura foram analisados por meio dos modelos conceituais de adição de concentração (CA) e ação independente (IA). Inicialmente, os dados observados foram comparados com o efeito combinado esperado calculado a partir das exposições individuais, utilizando a ferramenta MIXTOX (Jonker et al., 2005). Em seguida, as análises foram estendidas, tal como descrito por Jonker et al. (2005) e os três

desvios dos modelos de referência, tais como interações sinérgicas/antagônicas (S/A), desvio dependente da proporção da dose (*dose ratio-dependent* - DR) e dependente do nível da dose (*dose level-dependent* - DL) foram modelados pela adição de dois parâmetros (“a” e “b”). O parâmetro “a”, em desvios sinérgicos e antagônicos, torna-se, respectivamente, negativo ou positivo. Para o desvio dependente da proporção da dose (DR), um segundo parâmetro “ b_{DR} ” está incluído além do parâmetro “a”, permitindo que o papel de cada composto na mistura seja identificado. Para descrever o desvio dependente do nível da dose (DL), novamente um segundo parâmetro “ b_{DL} ” é incluído além do parâmetro “a”. O valor de “a” indica o desvio em baixas e altas doses e o valor de “ b_{DL} ” indica em que nível da dose o desvio muda. Maiores detalhes sobre estas funções de desvio podem ser obtidos em Jonker et al. (2005) e na Tabela 1. Os dados foram ajustados aos modelos conceituais e desvios, e o melhor ajuste foi escolhido pelo método de máxima verossimilhança. Após identificado o modelo estatisticamente mais adequado para a descrição do desvio, o padrão de efeitos foi deduzido diretamente dos valores dos parâmetros (Tabela 1) e o desvio máximo pode ser calculado em termos de nível de efeito (Jonker et al., 2005; Freitas et al., 2014).

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)	Parâmetro "b" (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 a < 0 - sinergismo, exceto para aquelas proporções de misturas onde um valor de b positivo significativo indica antagonismo	b _i > 0 - antagonismo onde a toxicidade da mistura é causada principalmente pelo toxicante <i>i</i> b _i < 0 - sinergismo onde a toxicidade da mistura é causada principalmente pelo toxicante <i>i</i>	
Dependente do nível da dose (DL)	a > 0 - antagonismo em nível da dose baixo e sinergismo em nível da dose alto a < 0 - sinergismo em nível da dose baixo e antagonismo em nível da dose alto	b _{DL} > 1 - mudança em nível da dose menor do que CE ₅₀ b _{DL} = 1 - mudança em CE ₅₀ 0 < b _{DL} < 1 - mudança em nível da dose maior do que CE ₅₀ b _{DL} < 0 - sem mudança, mas a magnitude do S/A é dependente do nível da dose	b _{DL} > 2 - mudança em nível da dose menor do que CE ₅₀ b _{DL} = 2 - mudança em CE ₅₀ 1 < b _{DL} < 2 - mudança em nível da dose maior do que CE ₅₀ b _{DL} < 1 - sem mudança, mas a magnitude do S/A é dependente do nível de efeito

3. Resultados

3.1. Variáveis abióticas dos testes de toxicidade e análises químicas

Nos testes de toxicidade com o protozoário, o pH das soluções-teste permaneceu dentro do intervalo de 7,5 e 8,1 e a temperatura da água variou entre 24,8 e 25,4 °C. Nas soluções-teste utilizadas nos testes de toxicidade com o cladóceros, o pH variou entre 7,2 e 7,7, a temperatura da água entre 24,6 e 25,5 °C, a condutividade elétrica entre 147,6 e 162,8 $\mu\text{S cm}^{-1}$ e a dureza da água entre 40 e 46 mg $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$. Assim, nos testes de toxicidade foram atendidos os critérios de validade estabelecidos nas orientações da OECD (2004, 2008).

As análises das soluções-teste em HPLC-DAD mostraram que nos testes de toxicidade aguda e crônica com as misturas de diuron e carbofuran e dos seus produtos comerciais com o protozoário (Tabelas 1 a 4, Apêndice D) e o cladóceros (Tabelas 5 a 8, Apêndice D), as concentrações reais de diuron e carbofuran diferiram menos de 10% das concentrações nominais. Portanto, os resultados foram calculados com base nas concentrações nominais, como sugerido pela ISO 10706 (2000).

3.2. Testes de toxicidade das misturas

Os valores de toxicidade aguda e crônica para o protozoário ($\text{CL}_{50-4\text{h}}$ e $\text{CI}_{50-24\text{h}}$) e o cladóceros ($\text{CE}_{50-48\text{h}}$ e $\text{CE}_{50-8\text{d}}$) para cada composto testado individualmente no curso dos testes de mistura são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Valores médios das concentrações que causam toxicidade aguda e crônica para o protozoário *P. caudatum* e o cladóceros *C. silvestrii* obtidos para cada composto testado individualmente durante os testes de mistura.

Compostos	<i>Paramecium caudatum</i>		<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	
	Toxicidade Aguda	Toxicidade Crônica	Toxicidade Aguda	Toxicidade Crônica
	CL ₅₀ -4h	CI ₅₀ -24h	CE ₅₀ -48h	CE ₅₀ -8d
Diuron (ingrediente ativo padrão) (mg L ⁻¹)	78,24 (9,04)	7,22 (0,88)	8,22 (0,81)	6,77 (0,29)
Diuron (Diuron Nortox [®] 500 SC) (mg L ⁻¹)	73,54 (6,19)	6,96 (1,15)	1,15 (0,06)	0,67 (0,06)
Carbofuran (ingrediente ativo padrão) (mg L ⁻¹)	174,36 (10,58)	22,68 (4,07)	0,98 x 10 ⁻³ (0,06 x 10 ⁻³)	0,87 x 10 ⁻³ (0,06 x 10 ⁻³)
Carbofuran (Furadan [®] 350 SC) (mg L ⁻¹)	97,99 (1,83)	5,06 (0,83)	1,01 x 10 ⁻³ (0,08 x 10 ⁻³)	0,85 x 10 ⁻³ (0,14 x 10 ⁻³)

Os valores do desvio-padrão estão entre parênteses.

Neste estudo, os dois modelos de referência (CA e IA) foram utilizados para avaliar a resposta de *P. caudatum* e *C. silvestrii* quando expostos às misturas dos agrotóxicos selecionados. As Tabelas completas com todos os parâmetros e resultados dos testes de significância para as misturas obtidos por meio dos ajustes da ferramenta MIXTOX são apresentadas no Apêndice D para o protozoário *P. caudatum* (Tabelas 9 a 12) e para o cladóceros *C. silvestrii* (Tabelas 13 a 16).

Nos testes de toxicidade aguda da mistura de diuron e carbofuran (padrão e comercial) sobre *P. caudatum*, os resultados ajustaram-se aos dois modelos de referência e apresentaram desvios significativos (Tabela 3). Na mistura de diuron e carbofuran padrão, o ajuste dos dados ao modelo CA produziu uma soma dos quadrados dos resíduos (SS) de 80,73 ($p < 0,05$; $r^2 = 0,61$). Após a adição dos parâmetros “a” e “b” para o modelo CA, o desvio dependente da proporção da dose (DR) (Figura 2A) descreveu melhor os dados, na qual houve uma diminuição do valor de SS para 42,72 e foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$; $r^2 = 0,79$). Já o ajuste dos dados ao modelo IA produziu um valor de SS de 73,57 ($p < 0,05$; $r^2 = 0,64$) e após a adição dos parâmetros “a” e “b”, não apresentou desvios significativos, indicando que os dados se ajustam melhor ao modelo conceitual IA (Figura 2B). De modo geral, o melhor modelo e desvio que explicou os dados da mistura dos ingredientes ativos padrões foi o CA com desvio DR, no qual mostrou sinergismo causado principalmente pelo carbofuran e antagonismo causado principalmente pelo diuron. Na mistura do diuron e do carbofuran em suas formulações comerciais, o ajuste dos dados ao modelo CA produziu um valor de SS de 90,61 ($p < 0,05$; $r^2 = 0,64$). Após a adição do parâmetro “a” para o modelo de CA, de modo a descrever o desvio S/A, o valor de SS diminuiu para 43,16 e foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$; $r^2 = 0,83$) (Figura 2C). Os desvios DR e DL não foram significativos para o modelo CA. O ajuste ao modelo IA

produziu um valor de SS de 40,27 ($p < 0,05$; $r^2 = 0,84$). Após a adição do parâmetro “a” ao modelo IA, o desvio S/A (Figura 2D) descreveu melhor os dados, havendo uma diminuição do valor de SS para 33,77 e que foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$; $r^2 = 0,87$). Os desvios DR e DL não foram significativos para o modelo IA. De acordo com estes resultados, o melhor modelo e desvio que explicou os dados da mistura de diuron e carbofuran comerciais foi o IA com desvio S/A, no qual o valor negativo do parâmetro “a” indicou sinergismo dos agrotóxicos em mistura.

Tabela 3. Resumo dos parâmetros e testes de ajuste dos modelos de referência para a toxicidade aguda e crônica das misturas de diuron e carbofuran nas formas padrão e comercial para o protozoário *Paramecium caudatum*.

Toxicidade	Mistura	Modelo e Desvio	a	b _{DR/DL}	SS	r ²	p (χ ² ou F)	max	CL ₅₀ ou CI ₅₀ Diuron	β _{Diuron}	CL ₅₀ ou CI ₅₀ Carbofuran	β _{Carbofuran}
Aguda	Diuron e Carbofuran (padrão)	CA	-	-	80,73	0,61	7,60x10 ⁻²⁶	1,00	97,78	1,76	170,03	7,20
		CA-DR	-0,99	4,65	42,72	0,79	8,28x10 ⁻⁷	0,88	93,66	4,65	182,73	10,14
		IA	-	-	73,57	0,64	2,23x10 ⁻²⁷	1,00	74,06	2,44	165,10	10,26
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Diuron e Carbofuran (comercial)	CA	-	-	90,61	0,64	2,46x10 ⁻³⁴	1,00	78,09	1,66	105,73	6,09
		CA-S/A	1,31	-	43,16	0,83	5,67x10 ⁻¹²	0,95	80,51	3,22	98,67	8,13
		IA	-	-	40,27	0,84	3,76x10 ⁻⁴⁵	1,00	67,77	2,51	89,21	5,89
		IA-S/A	-0,30	-	33,77	0,87	0,01	0,99	67,50	2,51	96,53	6,59
Crônica	Diuron e Carbofuran (padrão)	CA	-	-	162,66	0,95	2,21x10 ⁻¹⁹	61,78	7,40	0,90	25,17	0,50
		CA-S/A	0,80	-	143,02	0,95	0,03	62,28	6,67	0,89	20,54	0,51
		IA	-	-	350,27	0,89	3,03x10 ⁻¹⁴	54,24	11,84	1,25	47,02	0,61
		IA-S/A	1,69	-	150,94	0,95	3,69x10 ⁻⁸	62,37	7,31	0,83	19,07	0,48
	Diuron e Carbofuran (comercial)	CA	-	-	331,98	0,92	3,85x10 ⁻¹⁶	65,14	4,84	0,73	4,39	0,71
		CA-DR	1,95	-5,01	277,05	0,93	0,04	64,88	6,17	0,72	4,01	0,72
		IA	-	-	419,04	0,89	1,39x10 ⁻¹⁴	60,09	8,35	0,82	7,69	0,72
		IA-DR	2,20	-2,19	241,17	0,94	0,05	65,57	6,04	0,65	4,13	0,66

CA é o modelo de adição de concentração e IA é o modelo de ação independente (ambos modelos de referência); S/A é o desvio sinergismo ou antagonismo; DR é o desvio dependente da proporção da dose; a, b_{DR} e b_{DL} são os parâmetros da função; SS é a soma dos quadrados dos resíduos; r² é o coeficiente de regressão; χ² ou F é o teste estatístico; p (χ² ou F) é o nível de significância do teste estatístico; max é o valor máximo da resposta; CL₅₀ é a concentração letal e CI₅₀ é a concentração de inibição de crescimento (valores expressos em mg L⁻¹); β é o *slope* da curva de resposta à dose individual.

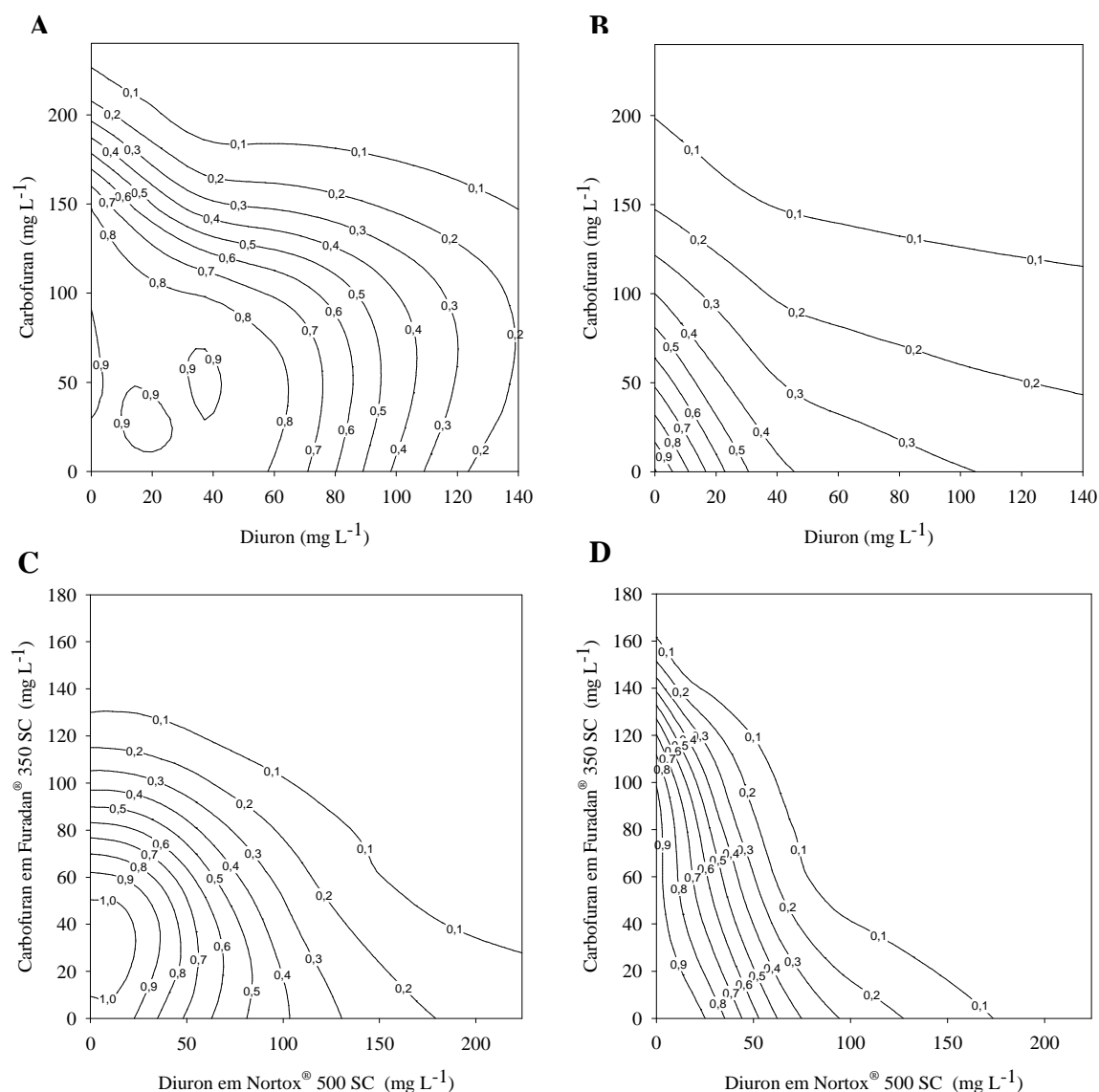


Figura 2. Isobogramas dos efeitos das misturas de diuron e carbofuran nas formas padrão e comercial sobre a sobrevivência de *Paramecium caudatum*. (A) Desvio dependente da proporção da dose (DR) a partir do modelo de CA para a mistura dos agrotóxicos padrões; (B) Ajuste ao modelo de IA sem desvio significativo para a mistura dos agrotóxicos padrões; (C) Desvio S/A mostrando antagonismo a partir do modelo CA para a mistura dos agrotóxicos comerciais; (D) Desvio S/A mostrando sinergismo a partir do modelo IA para a mistura dos agrotóxicos comerciais.

Para os efeitos da mistura de diuron e carbofuran (padrão e comercial) sobre o crescimento populacional de *P. caudatum*, os dados ajustaram-se aos modelos de referência e apresentaram desvios significativos (Tabela 3). Na mistura dos ingredientes ativos padrões, o ajuste dos dados ao modelo CA produziu um valor de SS de 162,66 ($p < 0,05$; $r^2 = 0,95$). Após a adição do parâmetro “a” para o modelo de CA, de modo a descrever o desvio S/A, o valor de SS diminuiu para 143,02 e foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$; $r^2 = 0,95$)

(Figura 3A). Os desvios DR e DL não foram significativos para o modelo CA. No ajuste do modelo IA aos dados ($SS = 350,27$; $p < 0,05$; $r^2 = 0,89$), verificou-se resultado semelhante ao modelo CA, no qual o desvio S/A (Figura 3B) foi o que melhor descreveu os dados ($SS = 150,94$; $p < 0,05$; $r^2 = 0,95$). Porém, o melhor modelo e desvio que explicou os dados da mistura dos ingredientes ativos padrões foi o CA com desvio S/A, que indicou diminuição da toxicidade (antagonismo) dos compostos em mistura. Na mistura de diuron e carbofuran em suas formulações comerciais, o ajuste do modelo CA aos dados produziu um valor de SS de 331,98 ($p < 0,05$; $r^2 = 0,92$). Após a adição dos parâmetros “a” e “b” para o modelo CA, o desvio DR (Figura 3C) descreveu melhor os dados, na qual houve uma diminuição do valor de SS para 277,05 e que foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$; $r^2 = 0,93$). No ajuste do modelo IA aos dados ($SS = 419,04$; $p < 0,05$; $r^2 = 0,89$), após a adição dos parâmetros “a” e “b”, o desvio DR (Figura 3D) também foi o que melhor descreveu os dados ($SS = 241,17$; $p < 0,05$; $r^2 = 0,94$). De modo geral, o melhor modelo e desvio que explicou os dados da mistura de diuron e carbofuran comerciais foi o IA com desvio DR, que mostrou antagonismo causado principalmente pelo carbofuran e sinergismo causado principalmente pelo diuron.

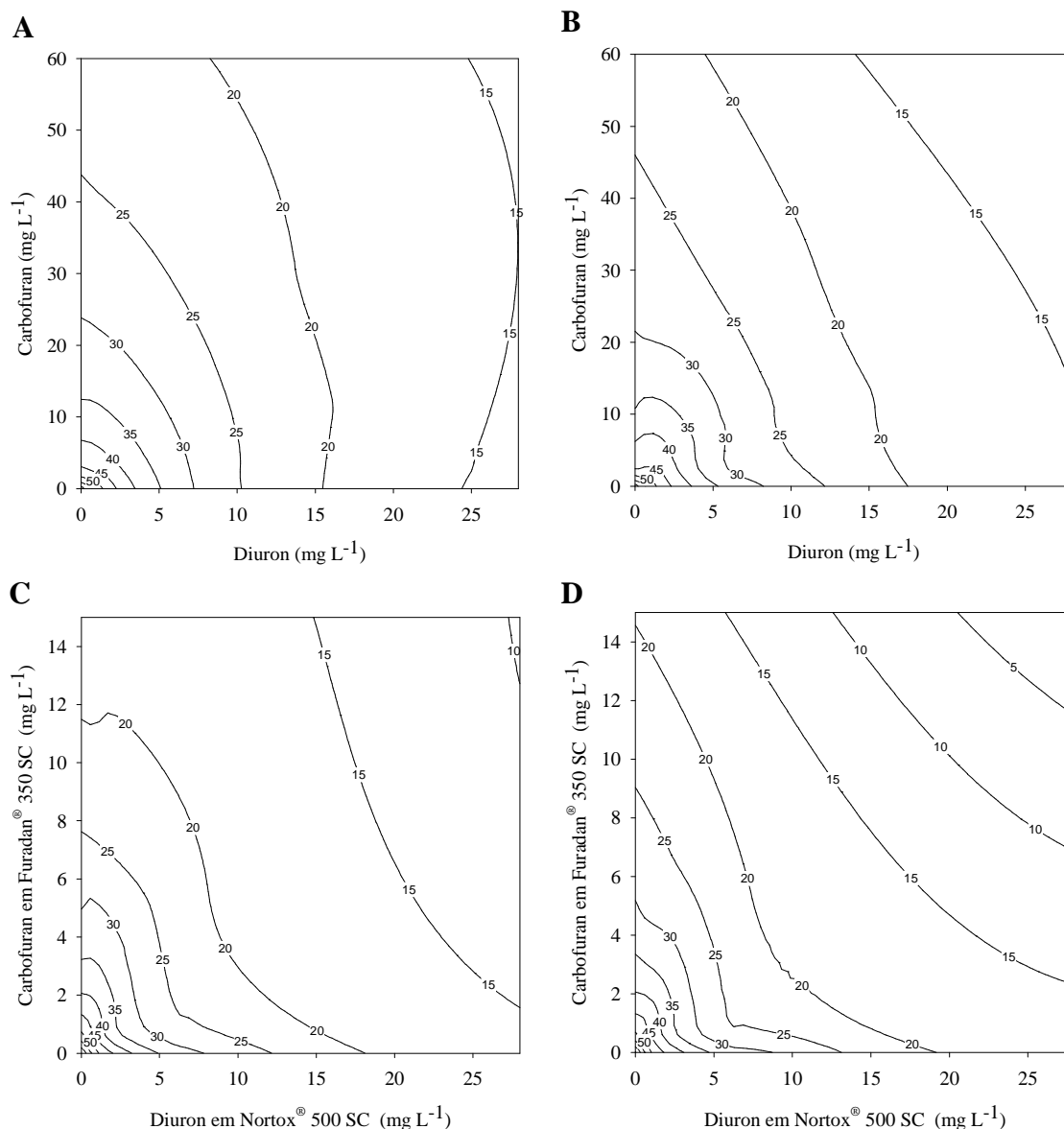


Figura 3. Isobogramas dos efeitos das misturas de diuron e carbofuran nas formas padrão e comercial sobre o crescimento populacional de *Paramecium caudatum*. (A) Desvio S/A mostrando antagonismo a partir do modelo de CA para a mistura dos agrotóxicos padrões; (B) Desvio S/A mostrando antagonismo a partir do modelo de IA para a mistura dos agrotóxicos padrões; (C) Desvio dependente da proporção da dose (DR) a partir do modelo de CA para a mistura dos agrotóxicos comerciais; (D) Desvio DR a partir do modelo de IA para a mistura dos agrotóxicos comerciais.

Nos testes de toxicidade aguda da mistura de diuron e carbofuran (padrão e comercial) sobre *C. silvestrii*, os resultados ajustaram-se aos dois modelos de referência e apresentaram desvios significativos (Tabela 4). Na mistura dos ingredientes ativos padrões, o ajuste dos dados ao modelo CA produziu um valor de SS de 27,16 ($p < 0,05$; $r^2 = 0,93$). Após a adição dos parâmetros “a” e “b” para o modelo CA, o desvio dependente do nível da

dose (DL) (Figura 4A) descreveu melhor os dados havendo uma diminuição de SS para 17,86 e foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$; $r^2 = 0,95$). No ajuste dos dados ao modelo IA (SS = 205,40; $p < 0,05$; $r^2 = 0,46$), após a adição dos parâmetros “a” e “b”, o desvio DR (Figura 4B) descreveu melhor os dados (SS = 20,83; $p < 0,05$; $r^2 = 0,94$). No geral, o melhor modelo e desvio que explicou os dados da mistura de diuron e carbofuran padrão foi o CA com desvio DL, no qual mostrou antagonismo em baixas doses e sinergismo em altas doses, ocorrendo a mudança para sinergismo em um nível da dose menor que a CE_{50} . Na mistura de diuron e carbofuran em suas formulações comerciais, o ajuste dos dados ao modelo CA produziu um valor de SS de 88,96 ($p < 0,05$; $r^2 = 0,74$). Após a adição do parâmetro “a” para o modelo de CA, de modo a descrever o desvio S/A, o valor de SS diminuiu para 45,56 e foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$; $r^2 = 0,87$) (Figura 4C). Os desvios DR e DL não foram significativos para o modelo CA. No ajuste dos dados ao modelo IA (SS = 50,78, $p < 0,05$; $r^2 = 0,85$), após a adição do parâmetro “a” ao modelo IA, o desvio S/A (Figura 4D) também foi o que melhor descreveu os dados (SS = 16,72, $p < 0,05$; $r^2 = 0,95$). Os desvios DR e DL não foram significativos para o modelo IA. De acordo com estes resultados, o melhor modelo e desvio que explicou os dados da mistura de diuron e carbofuran comerciais foi o IA com desvio S/A, no qual o valor positivo do parâmetro “a” indicou antagonismo dos agrotóxicos em mistura.

Tabela 4. Resumo dos parâmetros e testes de ajuste dos modelos de referência para a toxicidade aguda e crônica das misturas de diuron e carbofuran nas formas padrão e comercial para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*.

Toxicidade	Parâmetro	Modelo e Desvio	a	b _{DR/DL}	SS	r ²	p (χ ² ou F)	max	CE ₅₀ Diuron	β _{Diuron}	CE ₅₀ Carbofuran	β _{Carbofuran}	
Aguda	Diuron e Carbofuran (padrão)	CA	-	-	27,16	0,93	1,01 x 10 ⁻⁷⁴	0,95	6,42	2,73	0,88 x 10 ⁻³	4,71	
		CA-DL	1,93	1,56	17,86	0,95	0,05	0,96	7,13	2,01	0,99 x 10 ⁻³	3,59	
		IA	-	-	205,40	0,46	2,54 x 10 ⁻³⁶	0,99	9,03	3,50	1,05 x 10 ⁻³	3,5	
		IA-DR	-6,55	0,70	20,83	0,94	2,49 x 10 ⁻⁵	0,93	9,03	3,16	0,98 x 10 ⁻³	4,37	
	Diuron e Carbofuran (comercial)	CA	-	-	88,96	0,74	6,79 x 10 ⁻⁵³	1,27	1,16	1,16	0,89 x 10 ⁻³	3,27	
		CA-S/A	2,44	-	45,56	0,87	4,46 x 10 ⁻¹¹	0,94	1,20	4,50	1,00 x 10 ⁻³	4,84	
		IA	-	-	50,78	0,85	3,99 x 10 ⁻⁶¹	1,06	1,16	2,37	1,14 x 10 ⁻³	4,68	
		IA-S/A	4,24	-	16,72	0,95	5,36 x 10 ⁻⁹	4,44	0,05	0,66	0,66 x 10 ⁻³	4,01	
Crônica	Diuron e Carbofuran (padrão)	CA	-	-	47,68	0,87	5,40 x 10 ⁻¹³	16,63	6,92	4,46	1,56 x 10 ⁻³	0,98	
		CA-S/A	1,56	-	21,44	0,94	1,23 x 10 ⁻⁷	16,52	6,43	3,74	0,86 x 10 ⁻³	1,41	
		IA	-	-	24,52	0,93	2,69 x 10 ⁻¹⁷	16,24	6,64	3,78	0,92 x 10 ⁻³	1,49	
	Diuron e Carbofuran (comercial)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		CA	-	-	25,26	0,87	1,82 x 10 ⁻¹²	16,57	0,78	1,27	1,36 x 10 ⁻³	0,26	
		CA-DL	-2,23	1,22	20,14	0,90	0,02	16,52	0,74	1,33	0,78 x 10 ⁻³	0,56	
	IA	-	-	45,12	0,77	7,28 x 10 ⁻⁹	15,38	1,60	1,10	2,30 x 10 ⁻³	0,38		
		IA-DL	-3,73	2,30	15,96	0,92	1,28 x 10 ⁻⁷	16,69	0,74	1,29	0,64 x 10 ⁻³	0,76	

CA é o modelo de adição de concentração e IA é o modelo de ação independente (ambos modelos de referência); S/A é o desvio sinergismo ou antagonismo; DR é o desvio dependente da proporção da dose; DL é o desvio dependente do nível da dose; a, b_{DR} e b_{DL} são os parâmetros da função; SS é a soma dos quadrados dos resíduos; r² é o coeficiente de regressão; χ² ou F é o teste estatístico; p (χ² ou F) é o nível de significância do teste estatístico; max é o valor máximo da resposta; CE₅₀ é a concentração efetiva mediana (valores expressos em mg L⁻¹); β é o *slope* da curva de resposta à dose individual.

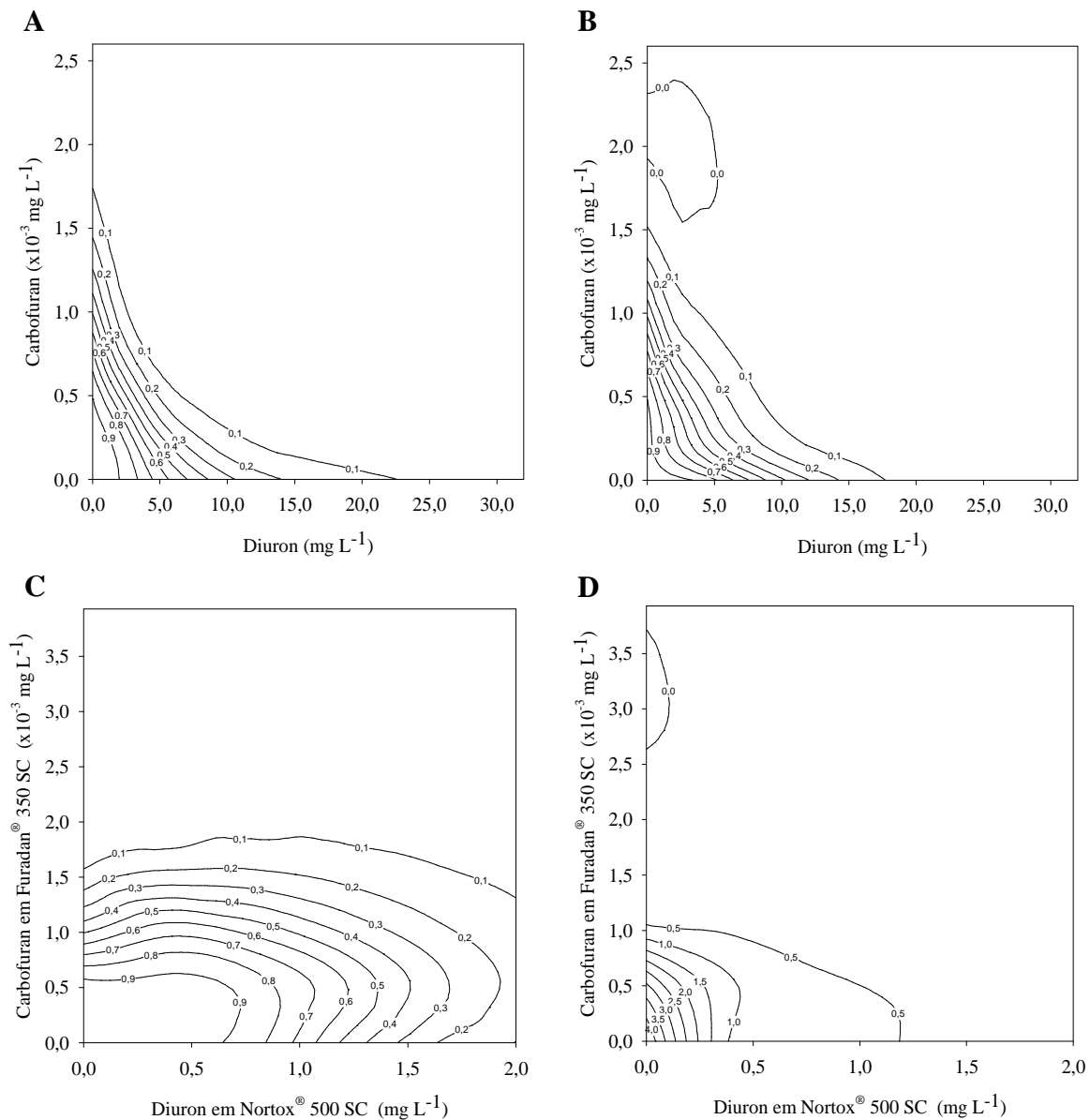


Figura 4. Isobogramas dos efeitos das misturas de diuron e carbofuran nas formas padrão e comercial sobre a mobilidade de *Ceriodaphnia silvestrii*. (A) Desvio dependente do nível da dose (DL) a partir do modelo de CA para a mistura dos agrotóxicos padrões; (B) Desvio dependente da proporção da dose (DR) a partir do modelo de IA para a mistura dos agrotóxicos padrões; (C) Desvio S/A mostrando antagonismo a partir do modelo CA para a mistura dos agrotóxicos comerciais; (D) Desvio S/A mostrando antagonismo a partir do modelo IA para a mistura dos agrotóxicos comerciais.

Para os efeitos da mistura de diuron e carbofuran (padrão e comercial) sobre a reprodução (número de neonatos por fêmea) de *C. silvestrii*, os dados ajustaram-se aos modelos de referência e apresentaram desvios significativos (Tabela 4). Na mistura dos ingredientes ativos padrões, o ajuste dos dados ao modelo CA produziu um valor de SS de 47,68 ($p < 0,05$; $r^2 = 0,87$). Após a adição do parâmetro “a” para o modelo de CA, de modo

a descrever o desvio S/A, o valor de SS diminuiu para 21,44 e foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$; $r^2 = 0,94$) (Figura 5A). O ajuste dos dados ao modelo IA produziu um valor de SS de 24,52 ($p < 0,05$; $r^2 = 0,93$) e não apresentou desvios significativos (Figura 5B). De modo geral, o melhor modelo e desvio que explicou os dados da mistura dos ingredientes ativos padrões foi o CA com desvio S/A, no qual o valor positivo do parâmetro “a” indicou antagonismo dos agrotóxicos em mistura. Na mistura de diuron e carbofuran em suas formulações comerciais, tanto o ajuste dos dados ao modelo CA (SS = 25,26, $p < 0,05$; $r^2 = 0,87$) como ao modelo IA (SS = 45,12, $p < 0,05$; $r^2 = 0,77$), após a adição dos parâmetros “a” e “b”, o desvio DL descreveu melhor os dados (CA: SS = 20,14; $p < 0,05$; $r^2 = 0,90$; IA: SS = 15,96, $p < 0,05$; $r^2 = 0,92$) (Figuras 5C e 5D, respectivamente). No entanto, o melhor modelo e desvio que explicou os dados da mistura de diuron e carbofuran comerciais foi o IA com desvio DL, indicando sinergismo em baixas doses e antagonismo em altas doses.

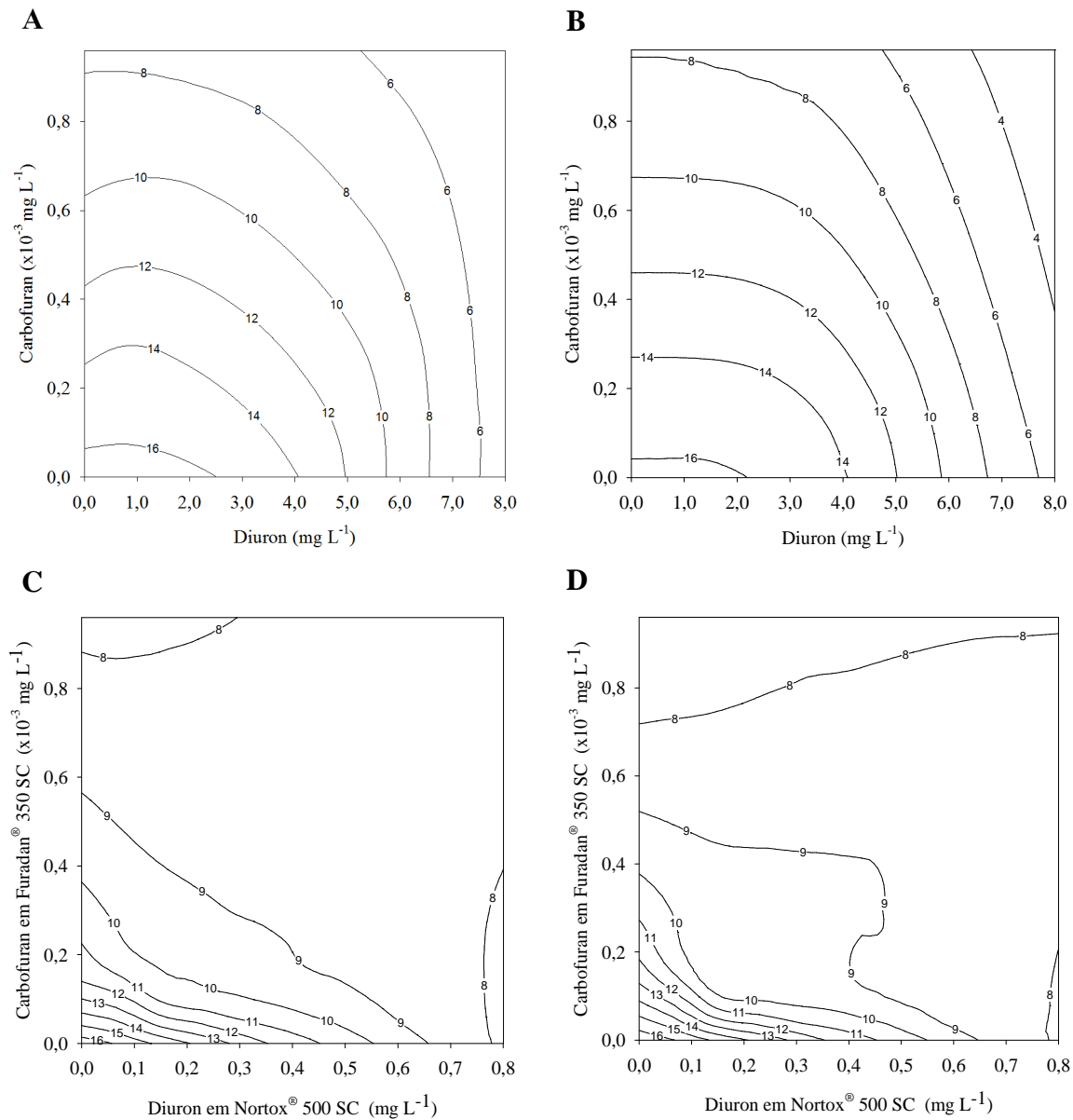


Figura 5. Isobogramas dos efeitos das misturas de diuron e carbofuran nas formas padrão e comercial sobre a reprodução de *Ceriodaphnia silvestrii*. (A) Desvio S/A mostrando antagonismo a partir do modelo de CA para a mistura dos agrotóxicos padrões; (B) Ajuste ao modelo de IA sem desvio significativo para a mistura dos agrotóxicos padrões; (C) Desvio dependente do nível da dose (DL) a partir do modelo de CA para a mistura dos agrotóxicos comerciais; (D) Desvio DL a partir do modelo de IA para a mistura dos agrotóxicos comerciais.

Uma síntese dos efeitos das misturas de diuron e carbofuran (padrão e comercial) nos testes de toxicidade aguda e crônica para as espécies *P. caudatum* e *C. silvestrii* é apresentada na Tabela 5. Pode-se observar que para todas as misturas de diuron e carbofuran (ingrediente ativo padrão) os dados ajustaram-se melhor ao modelo CA, enquanto que os dados da mistura dos agrotóxicos comerciais ajustaram-se melhor ao modelo IA. Além disso, ao

comparar os efeitos das misturas dos ingredientes ativos nas formas padrão e comercial, verificaram-se desvios dos modelos de referência diferentes. Este estudo também mostrou que os efeitos das misturas de diuron e carbofuran são espécie-específico, pois tiveram interações diferentes para *P. caudatum* e *C. silvestrii*.

Tabela 5. Resumo das análises obtidas a partir dos testes de toxicidade aguda e crônica das misturas de diuron e carbofuran (padrão e comercial) para as espécies *P. caudatum* e *C. silvestrii*.

Toxicidade	Mistura	<i>Paramecium caudatum</i>		<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	
		Modelo e Desvio	Tipo de interação	Modelo e Desvio	Tipo de interação
Aguda	Diuron e Carbofuran (padrão)	CA - DR	Sinergismo causado principalmente pelo carbofuran e antagonismo causado principalmente pelo diuron	CA - DL	Antagonismo em baixas doses e sinergismo em altas doses, com a mudança ocorrendo em um valor menor do que CE ₅₀
	Diuron e Carbofuran (comercial)	IA - S/A	Sinergismo	IA -S/A	Antagonismo
Crônica	Diuron e Carbofuran (padrão)	CA - S/A	Antagonismo	CA - S/A	Antagonismo
	Diuron e Carbofuran (comercial)	IA - DR	Antagonismo causado principalmente pelo carbofuran e sinergismo causado principalmente pelo diuron	IA - DL	Sinergismo em baixas doses e antagonismo em altas doses, com a mudança ocorrendo em um valor menor do que CE ₅₀

4. Discussão

Neste estudo, os testes de toxicidade aguda e crônica revelaram que as misturas dos agrotóxicos diuron e carbofuran (padrão e comercial) causam desvios significativos da toxicidade prevista pelos modelos de referência CA e IA sobre os invertebrados *P. caudatum* e *C. silvestrii*.

Nos testes de mistura com os protozoários, os resultados foram analisados utilizando-se os dois modelos de referência, a CA e a IA, e o que melhor se ajustou aos dados foi selecionado, como sugerido por alguns autores (e.g. Loureiro et al., 2010; Pavlaki et al., 2011). Segundo Walter et al. (2002), para a maioria dos compostos químicos que ocorrem no ambiente, frequentemente não existem informações suficientes sobre os seus modos de ação que permitam classificá-los em grupos de ação similares ou diferentes. Para os protozoários ciliados, os modos de ação do diuron e do carbofuran ainda não estão claros e seus efeitos tóxicos sobre estes organismos estão embasados em hipóteses. De acordo com alguns estudos, diuron exerce efeitos tóxicos nos microrganismos heterotróficos (e.g. levedura *Saccharomyces cerevisiae*) pelo bloqueio da cadeia respiratória mitocondrial (Dragone et al., 2015; Estève et al., 2009) e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Tenda et al., 2012). No caso do carbofuran, Hussain et al. (2008) relataram que este agrotóxico induziu efeito inibitório sobre a fagocitose e sobre a atividade do vacúolo pulsátil de *P. caudatum*, demonstrando alterações fisiológicas causadas por este composto. Além disso, anormalidades celulares em alguns microrganismos (cianobactérias, microalgas e flagelados) indicaram a interferência do carbofuran nas propriedades da membrana (Azizullah et al., 2011; Megharaj et al., 1993). Assim, em relação à toxicidade individual dos agrotóxicos, acredita-se que os efeitos tóxicos do diuron sobre *P. caudatum* podem ter sido causados provavelmente pela inibição da respiração e aumento do nível de ROS e consequente lise celular, enquanto que os efeitos tóxicos do carbofuran sobre este protozoário pode ter sido causado provavelmente por interferência deste composto nas propriedades das membranas celulares. No entanto, estas hipóteses devem ser testadas em estudos futuros.

Para o ciliado *P. caudatum*, o teste de toxicidade aguda da mistura dos ingredientes ativos padrões, mostrou que a combinação de diuron e carbofuran alterou a toxicidade dos compostos sobre a sobrevivência do protozoário, sendo que o tipo de interação foi dependente da proporção da dose. Quando o carbofuran foi o composto dominante na

mistura, verificaram-se interações sinérgicas entre os compostos (aumento da toxicidade). No entanto, quando o diuron foi o composto dominante na mistura, observaram-se interações antagônicas entre os compostos (diminuição da toxicidade). Gallego et al. (2007), ao avaliarem a toxicidade de misturas binárias dos metais cádmio, cobre e zinco sobre o ciliado *Tetrahymena thermophila*, verificaram que a proporção da concentração entre metais desempenhou um papel importante na determinação do tipo de interação entre os metais, resultado que se assemelha ao verificado neste estudo para a mistura dos agrotóxicos padrões. Na pesquisa de Gallego et al. (2007), a interação predominante na mistura dos metais foi o antagonismo, mas a interação foi alterada para aditividade ou mesmo para sinergismo nas altas concentrações dos metais.

Em relação à toxicidade crônica da mistura, ao analisar os efeitos dos ingredientes ativos padrões sobre a inibição de crescimento de *P. caudatum*, constatou-se que a interação dos compostos em mistura levou a uma diminuição da toxicidade da resposta (antagonismo). Láng e Kohidai (2012) analisaram os efeitos inibitórios de misturas binárias de fármacos (diclofenaco, ibuprofeno, metoprolol e propranolol) sobre o crescimento populacional do protozoário *Tetrahymena pyriformis* e verificaram que o tipo de interação predominante nas misturas foi o antagonismo (em 59% das combinações), seguido por aditividade (37%) e sinergismo (4%). De acordo com estes autores, a predominância do antagonismo pode ser explicada por uma inibição competitiva entre os dois fármacos que atuam sobre o mesmo alvo molecular, no entanto, eles ressaltaram que existe uma maior dificuldade para explicar o antagonismo observado entre fármacos que têm diferentes alvos moleculares. Neste estudo, destacamos também a necessidade de mais informações sobre os mecanismos de ação dos agrotóxicos selecionados sobre protozoários para elucidar as interações antagônicas que ocorreram sobre o crescimento populacional.

Ao comparar os resultados do presente estudo com outras pesquisas realizadas com misturas de agrotóxicos envolvendo microrganismos heterotróficos, verificou-se que Fernández-Alba et al. (2002) observaram interações antagônicas para a mistura dos herbicidas Irgarol 1051 e Sea nine 211 e para a mistura de Irgarol 1051, Sea nine 211 e diuron sobre a bactéria *Vibrio fischeri*. No entanto, a mistura dos herbicidas Irgarol 1051 e diuron e a mistura de um herbicida com um fungicida (Irgarol 1051 e clorotalonil; Irgarol 1051 e TCMTB) causaram interação sinérgica para a bactéria (Fernández-Alba et al., 2002). Farré et al. (2002) observaram efeitos antagônicos nas misturas de vários agrotóxicos (endossulfan, dimetoato, fenamifós, ametrina e clorfenvinfós) para a bactéria *V. fischeri*

causados por associações entre as moléculas dos compostos que diminuíram a sua biodisponibilidade.

Quando os testes de toxicidade das misturas sobre *P. caudatum* foram realizados com diuron e carbofuran em suas formulações comerciais, os resultados foram significativamente diferentes das misturas com os ingredientes ativos padrões. De acordo com os desvios dos modelos de referência (Tabela 5), percebeu-se que a mistura das formulações comerciais de diuron e carbofuran causaram toxicidades mais severas do que as misturas dos ingredientes ativos padrões. No teste de toxicidade aguda com a mistura dos produtos comerciais ocorreu um aumento da toxicidade (sinergismo) sobre o protozoário, e o teste de toxicidade crônica resultou em interações dependentes da proporção da dose, que indicou sinergismo quando o diuron comercial foi o composto predominante na mistura, resultado este que não ocorreu na mistura dos ingredientes ativos padrões. Ressalta-se que o produto comercial dos agrotóxicos já é uma mistura de substâncias, na qual o ingrediente ativo encontra-se misturado com os chamados ingredientes “inertes”, compostos estes que podem contribuir para a toxicidade da formulação, tanto por causar atividade tóxica por si próprios como pela interação com o ingrediente ativo (Cox e Sorgan, 2006). Quando os dois produtos comerciais (Diuron Nortox[®] 500 SC e Furadan[®] 350 SC) foram misturados neste estudo, aumentou-se a complexidade da mistura e o protozoário foi exposto a um coquetel de substâncias. Assim, provavelmente o aumento da toxicidade nas misturas deve-se às interações do diuron, carbofuran e seus ingredientes “inertes”. No presente estudo, consideramos que as interações observadas a partir das misturas das formulações comerciais dos agrotóxicos sobre o protozoário são mais propensas a ocorrer nos ambientes aquáticos naturais.

Para o protozoário, os resultados deste estudo também reforçam a conclusão de que a toxicidade de misturas contendo diferentes substâncias geralmente não pode ser correlacionada com a toxicidade dos seus componentes individuais (Fernandez-Alba et al., 2001; Gomiero e Viarengo, 2014). Apesar da simplicidade estrutural de *P. caudatum*, um organismo eucariótico unicelular, esta espécie foi sensível ao diuron e ao carbofuran e exibiu respostas identificáveis em nível individual e populacional à toxicidade da mistura destes agrotóxicos, mostrando desvios significativos da toxicidade, sendo considerado, portanto, um organismo-teste adequado para ser utilizado em avaliações de risco de misturas de agrotóxicos ou de outros contaminantes aquáticos. Entretanto, são raros os estudos de misturas de substâncias que utilizaram os protozoários como organismos-teste (e.g. Gomiero e Viarengo, 2014; Láng e Kohidai, 2012; Trielli et al., 2007), quando comparado com outros

microrganismos, como bactérias (e.g. Zhou et al., 2010; Liu et al., 2013) e algas (e.g. Brezovsek et al., 2014; Perez et al., 2011). Assim, mais estudos de misturas de substâncias tóxicas envolvendo protozoários são necessários.

Nos testes de mistura com cladóceros, os resultados também foram analisados utilizando os dois modelos de referência, a CA e a IA. Apesar do modo de ação do carbofuran (inibidor de acetilcolinesterase) sobre os cladóceros estar bem definido, o mecanismo de ação do diuron sobre estes organismos ainda não está claro. De acordo com alguns estudos, acredita-se que o diuron pode causar efeitos tóxicos em cladóceros por interações não-covalentes inespecíficas com componentes da membrana (toxicidade *baseline*) (Neuwoehner et al., 2010), e similarmente pode induzir o citocromo P450 como observado para o herbicida atrazina (Kao et al., 1995; Phyu et al., 2011).

Para o cladóceros *C. silvestrii*, o teste de toxicidade aguda da mistura dos agrotóxicos padrões, revelou que a interação dos compostos foi dependente do nível da dose, sendo que o antagonismo ocorreu em baixas doses e o sinergismo em altas doses dos agrotóxicos. Além disso, os resultados indicaram que a mudança da interação ocorreu em um nível da dose menor do que a CE_{50} . Choung et al. (2011), ao avaliar a toxicidade da mistura de um herbicida (atrazina) com um inseticida organofosforado (terbufós) sobre a imobilidade de *Ceriodaphnia dubia*, observaram um aumento da toxicidade (sinergismo) dos compostos em mistura. Loureiro et al. (2010) verificaram interação sinérgica para a mistura dos inseticidas imidacloprid e tiacloprid e interação antagônica para a mistura dos inseticidas imidacloprid e clorpirifós em exposições agudas (imobilização) à espécie *Daphnia magna*. Assim, a comparação dos resultados do presente estudo com outros trabalhos mostra que o tipo de interação a partir da mistura de agrotóxicos é dependente dos co-contaminantes testados e do cladóceros utilizado como organismo-teste.

Em relação à toxicidade crônica da mistura, ao analisar os efeitos dos ingredientes ativos padrões sobre a reprodução de *C. silvestrii* (número de neonatos por fêmea), verificou-se que a interação dos compostos em mistura levou a uma diminuição da toxicidade da resposta (antagonismo). Phyu et al. (2011) observaram que, usando o modelo de CA, a mistura de um herbicida (atrazina) e um inseticida (permetrina) causou a diminuição da toxicidade crônica (antagonismo) ao cladóceros *Ceriodaphnia cf. dubia*, como ocorrido neste estudo para *C. silvestrii*. Além disso, estes autores também observaram interações antagônicas com a mistura binária de atrazina e clorotalonil (fungicida) e a mistura ternária de atrazina, clorotalonil e permetrina, utilizando o modelo de CA. Pavlaki et al. (2011), ao

testar a toxicidade da mistura dos inseticidas imidacloprid e thiacloprid sobre a fertilidade de *D. magna*, observaram que a interação foi dependente do nível da dose, enquanto que, para os valores do comprimento do corpo, os dados apresentaram antagonismo ao se utilizar o modelo de IA.

Os efeitos da mistura de diuron e carbofuran sobre o cladóceros *C. silvestrii* pode ter ocorrido em nível toxicocinético ou toxicodinâmico. No entanto, uma provável explicação para a ocorrência do antagonismo nos testes de toxicidade crônica e em baixas doses nos testes de toxicidade aguda neste estudo poderia ser devido ao fato do diuron ter induzido o citocromo P450 e aumentado a biotransformação do carbofuran e, conseqüentemente, causado uma diminuição da toxicidade por uma desintoxicação metabólica. Anderson e Zhu (2004) verificaram que a combinação de um herbicida (atrazina) com um inseticida (ometoato) diminuiu a toxicidade do inseticida (antagonismo), como o verificado neste estudo para a mistura de diuron e carbofuran. Segundo estes autores, o herbicida atrazina diminuiu a toxicidade de ometoato pela indução de monooxigenases do citocromo P450 de *Chironomus tentans*, resultando na biotransformação aumentada de ometoato em metabolitos menos tóxicos. Vários estudos demonstraram que o mecanismo da ação mais comumente observado entre a atrazina e vários inseticidas organofosforados foi resultante do fato da atrazina aumentar a biotransformação destes compostos, convertendo-os em metabolitos mais (ou menos) tóxicos a vários organismos, como *Ceriodaphnia dubia*, *Chironomus tentans* e *Hyaella azteca* (Anderson e Lydy, 2002; Banks et al., 2005; Belden e Lydy, 2000; Choung et al., 2011; Mehler et al., 2008).

Nos testes de misturas de diuron e carbofuran em suas formulações comerciais sobre *C. silvestrii*, os resultados também foram significativamente diferentes das misturas com os ingredientes ativos padrões, como o ocorrido para o protozoário. No teste de toxicidade aguda, a mistura dos produtos comerciais apresentou somente antagonismo sobre o cladóceros, e o teste de toxicidade crônica mostrou interações dependentes do nível da dose, sendo observado sinergismo em baixas concentrações dos compostos, resultado este que não foi evidenciado na mistura dos ingredientes ativos padrões (Tabela 5). Chen e Stark (2010), após avaliarem os efeitos da combinação do inseticida spirotetramat com o adjuvante Destiny sobre o cladóceros *C. dubia*, indicaram que os adjuvantes agrícolas e agrotóxicos podem causar mais danos para os organismos aquáticos na forma de mistura do que em ações individuais. Poucas são as pesquisas que realizaram testes de mistura com os produtos comerciais (e.g. Coors e Frische, 2011; Tesolin et al., 2014), portanto, destacamos a

importância dos estudos de mistura utilizando as formulações comerciais, além dos testes com os ingredientes ativos padrões, pois estes podem fornecer informações mais realistas sobre os tipos de interações que ocorrem em condições naturais.

Em relação aos conceitos de referência para predição dos efeitos, independente do organismo-teste utilizado, em todas as misturas dos ingredientes ativos padrões os dados ajustaram-se melhor ao modelo de CA, enquanto que os dados da mistura de diuron e carbofuran comerciais ajustaram-se melhor ao modelo de IA. Portanto, os resultados mostraram que as misturas binárias dos agrotóxicos apresentaram uma tendência geral de fornecer melhores estimativas de toxicidade utilizando o modelo de CA em comparação com o modelo de IA, embora a precisão preditiva geral dos dois modelos seja muito similar. No entanto, para as misturas mais complexas de produtos comerciais (várias substâncias combinadas), o modelo IA forneceu melhor predição da toxicidade. De modo geral, os resultados deste estudo concordam com o consenso da maioria dos trabalhos de que o modelo de CA pode ser utilizado como um modelo mais conservador (de proteção) da toxicidade de misturas binárias para fins regulatórios e de avaliações de risco ambiental, fornecendo estimativas preditivas mesmo para misturas quimicamente diferentes (Backhaus e Faust, 2012; Belden et al., 2007; Hassold e Backhaus, 2014; Kortenkamp et al., 2009).

Os efeitos tóxicos das misturas de diuron e carbofuran foram significativamente diferentes para *P. caudatum* e *C. silvestrii*. Os resultados de interação diferentes para as espécies de invertebrados indicaram que o tipo de interação entre os compostos selecionados está intimamente relacionado ao organismo-teste e ao parâmetro avaliado. Segundo Liu et al. (2013), a conclusão da interação de uma mistura obtida para um organismo-teste não pode ser extrapolada para outros organismos. Neste estudo, ressaltamos também que os efeitos das misturas de agrotóxicos são espécie-específicos.

Estudos realizados no Brasil e em outros lugares do mundo (e.g. Carbo et al., 2008; Faggiano et al., 2010) verificaram a presença simultânea dos agrotóxicos diuron e carbofuran em corpos d'água próximos às áreas agrícolas. Considerando que os resultados deste estudo demonstraram que estes compostos misturados podem causar maior (sinergismo) ou menor toxicidade (antagonismo) às espécies *P. caudatum* e *C. silvestrii* do que quando analisados sozinhos, as avaliações de risco e critérios de qualidade ambiental com base em exposições individuais destes agrotóxicos podem não estar protegendo adequadamente os ecossistemas aquáticos. Portanto, para uma melhor proteção da biota aquática, faz-se necessário que as

agências reguladoras considerem a toxicidade de misturas, uma vez que os organismos aquáticos são constantemente expostos a um coquetel de agrotóxicos.

5. Conclusões

Os resultados dos efeitos da mistura dos agrotóxicos diuron e carbofuran sobre o protozoário *P. caudatum* e o cladóceros *C. silvestrii* obtidos neste estudo são inéditos. Os testes de toxicidade aguda e crônica mostraram que as misturas destes compostos causam desvios significativos da toxicidade prevista pelos modelos de referência CA e IA, apresentando interações sinérgicas e antagônicas, além de interações dependentes do nível e da proporção da dose. Os dois invertebrados selecionados neste estudo foram sensíveis e exibiram respostas letais e subletais à toxicidade da mistura destes agrotóxicos, mostrando desvios significativos da toxicidade podendo portanto, serem considerados organismos-teste adequados para utilização em avaliações de risco de misturas de agrotóxicos ou de outros contaminantes aquáticos. A comparação dos efeitos das misturas de diuron e carbofuran para *P. caudatum* e *C. silvestrii* revelou resultados significativamente diferentes para as espécies, indicando que as interações entre estes compostos são espécie-específicas. As misturas dos produtos comerciais apresentaram toxicidades mais severas do que as misturas dos compostos padrões provavelmente devido às interações dos dois ingredientes ativos entre si e com os ingredientes “inertes” das formulações comerciais. As interações sinérgicas observadas nas misturas dos agrotóxicos comerciais são preocupantes, pois são interações mais propensas a ocorrer nos ecossistemas aquáticos em condições reais. De acordo com este estudo, a presença de diuron e carbofuran em mistura nos corpos d’água pode levar a respostas tóxicas diferentes das verificadas para os compostos individuais. Assim, nossos resultados reforçam que as avaliações de risco ecológico devem considerar a toxicidade de misturas, a fim de evitar sub ou sobre-estimação dos efeitos do diuron e do carbofuran sobre o protozooplâncton e o zooplâncton de água doce, uma vez que estes agrotóxicos são encontrados em mistura nos ambientes naturais.

Referências Bibliográficas

Anderson, T.D., Lydy, M.J., 2002. Increased toxicity to invertebrates associated with a mixture of atrazine and organophosphate insecticides. *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (7), 1507-1514.

Anderson, T.D., Zhu, K.Y., 2004. Synergistic and antagonistic effects of atrazine on the toxicity of organophosphorodithioate and organophosphorothioate insecticides to *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). *Pestic. Biochem. Phys.* 80 (1), 54-64.

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.

Azizullah, A., Richter, P., Häder, D.P., 2011. Comparative toxicity of the pesticides carbofuran and malathion to the freshwater flagellate *Euglena gracilis*. *Ecotoxicology*, 20 (6), 1442-1454.

Bacigalupo, M.A., Meroni, G., 2007. Quantitative determination of diuron in ground and surface water by time-resolved fluoroimmunoassay: seasonal variations of diuron, carbofuran, and paraquat in an agricultural area. *J. Agric. Food Chem.* 55 (10), 3823-3828.

Backhaus, T., Faust, M., 2012. Predictive environmental risk assessment of chemical mixtures: a conceptual framework. *Environ. Sci. Technol.* 46, 2564-2573.

Banks, K.E., Turner, P.K., Wood, S.H., Matthews, C., 2005. Increased toxicity to *Ceriodaphnia dubia* in mixtures of atrazine and diazinon at environmentally realistic concentrations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 60, 28-36.

Barata, C., Baird, D.J., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M., Riva, M.C., 2006. Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus. Implications for multi-substance risks assessment. *Aquat Toxicol.* 78, 1-14.

Belden, J.B., Lydy, M.J., 2000. Impact of atrazine on organophosphate insecticide toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 19 (9), 2266-2274.

Belden, J.B., Gilliom, R., Lydy, M.J., 2007. How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life? *Integrat. Environ. Assess. Manage.* 3, 364-372.

Bliss, C.I., 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann. Appl. Biol.* 26, 585-615.

Brezovšek, P., Eleršek, T., Filipič, M., 2014. Toxicities of four anti-neoplastic drugs and their binary mixtures tested on the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* and the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis*. *Water Res.* 52, 168-177.

Carbo, L., Souza, V., Dores, E.F., Ribeiro, M.L., 2008. Determination of pesticides multiresidues in shallow groundwater in a cotton-growing region of Mato Grosso, Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* 19 (6), 1111-1117.

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.

Cassee, F.R., Groten, J.P., Bladeren, P.J., Feron, V.J., 1998. Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures. *Crit. Rev. Toxicol.* 28, 73-101.

Chen, X.D., Stark, J.D., 2010. Individual-and population-level toxicity of the insecticide, spirotetramat and the agricultural adjuvant, Destiny to the Cladoceran, *Ceriodaphnia dubia*. *Ecotoxicology*, 19 (6), 1124-1129.

Chèvre, N., Loepfe, C., Singer, H., Stamm, C., Fenner, K., Escher, B.I., 2006. Including mixtures in the determination of water quality criteria for herbicides in surface water. *Environ. Sci. Technol.* 40 (2), 426-435.

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.

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.

Coors, A., Frische, T., 2011. Predicting the aquatic toxicity of commercial pesticide mixtures. *Environ. Sci. Eur.* 23 (1), 1-18.

Cox, C., Surgan, M., 2006. Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. *Environ. Health Perspect.* 114, 1803-1806.

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.

Dragone, R., Cheng, R., Grasso, G., Frazzoli, C., 2015. Diuron in water: functional toxicity and intracellular detoxification patterns of active concentrations assayed in tandem by a yeast-based probe. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 12 (4), 3731-3740.

Ehler, L.E., 2004. An evaluation of some natural enemies of *Spodoptera exigua* on sugarbeet in Northern California. *BioControl* 49 (2), 121-135.

Estève, K., Poupot, C., Dabert, P., Mietton-Peuchot, M., Milisic, V., 2009. A *Saccharomyces cerevisiae*-based bioassay for assessing pesticide toxicity. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36 (12), 1529-1534.

Faggiano, L., de Zwart, D., García-Berthou, E., Lek, S., Gevrey, M., 2010. Patterning ecological risk of pesticide contamination at the river basin scale. *Sci. Total Environ.* 408 (11), 2319-2326.

Farré, M., Gonçalves, C., Lacorte, S., Barceló, D., Alpendurada, M., 2002. Pesticide toxicity assessment using an electrochemical biosensor with *Pseudomonas putida* and a bioluminescence inhibition assay with *Vibrio fischeri*. *Anal. Bioanal. Chem.*, 373 (8), 696-703.

Fenchel, T., 1987. Ecology of Protozoa: the biology of free-living Phagotrophic Protists. Madison/Springer-Verlag, Berlin.

Fernandez-Alba, A.R., Guil, M.D.H., Lopez, G.D., Chisti, Y., 2002. Comparative evaluation of the effects of pesticides in acute toxicity luminescence bioassays. *Anal. Chim. Acta.* 451, 195-202.

Ferreira, A.L.G., Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., 2008. Toxicity prediction of binary combinations of cadmium, carbendazim and low dissolved oxygen on *Daphnia magna*. *Aquat. Toxicol.* 89, 28-39.

Field, J.A., Reed, R.L., Sawyer, T.E., Griffith, S.M., Wigington, P.J., 2003. Diuron occurrence and distribution in soil and surface and ground water associated with grass seed production. *J. Environ. Qual.* 32, 171-179.

Freitas, E.C., Pinheiro, C., Rocha, O., Loureiro, S., 2014. 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* 31, 143-152.

Gallego, A., Martín-González, A., Ortega, R., Gutiérrez, J.C., 2007. Flow cytometry assessment of cytotoxicity and reactive oxygen species generation by single and binary mixtures of cadmium, zinc and copper on populations of the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*. *Chemosphere* 68 (4), 647-661.

Giacomazzi, S., Cochet, N., 2004. Environmental impact of diuron transformation: a review. *Chemosphere* 56, 1021-1032.

Gomiero, A., Viarengo, A., 2014. Effects of elevated temperature on the toxicity of copper and oxytetracycline in the marine model, *Euplotes crassus*: A climate change perspective. *Environ. Pollut.* 194, 262-271.

Hassold, E., Backhaus, T., 2014. The predictability of mixture toxicity of demethylase inhibiting fungicides to *Daphnia magna* depends on life-cycle parameters. *Aquat. Toxicol.* 152, 205-214.

Hussain, M.M., Amanchi, N.R., Solanki, V.R., Bhagavathi, M., 2008. Low cost microbioassay test for assessing cytopathological and physiological responses of ciliate model *Paramecium caudatum* to carbofuran pesticide. *Pest Biochem. Phys.* 90, 66-70.

ISO 10706, 2000. Water quality - determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). International Organisation for Standardisation, Geneve, Switzerland.

Jonker, M.J., Svendsen, C., Bedaux, J.J.M., Bongers, M., Kammenga, J.E., 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose-level dependent, or dose ratiodependent effects in mixture dose response analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2701-2713.

Kao, L.M., Wilkinson, C.F., Brattsten, L.B., 1995. In vivo effects of 2, 4-d and atrazine on cytochrome p-450 and insecticide toxicity in southern armyworm (*Spodoptera eridania*) larvae. Pestic. Sci. 45, 331-334.

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.

Láng, J., Kőhidai, L., 2012. Effects of the aquatic contaminant human pharmaceuticals and their mixtures on the proliferation and migratory responses of the bioindicator freshwater ciliate *Tetrahymena*. Chemosphere 89 (5), 592-601.

Liu, S.S., Wang, C.L., Zhang, J., Zhu, X.W., Li, W.Y., 2013. Combined toxicity of pesticide mixtures on green algae and photobacteria. Ecotox. Environ. Saf. 95, 98-103.

Loewe, S., Muischnek, H., 1926. Combined effects I announcement-implements to the problem. Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 114, 313-326.

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.

Mansano, A.S., Moreira, R.A., Pierozzi, M. Oliveira, T.M.A, Vieira, E.M., Rocha, O., Regali-Selegim, M.H., 2016. Effects of diuron and carbofuran pesticides in their pure and commercial forms on *Paramecium caudatum*: The use of protozoan in ecotoxicology. Environ. Pollut. 213, 160-172.

Masiá, A., Campo, J., Navarro-Ortega, A., Barceló, D., Picó, Y., 2015. Pesticide monitoring in the basin of Llobregat River (Catalonia, Spain) and comparison with historical data. Sci. Total Environ. 503-504, 58-68.

Megharaj, M., Pearson, H.W., Venkateswarlu, K., 1993. Toxicity of carbofuran to soil isolates of *Chlorella vulgaris*, *Nostoc linckia* and *N. muscorum*. Appl. Microbiol. Biot. 39 (4-5), 644-648.

Mehler, W.T., Schuler, L.J., Lydy, M.J., 2008. Examining the joint toxicity of chlorpyrifos and atrazine in the aquatic species: *Lepomis macrochirus*, *Pimephales promelas* and *Chironomus tentans*. Environ. Pollut. 152, 217-224.

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

Neuwoehner, J., Zilberman, T., Fenner, K., Escher, B.I., 2010. QSAR-analysis and mixture toxicity as diagnostic tools: Influence of degradation on the toxicity and mode of action of diuron in algae and daphnids. Aquat. Toxicol. 97, 58-67.

Novelli, A., Vieira, B.H., Cordeiro, D., Cappellini, L.T.D., Vieira, E.M., Espíndola, E.L.G., 2012. Lethal effects of abamectin on the aquatic organisms *Daphnia similis*, *Chironomus xanthus* and *Danio rerio*. *Chemosphere* 86, 36-40.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development, 2004. Guideline for testing of chemicals. *Daphnia* sp., acute immobilisation test. OECD 202, Paris

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development, 2008. Guidelines for testing of chemicals. *Daphnia magna* reproduction test. OECD 211, Paris.

Pavlaki, M.D., Pereira, R., Loureiro, S., Soares, A.M.V.M., 2011. Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 99-110.

Pérez, J., Domingues, I., Soares, A. M., Loureiro, S., 2011. 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* 20 (6), 1167-1175.

Pessoa, P.C., Luchmann, K.H., Ribeiro, A.B., Veras, M.M., Correa, J.R.M.B., Nogueira, A.J., Bainy, A.C.D., Carvalho, P.S.M., 2011. Cholinesterase inhibition and behavioral toxicity of carbofuran on *Oreochromis niloticus* early life stages. *Aquat. Toxicol.* 105 (3), 312-320.

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.

Rao, V.J., Gunda, V.G., Srikanth, K., Arepalli, S.K., 2007. Acute toxicity bioassay using *Paramecium caudatum*, a key member to study the effects of monocrotophos on swimming behaviour, morphology and reproduction. *Toxicol. Environ. Chem.* 89 (2), 307-317.

Ribeiro, A.C.A., Dores, E.F.G.C., Amorim, R.S.S., Lourencetti, C., 2013. Resíduos de pesticidas em águas superficiais de área de nascente do Rio São Lourenço-MT: Validação de método por extração em fase sólida e cromatografia líquida. *Química Nova* 36 (2), 284-290.

Saib, A., Berrebbah, H., Berredjem, M., Djebbar, M.R., 2014. Cytotoxic study of three derivatives amidophosphonates on alternative cellular model: *Paramecium tetraurelia*. *Toxicol. Res.* 3 (5), 395-399.

Sherr, B.F., Sherr, E.B., 1984. The role of heterotrophic protozoa in carbon and energy flow in aquatic ecosystems. In: Klug, M.J., Reddy, C.A. (Eds.). *Currents perspectives in microbial ecology*. American Society for Microbiology (Washington, DC), 412-423.

Souza, V., 2006. Avaliação da contaminação de águas por resíduos de pesticidas em área de cultura de algodão: região de Primavera do Leste - MT. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, 125 p.

Systat, 2008. Systat Software, Incorporation SigmaPlot for Windows version 11.0.

Tesolin, G.A.S., Marson, M.M., Jonsson, C.M., Nogueira, A.J.A., Siqueira Franco, D.A., Almeida, S.D.B., Matallo, M.B., Moura, M.A.M., 2014. Toxicity evaluation of herbicides used in sugarcane crops to Zebrafish (*Danio rerio*). *O Mundo da Saúde* 38, 86-97.

Trielli, F., Amaroli, A., Sifredi, F., Marchi, B., Falugi, C., Corrado, M.U.D., 2007. Effects of xenobiotic compounds on the cell activities of *Euplotes crassus*, a single-cell eukaryotic test organism for the study of the pollution of marine sediments. *Aquat. Toxicol.* 83 (4), 272-283.

Walter, H., Consolaro, F., Gramatica P., Scholze, M., Altenburger, R., 2002. Mixture toxicity of priority pollutants at no observed effect concentrations (NOECs). *Ecotoxicology* 11 (5), 299-310.

Zhou, X., Sang, W., Liu, S., Zhang, Y., Ge, H., 2010. Modeling and prediction for the acute toxicity of pesticide mixtures to the freshwater luminescent bacterium *Vibrio qinghaiensis* sp.-Q67. *J. Environ. Sci.* 22 (3), 433-440.

Avaliação de risco preliminar dos agrotóxicos diuron e carbofuran para os corpos d'água brasileiros e distribuição da sensibilidade das espécies

Resumo

Nas últimas décadas, com a finalidade de aumentar a produtividade agrícola, aumentou-se exageradamente o uso de agrotóxicos, especialmente nos países em desenvolvimento como o Brasil e a China. Com isso, os riscos ecológicos que estes compostos representam aos ecossistemas aquáticos também foram maximizados. Desta forma, o objetivo deste estudo foi analisar a distribuição da sensibilidade das espécies (SSD) expostas aos agrotóxicos diuron e carbofuran e avaliar os riscos ecológicos destes compostos para corpos d'água brasileiros. Para isso, curvas SSDs foram construídas e uma avaliação de risco preliminar com base no quociente de risco (RQ) foi realizada utilizando-se dados obtidos para os organismos-teste *Raphidocelis subcapitata*, *Paramecium caudatum* e *Ceriodaphnia silvestrii*. Além disso, a distribuição e a concentração ambiental prevista destes agrotóxicos no ambiente aquático foram determinadas por meio de modelos matemáticos. De acordo com os resultados, o compartimento água apresentou altas porcentagens de distribuição de diuron (59,8%) e de carbofuran (94,6%), sendo considerado, portanto, um compartimento com alto risco de contaminação por estes compostos. Para o diuron, as concentrações ambientais previstas (PECs) por modelagem situaram-se dentro da faixa verificada nos corpos d'água brasileiros, no entanto, para o carbofuran, os valores modelados foram superiores aos observados, provavelmente devido à rápida dissipação deste composto nos ambientes tropicais. As curvas SSDs mostraram que as algas clorofíceas, como *R. subcapitata* e os crustáceos, como *C. silvestrii*, foram os organismos aquáticos mais sensíveis ao diuron e ao carbofuran, respectivamente. A concentração perigosa para 5% (HC₅) das espécies, de acordo com as SSDs, foi de 2,83 µg L⁻¹ para diuron e de 1,37 µg L⁻¹ para o carbofuran. Na avaliação de risco preliminar destes agrotóxicos, os RQ foram maiores do que 1, indicando que o diuron e o carbofuran representam riscos ecológicos potenciais para os corpos d'água brasileiros. Assim, os resultados deste estudo evidenciam a alta probabilidade de ocorrerem efeitos adversos sobre os ecossistemas aquáticos expostos a estes compostos. Acredita-se que as informações desta pesquisa possam auxiliar no reconhecimento dos riscos ecológicos e contribuir para as decisões de gestão em relação à utilização agrícola destes agrotóxicos no Brasil.

Palavras-chave: ecotoxicologia, curva SSD; modelo MacKay; modelo FOCUS; quociente de risco

1. Introdução

Durante os últimos 50 anos houve uma intensificação na utilização de agrotóxico com a finalidade de aumentar a produtividade agrícola. O uso indiscriminado destes compostos pode causar impactos significativos aos ecossistemas aquáticos e terrestres, uma vez que não afetam somente os organismos-alvo, sendo atualmente, um dos principais fatores de preocupação em nível mundial (Köhler e Triebkorn, 2013). Além dos perigos que representam aos seres humanos nos aspectos ocupacionais, alimentares e de saúde pública, os agrotóxicos no ambiente podem provocar efeitos deletérios à biota aquática (Köhler e Triebkorn, 2013; Silva e Santos, 2007).

Para mensurar o efeito destes compostos aos organismos aquáticos, amostragens em campo e testes laboratoriais constituem bons métodos de análise, no entanto, ambos apresentam vantagens e desvantagens metodológicas. Enquanto as amostragens em campo proporcionam alto grau de realismo ecológico, este método é, muitas vezes, trabalhoso, caro e que pode gerar difícil interpretação dos dados devido à sua alta complexidade. Por sua vez, os testes laboratoriais apresentam alta reprodutibilidade e precisão e são baratos de serem realizados, porém possuem menor complexidade ecológica (Brock et al., 2000). Neste contexto, uma alternativa que reúne algumas vantagens de ambas as metodologias são as modelagens matemáticas, uma vez que são de baixo custo e podem servir como ligação entre estudos laboratoriais e de campo, aproximando-se da complexidade ecológica do ambiente.

Após da aplicação de um agrotóxico no campo, vários processos físicos, químicos e biológicos determinam o seu destino no ambiente (e.g. sorção, degradação, deriva, lixiviação e escoamento superficial), tornando difícil a previsão dos compartimentos atingidos e as concentrações a que estes podem estar expostos (Vryzas et al., 2009). A utilização de modelos matemáticos possibilita prever o comportamento e o destino dos agrotóxicos no ambiente. O interesse em estudos com modelagem e contaminação ambiental começou por volta de 1960, porém apenas 10 anos depois surgiram os primeiros modelos matemáticos (Spadotto et al., 2010).

Entre os vários modelos preditivos desenvolvidos, têm-se os modelos MacKay e FOCUS (*Forum for the Co-ordination of Pesticide Fate Models and their Use*), que são capazes de estimar a distribuição ambiental prevista (*Predicted environmental distribution* – PED) e a concentração ambiental prevista (*Predicted environmental concentration* – PEC), respectivamente. De modo geral, os modelos podem apresentar certo grau de simplificação

e abstração, assim como limitações de uso. No entanto, a não exatidão das previsões não representam fracasso na simulação, mas sim uma maior aproximação possível da representação do real com base nos conhecimentos atuais e informações disponíveis (Spadotto et al., 2010).

O modelo matemático MacKay é um modelo de fugacidade, ou seja, ele descreve a tendência de um composto químico em escapar de uma fase, com base em suas características físico-químicas (massa molar, solubilidade em água, pressão de vapor, ponto de fusão e coeficiente de partição octanol-água). Relacionando estes dados com as características ambientais do local onde o composto se encontra, é possível determinar o potencial de distribuição dos agrotóxicos pelos compartimentos ar, água, solo e sedimento. Este modelo apresenta quatro níveis de complexidade (MacKay, 1991). O nível I prevê a distribuição do agrotóxico entre os compartimentos, assumindo equilíbrio termodinâmico dos coeficientes de partição em estado de equilíbrio estacionário. O nível II também assume um equilíbrio, porém com adição dos processos de advecção e degradação da substância nos compartimentos. O nível III assume um cenário de não-equilíbrio e adiciona advecções, degradações, emissões e transferência da substância entre os compartimentos. O nível IV é o mais complexo e assume um sistema instável, descrito por um sistema linear de equações diferenciais (Mackay, 1991). Este modelo possibilita a identificação do compartimento possivelmente mais contaminado além de prever as porcentagens de distribuição do composto em todos os compartimentos (Mackay e Paterson, 1985).

O modelo FOCUS fornece dados mais quantitativos. Com base em características físico-químicas do agrotóxico (massa molar, solubilidade em água, DT_{50} no solo, DT_{50} na água, DT_{50} no sedimento, DT_{50} sedimento/água e K_{oc}), além de outras informações referentes à taxa de aplicação do composto e as características ambientais, o FOCUS calcula a concentração ambiental prevista (PEC) na água e no sedimento do compartimento aquático. Este modelo apresenta quatro “passos” de acordo com sua complexidade e refinamento nos resultados gerados. O “Passo 1” é o de maior simplicidade e representa o “pior cenário” da aplicação de agrotóxicos, assumindo a entrada de contaminantes via deriva, *runoff*, erosão e/ou drenagem em uma única ocasião. Diferentemente, o “Passo 2” assume entradas com base em padrões de aplicações sequenciais tendo em conta a degradação do composto entre aplicações sucessivas. Ainda neste passo há a possibilidade de refinamento por meio de escolhas de outros parâmetros a serem considerados, como estação do ano, região de aplicação e presença ou ausência de interceptação por plantações

e tipo de plantações. Os demais passos (3 e 4) são específicos para determinadas regiões da Europa e, portanto, muito mais refinados, uma vez que levam em consideração as características físico-químicas destes locais especificamente (FOCUS, 2001).

A curva de distribuição da sensibilidade das espécies (*Species Sensitivity Distribution* – SSD) é uma distribuição estatística feita com os dados laboratoriais de toxicidade (CE_{50} , CL_{50} ou CENO) os quais são plotados gerando uma curva log-normal de dados preditivos. A SSD pode ser usada tanto para avaliações prospectivas quanto retrospectivas (Posthuma et al., 2002). A avaliação prospectiva permite o cálculo da concentração perigosa para 5% das espécies (*Hazardous concentration 5% – HC5*), e retrospectivamente, pode ser utilizada para estimar a fração das espécies potencialmente afetadas numa certa concentração do agrotóxico (Kwok et al., 2007; Larras et al., 2012; Maltby et al., 2005). Além destas aplicações, as curvas SSDs também têm sido utilizadas para comparar a sensibilidades de diferentes táxons, habitats e ambientes, e fornecer uma melhor representação da sensibilidade para toda a biota aquática (Daam e Van Den Brink, 2010).

Após análises da distribuição e concentração ambiental prevista dos agrotóxicos no ambiente, bem como a realização de testes ecotoxicológicos para verificar os efeitos destes compostos sobre os organismos aquáticos, é possível avaliar se os agrotóxicos representam risco para os ecossistemas aquáticos. A avaliação de risco ecológico é definida como um processo que avalia a probabilidade de efeitos ecológicos adversos sobre os ecossistemas expostos a um ou mais fatores de stress (USEPA, 1998). A caracterização do risco é normalmente expressa como a razão entre a concentração ambiental prevista (PEC) e a concentração sem efeito previsto (PNEC) (Gao et al., 2014; Vryzas et al., 2009). Os valores de PEC são calculados utilizando modelos de previsão ou diretamente de dados de monitoramento, enquanto os valores PNEC são geralmente calculadas com base em concentrações críticas, por exemplo, CE_{50} , CL_{50} e CENO (Palma et al., 2004; Vryzas et al., 2009).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi mensurar a distribuição e concentração ambiental prevista do diuron e do carbofuran no ambiente aquático, utilizando modelos matemáticos, e comparar a sensibilidade dos organismos-teste a estes compostos baseando-se em curvas preditivas (SSDs). Além disso, esta pesquisa avaliou os riscos ecológicos dos agrotóxicos diuron e carbofuran para os corpos d'água brasileiros.

2. Materiais e Métodos

2.1. Distribuição e concentração ambiental prevista

Os modelos MacKay e FOCUS utilizam as informações físico-químicas dos agrotóxicos e simulam a porcentagem de distribuição dos compostos nos compartimentos ambientais (MacKay) ou preveem a concentração provável que poderá ser encontrada nos compartimentos água e sedimento (FOCUS). Neste trabalho a ênfase foi o compartimento aquático, sendo que somente estas informações serão discutidas posteriormente. Para o modelo de MacKay (MacKay, 2001) utilizou-se o *software* Level I versão 3.00 (disponível em <http://www.trentu.ca/academic/aminss/envmodel/models/L1300.html>) e para o modelo FOCUS utilizou-se o *software* FOCUS Steps 1-2 versão 3.2 (disponível em <http://focus.jrc.ec.europa.eu/sw/index.html>). No modelo MacKay foi selecionada a forma mais simples (Nível I) para ser aplicada neste estudo, ou seja, o considerado “pior cenário”. No modelo FOCUS foi selecionado o Passo 2, no qual refinou-se um pouco mais os dados levando em consideração a concentração e número de aplicações dos compostos no campo. Neste estudo, a cultura agrícola cana de açúcar foi selecionada como cultura base para obtenção das informações agrícolas referentes ao uso dos produtos comerciais Diuron Nortox[®] 500 SC (diuron) e Furadan[®] 350 SC (carbofuran). Os dados utilizados nos modelos MacKay e FOCUS estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Dados de entrada utilizados para os cálculos de PED (*Predicted Environmental Distribution*) e PEC (*Predicted Environmental Concentration*) nos modelos matemáticos Mackay Nível I e FOCUS Passo 2. Fontes: PPDB – *Pesticide Properties DataBase* e DAR – *Draft Assessment Report* (EFSA – *Europe Food Safety Authority*).

Características	Diuron		Carbofuran	
	MacKay	FOCUS	MacKay	FOCUS
Massa molar	233,1 g mol ⁻¹	233,1 g mol ⁻¹	221,3 g mol ⁻¹	221,3 g mol ⁻¹
Solubilidade em água	35,6 g m ⁻³	35,6 mg L ⁻¹	322 g m ⁻³	322 mg L ⁻¹
Pressão de vapor	1,15 x 10 ⁻⁰⁶ Pa	-	8 x 10 ⁻⁵ Pa	-
Ponto de fusão	157 °C	-	153,1 °C	-
Log Kow	2,87	-	1,8	-
DT ₅₀ Água	-	8,8 dias	-	6,1 dias
DT ₅₀ Solo	-	75,5 dias	-	12,8 dias
DT ₅₀ sedimento/água	-	48 dias	-	9,7 dias
DT ₅₀ Sedimento	-	14 dias	-	10,7 dias
Koc	-	366 L kg ⁻¹	-	22 L kg ⁻¹
Temperatura	20°C	-	20°C	-
Concentração de aplicação*	-	3200 g i.a./ha	-	1750 g i.a./ha
Número de aplicações por estação*	-	1 aplicação	-	1 aplicação

Log Kow = coeficiente de partição octanol-água; DT50 = tempo de degradação de 50% do composto (meia-vida) e Koc = coeficiente de adsorção.

*Dados referentes à cultura de cana de açúcar e produtos comerciais Diuron Nortox[®] 500 SC (diuron) e Furadan[®] 350 SC (carbofuran) (AGROFIT, 2015). i.a. = ingrediente ativo.

2.2. Distribuição da sensibilidade das espécies

Os dados ecotoxicológicos apresentados nos capítulos anteriores para os organismos-teste *Raphidocelis subcapitata* (capítulo 1; CI₅₀-96h), *Paramecium caudatum* (capítulo 2; CI₅₀-24h) e *Ceriodaphnia silvestrii* (capítulo 3; CE₅₀-48h) expostos aos ingredientes ativos diuron e carbofuran foram utilizados no presente capítulo. Estes dados, juntamente com os obtidos da literatura, foram utilizados para a elaboração de curvas de distribuição da sensibilidade das espécies (SSD), possibilitando melhor visualização comparativa da sensibilidade das espécies e inferência dos grupos taxonômicos mais e menos sensíveis aos agrotóxicos selecionados.

Dados de toxicidade para os organismos aquáticos foram compilados a partir do banco de dados USEPA ECOTOX (<http://cfpub.epa.gov/ecotox/>), suplementado com dados da literatura aberta e relatórios de avaliação do diuron e carbofuran (European Commission, 2006) para as espécies não incluídas neste banco de dados. Distribuições log-normal dos valores foram construídas utilizando o software ETX, versão 2.0 (Van Vlaardingen et al.,

2004). O gráfico resultante traz no eixo Y a fração potencialmente afetada (*Potentially Affected Fraction* – PAF) que se refere ao HC_p (*Hazardous concentration* – concentração perigosa) onde p é a porcentagem de espécies ameaçadas pelo contaminante. As porcentagens mais comumente utilizadas são 5% e 50%, ou seja, HC₅ e HC₅₀ (Maltby et al., 2005; Kwok et al., 2007). Os valores de HC₅ e HC₅₀ e seus respectivos limites de confiança foram calculados com este software com base na metodologia descrita por Aldenberg e Jaworska (2000). Uma vez que o modelo assume uma distribuição log-normal dos dados, a log-normalidade foi testada com o teste de Anderson-Darling incluídos no pacote do software ETX, que foi avaliada em nível de significância de 5%.

2.3. Avaliação de risco preliminar

A avaliação de risco preliminar dos agrotóxicos diuron e carbofuran foi realizada com base no quociente de risco (*Risk Quotient* - RQ). Os quocientes de risco foram calculados a partir da concentração ambiental prevista (PEC) e a concentração sem efeito previsto (PNEC) destes compostos, expressos como a razão de PEC/PNEC ($RQ = PEC/PNEC$) (Gao et al., 2014; Cristale et al., 2013; Sánchez-Avila et al., 2012). Os valores de PEC para diuron e carbofuran foram estimados usando o modelo FOCUS (descrito anteriormente). Os valores de PNEC foram calculados utilizando a seguinte equação: $PNEC = CENO$ ou CI_{10}/AF , onde CENO ou CI_{10} é o valor obtido a partir dos testes de toxicidade crônica e AF (*Assessment Factor*) é o fator de avaliação. O AF é usado para ajustar a concentração de efeitos a partir de um conjunto limitado de dados e estimar a PNEC, refletindo as incertezas da extrapolação (European Commission, 2011; OECD, 2011). Neste estudo, um AF de 10 foi aplicado aos dados de toxicidade crônica (OECD, 2011). Para a interpretação dos dados, $RQ < 1$ indica que não há risco significativo e $RQ \geq 1$ indica um risco potencial (Ginebreda et al., 2010; Vryzas et al., 2009).

3. Resultados

3.1. Distribuição e concentração ambiental prevista

Segundo o modelo MacKay, o compartimento mais vulnerável ao agrotóxico diuron foi a água, a qual reteve cerca de 59,8% do composto. O segundo compartimento mais afetado por este agrotóxico foi o solo (39,3%). Os demais compartimentos, sedimento e ar, acumularam aproximadamente 0,87% e $9,24 \times 10^{-5}$ % de diuron, respectivamente (Figura 1). O diuron apresentou fugacidade de $9,66 \times 10^{-6}$ micropascal.

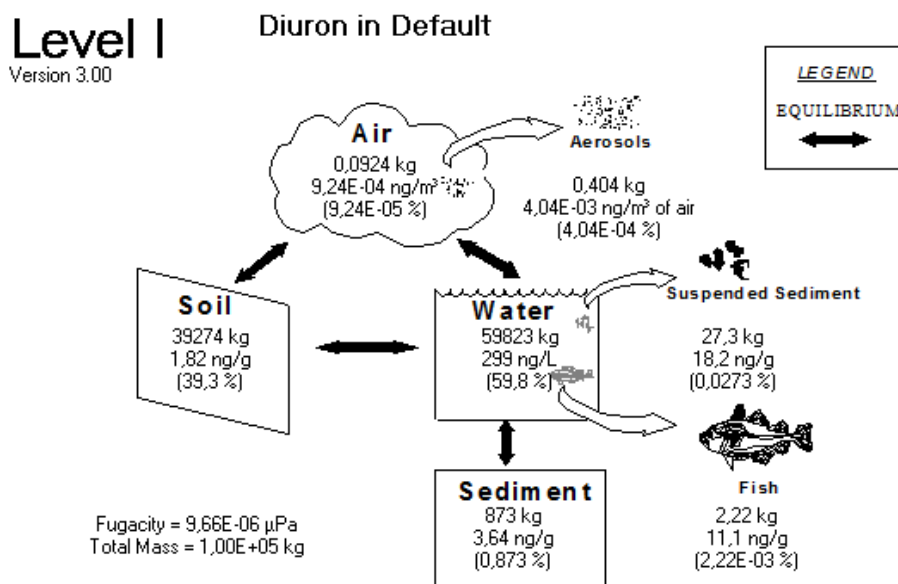


Figura 1. Distribuição ambiental prevista (PED) do agrotóxico diuron com base no modelo de fugacidade MacKay Nível I.

Para o carbofuran, de acordo com o modelo MacKay, o compartimento água mostrou-se como o principal destino deste agrotóxico, o qual acumulou cerca de 94,6% do composto, demonstrando alta vulnerabilidade. O compartimento solo reteve 5,29%, enquanto o sedimento acumulou aproximadamente 0,12%. O compartimento menos atingido pelo diuron foi o ar ($6,67 \times 10^{-4}$ %) (Figura 2). O carbofuran apresentou fugacidade de $7,34 \times 10^{-5}$ micropascal.

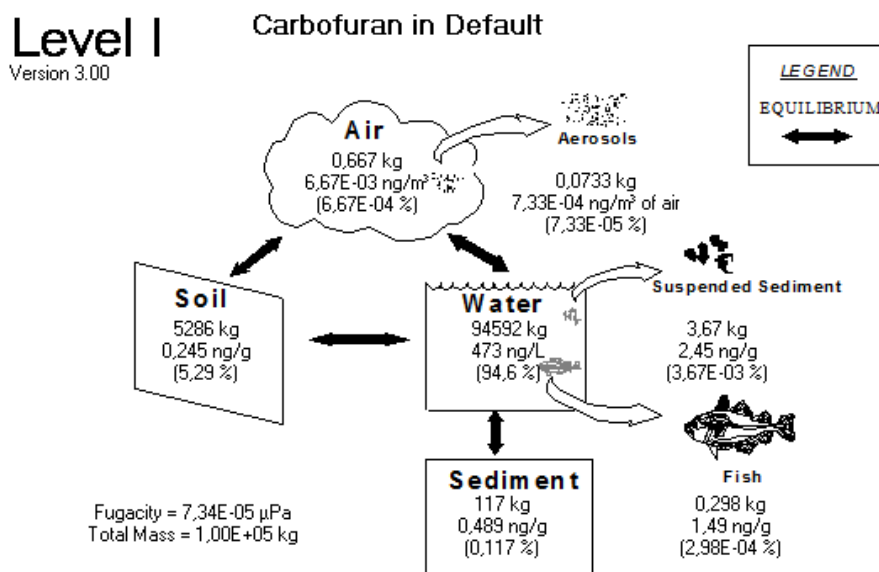


Figura 2. Distribuição ambiental prevista (PED) do agrotóxico carbofuran com base no modelo de fugacidade MacKay Nível I.

Por meio do modelo FOCUS, foi possível prever a PEC máxima (PEC_{max}) de diuron e carbofuran que atingiriam o compartimento aquático logo após a aplicação dos agrotóxicos nas áreas agrícolas. Além disso, este modelo também forneceu a PEC média ponderada pelo tempo (PEC_{twa} – *time-weighted average*), no qual foi possível prever as concentrações após 1 a 100 dias da aplicação dos agrotóxicos. Os valores da PEC_{max} e PEC_{twa} para diuron e carbofuran são apresentadas na Tabela 2. No presente estudo, os dados obtidos a partir do modelo FOCUS referem-se ao Passo 2 (*Step 2*).

Tabela 2. Valores de PEC máxima (PEC_{max}) e PEC média ponderada pelo tempo (PEC_{twa}) dos agrotóxicos diuron e carbofuran nos corpos d'água.

	Diuron (μg L ⁻¹)	Carbofuran (μg L ⁻¹)
PEC _{max}	292,9	192,6
PEC _{twa} -1d	281,1	182,2
PEC _{twa} -2d	270,6	172,5
PEC _{twa} -4d	252,7	155,1
PEC _{twa} -7d	229,1	133,3
PEC _{twa} -14d	185,1	97,0
PEC _{twa} -21d	152,4	73,9
PEC _{twa} -28d	127,7	58,6
PEC _{twa} -42d	94,0	40,5
PEC _{twa} -50d	80,9	34,2
PEC _{twa} -100d	41,8	17,2

PEC = concentração ambiental prevista; d = dias.

3.2. Distribuição da sensibilidade das espécies

A curva SSD construída para o agrotóxico diuron (Figura 3) mostrou que, em relação aos três organismos-teste utilizados neste estudo, a alga *Raphidocelis subcapitata* foi a espécie mais sensível ($CI_{50-96h} = 10,4 \mu\text{g L}^{-1}$). O protozoário *Paramecium caudatum* ($CI_{50-24h} = 7100,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* ($CE_{50-48h} = 7100,0 \mu\text{g L}^{-1}$) foram, respectivamente, 683 e 715 vezes menos sensíveis do que a alga selecionada. De modo geral, a espécie mais sensível na curva SSD foi a alga *Scenedesmus quadricauda* ($CI_{50-24h} = 2,7 \mu\text{g L}^{-1}$) e a menos sensível foi a bactéria *Vibrio fischeri* ($CE_{50-30min} = 58070,0 \mu\text{g L}^{-1}$). Em relação aos grupos, a ordem decrescente de sensibilidade das espécies ao diuron foi: algas clorofíceas > macrófitas > cianobactéria > algas diatomáceas > copépode > protozoário > cladóceros > peixe > poliqueta > anfípoda > bactéria.

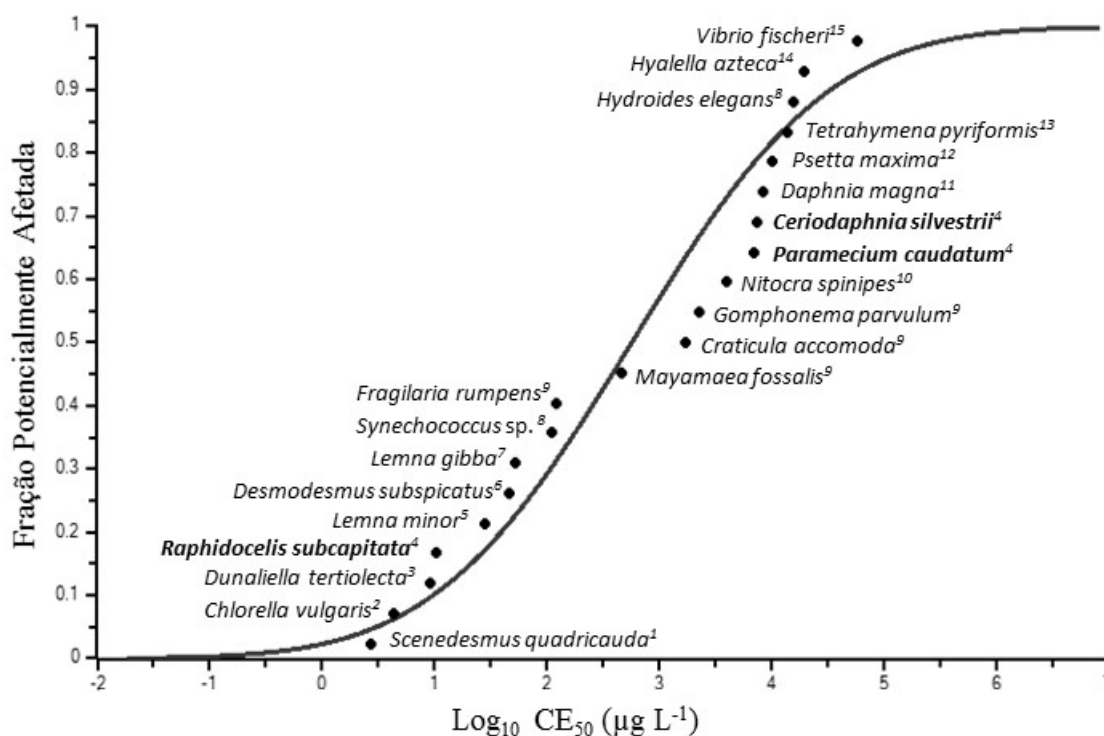


Figura 3. Curva de distribuição da sensibilidade das espécies (SSD) para o agrotóxico diuron a partir de dados das espécies utilizadas no presente estudo (em negrito) e para outros organismos aquáticos publicados na literatura. (1) Ma et al. (2003); (2) Ma et al. (2002); (3) DeLorenzo et al. (2013); (4) Presente estudo; (5) Gatidou et al. (2015); (6) Masojidek et al. (2011); (7) Burns et al. (2015); (8) Bao et al. (2011); (9) Larras et al. (2012); (10) Karlsson et al. (2006); (11) Hernando et al. (2005); (12) Lazhar et al. (2012); (13) Bricheux et al. (2013); (14) Nebeker e Schuyttema (1998); (15) Bonnet et al. (2007).

Para o carbofuran, a curva SSD (Figura 4) mostrou que a *C. silvestrii* foi a espécie mais sensível entre os três organismos-teste aqui estudados ($CE_{50-48h} = 0,86 \mu\text{g L}^{-1}$), seguida da alga *R. subcapitata* ($CI_{50-96h} = 7426,5 \mu\text{g L}^{-1}$). O protozoário *P. caudatum* apresentou baixa sensibilidade a este composto ($CI_{50-96h} = 22950,0 \mu\text{g L}^{-1}$). Ao comparar com outras espécies da literatura, *C. silvestrii* foi o organismo-teste mais sensível já registrado e a bactéria *V. fischeri* foi o menos sensível ($CE_{50-30min} = 28900,0 \mu\text{g L}^{-1}$). Em relação aos grupos, a ordem decrescente de sensibilidade das espécies ao diuron foi: cladóceros > anfípodos > insetos > ostrácoda > decápoda > peixes > cianobactéria > algas > rotíferos > protozoário > bactéria.

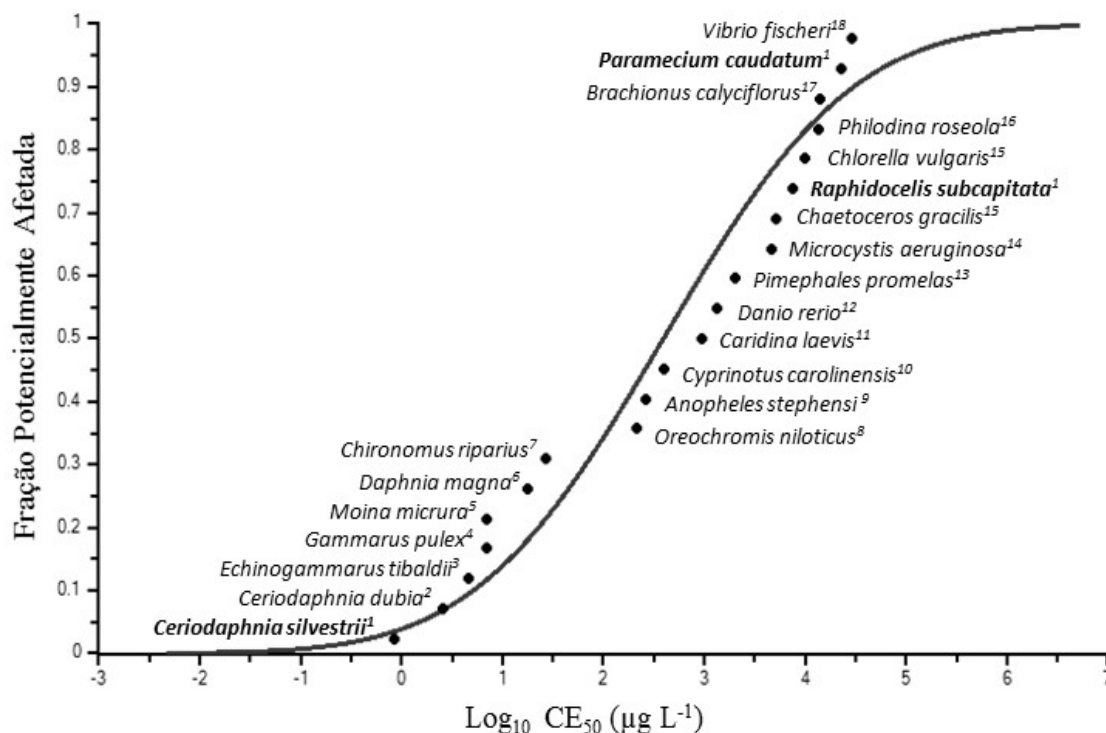


Figura 4. Curva de distribuição da sensibilidade das espécies (SSD) para o agrotóxico carbofuran a partir de dados das espécies utilizadas no presente estudo (em negrito) e para outros organismos aquáticos publicados na literatura. (1) Presente estudo; (2) Bailey et al. (1996); (3) Pantani et al. (1997); (4) Ashauer et al. (2010); (5) Iwai et al. (2011); (6) Hernando et al. (2005); (7) Ibrahim et al. (1998); (8) Pessoa et al. (2011); (9) Kumar et al. (2004); (10) Grant et al. (1983); (11) Sucahyo et al. (2008); (12) Lee et al. (2014); (13) Tarkowski (2004); (14) Ma et al. (2006); (15) Arzul et al. (2006); (16) Moreira et al. (2015); (17) Iesce et al. (2006); (18) Fernández-Alba et al. (2002).

A partir das curvas de SSD para diuron e carbofuran, os valores da concentração perigosa para 5% (HC₅) e 50% (HC₅₀) dos organismos aquáticos foram calculados para os agrotóxicos selecionados (Tabela 3).

Tabela 3. Valor médio da concentração perigosa para 5% (HC₅) e 50% (HC₅₀) dos organismos aquáticos e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) para diuron e carbofuran, calculada com base nas curvas de SSD.

Agrotóxico	HC ₅		HC ₅₀	
	HC ₅ (µg L ⁻¹)	IC 95% (µg L ⁻¹)	HC ₅₀ (µg L ⁻¹)	IC 95% (µg L ⁻¹)
Diuron	2,83	0,30 - 13,25	573,14	173,12 - 1897,45
Carbofuran	1,37	0,13 - 7,11	392,58	109,71 - 1404,73

3.3. Avaliação de risco preliminar

Os valores de PEC, PNEC e RQ são apresentados na Tabela 4, juntamente com os dados de toxicidade crônica (CENO ou IC₁₀) utilizados na avaliação de risco. De acordo com os resultados, todos os valores de RQ foram > 1, indicando que os agrotóxicos diuron e carbofuran apresentam riscos ecológicos potenciais para os corpos d'água brasileiros.

Tabela 4. Risco ecológico dos agrotóxicos diuron e carbofuran como quociente de risco (RQ), com base nos dados de toxicidade crônica dos organismos-teste selecionados.

Agrotóxico	Organismo-teste	CENO ou CI ₁₀ (µg L ⁻¹)	PECTwa (µg L ⁻¹)	PNEC (µg L ⁻¹)	RQ (PEC/PNEC)
Diuron	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	2,5	252,7 ^a	0,25	1010,7
	<i>Paramecium caudatum</i>	610,0	281,1 ^b	61,00	4,6
	<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	125,0	229,1 ^c	12,50	18,3
Carbofuran	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	800,0	155,1 ^d	80,00	1,9
	<i>Paramecium caudatum</i>	300,0	182,2 ^e	30,00	6,1
	<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	0,23	133,3 ^f	0,023	5796,6

^a PECTwa-4 dias para diuron; ^b PECTwa-1 dia para diuron; ^c PECTwa-7 dias para diuron; ^d PECTwa-4 dias para carbofuran; ^e PECTwa-1 dia para carbofuran; ^f PECTwa-7 dias para carbofuran.

CENO = concentração de efeito não observado; CI₁₀ = concentração que inibe 10% do crescimento populacional; PEC = concentração ambiental prevista; twa = média ponderada pelo tempo; PNEC = concentração sem efeito previsto.

4. Discussão

Neste estudo, o modelo MacKay (MacKay, 2001) mostrou que o ambiente aquático é o principal destino dos agrotóxicos diuron e carbofuran, apresentando altas porcentagens de distribuição no compartimento água, sendo considerado, portanto, um compartimento com alto risco de contaminação por estes compostos. Outros estudos realizados no Brasil com estes compostos também evidenciaram a vulnerabilidade do compartimento água. Plese et al. (2009), ao avaliar o destino ambiental de herbicidas utilizados nas culturas de algodão, café e citros, verificaram que, para o diuron, o compartimento água foi o mais afetado (87,93%), seguido pelo compartimento solo (3,67%). Para carbofuran, Silva et al. (2007) e Plese (2005) também verificaram altas porcentagens de distribuição deste agrotóxico na água (99%), como observado no presente estudo. Devido à alta solubilidade em água (322 mg L^{-1}) e ao baixo coeficiente de adsorção ao solo ($K_{oc} = 22 \text{ mL g}^{-1}$), o carbofuran possui alto potencial de ser transportado dissolvido em água e assim contaminar o compartimento aquático (Plese et al., 2005; Silva et al., 2009), como demonstrado pelo modelo MacKay.

Outros métodos de modelagem utilizados por alguns pesquisadores também demonstraram o alto risco de contaminação dos ambientes aquáticos brasileiros. Ferracini et al. (2001), utilizando os métodos da Agência de Proteção Ambiental (EPA), como o índice de GUS (*Groundwater Ubiquity Score*) (Funari et al., 1991) e o método de GOSS (Goss, 1992) afirmaram que o ingrediente ativo diuron atendeu todos os critérios de avaliação estabelecidos, indicando potencial de contaminação de águas subterrâneas da região de Petrolina (PE) e Juazeiro (BA). Pinheiro e Rosa (2008), utilizando o método SIRIS (Sistema de Integração de Risco com Interação de *Scores*) (Vaillant et al., 1995), verificaram que diuron e carbofuran foram os ingredientes ativos com maior risco de degradação de águas superficiais na bacia do rio Itajaí (SC).

As concentrações previstas nos ambientes aquáticos pelo modelo FOCUS não foram tão discrepantes das concentrações reais quantificadas nos ambientes aquáticos brasileiros (Tabela 5). No caso do diuron, a PEC máxima e as PEC médias ponderadas no tempo (PEC_{twa}) previstas pelo FOCUS estavam dentro da faixa verificada para os corpos d'água brasileiros, sendo esta de 0,9 a 408,0 $\mu\text{g L}^{-1}$. No entanto, verificou-se que a PEC máxima prevista (292,9 $\mu\text{g L}^{-1}$) foi cerca de 1,4 vezes menor do que a concentração máxima detectada por Paschoalato et al. (2008) em amostras de água do Rio Pardo (Ribeirão Preto, SP). O Rio Pardo localiza-se na principal região sucroalcooleira do Brasil e fica vulnerável à

contaminação com os agrotóxicos utilizados nas plantações de cana de açúcar, como o herbicida diuron. A alta concentração registrada por Paschoalato et al. (2008) pode ser resultado da excessiva utilização de diuron nas áreas agrícolas, como por exemplo pela aplicação de dosagens mais elevadas que as recomendadas, e também pela proximidade das plantações com os corpos d'água.

Tabela 5. Concentrações máximas dos agrotóxicos diuron e carbofuran detectadas em ambientes de água doce no Brasil.

Diuron ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Carbofuran ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Área de estudo	Referência
0,90	-	Alto Rio Poxim, Aracaju, SE (água superficial)	Britto et al. (2012)
-	10,40	Quitéria, RS (água subterrânea)	Caldas et al. (2011)
0,78	68,80	Primavera do Leste, MT (água subterrânea)	Carbo et al. (2008)
7,12	-	Ribeirão Preto, SP (água subterrânea)	Dantas et al. (2011)
6,29	-	Região Centro-Oeste (água subterrânea)	Dores et al. (2009)
-	14,99	Canal São Gonçalo e Rio Piratini, RS (água superficial)	Grützmacher et al. (2008)
-	0,10	Região do médio rio Uruguai, RS (água superficial)	Loro et al. (2015)
-	0,80	Rios da Depressão Central, RS (água superficial)	Marchesan et al. (2010)
408,00	-	Rio Pardo, Ribeirão Preto, SP (água superficial)	Paschoalato et al. (2008)
-	35,25	Rio São Lorenzo, MT (água superficial)	Ribeiro et al (2013)
-	1,40	Sete regiões do sul do Brasil (água superficial)	Silva et al. (2009)

Para o agrotóxico carbofuran, a PEC máxima ($192,6 \mu\text{g L}^{-1}$) e as PEC_{twa} (1° até 21° dia) previstas pelo modelo FOCUS foram maiores do que a faixa de valores verificada para os corpos d'água brasileiros, sendo esta de 0,1 a $68,8 \mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 5). A diferença entre os valores pode ser provavelmente devida a dois motivos: 1) a amostragem do ambiente aquático pode ter sido realizada vários dias após a aplicação do agrotóxico em campo e/ ou eventos de chuvas, e parte do composto já poderia ter se degradado; 2) as condições geoclimáticas dos ambientes tropicais, como temperaturas mais elevadas e qualidade do solo, podem ter favorecido a dissipação mais rápida do carbofuran no ambiente, apresentando assim, concentrações mais baixas do que as previstas no compartimento aquático.

Neste estudo, o uso de organismos-teste de diferentes níveis tróficos nos ensaios ecotoxicológicos (uma alga, um protozoário e um cladóceros) foi adequado para verificar a abrangência dos efeitos deletérios do diuron (herbicida) e do carbofuran (inseticida), sendo que contemplou faixas de sensibilidade bem diferentes. Como esperado, o diuron foi altamente tóxico para a microalga *R. subcapitata*, enquanto o carbofuran foi extremamente

tóxico para o cladóceros *C. silvestrii*. A alta toxicidade do diuron sobre os organismos fotossintetizantes deve-se ao bloqueio do transporte de elétrons no fotossistema II e, conseqüentemente a inibição do processo da fotossíntese (Krieger-Liszkay, 2005). Já a toxicidade do carbofuran é causada pela inibição da enzima acetilcolinesterase (Ibrahim e Harabawy, 2014). Em relação ao protozoário *P. caudatum*, previamente acreditava-se que este seria o organismo-teste menos sensível aos agrotóxicos estudados. No entanto, inusitadamente para o herbicida diuron, este protozoário, sendo um organismo não-alvo, foi mais sensível do que espécies comumente utilizadas em estudos ecotoxicológicos, tais como *Vibrio fischeri*, *Daphnia magna* e *Hyalella azteca* (Figura 3).

As curvas de SSD forneceram uma melhor representação da sensibilidade da biota aquática aos agrotóxicos selecionados, envolvendo desde produtores primários (algas e macrófitas) e microrganismos até vertebrados (peixes). Tais resultados demonstram a importância de uma análise multi-espécie no diagnóstico ambiental, tendo em vista que existem espécies mais e menos sensíveis a determinados contaminantes. Segundo Larras et al. (2012), dentro de uma mesma comunidade, diferentes espécies podem responder de forma diferente dependendo de suas características fisiológicas e ecológicas. Assim, através das curvas SSDs foi possível demonstrar a variação da sensibilidade para um conjunto de espécies, podendo-se extrapolar o valor de HC para comunidades naturais (Brock et al, 2006), que é mais realista do ponto de vista ambiental.

Alguns autores construíram curvas SSD para o diuron com base na sensibilidade dos produtores primários, incluindo macrófitas e microalgas (Knauert et al., 2008; Chèvre et al., 2006; Larras et al., 2012). O HC₅ médio para diuron (1,43 µg L⁻¹) verificado por Larras et al. (2012) foi inferior ao obtido neste estudo (2,83 µg L⁻¹), sendo que estes autores construíram a curva SSD somente com base na comunidade de algas diatomáceas. Para o carbofuran, o HC₅ médio observado no presente estudo (1,37 µg L⁻¹) foi superior ao valor relatado por Maltby et al. (2005) (0,22 µg L⁻¹), pois estes pesquisadores utilizaram somente os artrópodes para a construção da curva SSD. Assim, observa-se que a variação dos valores de HC₅ médio depende das espécies utilizadas, podendo-se dar enfoque somente nos grupos taxonômicos mais sensíveis, como o ocorrido nos estudos de Larras et al. (2012) e Maltby et al. (2005), ou a inclusão de diferentes comunidades, como realizado no presente trabalho.

Os valores de HC₅ obtidos a partir das SSDs para os agrotóxicos diuron e carbofuran foram mais baixos do que as concentrações reais encontradas nos corpos d'água brasileiros (Tabela 5). Isso implica que as comunidades aquáticas mais sensíveis, como as algas e

macrófitas para diuron e microcrustáceos e insetos para carbofuran, podem ser afetadas por estes agrotóxicos, causando redução na densidade e diversidade, seleção biológica de organismos indesejáveis e possíveis alterações na dinâmica bioquímica, induzindo a um desequilíbrio do ecossistema aquático (Köhler e Triebkorn, 2013).

A avaliação de risco preliminar dos agrotóxicos diuron e carbofuran mostrou RQs maiores do que 1, indicando que estes compostos apresentam riscos ecológicos potenciais para os corpos d'água no Brasil. Neste estudo, utilizando a espécie mais sensível ou qualquer um dos organismos-teste estudados, todos indicaram o potencial risco destes agrotóxicos aos ecossistemas aquáticos. Para as espécies mais sensíveis ao diuron e carbofuran, altos valores de RQ foram observados (Tabela 4). Papadakis et al. (2015), utilizando a abordagem do quociente de risco, verificaram que os inseticidas clorpirifós, diazinon e metil paration apresentaram elevados valores de RQs principalmente devido à sua alta toxicidade para invertebrados aquáticos e peixes, enquanto o herbicida prometrina mostrou alto valor devido à sua toxicidade para as algas.

Alguns estudos também evidenciaram os riscos ecológicos destes agrotóxicos para os ambientes aquáticos. DeLorenzo e Fulton (2012), ao avaliar o risco ecológico de ambientes estuarinos ao diuron, verificaram que todas as espécies de algas tiveram quocientes de risco maior do que 1, indicando que um efeito tóxico é de provável ocorrência. Chelinho et al. (2012), ao realizar uma avaliação de risco integrada de carbofuran, relataram que este inseticida nas doses recomendadas representa um risco severo para os ecossistemas aquáticos tropicais. Além disso, estes pesquisadores ressaltaram que aplicações intensivas e/ou excessivas deste agrotóxico, acoplado à alta precipitação que ocorre nos trópicos, podem amplificar o risco.

Muitas fontes de incerteza na avaliação de risco podem afetar a estimativa do risco. Misturas de agrotóxicos representam uma forma de incerteza na avaliação de risco, pois as combinações de alguns contaminantes podem apresentar toxicidades aditivas (sem interações), porém alguns estudos mostraram efeitos sinérgicos (DeLorenzo e Serrano, 2006; Key et al., 2007), assim como determinadas misturas de diuron e carbofuran apresentadas nos capítulos anteriores (capítulos 1 e 4). Algumas opções para a avaliação do risco de misturas têm sido discutidas: (a) o uso de um fator de avaliação (AF) específico para mistura (*Mixture Assessment Factor* - MAF); (b) um cenário específico de avaliações de riscos cumulativos (Backhaus et al., 2010). No entanto, a implementação real dessas opções é atualmente dificultada pela falta de conhecimento. Neste estudo, optou-se pelo uso de AF na

avaliação de risco. Atualmente, são raros os estudos de avaliação de risco que consideraram a mistura de agrotóxicos (e.g. Backhaus e Faust, 2012; Chèvre et al., 2008; Laetz et al., 2009) e algumas propostas de avaliação de risco de misturas têm sido desenvolvidas (e.g. Backhaus et al., 2013). Para estudos futuros, faz-se necessário um enfoque maior em propostas e aplicação de avaliação de risco considerando as misturas com o intuito de ampliar o conhecimento e preencher as lacunas ainda existentes.

Segundo Brock et al. (2006), o interesse na avaliação de risco ecológico é contribuir para a gestão sustentável dos ambientes aquáticos. Um dos principais focos é a preservação do funcionamento normal dos ecossistemas aquáticos, além de manter a sua capacidade de auto-regulação sob uma variedade de condições ambientais no espaço e no tempo (Brock et al., 2006; Swift et al., 2004). Para uma melhor proteção dos corpos d'água brasileiros, é importante que as agências reguladoras reconheçam os riscos ecológicos destes agrotóxicos para a biota aquática. Do ponto de vista ético, o valor intrínseco de todas as espécies que habitam os ambientes de água doce na paisagem agrícola pode ser um motivo importante para protegê-los. Por outro lado, a partir de uma perspectiva econômica, os lucros dos agroecossistemas podem ser mais valorizados do que a conservação das populações de espécies vulneráveis nestes sistemas (Brock et al., 2006). Assim, acreditamos que os resultados do presente estudo possam auxiliar no reconhecimento dos riscos ambientais e contribuam para as decisões de gestão em relação à utilização agrícola destes agrotóxicos no Brasil.

5. Conclusões

Os resultados deste estudo evidenciaram que os agrotóxicos diuron e carbofuran representam riscos ecológicos potenciais para os corpos d'água brasileiros. O compartimento água foi o principal destino destes compostos, como demonstrado pelo modelo MacKay, o qual apresentou altas porcentagens de distribuição, sendo considerado, portanto, um compartimento com alto risco de contaminação. De acordo com as curvas de SSDs, as algas clorofíceas, como *R. subcapitata* e os crustáceos, como *C. silvestrii*, foram os organismos aquáticos mais sensíveis ao diuron e ao carbofuran, respectivamente. Os valores de HC₅ obtidos a partir das SSDs foram mais baixos do que as concentrações reais destes agrotóxicos encontradas nos corpos d'água brasileiros, demonstrando que as comunidades aquáticas mais sensíveis, como o fitoplâncton para o diuron, e o zooplâncton

para o carbofuran, podem ser afetadas por estes compostos, levando provavelmente a alterações na estrutura e prejuízos ao funcionamento normal do ecossistema aquático. A avaliação de risco preliminar realizada com base no quociente de risco (RQ) revelou que o diuron e o carbofuran representam riscos de causar efeitos tóxicos adversos sobre a biota aquática dos ecossistemas aquáticos brasileiros. De modo geral, os resultados do presente estudo fornecem informações importantes que apesar de preliminares, podem auxiliar na avaliação dos riscos ecológicos e contribuir para as decisões de gestão sobre o uso destes agrotóxicos no Brasil.

Referências Bibliográficas

AGROFIT. Sistema de agrotóxicos fitossanitários, 2015. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> (Acesso em 08/01/2016).

Aldenberg, T., Jaworska, J.S., 2000. Uncertainty of hazardous concentrations and fraction affected for normal species sensitivity distributions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46, 1-18.

Arzul, G., Quiniou, F., Carrie, C., 2006. In vitro test-based comparison of pesticide-induced sensitivity in marine and freshwater phytoplankton. *Toxicol. Mech. Methods* 16 (8), 431-437.

Ashauer, R., Caravatti, I., Hintermeister, A., Escher, B.I., 2010. Bioaccumulation kinetics of organic xenobiotic pollutants in the freshwater invertebrate *Gammarus pulex* modeled with prediction intervals. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 1625-1636.

Backhaus, T., Altenburger, R., Faust, M., Frein, D., Frische, T., Johansson, P., Kehre, A., Porsbring, T., 2013. Proposal for environmental mixture risk assessment in the context of the biocidal product authorization in the EU. *Environ. Sci. Europe* 25 (4), 1-9.

Backhaus, T., Blanck, H., Faust, M., 2010. Hazard and risk assessment of chemical mixtures under REACH: state of the art, gaps and options for improvement. Swedish chemicals agency, 75 p.

Backhaus, T., Faust, M., 2012. Predictive environmental risk assessment of chemical mixtures: a conceptual framework. *Environ. Sci. Technol.* 46 (5), 2564-2573.

Bailey, H., Digiorgio, C., Kroll, K., Miller, J., Hinton, D., Starrett, G., 1996. Development of procedures for identifying pesticide toxicity in ambient waters: carbofuran, diazinon, chlorpyrifos. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 837-845.

Bao, V.W., Leung, K.M., Qiu, J.W., Lam, M.H., 2011. Acute toxicities of five commonly used antifouling booster biocides to selected subtropical and cosmopolitan marine species. *Mar. Pollut. Bull.* 62 (5), 1147-1151.

Bonnet, J.L., Bonnemoy, F., Dusser, M., Bohatier, J., 2007. Assessment of the potential toxicity of herbicides and their degradation products to nontarget cells using two microorganisms, the bacteria *Vibrio fischeri* and the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *Environ. Toxicol.* 22, 78-91.

Bricheux, G., Bonnet, J., Bohatier, J., Morel, J., Desrosiers, N.M., 2013. Microcalorimetry: a powerful and original tool for tracking the toxicity of a xenobiotic on *Tetrahymena pyriformis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 98, 88-94.

Britto, F.B., Vasco, A.N.D., Pereira, A.P.S., Júnior, M., Vieira, A., Nogueira, L.C., 2012. Herbicides in the upper Poxim River, Sergipe, and the risk of contamination of water resources. *Revista Ciência Agronômica* 43, 390-398.

Brock, T.C.M., Arts, G.H.P., Maltby, L. Van den Brink, P.J., 2006. Aquatic risks of pesticides, ecological protection goals and common aims in European Union Legislation. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 2 (4), 20-46.

Brock, T.C.M., Lahr, J., Van den Brink, P.J., 2000. Ecological risks of pesticides in freshwater ecosystems. Part 1: Herbicides. *Alterra-Rapport*, Wageningen, The Netherlands.

Burns, M., Hanson, M.L., Prosser, R.S., Crossan, A.N., Kennedy, I.R., 2015. Growth Recovery of *Lemna gibba* and *Lemna minor* Following a 7-Day Exposure to the Herbicide Diuron. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 95 (2), 150-156.

Caldas, S., Primel, E., Zanella, R., 2011. Risk estimate of water contamination and occurrence of pesticide in the South of Brazil. In *Herbicides and environment*. Kortekamp, A. (Ed.), INTECH Open Access Publisher, 471-492.

Carbo, L., Souza, V., Dores, E.F., Ribeiro, M.L., 2008. Determination of pesticides multiresidues in shallow groundwater in a cotton-growing region of Mato Grosso, Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* 19 (6), 1111-1117.

Chelinho, S., Lopes, I., Natal-da-Luz, T., Domene, X., Tenorio Nunes, M.E., Espíndola, E.L., Ribeiro, R., Sousa, J.P., 2012. Integrated ecological risk assessment of pesticides in tropical ecosystems: A case study with carbofuran in Brazil. *Environ. Toxicol. Chem.* 31 (2), 437-445.

Chèvre, N., Edder, P., Ortelli, D., Tatti, E., Erkman, S., Rapin, F., 2008. Risk assessment of herbicide mixtures in a large European lake. *Environ. Toxicol.* 23 (2), 269-277.

Chèvre, N., Loepfe, C., Singer, H., Stamm, C., Fenner, K., Escher, B.I., 2006. Including mixtures in the determination of water quality criteria for herbicides in surface water. *Environ. Sci. Technol.* 40 (2), 426-435.

Cristale, J., Katsoyiannis, A., Sweetman, A.J., Jones, K.C., Lacorte, S., 2013. Occurrence and risk assessment of organophosphorus and brominated flame retardants in the River Aire (UK). *Environ. Pollut.* 179, 194-200.

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.

Dantas, A.D.B., Paschoalato, C.F., Martinez, M.S., Ballejo, R.R., Di Bernardo, L., 2011. Removal of diuron and hexazinone from Guarany Aquifer groundwater. *Braz. J. Chem. Eng.*, 28, 415-424.

DeLorenzo, M.E., Danese, L.E., Baird, T.D., 2013. Influence of increasing temperature and salinity on herbicide toxicity in estuarine phytoplankton. *Environ. Toxicol.* 28 (7), 35-371.

DeLorenzo, M.E., Fulton, M.H., 2012. Comparative risk assessment of permethrin, chlorothalonil, and diuron to coastal aquatic species. *Mar. Pollut. Bull.* 64 (7), 1291-1299.

DeLorenzo, M.E., Serrano, L., 2006. Mixture toxicity of the antifouling compound irgarol to the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*. *J. Environ. Sci. Health Part B* 41, 1349-1360.

Dores, E.F.G.C., Spadotto, C. A., Weber, O.L., Carbo, L., Vecchiato, A.B., Pinto, A.A., 2009. Environmental behaviour of metolachlor and diuron in a tropical soil in the central region of Brazil. *Water Air Soil Pollut.* 197, 175-183.

European Commission, 2006. Draft Assessment Report (DAR) - Public Version - Initial risk assessment provided by the Rapporteur Member State Belgium for the existing active substance carbofuran of the second stage of the review programme referred to in Article 8 (2) of Council Directive 91/414/EEC.

Ferracini, V.L, Pessoa, M.C.Y.P., Silva, A.S., Spadotto, C.A., 2001. Análise de risco de contaminação das águas subterrâneas e superficiais da região de Petrolina (PE) e Juazeiro (BA). *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente* 11, 1-16.

Fernández-Alba, A.R., Guil, M.H., López, G.D., Chisti, Y., 2002. Comparative evaluation of the effects of pesticides in acute toxicity luminescence bioassays. *Anal. Chim. Acta*, 451, 195-202.

FOCUS - Forum for the Co-ordination of Pesticide Fate Models and their Use, 2001. FOCUS Surface Water Scenarios in the EU Evaluation Process under 91/414/EEC. Report of the FOCUS Working Group on Surface Water Scenarios, EC Document Reference SANCO/4802/2001-rev.2. 245 p.

Funari, E., Bottoni, P., Giuliano, G., 1991. Groundwater contamination by herbicides. Measured and simulated runoff volumes and peak discharges for all storms used in calibration and verification of the 1990-93 rainfall-runoff model at basin 9, Perris Valley.

Processes and evaluation criteria. In: Richardson, M.L. (Ed.). Chemistry agriculture and environment. Cambridge, England: The Royal Society of Chemistry, 235-254.

Gao, P., Li, Z., Gibson, M., Gao, H., 2014. Ecological risk assessment of nonylphenol in coastal waters of China based on species sensitivity distribution model. *Chemosphere* 104, 113-119.

Gatidou, G., Stasinakis, A.S., Iatrou, E.I., 2015. Assessing single and joint toxicity of three phenylurea herbicides using *Lemna minor* and *Vibrio fischeri* bioassays. *Chemosphere* 119, 69-74.

Ginebreda, A., Muñoz, I., Alda, M. L., Brix, R., López-Doval, J., Barceló, D., 2010. Environmental risk assessment of pharmaceuticals in rivers: relationships between hazard indexes and aquatic macroinvertebrate diversity indexes in the Llobregat River (NE Spain). *Environ. Int.* 36 (2), 153-162.

Goss, D.W., 1992. Screening procedure for soils and pesticides for potential water quality impacts. *Weed Technol.* 6 (3), 701-708.

Grant, I.F., Egan, E.A., Alexander, M., 1983. Pesticides to control ostracods grazing on blue-green algae. *Soil Biol. Biochem.* 15 (2), 193-197.

Grützmacher, D.D., Grützmacher, A.D., Agostinetto, D., Loeck, A.E., Roman, R., Peixoto, S.C., Zanella, R., 2008. Monitoring of pesticides in two water sources in Southern Brazil. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 12 (6), 632-637.

Hernando, M.D., Fernández-Alba, A.R., Tauler, R., Barceló, D., 2005. Toxicity assays applied to wastewater treatment. *Talanta* 65 (2), 358-366.

Ibrahim, A.T.A., Harabawy, A.S., 2014. Sublethal toxicity of carbofuran on the African catfish *Clarias gariepinus*: Hormonal, enzymatic and antioxidant responses. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 106, 33-39.

Iesce, M.R., Della Greca, M., Cermola, F., Rubino, M., Isidori, M., Pascarella, L., 2006. Transformation and ecotoxicity of carbamic pesticides in water. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 13 (2), 105-109.

Iwai, C. B., Somparn, A., Noller, B., 2011. Using Zooplankton, *Moina Micrura Kurz* to Evaluate the Ecotoxicology of Pesticides Used in Paddy Fields of Thailand. INTECH Open Access Publisher.

Karlsson, J., Breitholtz, M., Eklund, B., 2006. A practical ranking system to compare toxicity of anti-fouling paints. *Mari. Pollut. Bull.* 52 (12), 1661-1667.

Key, P.B., Chung, K.W., Siewicki, T., Fulton, M.H., 2007. Toxicity of three pesticides individually and in mixture to larval grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 68, 272-277.

Knauert, S., Escher, B., Singer, H., Hollender, J., Knauer, K., 2008. Mixture toxicity of three photosystem II inhibitors (atrazine, isoproturon, and diuron) toward photosynthesis of freshwater phytoplankton studied in outdoor mesocosms. *Environ. Sci. Technol.* 42, 6424-6430.

Köhler, H.R., Triebkorn, R., 2013. Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? *Science* 341, 759-765.

Krieger-Liszakay, A., 2005. Singlet oxygen production in photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 56, 337-346.

Kumar, S., Thomas, A., Sahgal, A., Verma, A., Samuel, T., Pillai, M.K., 2004. Variations in the insecticide-resistance spectrum of *Anopheles stephensi* after selection with deltamethrin or a deltamethrin-piperonyl-butoxide combination. *Trop. Med. Parasitol.* 98 (8), 861-871.

Kwok, K.W., Leung, K.M., Lui, G.S., Chu, V.K., Lam, P.K., Morritt, D., Crane, M., 2007. Comparison of tropical and temperate freshwater animal species' acute sensitivities to chemicals: Implications for deriving safe extrapolation factors. *Integrated Environ Assess Manag* 3, 49-67.

Laetz, C.A., Baldwin, D.H., Collier, T.K., Hebert, V., Stark, J.D., 2009. The synergistic toxicity of pesticide mixtures: Implications for risk assessment and the conservation of endangered Pacific salmon. *Environ. Health Perspect.* 117 (3). 348-353.

Larras, F., Bouchez, A., Rimet, F., Montuelle, B., 2012. Using bioassays and species sensitivity distributions to assess herbicide toxicity towards benthic diatoms. *PloS One* 7 (8), e44458.

Lazhar, M., Hela, T., Moncef, B., Néji, A.A., 2012. Toxicity of three selected pesticides (alachlor, atrazine and diuron) to the marine fish (turbot *Psetta maxima*). *Afr. J. Biotechnol.* 11 (51), 11321-11328.

Lee, H.C., Lu, P.N., Huang, H.L., Chu, C., Li, H.P., Tsai, H.J., 2014. Zebrafish transgenic line huORFZ is an effective living bioindicator for detecting environmental toxicants. *PloS One* 9 (3), 149-160.

Loro, V.L., Murussi, C., Menezes, C., Leitemperger, J., Severo, E., Guerra, L., Guerra, L., Costa, M., Perazzo, G.X., Zanella, R., 2015. Spatial and temporal biomarkers responses of *Astyanax jacuhiensis* (Cope, 1894) (Characiformes: Characidae) from the middle rio Uruguai, Brazil. *Neotrop. Ichthyol.* 13 (3), 569-578.

Ma, J., Xu, L., Wang, S., Zheng, R., Jin, S., Huang, S., Huang, Y., 2002a. Toxicity of 40 herbicides to the green alga *Chlorella vulgaris*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 51 (2), 128-132.

Ma, J., Lin, F., Wang, S., Xu, L., 2003. Toxicity of 21 herbicides to the green alga *Scenedesmus quadricauda*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 71, 594-601.

Ma, J., Lu, N., Qin, W., Xu, R., Wang, Y., Chen, X., 2006. Differential responses of eight cyanobacterial and green algal species, to carbamate insecticides. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 63 (2), 268-274.

Mackay, D., 1991. *Multimedia environmental models: the fugacity approach*. Michigan: Lewis Publishers, 257 p.

Mackay, D., 2001. *Multimedia Environmental Models: The Fugacity Approach - Second Edition*, Lewis Publishers, Boca Raton, pp. 1-261.

Mackay, D., Paterson, S., 1985. A Model of the long-term fate of chemical spills, report EE-64, Environment Canada, Ottawa.

Maltby, L., Blake, N., Brock, T.C.M., Van den Brink, P.J., 2005. Insecticide species sensitivity distributions: Importance of test species selection and relevance to aquatic ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 379-288.

Marchesan, E., Sartori, G.M.S., Avila, L.A.D., Machado, S.L.D.O., Zanella, R., Primel, E.G., Macedo, V.V.R.M., Marchezan, M.G., 2010. Residues of pesticides in the water of the Depression Central Rivers in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Ciência Rural*, 40 (5), 1053-1059.

Masojídek, J., Souček, P., Máchová, J., Frolík, J., Klem, K., Malý, J., 2011. Detection of photosynthetic herbicides: Algal growth inhibition test vs. electrochemical photosystem II biosensor. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 117-122.

Moreira, R.A., Mansano, A.S., Rocha, O., 2015. The toxicity of carbofuran to the freshwater rotifer, *Philodina roseola*. *Ecotoxicology* 24 (3), 604-615.

Nebeker, A.V., Schuyttema, G.S., 1998. Chronic effects of the herbicide diuron on freshwater cladocerans, amphipods, midges, minnows, worms, and snails. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35 (3), 441-446.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development, 2011. *Manual for the assessment of chemicals - Chapter 4: Initial assessment of data*. Paris, France.

Palma, G., Sanchez, A., Olave, Y., Encina, F., Palma, R., Barra, R., 2004. Pesticide levels in surface waters in an agricultural forestry basin in Southern Chile. *Chemosphere* 57, 763-770.

Papadakis, E.N., Tsaboula, A., Kotopoulou, A., Kintzikoglou, K., Vryzas, Z., Papadopoulou-Mourkidou, E., 2015. Pesticides in the surface waters of Lake Vistonis Basin, Greece: Occurrence and environmental risk assessment. *Sci. Total Environ.* 536, 793-802.

Paschoalato, C., Dantas, A., Rosa, I., Faleiros, R., Bernardo, L.D., 2008. Use of activated carbon to remove the herbicides diuron and hexazinone from water. *Revista DAE* 179, 34-41.

Pessoa, P.C., Luchmann, K.H., Ribeiro, A.B., Veras, M.M., Correa, J.R.M.B., Nogueira, A.J., Bainy, A.C.D., Carvalho, P.S.M., 2011. Cholinesterase inhibition and behavioral toxicity of carbofuran on *Oreochromis niloticus* early life stages. *Aquat. Toxicol.* 105 (3), 312-320.

Pinheiro, A., Rosa, F.D.C., 2008. Classificação dos pesticidas usados na bacia hidrográfica do Itajaí (SC) quanto ao risco de degradação dos recursos hídricos. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 18, 45-58.

Plese, L.P.M., 2005. Utilização do conceito de fugacidade na previsão do comportamento ambiental do carbosulfan e do carbofuran na cultura do arroz irrigado. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 146 p.

Plese, L.P.M., Paraiba, L.C., Foloni, L.L., Trevizan, L.R.P., 2005. Kinetics of carbosulfan hydrolysis to carbofuran and the subsequent degradation of this last compound in irrigated rice fields. *Chemosphere* 60 (2), 149-156.

Plese, L.P.M., Silva, C.L., Foloni, L.L., 2009. Distribution of environmental compartments of herbicides used in the cotton, coffee and citrus cultures. *Planta Daninha* 27, 123-132.

Posthuma, L., Traas, T.P., De Zwart, D., Suter, G.W., 2002. Conceptual and technical outlook on Species Sensitivity Distributions in Posthuma, L., Suter, G. W. II Traas, T. P., eds, *Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology*. Lewis, Boca Raton, USA, 475-510.

Ribeiro, A.C.A., Dores, E.D.C., Amorim, R.S.S., Lourencetti, C., 2013. Pesticide residues in surface waters at the headwaters of São Lourenço River-MT, Brazil: validation of a method using solid-phase extraction and liquid chromatography. *Química Nova* 36 (2), 284-290.

Sánchez-Avila, J., Tauler, R., Lacorte, S., 2012. Organic micropollutants in coastal waters from NW Mediterranean Sea: sources distribution and potential risk. *Environ. Int.* 46, 50-62.

Silva, C.L., Foloni, L.L., Paraíba, L.C., Plese, L.P.M., 2007. Previsão ambiental da distribuição dos pesticidas aplicados na cultura do arroz. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente* 17, 75-86.

Silva, D.R.O.D., Avila, L.A.D., Agostinetto, D., Dal Magro, T., Oliveira, E.D., Zanella, R., Noldin, J.A., 2009. Pesticides monitoring in surface water of rice production areas in Southern Brazil. *Ciência Rural* 39 (9), 2383-2389.

Silva, L.C., 2015. A comunidade zooplancônica de rios amazônicos na área de influência da Usina Hidrelétrica de Santo Antônio do Madeira, RO: diferentes abordagens no monitoramento. Tese de doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, São Paulo, 335p.

Silva, J.M., Santos, J.R., 2007. Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos. *Oecologia Brasiliensis* 11 (4), 565-573.

Spadotto, C.A., Scorza, R.P.J., Dores, E.D.C., Gebler, L., Moraes, D.D.C., 2010. Fundamentos e aplicações da modelagem ambiental de agrotóxicos. Embrapa Monitoramento por Satélite. Documentos 78.

Sucahyo, D., van Straalen, N.M., Krave, A., van Gestel, C.A.M., 2008. Acute toxicity of pesticides to the tropical freshwater shrimp *Caridina laevis*. Ecotoxicol. Environ. Saf., 69, 421-427.

Swift, M.J., Izak, A.M.N., Van Noordwijk, M., 2004. Biodiversity and ecosystem services in agricultural landscapes - Are we asking the right questions? Agric. Ecosyst. Environ. 104,113-134.

Tarkowski, G.M., 2004. Carbofuran analysis of risks to endangered and threatened salmon and steelhead. U.S. Environmental Protection Agency Environmental Field Branch Office of Pesticide Programs.

USEPA - US Environmental Protection Agency, 1998. Guidelines for Ecological Risk Assessment. EPA/630/R-95/002F. Washington, DC.

Vaillant, M., Jouany, J.M., Devillers, J., 1995. A multicriteria estimation of the environmental risk of chemicals with the SIRIS method. Toxicol. Model. 1, 57-72.

Van Vlaardingen, P., Traas, T.P., Wintersen, A.M., Aldenberg, T., 2004. ETX 2.0. A program to calculate hazardous concentrations and fraction affected, based on normally distributed toxicity data. RIVM Report No. 601501028/2004. National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, the Netherlands.

Vryzas, Z., Vassiliou, G., Alexoudis, C., Papadopoulou-Mourkidou, E., 2009. Spatial and temporal distribution of pesticide residues in surface waters in northeastern Greece. Water Res. 43, 1-10.

Conclusões Finais

Com este estudo, as seguintes conclusões gerais puderam ser obtidas:

- A alga *R. subcapitata* foi um organismo-teste adequado para avaliar os efeitos dos agrotóxicos, principalmente o do herbicida, apresentando respostas quantificáveis em relação ao crescimento populacional, fisiologia (conteúdo de clorofila *a*) e morfologia (complexidade e tamanho celular) celular em baixas concentrações;
- O uso da citometria de fluxo foi uma ferramenta eficiente na avaliação das respostas da *R. subcapitata*, uma vez que permitiu uma contagem rápida e precisa do número de células algais e possibilitou a análise multiparamétrica das propriedades celulares;
- Apesar da simplicidade estrutural, o protozoário *P. caudatum* foi um organismo-teste adequado e sensível para avaliar a toxicidade dos agrotóxicos, exibindo um conjunto de respostas identificáveis em nível individual e populacional, podendo ser utilizado em estudos ecotoxicológicos;
- A espécie neotropical *C. silvestrii* apresentou alta sensibilidade aos agrotóxicos testados e evidenciou sua potencialidade como organismo-teste em estudos ecotoxicológicos nos ecossistemas aquáticos tropicais.
- Os testes de toxicidade com os ingredientes ativos nas suas formas padrão e comercial foram importantes, pois forneceram informações mais realistas sobre a toxicidade dos agrotóxicos e demonstraram que as diferentes respostas de toxicidade são espécie-específicas e composto-específicas.
- Os agrotóxicos diuron e carbofuran em mistura interagiram e causaram respostas tóxicas diferentes das previstas para os compostos individuais, evidenciando a importância dos estudos ecotoxicológicos com misturas;

- Os efeitos das misturas de diuron e carbofuran foram significativamente diferentes para os organismos-teste selecionados, indicando que os tipos de interação entre os compostos são espécie-específicos e dependem do parâmetro avaliado, não sendo possível extrapolar a conclusão sobre um organismo-teste para outros organismos;
- O uso de modelos matemáticos, como o MacKay e FOCUS, constituíram ferramentas importantes na avaliação de risco dos agrotóxicos, pois permitiram determinar a distribuição dos compostos nos compartimentos e prever suas concentrações na água após aplicação nas culturas agrícolas;
- A curva de distribuição da sensibilidade das espécies (SSD) forneceu uma melhor representação da sensibilidade para toda a biota aquática e permitiu uma avaliação prospectiva do cálculo da concentração perigosa para 5% das espécies;
- Ao comparar as concentrações reais encontradas nos corpos d'água brasileiros com os resultados dos testes de toxicidade aguda e crônica do presente estudo, foi possível concluir que os agrotóxicos, isolados ou em mistura, podem causar efeitos deletérios sobre o fitoplâncton, protozooplâncton e zooplâncton dos ambientes aquáticos;
- Os altos valores de quocientes de risco (RQs) indicaram que o diuron e o carbofuran representam riscos ecológicos potenciais para os corpos d'água brasileiros, o que sugere a implantação de medidas mais restritivas para o uso destes agrotóxicos no Brasil.

Considerações Finais

Em relação à primeira hipótese apresentada nesta tese, os resultados obtidos permitiram concluir que os agrotóxicos diuron e carbofuran (ingredientes ativos e formulações comerciais) causam efeitos deletérios aos organismos-teste selecionados (*R. subcapitata*, *P. caudatum* e *C. silvestrii*).

A partir dos resultados desta pesquisa verificou-se que estes agrotóxicos, principalmente o herbicida diuron, inibiram significativamente o crescimento populacional de *R. subcapitata* e causaram alterações fisiológicas e morfológicas nas células em baixas concentrações. Para o protozoário, estes compostos causaram uma diminuição significativa no crescimento populacional, no número de gerações e na biomassa de *P. caudatum* em concentrações relativamente baixas. Para o cladóceros *C. silvestrii*, o carbofuran causou imobilidade nos indivíduos e uma redução significativa na fertilidade das fêmeas em concentrações muito baixas, enquanto que, as concentrações subletais de diuron causaram efeitos horméticos sobre a fertilidade de *C. silvestrii*. De acordo com as concentrações reais encontradas nos corpos d'água brasileiros, os efeitos letais e subletais verificados neste estudo são passíveis de ocorrer nos ambientes aquáticos, evidenciando os riscos destes agrotóxicos sobre o fitoplâncton, protozooplâncton e zooplâncton.

Ao comparar a toxicidade dos ingredientes ativos nas suas formas padrão e comercial para os diferentes organismos-teste, os resultados não corroboraram a segunda hipótese. Neste estudo, verificou-se que a toxicidade das formulações comerciais foi maior, menor ou não apresentou diferença significativa em comparação com os seus ingredientes ativos padrões, sendo as respostas dependentes do composto e do organismo-teste testado. Assim, concluiu-se que a toxicidade do produto comercial pode causar diferentes respostas, tanto devido aos ingredientes “inertes” associados como pelas respostas de toxicidade serem espécie-específicas.

A terceira e quarta hipóteses, por sua vez, foram confirmadas. Os testes de toxicidade de misturas comprovaram que os efeitos das combinações de diuron e carbofuran sobre os organismos-teste são diferentes dos efeitos observados para a exposição isolada a cada agrotóxico, podendo ocorrer sinergismo, antagonismo ou interação dependente da proporção ou nível da dose. Como raramente os agrotóxicos ocorrem no ambiente como um único agente tóxico, recomendamos que seus efeitos sejam também avaliados em misturas. Além

disso, como nossos resultados confirmaram que mistura dos produtos comerciais causam efeitos tóxicos mais severos do que a dos ingredientes ativos padrões, recomendamos mais estudos utilizando as formulações comerciais, pois estes podem fornecer informações mais realistas sobre os tipos de interações que ocorrem em condições naturais.

Considerando o modo de ação específico dos agrotóxicos, ressaltamos que a seleção de um organismo-teste fotossintetizante e de um invertebrado artrópode neste estudo foi fundamental para o estudo ecotoxicológico do herbicida diuron e do inseticida carbofuran. Em uma avaliação de risco, a escolha de espécies mais sensíveis é recomendada para refinar a caracterização do risco dos contaminantes para os ecossistemas. A partir da representação das SSDs corroboramos a quinta hipótese, demonstrando a alta sensibilidade da alga *R. subcapitata* e do cladóceros *C. silvestrii* aos compostos diuron e carbofuran, respectivamente. Mediante os resultados obtidos com a espécie *C. silvestrii*, ressaltamos também a importância da utilização de espécies nativas para tornar ecologicamente relevante a avaliação de risco desses e de outros produtos tóxicos aos ecossistemas aquáticos tropicais.

Por meio da avaliação de risco preliminar realizada neste estudo, confirmamos a última hipótese desta tese, o qual revelou que o diuron e o carbofuran representam potenciais riscos ecológicos para os corpos d'água brasileiros. Nossos resultados, apesar de preliminares, fornecem informações importantes que podem contribuir para as decisões de gestão sobre o uso destes agrotóxicos no Brasil. É importante ressaltar a morosidade na reavaliação do princípio ativo carbofuran, que está sendo realizada pela ANVISA desde 2008 e ainda não foi concluída.

Para estudos futuros, sugerimos que os efeitos dos agrotóxicos diuron e carbofuran, isolados e em mistura, sobre comunidades planctônicas e suas implicações ecológicas nos ecossistemas aquáticos sejam avaliados em estudos experimentais *in situ*, como os mesocosmos (cenários mais complexos e realistas), os quais poderão fornecer informações necessárias para uma compreensão mais aprofundada dos efeitos dos mesmos e de suas interações com fatores ambientais.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Resultados Referentes ao Capítulo 1

Curva de crescimento da microalga

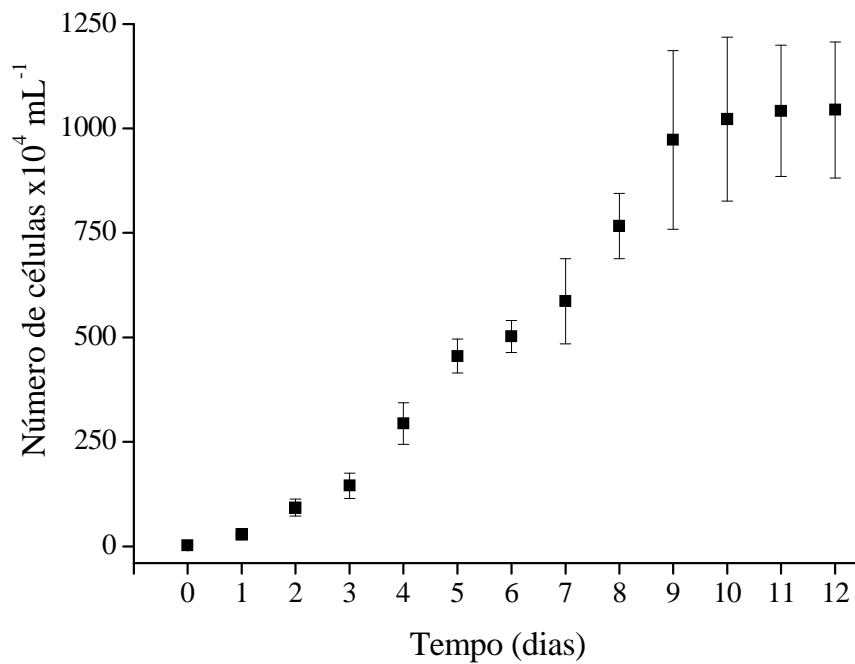


Figura 1. Crescimento populacional da microalga *Raphidocelis subcapitata* durante 12 dias de cultivo. Condições de cultivo: meio LC Oligo, iluminação contínua (4306 lux), temperatura controlada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e agitação manual três vezes ao dia. $n = 4$; média \pm desvio padrão.

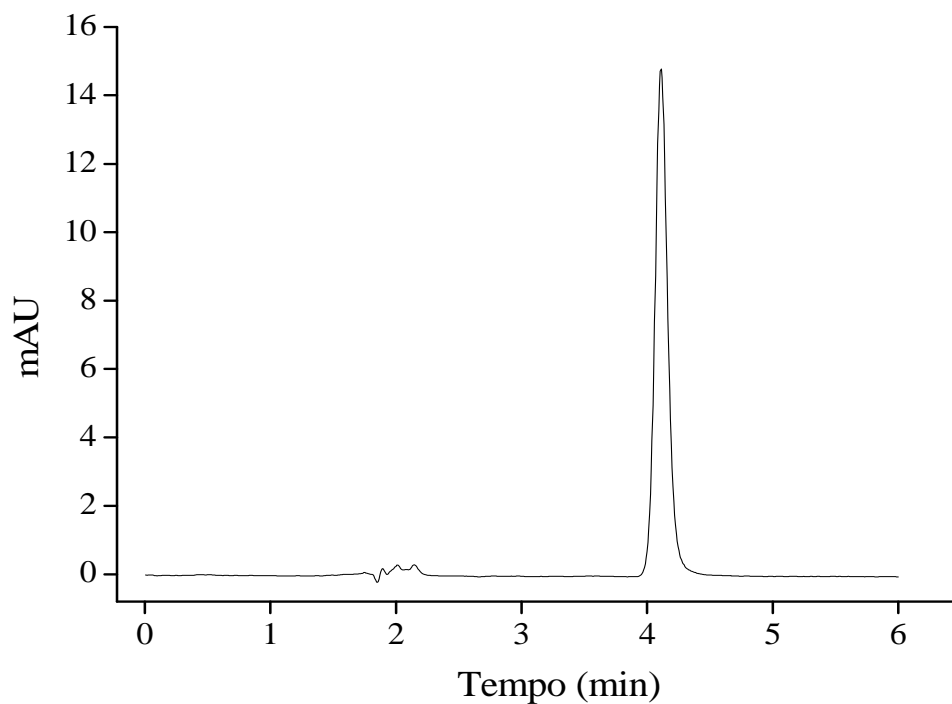
Análises Químicas

Figura 2. Cromatograma do composto diuron na concentração de 1 mg L^{-1} , analisado por HPLC-DAD (tempo de retenção = 4,111 min).

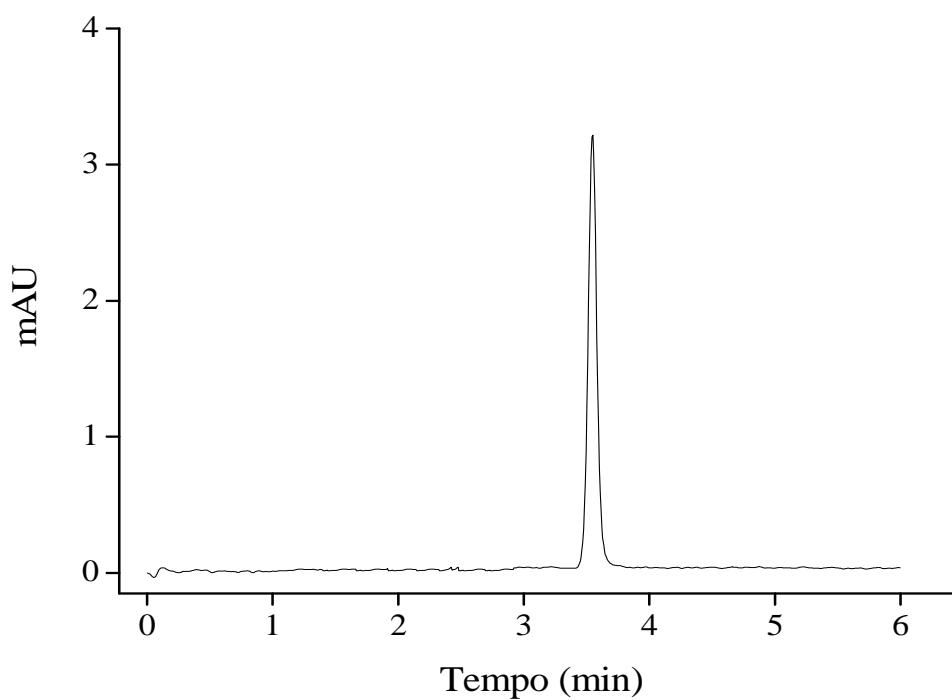


Figura 3. Cromatograma do composto carbofuran na concentração de 1 mg L^{-1} , analisado por HPLC-DAD (tempo de retenção = 3,548 min).

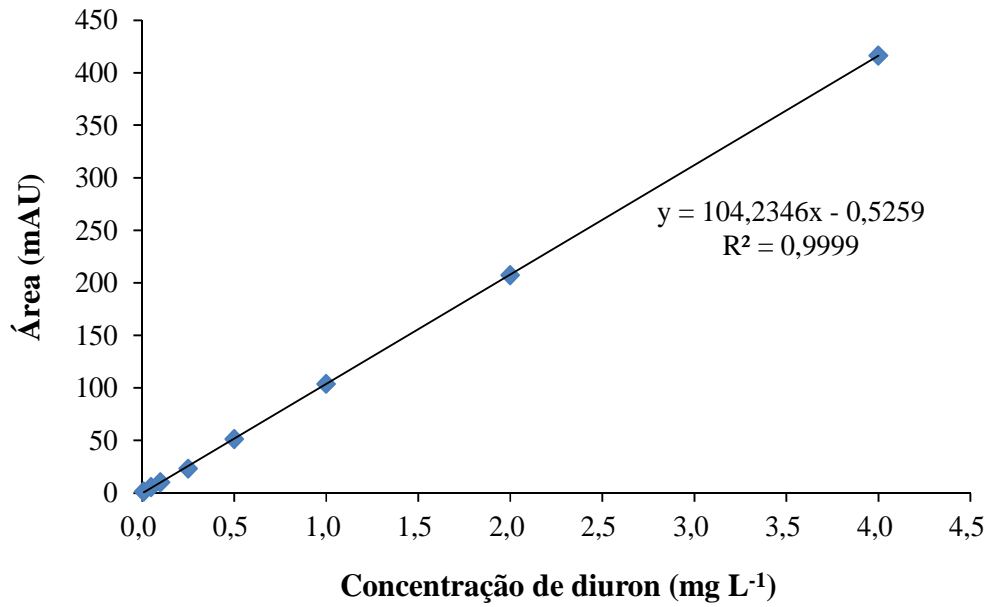


Figura 4. Curva analítica para o composto diuron (concentrações de 0,01 a 4,00 mg L⁻¹).

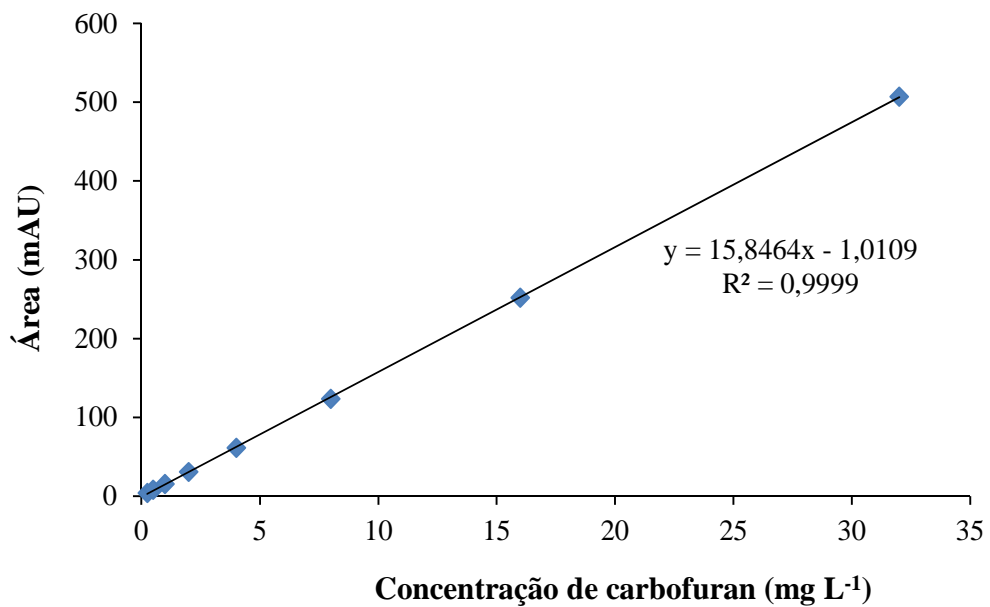


Figura 5. Curva analítica para o composto carbofuran (concentrações de 0,25 a 32,00 mg L⁻¹).

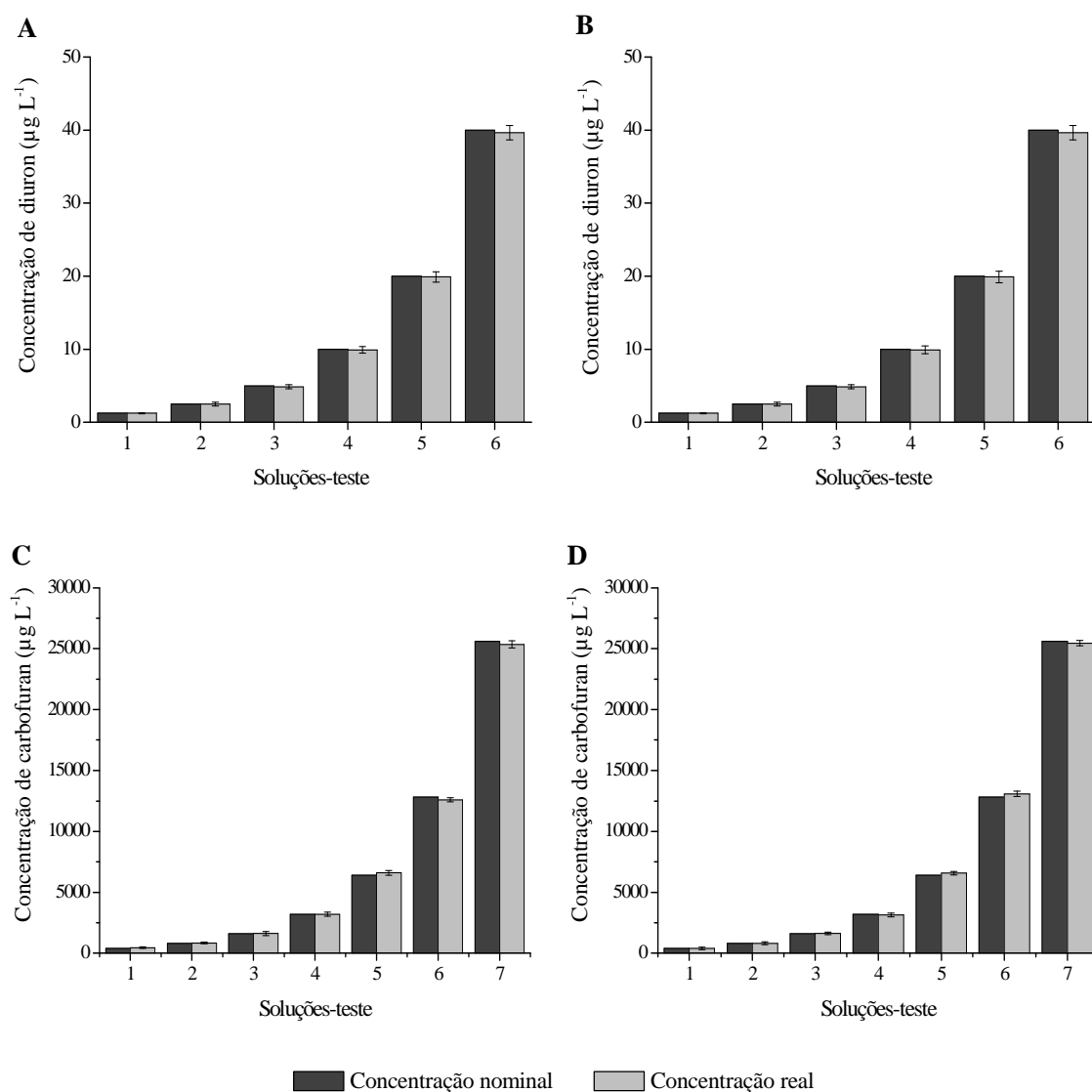


Figura 6. Concentrações nominais e reais dos compostos diuron e carbofuran nas soluções-teste utilizadas nos testes de toxicidade individuais. Em **A**, concentrações nominais de diuron padrão de 1 a 6, respectivamente: 1,25; 2,5; 5; 10; 20 e 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ e as concentrações reais de diuron. Em **B**, concentrações nominais de diuron do produto formulado de 1 a 6, respectivamente: 1,25; 2,5; 5; 10; 20 e 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ e as concentrações reais de diuron do produto comercial. Em **C**, concentrações nominais de carbofuran padrão de 1 a 7, respectivamente: 400, 800, 1600, 3200, 6400, 12800 e 25600 $\mu\text{g L}^{-1}$ e as concentrações reais de carbofuran. Em **D**, concentrações nominais de carbofuran do produto formulado de 1 a 7, respectivamente: 400, 800, 1600, 3200, 6400, 12800 e 25600 $\mu\text{g L}^{-1}$ e as concentrações reais de carbofuran do produto comercial.

Tabela 1. Concentrações nominais e reais de diuron e carbofuran nas soluções-teste das 23 combinações utilizadas no teste de toxicidade da mistura.

Combinações	Concentração nominal		Concentração real	
	Diuron ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Carbofuran ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Diuron ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Carbofuran ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	1,40	2270	1,33	2152
2	1,40	3400	1,35	3235
3	1,40	5670	1,34	5441
4	1,40	7940	1,36	7656
5	2,79	1130	2,65	1131
6	2,79	2270	2,68	2314
7	2,79	4540	2,75	4474
8	2,79	6800	2,74	6768
9	4,19	1130	4,14	1125
10	4,19	3400	4,23	3340
11	4,19	5670	4,19	5441
12	5,59	2270	5,59	2269
13	5,59	4540	5,60	4419
14	5,59	9070	5,60	8893
15	6,98	1130	7,06	1156
16	6,98	3400	7,16	3355
17	8,38	2270	8,58	2286
18	8,38	6800	8,51	6631
19	8,38	9070	8,38	8933
20	9,77	1130	9,69	1157
21	11,17	4540	11,10	4498
22	11,17	6800	10,99	6715
23	11,17	9070	11,07	8869

Tabela 2. Contagem da densidade de algas do teste de sensibilidade de *R. subcapitata* exposta ao cloreto de sódio (96 h) por citometria de fluxo e microscopia ótica.

Concentrações (g L^{-1})	Citometria de fluxo	Microscopia ótica
	Densidade ($\times 10^{-6}$ cel mL^{-1})	Densidade ($\times 10^{-6}$ cel mL^{-1})
0,0	$3,36 \pm 0,44$	$3,18 \pm 0,40$
0,5	$3,01 \pm 0,66$	$2,94 \pm 0,58$
2,0	$2,27 \pm 0,11$	$2,15 \pm 0,12$
3,5	$1,27 \pm 0,05$	$1,34 \pm 0,12$
5,0	$0,14 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,01$
6,5	$0,06 \pm 0,001$	$0,06 \pm 0,003$

APÊNDICE B – Resultados Referentes ao Capítulo 2

Análises químicas

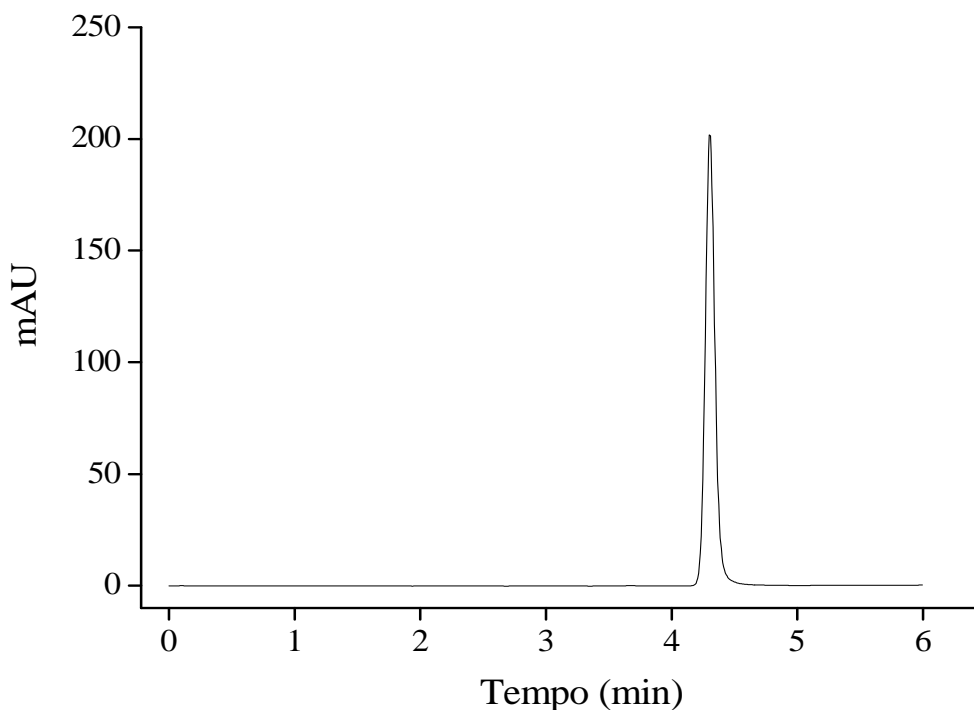


Figura 1. Cromatograma do composto diuron na concentração de 10 mg L^{-1} , analisado por HPLC-DAD (tempo de retenção = 4,296 min).

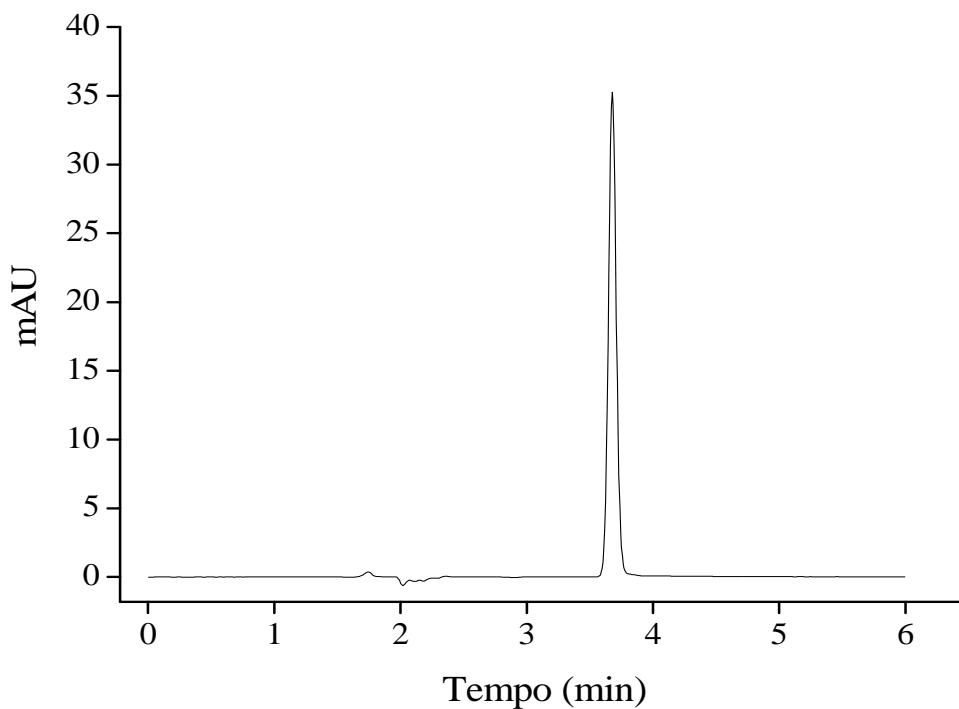


Figura 2. Cromatograma do composto carbofuran na concentração de 10 mg L^{-1} , analisado por HPLC-DAD (tempo de retenção = 3,678 min).

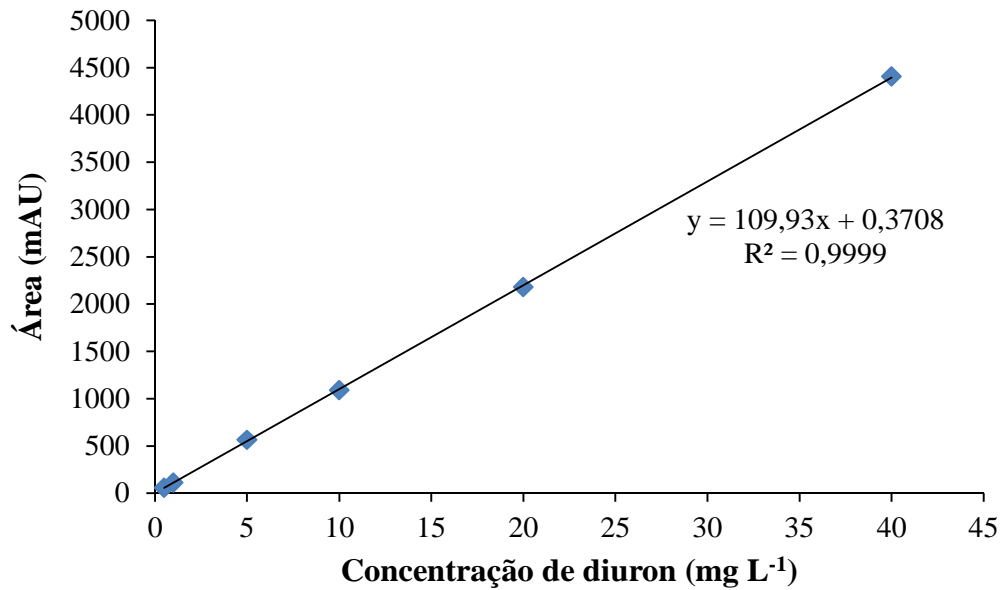


Figura 3. Curva analítica para o composto diuron (concentrações de 0,5 a 40,0 mg L⁻¹) utilizada para a quantificação das concentrações deste composto nas soluções-teste dos testes de toxicidade crônica.

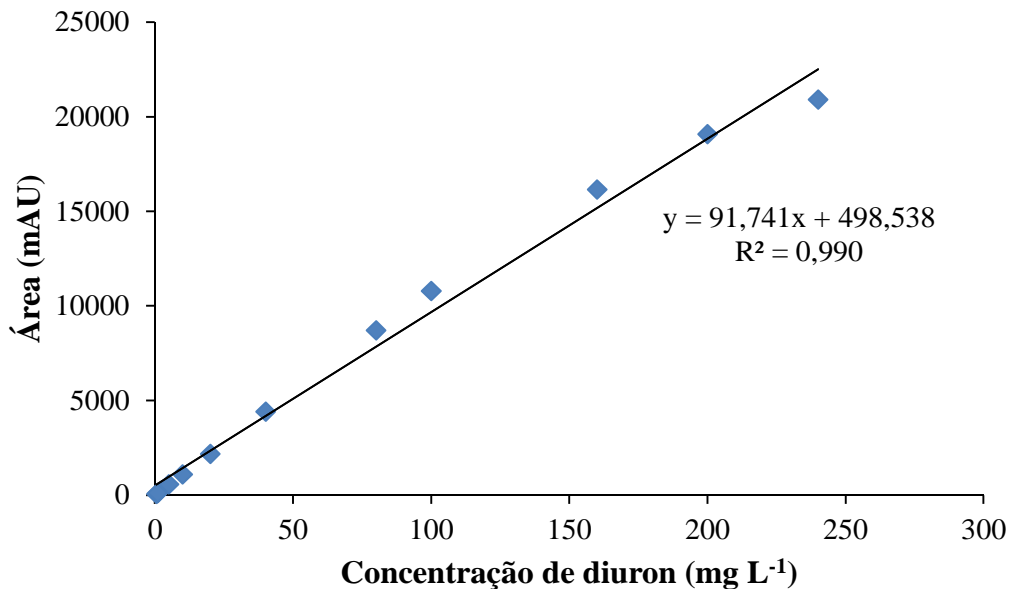


Figura 4. Curva analítica para o composto diuron (concentrações de 0,5 a 240,0 mg L⁻¹) utilizada para a quantificação das concentrações deste composto nas soluções-teste dos testes de toxicidade aguda.

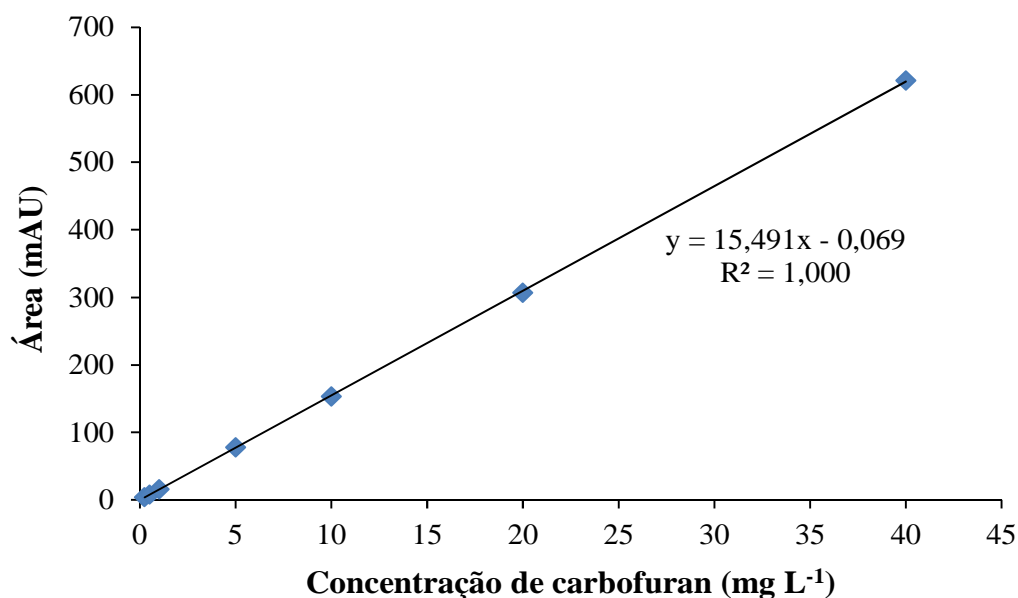


Figura 5. Curva analítica para o composto carbofuran (concentrações de 0,25 a 40,0 mg L⁻¹) utilizada para a quantificação das concentrações deste composto nas soluções-teste dos testes de toxicidade crônica.

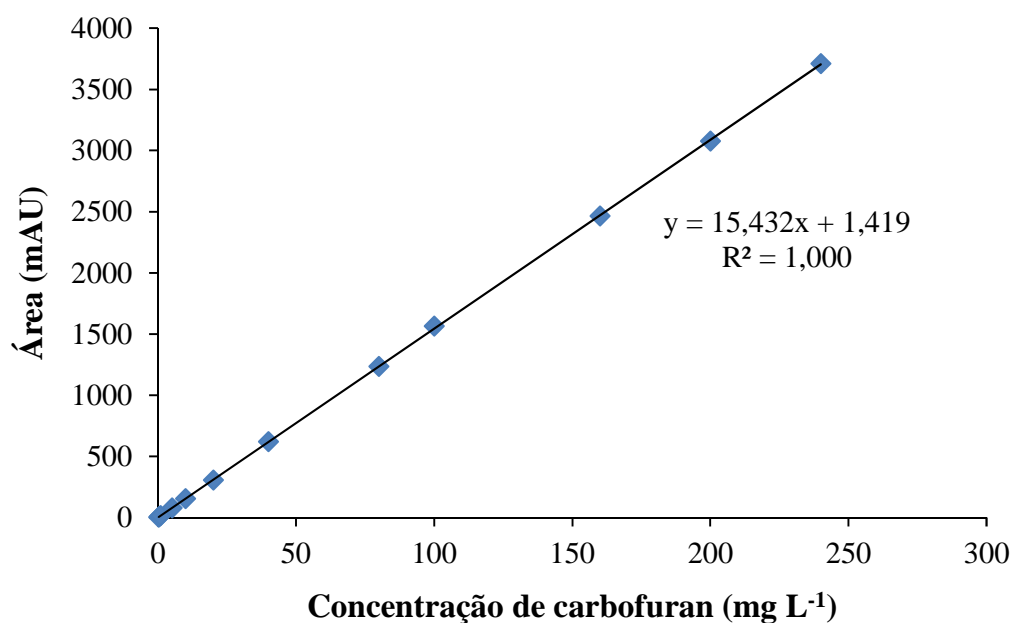


Figura 6. Curva analítica para o composto carbofuran (concentrações de 0,25 a 240,0 mg L⁻¹) utilizada para a quantificação das concentrações deste composto nas soluções-teste dos testes de toxicidade aguda.

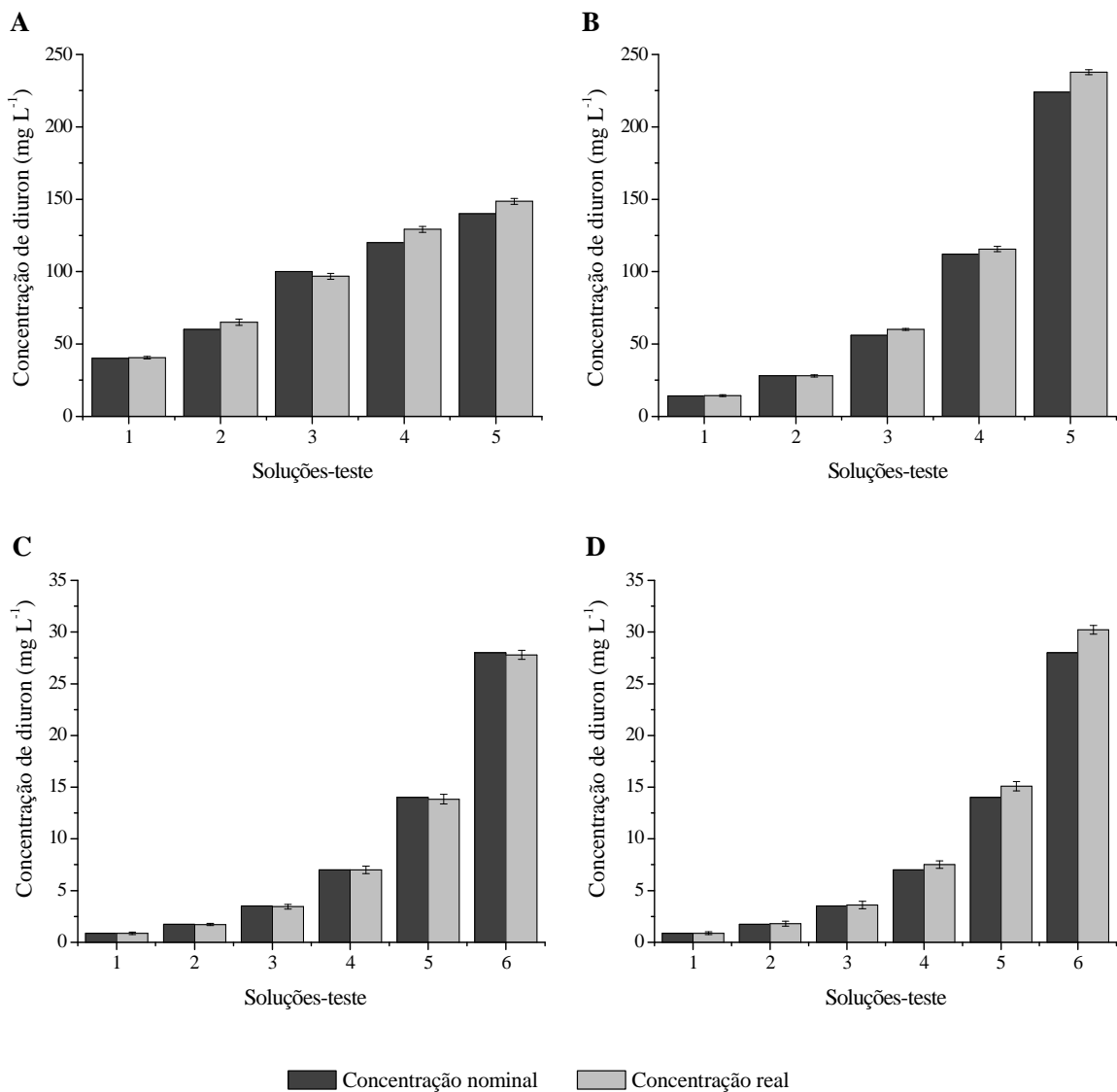


Figura 7. Concentrações nominais e reais de diuron nas soluções-teste utilizadas nos testes de toxicidade. Em **A**, concentrações nominais de diuron padrão de 1 a 5, respectivamente: 40, 60, 100, 120 e 140 mg L⁻¹ para os testes de toxicidade aguda e as concentrações reais de diuron. Em **B**, concentrações nominais de diuron do produto comercial de 1 a 5, respectivamente: 14, 28, 56, 112 e 224 mg L⁻¹ para os testes de toxicidade aguda e as concentrações reais de diuron. Em **C**, concentrações nominais de diuron padrão de 1 a 6, respectivamente: 0,88, 1,75, 3,5, 7,0, 14,0 e 28,0 mg L⁻¹ para os testes de toxicidade aguda e as concentrações reais de diuron. Em **D**, concentrações nominais de diuron do produto comercial de 1 a 6, respectivamente: 0,88, 1,75, 3,5, 7,0, 14,0 e 28,0 mg L⁻¹ para os testes de toxicidade aguda e as concentrações reais de diuron.

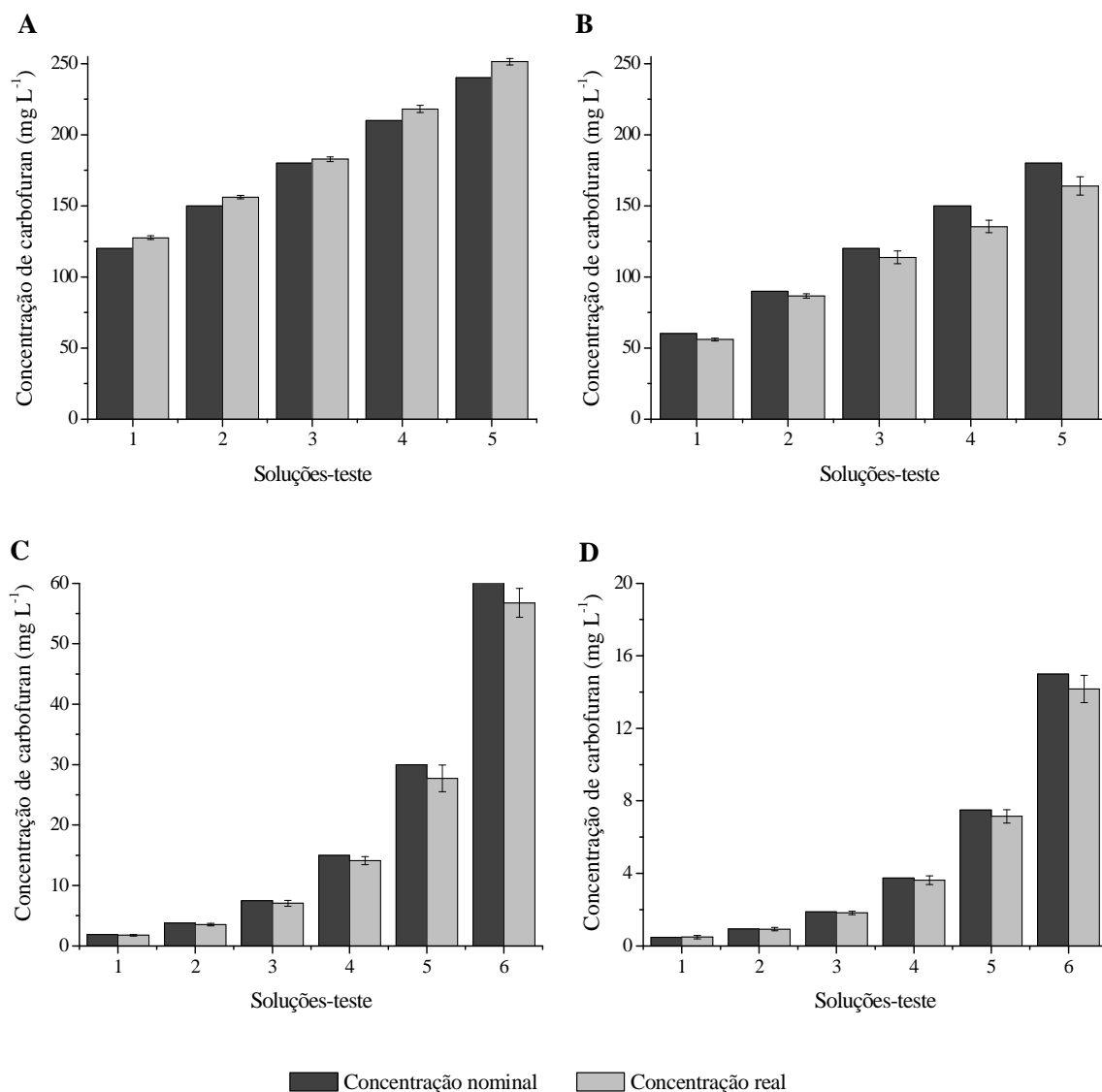


Figura. 8. Concentrações nominais e reais de carbofuran nas soluções-teste utilizadas nos testes de toxicidade. Em **A**, concentrações nominais de carbofuran padrão de 1 a 5, respectivamente: 120, 150, 180, 210 e 240 mg L⁻¹ para os testes de toxicidade aguda e as concentrações reais de carbofuran. Em **B**, concentrações nominais de carbofuran do produto comercial de 1 a 5, respectivamente: 60, 90, 120, 150 e 180 mg L⁻¹ para os testes de toxicidade aguda e as concentrações reais de carbofuran. Em **C**, concentrações nominais de carbofuran padrão de 1 a 6, respectivamente: 1,88, 3,75, 7,5, 15,0, 30,0 e 60,0 mg L⁻¹ para os testes de toxicidade crônica e as concentrações reais de carbofuran. Em **D**, concentrações nominais de carbofuran do produto comercial de 1 a 6, respectivamente: 0,47, 0,94, 1,88, 3,75, 7,5 e 15,0 mg L⁻¹ para os testes de toxicidade crônica e as concentrações reais de carbofuran.

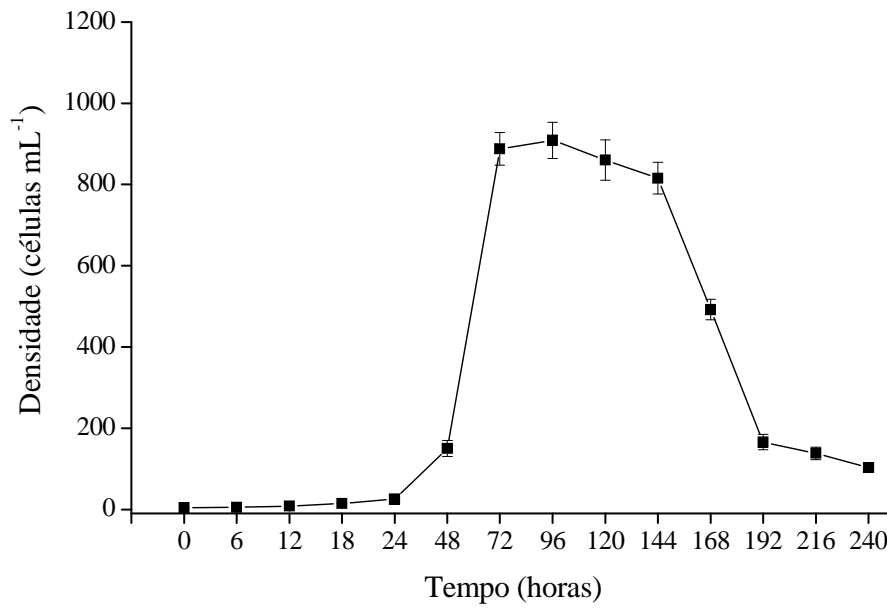
Curva de Crescimento

Figura 9. Crescimento populacional do protozoário *Paramecium caudatum* após 240 horas de cultivo. Condições de cultivo: água mineral Minalba[®] acrescida de bactérias *E. aerogenes*; temperatura controlada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$; fotoperíodo de 12 h luz: 12 h escuro e pH de 7,5-8,0. $n = 3$; média \pm desvio-padrão.

APÊNDICE C – Resultados Referentes ao Capítulo 3

Análises Químicas

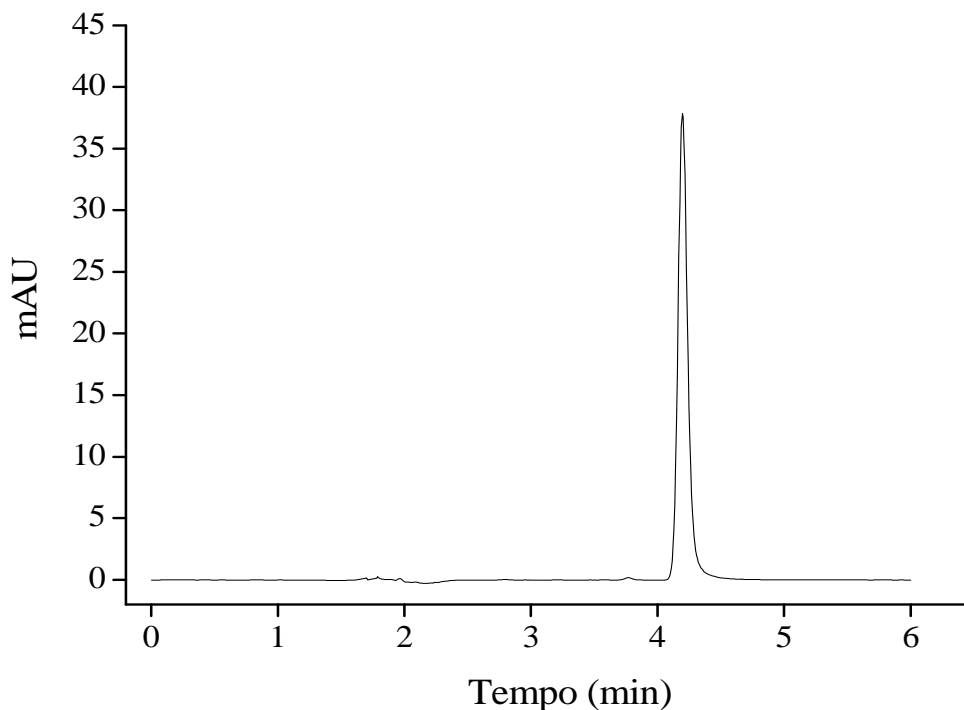


Figura 1. Cromatograma do composto diuron na concentração de 2 mg L^{-1} , analisado por HPLC-DAD (tempo de retenção = 4,198 min).

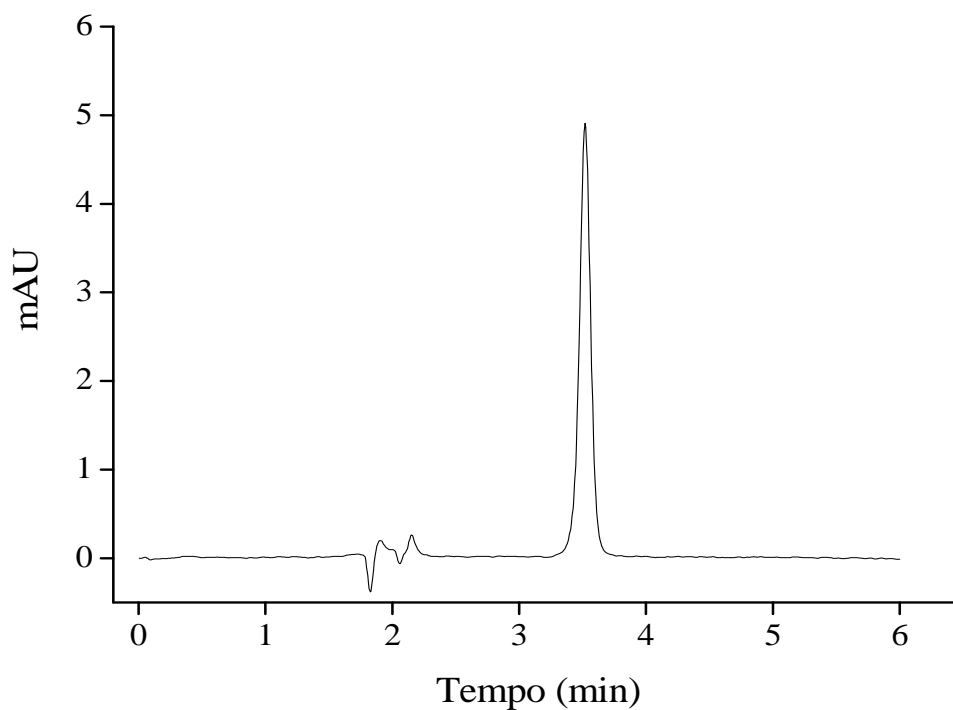


Figura 2. Cromatograma do composto carbofuran na concentração de 2 mg L^{-1} , analisado por HPLC-DAD (tempo de retenção = 3,520 min).

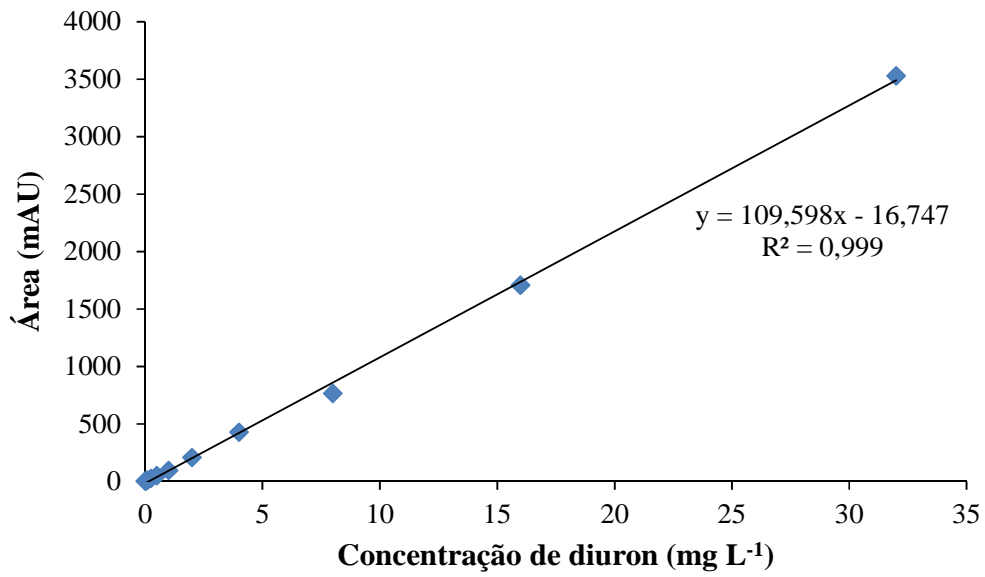


Figura 3. Curva analítica para o composto diuron (concentrações de 0,01 a 32,00 mg L⁻¹).

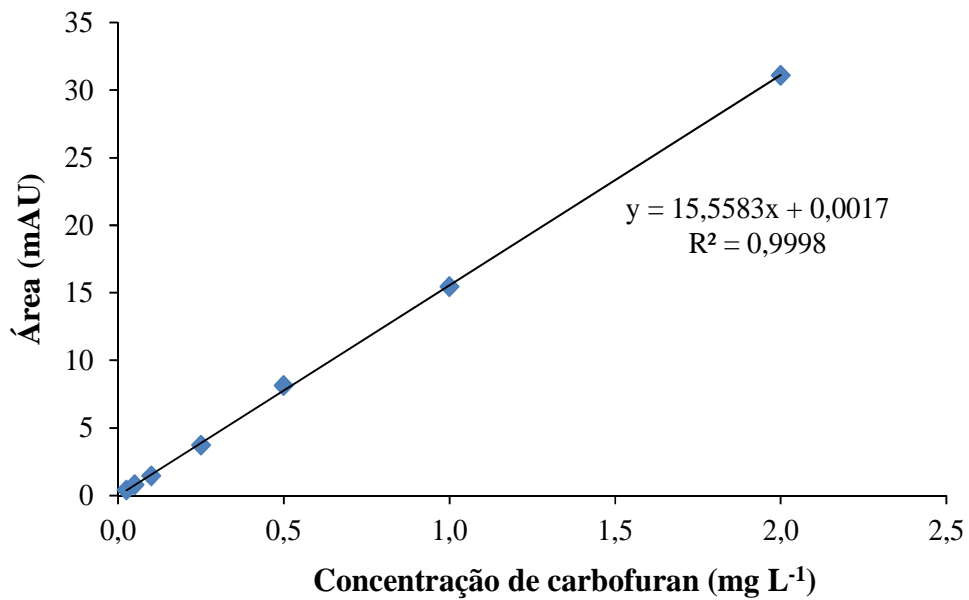


Figura 4. Curva analítica para o composto carbofuran (concentrações de 0,025 a 2,00 mg L⁻¹).

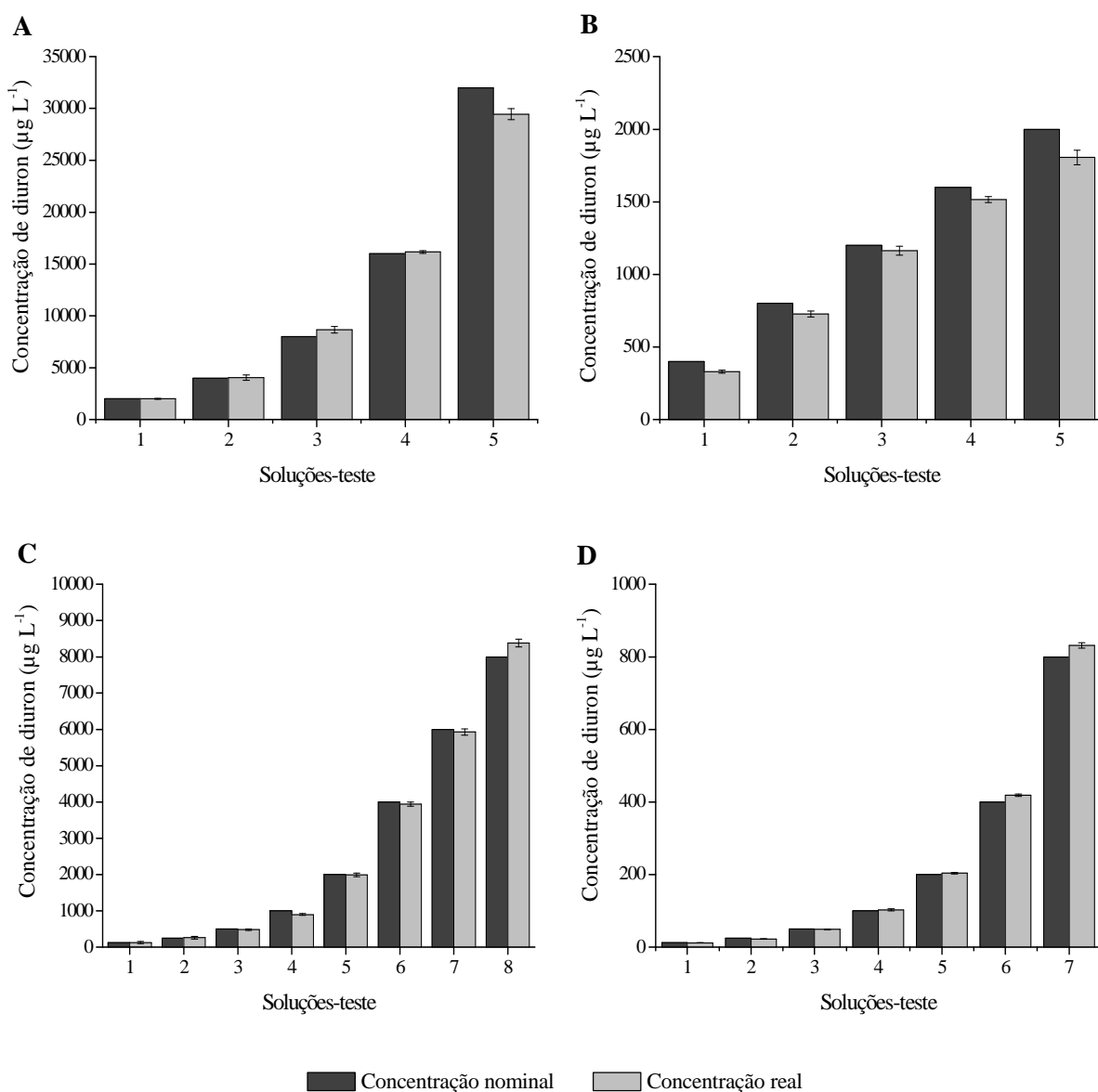


Figura 5. Concentrações nominais e reais de diuron nas soluções-teste utilizadas nos testes de toxicidade. Em **A**, concentrações nominais de diuron padrão de 1 a 5, respectivamente: 2000, 4000, 8000, 16000 e 32000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os testes de toxicidade aguda e as concentrações reais de diuron. Em **B**, concentrações nominais de diuron do produto comercial de 1 a 5, respectivamente: 400, 800, 1200, 1600 e 2000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os testes de toxicidade aguda e as concentrações reais de diuron. Em **C**, concentrações nominais de diuron padrão de 1 a 8, respectivamente: 125, 250, 500, 1000, 2000, 4000, 6000 e 8000 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os testes de toxicidade crônica e as concentrações reais de diuron. Em **D**, concentrações nominais de diuron do produto comercial de 1 a 7, respectivamente: 12,5, 25, 50, 100, 200, 400 e 800 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os testes de toxicidade crônica e as concentrações reais de diuron.

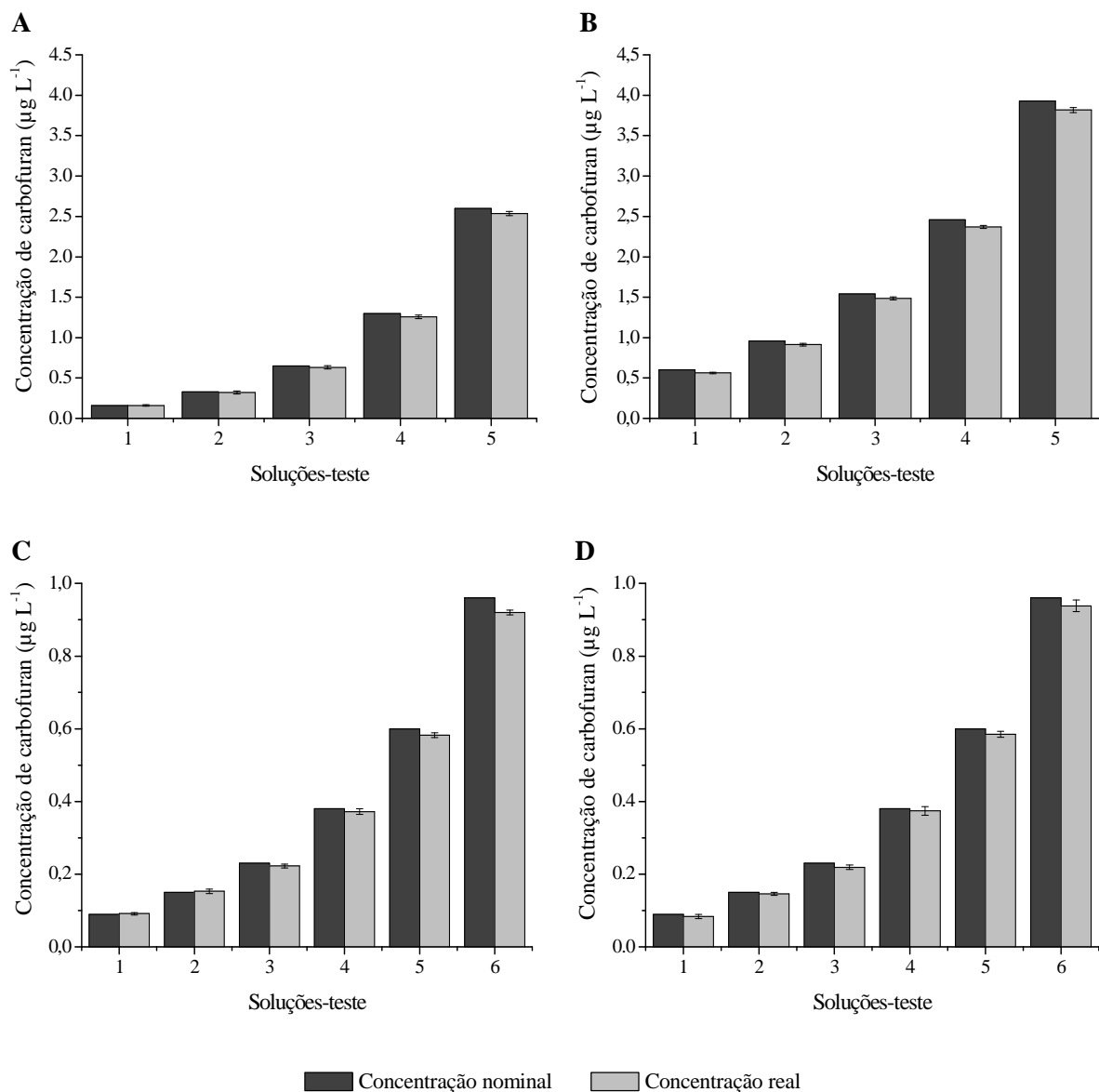


Figura 6. Concentrações nominais e reais de carbofuran nas soluções-teste utilizadas nos testes de toxicidade. Em **A**, concentrações nominais de carbofuran padrão de 1 a 5, respectivamente: 0,16, 0,33, 0,65, 1,3 e 2,6 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os testes de toxicidade aguda e as concentrações reais de carbofuran. Em **B**, concentrações nominais de carbofuran do produto comercial de 1 a 5, respectivamente: 0,60, 0,96, 1,54, 2,46 e 3,93 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os testes de toxicidade aguda e as concentrações reais de carbofuran. Em **C**, concentrações nominais de carbofuran padrão de 1 a 6, respectivamente: 0,09, 0,15, 0,23, 0,38, 0,60, 0,96 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os testes de toxicidade crônica e as concentrações reais de carbofuran. Em **D**, concentrações nominais de carbofuran do produto comercial de 1 a 6, respectivamente: 0,09, 0,15, 0,23, 0,38, 0,60, 0,96 $\mu\text{g L}^{-1}$ para os testes de toxicidade crônica e as concentrações reais de carbofuran.

Testes de sensibilidade

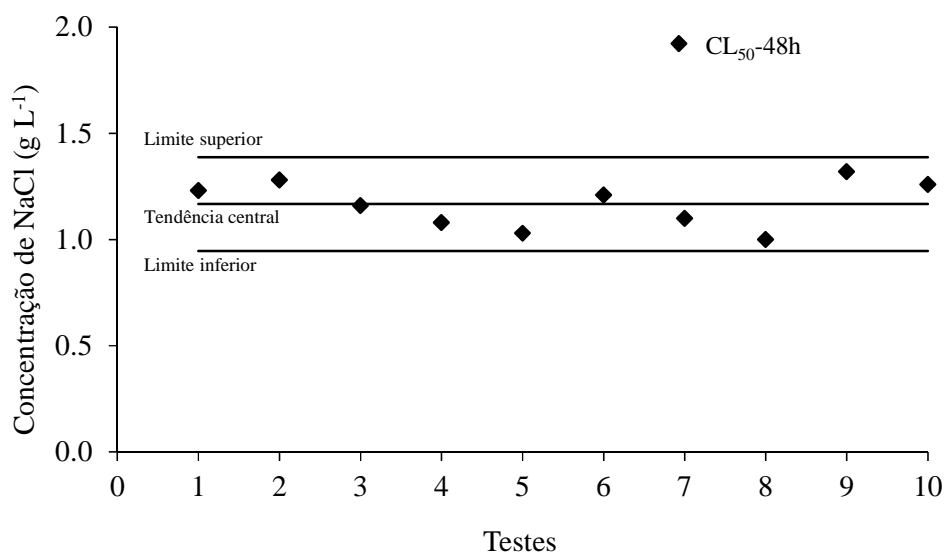


Figura 7. Faixa de sensibilidade de *C. silvestrii* (CE₅₀-48h) à substância de referência cloreto de sódio com base nos resultados de 10 testes de toxicidade aguda. Os limites superior e inferior correspondendo a intervalos de confiança de 95% foram 0,95 e 1,39 g L⁻¹, respectivamente.

APÊNDICE D – Resultados Referentes ao Capítulo 4

Análises químicas

Tabela 1. Concentrações nominais e reais de diuron e carbofuran nas soluções-teste das 25 combinações utilizadas no teste de toxicidade aguda da mistura dos agrotóxicos padrões realizado com *Paramecium caudatum*.

Combinações	Concentração nominal		Concentração real	
	Diuron (mg L ⁻¹)	Carbofuran (mg L ⁻¹)	Diuron (mg L ⁻¹)	Carbofuran (mg L ⁻¹)
1	40	120	40	117
2	40	150	41	152
3	40	180	41	184
4	40	210	41	197
5	40	240	41	227
6	60	120	63	116
7	60	150	63	152
8	60	180	63	183
9	60	210	63	195
10	60	240	62	229
11	100	120	102	128
12	100	150	106	152
13	100	180	107	190
14	100	210	105	192
15	100	240	104	233
16	120	120	130	127
17	120	150	128	155
18	120	180	128	186
19	120	210	126	211
20	120	240	125	234
21	140	120	147	124
22	140	150	149	152
23	140	180	147	184
24	140	210	149	210
25	140	240	148	240

Tabela 2. Concentrações nominais e reais de diuron e carbofuran nas soluções-teste das 25 combinações utilizadas no teste de toxicidade aguda da mistura dos agrotóxicos comerciais realizado com *Paramecium caudatum*.

Combinações	Concentração nominal		Concentração real	
	Diuron (mg L ⁻¹)	Carbofuran (mg L ⁻¹)	Diuron (mg L ⁻¹)	Carbofuran (mg L ⁻¹)
1	14	60	13	57
2	14	90	14	90
3	14	120	14	119
4	14	150	14	151
5	14	180	14	181
6	28	60	27	61
7	28	90	27	91
8	28	120	28	120
9	28	150	28	151
10	28	180	28	183
11	56	60	58	61
12	56	90	58	90
13	56	120	58	120
14	56	150	58	152
15	56	180	58	182
16	112	60	115	60
17	112	90	115	90
18	112	120	115	121
19	112	150	115	152
20	112	180	115	183
21	224	60	217	62
22	224	90	221	94
23	224	120	222	126
24	224	150	220	157
25	224	180	223	188

Tabela 3. Concentrações nominais e reais de diuron e carbofuran nas soluções-teste das 23 combinações utilizadas no teste de toxicidade crônica da mistura dos agrotóxicos padrões realizado com *Paramecium caudatum*.

Combinações	Concentração nominal		Concentração real	
	Diuron (mg L ⁻¹)	Carbofuran (mg L ⁻¹)	Diuron (mg L ⁻¹)	Carbofuran (mg L ⁻¹)
1	0,89	5,74	0,83	5,62
2	0,89	8,61	0,82	8,43
3	0,89	14,34	0,83	14,17
4	0,89	20,08	0,83	19,96
5	1,78	2,87	1,70	2,99
6	1,78	5,74	1,70	5,79
7	1,78	11,48	1,71	11,52
8	1,78	17,21	1,72	17,46
9	2,66	2,87	2,69	2,99
10	2,66	8,61	2,69	8,98
11	2,66	14,34	2,72	14,58
12	3,55	5,74	3,59	5,99
13	3,55	11,48	3,55	11,90
14	3,55	22,95	3,53	23,40
15	4,44	2,87	4,64	3,12
16	4,44	8,61	4,66	9,26
17	5,33	5,74	5,61	5,99
18	5,33	17,21	5,60	18,25
19	5,33	22,95	5,58	24,25
20	6,21	2,87	6,56	2,98
21	7,10	11,48	7,22	12,37
22	7,10	17,21	7,25	18,39
23	7,10	22,95	7,25	24,57

Tabela 4. Concentrações nominais e reais de diuron e carbofuran nas soluções-teste das 23 combinações utilizadas no teste de toxicidade crônica da mistura dos agrotóxicos comerciais realizado com *Paramecium caudatum*.

Combinações	Concentração nominal		Concentração real	
	Diuron (mg L ⁻¹)	Carbofuran (mg L ⁻¹)	Diuron (mg L ⁻¹)	Carbofuran (mg L ⁻¹)
1	0,85	1,25	0,79	1,17
2	0,85	1,87	0,78	1,77
3	0,85	3,11	0,80	3,01
4	0,85	4,36	0,79	4,31
5	1,70	0,62	1,54	0,58
6	1,70	1,25	1,54	1,20
7	1,70	2,49	1,54	2,49
8	1,70	3,74	1,56	3,73
9	2,54	0,62	2,35	0,58
10	2,54	1,87	2,45	1,87
11	2,54	3,11	2,47	3,21
12	3,39	1,25	3,44	1,26
13	3,39	2,49	3,53	2,67
14	3,39	4,98	3,57	5,45
15	4,24	0,62	4,44	0,67
16	4,24	1,87	4,46	2,03
17	5,09	1,25	5,38	1,35
18	5,09	3,74	5,38	4,04
19	5,09	4,98	5,48	5,39
20	5,93	0,62	5,70	0,65
21	6,78	2,49	6,67	2,72
22	6,78	3,74	6,73	4,08
23	6,78	4,98	6,76	5,45

Tabela 5. Concentrações nominais e reais de diuron e carbofuran nas soluções-teste das 25 combinações utilizadas no teste de toxicidade aguda da mistura dos agrotóxicos padrões realizado com *Ceriodaphnia silvestrii*.

Combinações	Concentração nominal		Concentração real	
	Diuron (mg L ⁻¹)	Carbofuran (mg L ⁻¹)	Diuron (mg L ⁻¹)	Carbofuran (mg L ⁻¹)
1	2,00	0,16 x 10 ⁻³	2,04	0,16 x 10 ⁻³
2	2,00	0,33 x 10 ⁻³	2,04	0,34 x 10 ⁻³
3	2,00	0,65 x 10 ⁻³	2,07	0,66 x 10 ⁻³
4	2,00	1,30 x 10 ⁻³	2,07	1,32 x 10 ⁻³
5	2,00	2,60 x 10 ⁻³	2,06	2,69 x 10 ⁻³
6	4,00	0,16 x 10 ⁻³	3,94	0,16 x 10 ⁻³
7	4,00	0,33 x 10 ⁻³	3,98	0,33 x 10 ⁻³
8	4,00	0,65 x 10 ⁻³	4,00	0,67 x 10 ⁻³
9	4,00	1,30 x 10 ⁻³	3,95	1,32 x 10 ⁻³
10	4,00	2,60 x 10 ⁻³	3,96	2,67 x 10 ⁻³
11	8,00	0,16 x 10 ⁻³	7,95	0,16 x 10 ⁻³
12	8,00	0,33 x 10 ⁻³	8,05	0,32 x 10 ⁻³
13	8,00	0,65 x 10 ⁻³	7,97	0,65 x 10 ⁻³
14	8,00	1,30 x 10 ⁻³	7,97	1,29 x 10 ⁻³
15	8,00	2,60 x 10 ⁻³	7,74	2,66 x 10 ⁻³
16	16,00	0,16 x 10 ⁻³	15,54	0,16 x 10 ⁻³
17	16,00	0,33 x 10 ⁻³	15,50	0,33 x 10 ⁻³
18	16,00	0,65 x 10 ⁻³	15,44	0,65 x 10 ⁻³
19	16,00	1,30 x 10 ⁻³	15,61	1,28 x 10 ⁻³
20	16,00	2,6 x 10 ⁻³	15,30	2,65 x 10 ⁻³
21	32,00	0,16 x 10 ⁻³	30,74	0,16 x 10 ⁻³
22	32,00	0,33 x 10 ⁻³	31,05	0,32 x 10 ⁻³
23	32,00	0,65 x 10 ⁻³	31,14	0,67 x 10 ⁻³
24	32,00	1,30 x 10 ⁻³	31,34	1,33 x 10 ⁻³
25	32,00	2,60 x 10 ⁻³	31,09	2,67 x 10 ⁻³

Tabela 6. Concentrações nominais e reais de diuron e carbofuran nas soluções-teste das 25 combinações utilizadas no teste de toxicidade aguda da mistura dos agrotóxicos comerciais realizado com *Ceriodaphnia silvestrii*.

Combinações	Concentração nominal		Concentração real	
	Diuron (mg L ⁻¹)	Carbofuran (mg L ⁻¹)	Diuron (mg L ⁻¹)	Carbofuran (mg L ⁻¹)
1	0,40	0,60 x 10 ⁻³	0,43	0,63 x 10 ⁻³
2	0,40	0,96 x 10 ⁻³	0,42	1,02 x 10 ⁻³
3	0,40	1,54 x 10 ⁻³	0,42	1,55 x 10 ⁻³
4	0,40	2,46 x 10 ⁻³	0,42	2,70 x 10 ⁻³
5	0,40	3,93 x 10 ⁻³	0,39	4,16 x 10 ⁻³
6	0,80	0,60 x 10 ⁻³	0,81	0,62 x 10 ⁻³
7	0,80	0,96 x 10 ⁻³	0,82	0,97 x 10 ⁻³
8	0,80	1,54 x 10 ⁻³	0,82	1,63 x 10 ⁻³
9	0,80	2,46 x 10 ⁻³	0,82	2,54 x 10 ⁻³
10	0,80	3,93 x 10 ⁻³	0,80	4,14 x 10 ⁻³
11	1,20	0,60 x 10 ⁻³	1,21	0,62 x 10 ⁻³
12	1,20	0,96 x 10 ⁻³	1,21	0,91 x 10 ⁻³
13	1,20	1,54 x 10 ⁻³	1,20	1,54 x 10 ⁻³
14	1,20	2,46 x 10 ⁻³	1,21	2,55 x 10 ⁻³
15	1,20	3,93 x 10 ⁻³	1,21	4,10 x 10 ⁻³
16	1,60	0,60 x 10 ⁻³	1,65	0,59 x 10 ⁻³
17	1,60	0,96 x 10 ⁻³	1,67	0,96 x 10 ⁻³
18	1,60	1,54 x 10 ⁻³	1,64	1,57 x 10 ⁻³
19	1,60	2,46 x 10 ⁻³	1,65	2,54 x 10 ⁻³
20	1,60	3,93 x 10 ⁻³	1,65	4,08 x 10 ⁻³
21	2,00	0,60 x 10 ⁻³	2,08	0,57 x 10 ⁻³
22	2,00	0,96 x 10 ⁻³	2,09	0,90 x 10 ⁻³
23	2,00	1,54 x 10 ⁻³	2,07	1,52 x 10 ⁻³
24	2,00	2,46 x 10 ⁻³	2,08	2,53 x 10 ⁻³
25	2,00	3,93 x 10 ⁻³	2,07	4,09 x 10 ⁻³

Tabela 7. Concentrações nominais e reais de diuron e carbofuran nas soluções-teste das 23 combinações utilizadas no teste de toxicidade crônica da mistura dos agrotóxicos padrões realizado com *Ceriodaphnia silvestrii*.

Combinações	Concentração nominal		Concentração real	
	Diuron (mg L ⁻¹)	Carbofuran (mg L ⁻¹)	Diuron (mg L ⁻¹)	Carbofuran (mg L ⁻¹)
1	0,71	0,21 x 10 ⁻³	0,76	0,21 x 10 ⁻³
2	0,71	0,31 x 10 ⁻³	0,76	0,31 x 10 ⁻³
3	0,71	0,51 x 10 ⁻³	0,76	0,52 x 10 ⁻³
4	0,71	0,72 x 10 ⁻³	0,76	0,73 x 10 ⁻³
5	1,41	0,10 x 10 ⁻³	1,44	0,10 x 10 ⁻³
6	1,41	0,21 x 10 ⁻³	1,44	0,21 x 10 ⁻³
7	1,41	0,41 x 10 ⁻³	1,44	0,41 x 10 ⁻³
8	1,41	0,62 x 10 ⁻³	1,43	0,62 x 10 ⁻³
9	2,12	0,10 x 10 ⁻³	2,14	0,10 x 10 ⁻³
10	2,12	0,31 x 10 ⁻³	2,13	0,31 x 10 ⁻³
11	2,12	0,51 x 10 ⁻³	2,11	0,52 x 10 ⁻³
12	2,83	0,21 x 10 ⁻³	2,88	0,20 x 10 ⁻³
13	2,83	0,41 x 10 ⁻³	2,85	0,41 x 10 ⁻³
14	2,83	0,82 x 10 ⁻³	2,84	0,83 x 10 ⁻³
15	3,53	0,10 x 10 ⁻³	3,53	0,10 x 10 ⁻³
16	3,53	0,31 x 10 ⁻³	3,51	0,31 x 10 ⁻³
17	4,24	0,21 x 10 ⁻³	4,30	0,21 x 10 ⁻³
18	4,24	0,62 x 10 ⁻³	4,25	0,62 x 10 ⁻³
19	4,24	0,82 x 10 ⁻³	4,25	0,83 x 10 ⁻³
20	4,94	0,10 x 10 ⁻³	4,90	0,11 x 10 ⁻³
21	5,65	0,41 x 10 ⁻³	5,78	0,41 x 10 ⁻³
22	5,65	0,62 x 10 ⁻³	5,76	0,62 x 10 ⁻³
23	5,65	0,82 x 10 ⁻³	5,76	0,81 x 10 ⁻³

Tabela 8. Concentrações nominais e reais de diuron e carbofuran nas soluções-teste das 23 combinações utilizadas no teste de toxicidade crônica da mistura dos agrotóxicos comerciais realizado com *Ceriodaphnia silvestrii*.

Combinações	Concentração nominal		Concentração real	
	Diuron (mg L ⁻¹)	Carbofuran (mg L ⁻¹)	Diuron (mg L ⁻¹)	Carbofuran (mg L ⁻¹)
1	0,08	0,19 x 10 ⁻³	0,08	0,18 x 10 ⁻³
2	0,08	0,28 x 10 ⁻³	0,08	0,29 x 10 ⁻³
3	0,08	0,47 x 10 ⁻³	0,08	0,49 x 10 ⁻³
4	0,08	0,66 x 10 ⁻³	0,08	0,69 x 10 ⁻³
5	0,17	0,09 x 10 ⁻³	0,17	0,09 x 10 ⁻³
6	0,17	0,19 x 10 ⁻³	0,17	0,19 x 10 ⁻³
7	0,17	0,38 x 10 ⁻³	0,17	0,38 x 10 ⁻³
8	0,17	0,56 x 10 ⁻³	0,17	0,59 x 10 ⁻³
9	0,25	0,09 x 10 ⁻³	0,25	0,28 x 10 ⁻³
10	0,25	0,28 x 10 ⁻³	0,25	0,28 x 10 ⁻³
11	0,25	0,47 x 10 ⁻³	0,25	0,48 x 10 ⁻³
12	0,34	0,19 x 10 ⁻³	0,34	0,18 x 10 ⁻³
13	0,34	0,38 x 10 ⁻³	0,34	0,38 x 10 ⁻³
14	0,34	0,75 x 10 ⁻³	0,34	0,78 x 10 ⁻³
15	0,42	0,09 x 10 ⁻³	0,42	0,10 x 10 ⁻³
16	0,42	0,28 x 10 ⁻³	0,42	0,28 x 10 ⁻³
17	0,50	0,19 x 10 ⁻³	0,51	0,20 x 10 ⁻³
18	0,50	0,56 x 10 ⁻³	0,51	0,60 x 10 ⁻³
19	0,50	0,75 x 10 ⁻³	0,52	0,78 x 10 ⁻³
20	0,59	0,09 x 10 ⁻³	0,59	0,09 x 10 ⁻³
21	0,67	0,38 x 10 ⁻³	0,67	0,38 x 10 ⁻³
22	0,67	0,56 x 10 ⁻³	0,67	0,61 x 10 ⁻³
23	0,67	0,75 x 10 ⁻³	0,68	0,77 x 10 ⁻³

Testes de toxicidade das misturas

Tabela 9. Parâmetros e testes de ajuste dos modelos de referência obtidos na análise do teste de toxicidade aguda da mistura dos agrotóxicos diuron e carbofuran padrão para o protozoário *Paramecium caudatum*.

	Adição de Concentração				Ação Independente			
	CA	S/A	DR	DL	IA	S/A	DR	DL
max	1,00	0,93	0,88	0,93	1,00	1,00	1,00	1,00
β_{Diuron}	1,76	2,94	4,65	2,87	2,44	1,39	0,56	0,56
$\beta_{\text{Carbofuran}}$	7,20	9,28	10,14	9,26	10,26	3,23	2,88	2,88
CL ₅₀ para Diuron	97,78	96,37	93,66	96,37	74,06	21,43	21,48	21,48
CL ₅₀ para Carbofuran	170,03	172,61	182,73	172,61	165,10	88,90	88,93	88,93
a	-	0,88	-0,99	-0,40	-	1,65	0,24	-0,22
b _{DR/DL}	-	-	4,65	2,00	-	-	0,16	2,00
SS	80,73	67,02	42,72	86,21	73,57	392,30	294,99	302,72
r^2	0,61	0,67	0,79	0,58	0,64	-0,92	-0,44	-0,48
Teste χ^2 ou F	123,96	13,72	24,29	-19,19	131,13	-	-	-
df	-	1,00	1,00	1,00	-	-	-	-
$p(\chi^2 \text{ ou F})$	$7,60 \times 10^{-26}$	$2,13 \times 10^{-4}$	$8,28 \times 10^{-7}$	-	$2,23 \times 10^{-27}$	-	-	-

Tabela 10. Parâmetros e testes de ajuste dos modelos de referência obtidos na análise do teste de toxicidade aguda da mistura dos agrotóxicos diuron e carbofuran comerciais para o protozoário *Paramecium caudatum*.

	Adição de Concentração				Ação Independente			
	CA	S/A	DR	DL	IA	S/A	DR	DL
max	1,00	0,95	0,95	0,95	1,00	0,99	0,99	1,00
β_{Diuron}	1,66	3,22	3,22	3,21	2,51	2,51	2,51	2,23
$\beta_{\text{Carbofuran}}$	6,09	8,13	8,13	8,13	5,89	6,59	6,59	5,99
CL ₅₀ para Diuron	78,09	80,51	80,51	80,51	67,77	67,50	67,49	65,42
CL ₅₀ para Carbofuran	105,73	98,67	98,67	98,67	89,21	96,53	96,53	95,51
a	-	1,31	0,04	-0,10	-	-0,30	-0,31	1,06
b _{DR/DL}	-	-	0,02	2,00	-	-	0,01	1,87
SS	90,61	43,16	133,58	117,13	40,27	33,77	33,77	33,05
r^2	0,64	0,83	0,47	0,54	0,84	0,87	0,87	0,87
Teste χ^2 ou F	163,61	47,44	-90,42	-73,96	213,95	6,50	0,00	0,72
df	-	1,00	1,00	1,00	-	1,00	1,00	1,00
$p(\chi^2 \text{ ou F})$	$2,46 \times 10^{-34}$	$5,67 \times 10^{-12}$	-	-	$3,76 \times 10^{-45}$	0,01	1,00	0,40

Tabela 11. Parâmetros e testes de ajuste dos modelos de referência obtidos na análise do teste de toxicidade crônica da mistura dos agrotóxicos diuron e carbofuran padrão para o protozoário *Paramecium caudatum*.

	Adição de Concentração				Ação Independente			
	CA	S/A	DR	DL	IA	S/A	DR	DL
max	61,78	62,28	62,30	61,95	54,24	62,37	61,94	62,19
β_{Diuron}	0,90	0,89	0,89	0,91	1,25	0,83	0,86	0,90
$\beta_{\text{Carbofuran}}$	0,50	0,51	0,52	0,53	0,61	0,48	0,46	0,54
CI ₅₀ para Diuron	7,40	6,67	6,72	6,95	11,84	7,31	7,09	7,20
CI ₅₀ para Carbofuran	25,17	20,54	20,12	22,06	47,02	19,07	22,77	19,40
a	-	0,80	1,05	-0,002	-	1,69	0,86	-0,08
b _{DR/DL}	-	-	-0,45	209,74	-	-	1,48	35,02
SS	162,66	143,02	142,76	150,62	350,27	150,94	141,73	142,37
r^2	0,95	0,95	0,95	0,95	0,89	0,95	0,95	0,95
Teste χ^2 ou F	140,16	4,63	0,07	-1,86	60,93	30,31	2,27	2,10
df	-	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
$p(\chi^2 \text{ ou F})$	$2,21 \times 10^{-19}$	0,03	0,80	-	$3,03 \times 10^{-14}$	$3,69 \times 10^{-8}$	0,13	0,15

Tabela 12. Parâmetros e testes de ajuste dos modelos de referência obtidos na análise do teste de toxicidade crônica da mistura dos agrotóxicos diuron e carbofuran comerciais para o protozoário *Paramecium caudatum*.

	Adição de Concentração				Ação Independente			
	CA	S/A	DR	DL	IA	S/A	DR	DL
max	65,14	64,97	64,88	65,04	60,09	65,90	65,57	65,73
β_{Diuron}	0,73	0,73	0,72	0,71	0,82	0,68	0,65	0,73
$\beta_{\text{Carbofuran}}$	0,71	0,70	0,72	0,69	0,72	0,60	0,66	0,64
CI ₅₀ para Diuron	4,84	5,14	6,17	5,11	8,35	5,13	6,04	5,19
CI ₅₀ para Carbofuran	4,39	4,63	4,01	4,64	7,69	4,72	4,13	4,73
a	-	-0,34	1,95	0,03	-	1,20	2,20	-0,02
b _{DR/DL}	-	-	-5,01	12,05	-	-	-2,19	77,18
SS	331,98	327,64	277,05	324,88	419,04	268,59	241,17	275,53
r^2	0,92	0,92	0,93	0,92	0,89	0,93	0,94	0,93
Teste χ^2 ou F	83,45	0,47	6,51	0,78	64,50	16,01	3,88	-0,92
df	-	1,00	2,00	2,00	-	1,00	1,00	1,00
$p(\chi^2 \text{ ou F})$	$3,85 \times 10^{-16}$	0,492	0,039	0,678	$1,39 \times 10^{-14}$	$6,29 \times 10^{-5}$	0,049	-

Tabela 13. Parâmetros e testes de ajuste dos modelos de referência obtidos na análise do teste de toxicidade aguda da mistura dos agrotóxicos diuron e carbofuran padrão para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*.

	Adição de Concentração				Ação Independente			
	CA	S/A	DR	DL	IA	S/A	DR	DL
max	0,95	0,89	0,89	0,96	0,99	0,99	0,93	1,00
β_{Diuron}	2,73	2,99	2,82	2,01	3,50	2,76	3,16	1,92
$\beta_{\text{Carbofuran}}$	4,71	10,52	12,79	3,59	3,50	5,67	4,37	2,17
CE ₅₀ para Diuron	6,42	8,41	8,42	7,13	9,03	9,03	9,03	9,03
CE ₅₀ para Carbofuran	$0,88 \times 10^{-3}$	$1,24 \times 10^{-3}$	$1,25 \times 10^{-3}$	$0,99 \times 10^{-3}$	$1,05 \times 10^{-3}$	$0,93 \times 10^{-3}$	$0,98 \times 10^{-3}$	$1,01 \times 10^{-3}$
a	-	-1,31	-0,62	1,93	-	-6,36	-6,55	0,79
b _{DR/DL}	-	-	-1,43	1,56	-	-	0,70	19,99
SS	27,16	21,88	21,17	17,86	205,40	38,60	20,83	27,31
r ²	0,93	0,94	0,94	0,95	0,46	0,90	0,94	0,93
Teste χ^2 ou F	351,11	5,28	0,71	4,02	172,86	166,81	17,77	11,29
df	-	1,00	1,00	1,00	-	1,00	1,00	1,00
p(χ^2 ou F)	$1,01 \times 10^{-74}$	0,021	0,398	0,045	$2,54 \times 10^{-36}$	$3,69 \times 10^{-38}$	$2,49 \times 10^{-5}$	$78,11 \times 10^{-5}$

Tabela 14. Parâmetros e testes de ajuste dos modelos de referência obtidos na análise do teste de toxicidade aguda da mistura dos agrotóxicos diuron e carbofuran comerciais para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*.

	Adição de Concentração				Ação Independente			
	CA	S/A	DR	DL	IA	S/A	DR	DL
max	1,27	0,94	0,98	0,99	1,06	4,44	3,90	4,30
β_{Diuron}	1,16	4,50	5,18	4,48	2,37	0,66	0,63	0,63
$\beta_{\text{Carbofuran}}$	3,27	4,84	4,35	4,82	4,68	4,01	4,01	4,01
CE ₅₀ para Diuron	1,16	1,20	1,20	1,20	1,16	0,05	0,05	0,05
CE ₅₀ para Carbofuran	$0,89 \times 10^{-3}$	$1,00 \times 10^{-3}$	$0,78 \times 10^{-3}$	$1,20 \times 10^{-3}$	$1,14 \times 10^{-3}$	$0,66 \times 10^{-3}$	$0,71 \times 10^{-3}$	$0,71 \times 10^{-3}$
a	-	2,44	0,96	-0,18	-	4,24	0,003	-0,003
b _{DR/DL}	-	-	3617,00	2,00	-	-	0,003	2,00
SS	88,96	45,56	73,28	127,64	50,78	16,72	77,12	120,38
r ²	0,74	0,87	0,78	0,62	0,85	0,95	0,77	0,64
Teste χ^2 ou F	249,91	43,40	-27,72	-82,08	288,10	34,05	-60,40	-103,66
df	-	1,00	1,00	1,00	-	1,00	1,00	1,00
p(χ^2 ou F)	$6,79 \times 10^{-53}$	$4,46 \times 10^{-11}$	-	-	$3,99 \times 10^{-61}$	$5,36 \times 10^{-9}$	-	-

Tabela 15. Parâmetros e testes de ajuste dos modelos de referência obtidos na análise do teste de toxicidade crônica da mistura dos agrotóxicos diuron e carbofuran padrão para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*.

	Adição de Concentração				Ação Independente			
	CA	S/A	DR	DL	IA	S/A	DR	DL
max	16,63	16,52	16,53	16,33	16,24	16,41	16,37	16,46
β_{Diuron}	4,46	3,74	3,97	4,40	3,78	3,43	3,62	3,50
$\beta_{\text{Carbofuran}}$	0,98	1,41	1,43	1,82	1,49	1,41	1,45	1,66
CE ₅₀ para Diuron	6,92	6,43	6,51	6,54	6,64	6,53	6,60	6,43
CE ₅₀ para Carbofuran	$1,56 \times 10^{-3}$	$0,86 \times 10^{-3}$	$0,81 \times 10^{-3}$	$0,85 \times 10^{-3}$	$0,92 \times 10^{-3}$	$0,86 \times 10^{-3}$	$0,83 \times 10^{-3}$	$0,82 \times 10^{-3}$
a	-	1,56	2,29	-0,01	-	0,47	0,95	-0,56
b _{DR/DL}	-	-	-1,30	109,75	-	-	-1,10	3,83
SS	47,68	21,44	20,80	23,09	24,52	23,45	23,21	21,85
r ²	0,87	0,94	0,94	0,94	0,93	0,94	0,94	0,94
Teste χ^2 ou F	51,31	27,97	1,06	-2,59	106,84	1,56	0,37	2,49
df	-	1,00	1,00	1,00	-	1,00	1,00	1,00
p(χ^2 ou F)	$5,40 \times 10^{-13}$	$1,23 \times 10^{-7}$	0,30	-	$2,69 \times 10^{-17}$	0,21	0,55	0,11

Tabela 16. Parâmetros e testes de ajuste dos modelos de referência obtidos na análise do teste de toxicidade crônica da mistura dos agrotóxicos diuron e carbofuran comerciais para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*.

	Adição de Concentração				Ação Independente			
	CA	S/A	DR	DL	IA	S/A	DR	DL
max	16,57	16,60	16,47	16,52	15,38	16,98	16,44	16,69
β_{Diuron}	1,27	1,32	1,42	1,33	1,10	0,71	0,96	1,29
$\beta_{\text{Carbofuran}}$	0,26	0,29	0,22	0,56	0,38	0,34	0,27	0,76
CE ₅₀ para Diuron	0,78	0,74	0,70	0,74	1,60	1,26	1,05	0,74
CE ₅₀ para Carbofuran	$1,36 \times 10^{-3}$	$1,02 \times 10^{-3}$	$2,32 \times 10^{-3}$	$0,78 \times 10^{-3}$	$2,30 \times 10^{-3}$	$0,87 \times 10^{-3}$	$1,95 \times 10^{-3}$	$0,64 \times 10^{-3}$
a	-	0,70	-7,27	-2,23	-	1,27	-1,37	-3,73
b _{DR/DL}	-	-	9,91	1,22	-	-	3,99	2,30
SS	25,26	24,89	22,30	20,14	45,12	36,25	32,69	15,96
r ²	0,87	0,87	0,89	0,90	0,77	0,81	0,83	0,92
Teste χ^2 ou F	48,76	0,51	4,24	7,71	24,11	1,00	1,00	1,00
df	-	1,00	2,00	2,00	-	7,44	3,52	27,90
p(χ^2 ou F)	$1,82 \times 10^{-12}$	0,48	0,12	0,02	$7,28 \times 10^{-9}$	0,006	0,06	$1,28 \times 10^{-7}$

APÊNDICE E – Fotos

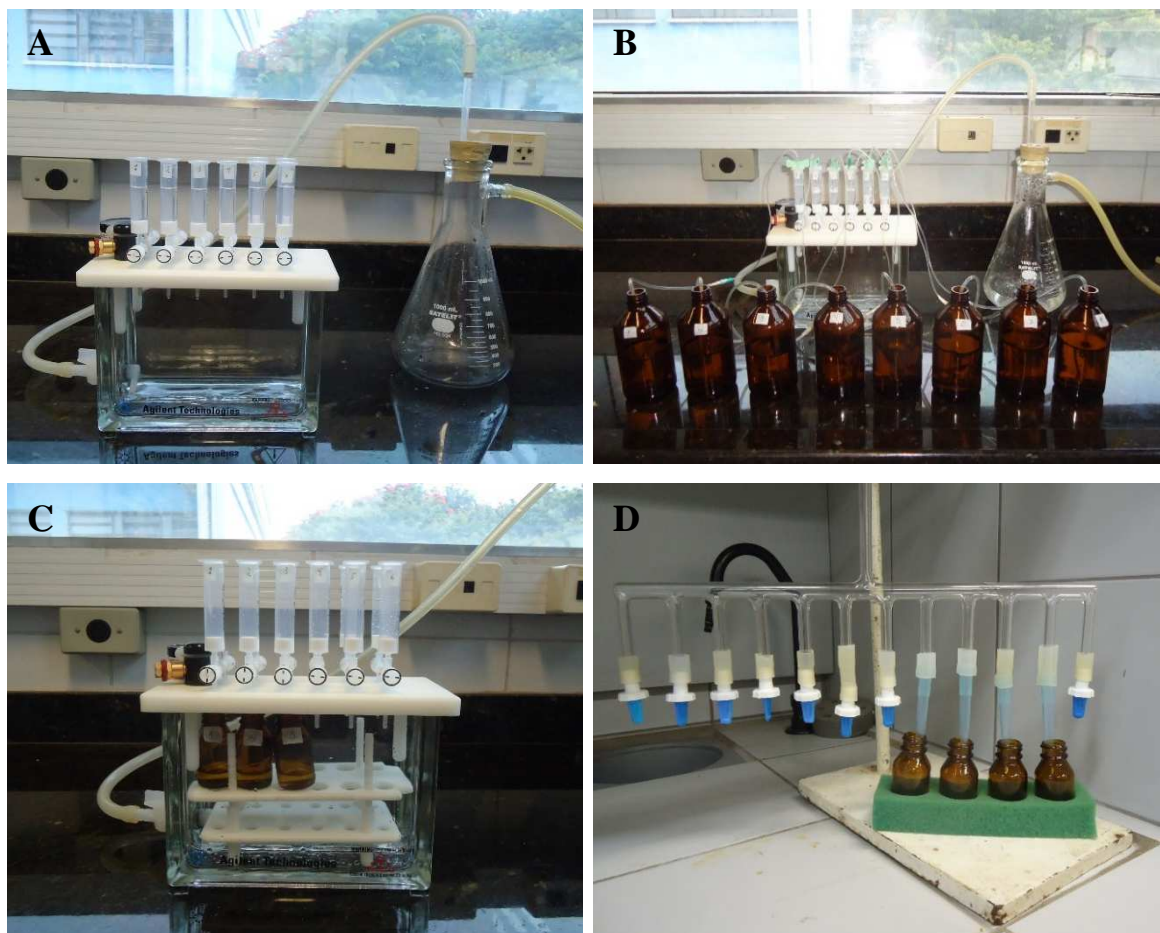


Figura 1. Sequência de fotos mostrando os processos de SPE (extração de fase sólida) em laboratório. **A)** Condicionamento dos cartuchos; **B)** Retenção dos analitos das soluções-teste nos cartuchos; **C)** Eluição dos analitos dos cartuchos; **D)** Evaporação com nitrogênio (Fotos: Adrislaine S. Mansano, 2016).

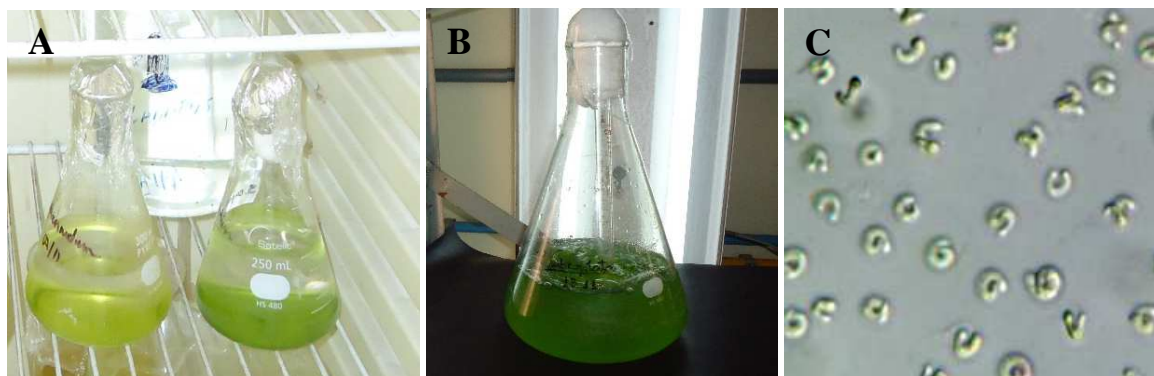


Figura 2. Vista geral de um cultivo da alga *Raphidocelis subcapitata* em laboratório. **A)** Inóculos-estoque das algas mantidos em meio Chu-12; **B)** Pré-inóculo dos testes de toxicidade cultivados em meio LC Oligo; **C)** Imagem do organismo-teste *Raphidocelis subcapitata* (Fotos: Adrislaine S. Mansano, 2016).

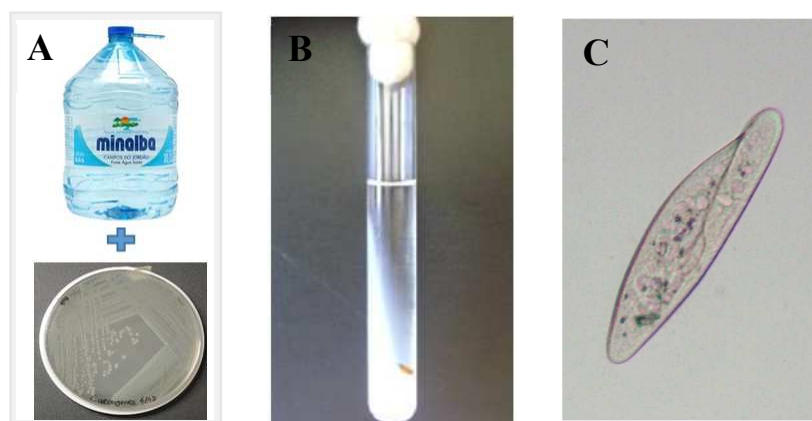


Figura 3. Vista geral de um cultivo do protozoário *Paramecium caudatum* em laboratório. **A)** Meio de cultivo: água mineral Minalba® estéril suplementado com a bactéria *Enterobacter aerogenes*; **B)** Tubo de ensaio contendo ágar inclinado (2%), um grão de arroz com casca estéril e meio de cultivo; **C)** Imagem do organismo-teste *Paramecium caudatum* (Fotos: Adrislaine S. Mansano, 2016).

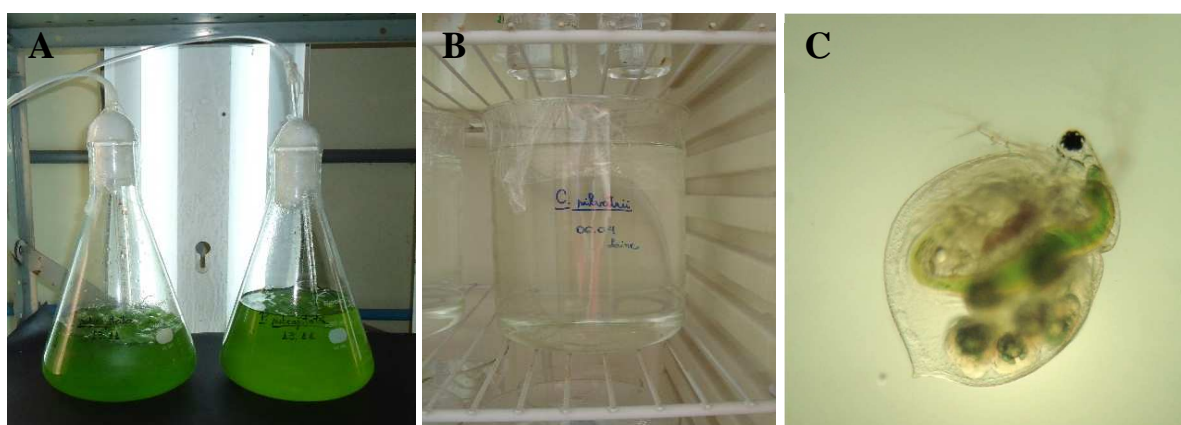


Figura 4. Vista geral de um cultivo do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* em laboratório. **A)** Cultivo da alga *Raphidocelis subcapitata* utilizada como alimento para o cladóceros; **B)**

Béquer de 2L com meio água reconstituída; **C)** Imagem do organismo-teste *Ceriodaphnia silvestrii* (Fotos: Adrislaine S. Mansano, 2016).

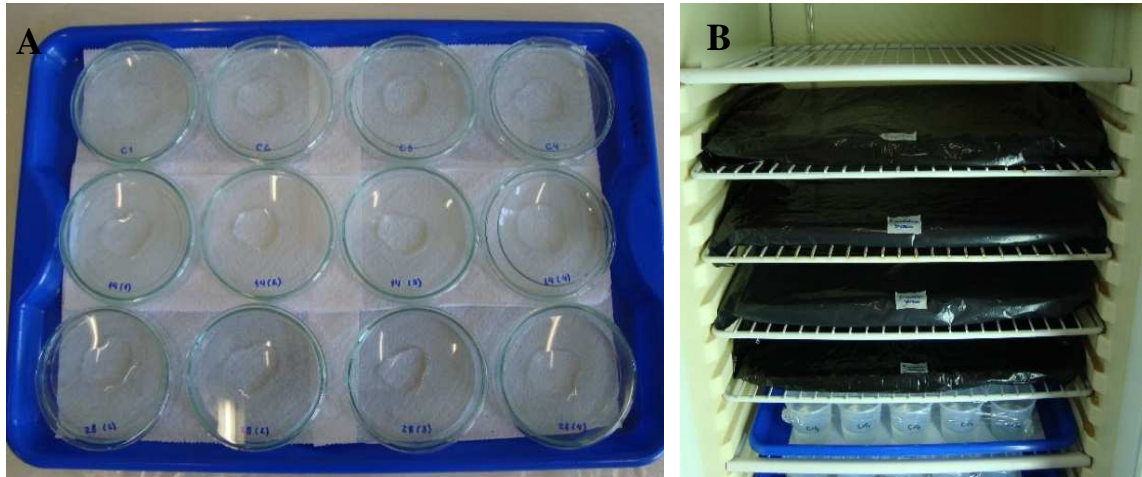


Figura 5. Vista geral do teste de toxicidade aguda utilizando o protozoário *Paramecium caudatum* como organismo-teste. Os experimentos foram realizados em vidros de relógio sustentados individualmente dentro de placas de Petri (**A**) e mantidos em incubadora com temperatura controlada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, sem adição de alimento e na ausência de luz (**B**) (Fotos: Adrislaine S. Mansano, 2016).

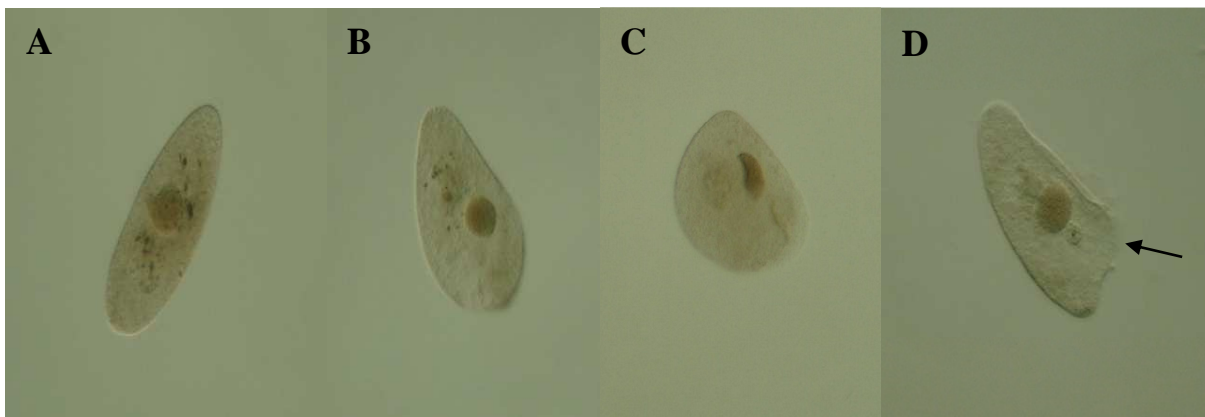


Figura 6. Fotografias em microscópio óptico ilustrando os efeitos de toxicidade aguda dos agrotóxicos diuron e carbofuran sobre o protozoário *Paramecium caudatum*. Células sem movimento ciliar (**A**), deformadas (**B e C**) ou lisadas (**D**) foram consideradas indivíduos mortos nos testes de toxicidade aguda (Fotos: Adrislaine S. Mansano, 2016).

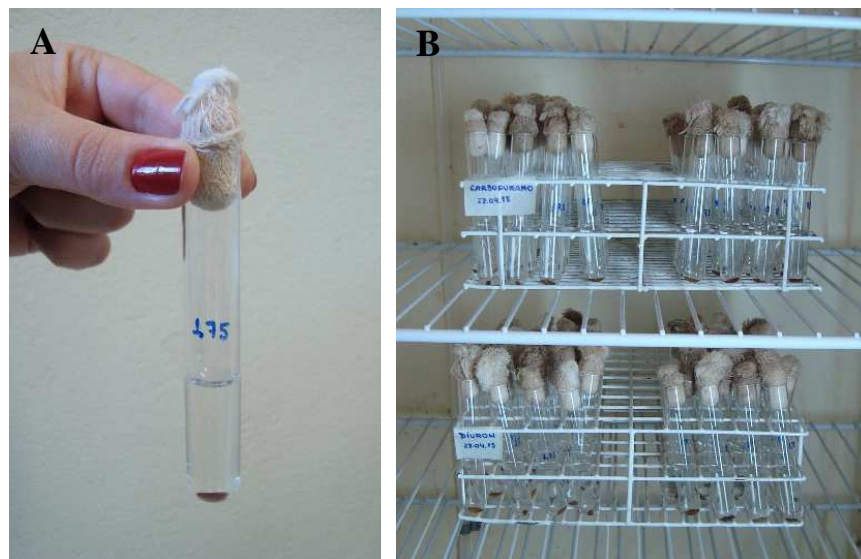


Figura 7. Vista geral do teste de toxicidade crônica utilizando o protozoário *Paramecium caudatum* como organismo-teste. Os experimentos foram realizados em tubos de ensaio contendo 5 mL de solução-teste, 1 grão de arroz com casca estéril e 50 protozoários (A) e mantidos em incubadora com temperatura controlada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h luz: 12 h escuro (B) (Fotos: Adrislaine S. Mansano, 2016).

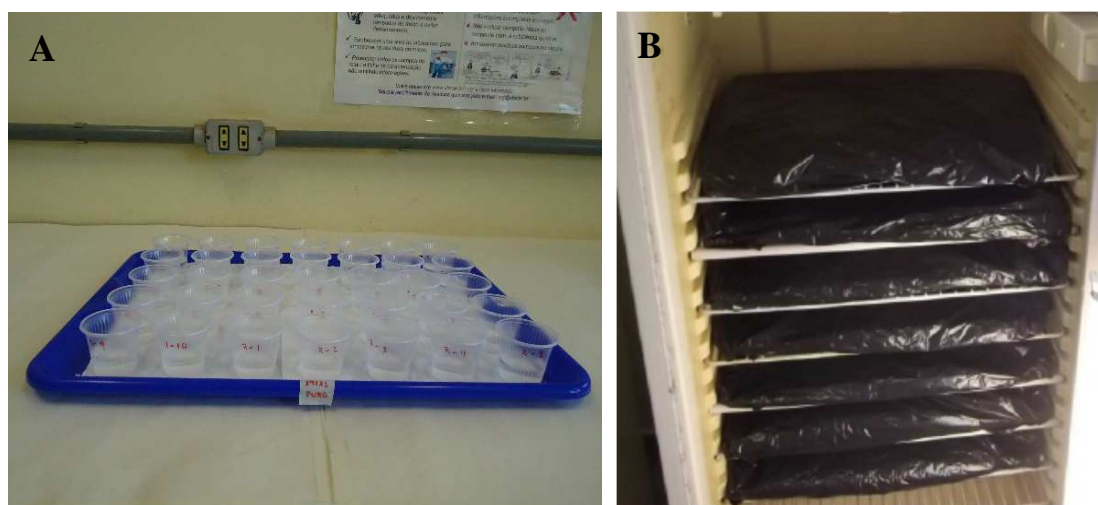


Figura 8. Vista geral do teste de toxicidade aguda utilizando o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* como organismo-teste. Os experimentos foram realizados em copos de polipropileno não-tóxicos contendo 10 mL de solução-teste e cinco neonatos em cada réplica (A) e mantidos em incubadora com temperatura controlada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, sem adição de alimento e na ausência de luz (B) (Fotos: Adrislaine S. Mansano, 2016).

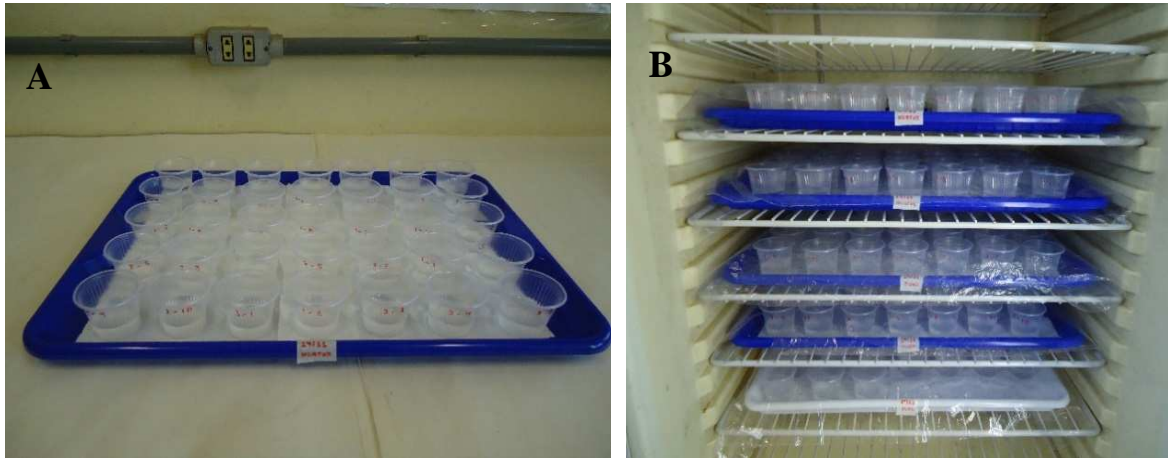


Figura 9. Vista geral do teste de toxicidade crônica utilizando o cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* como organismo-teste. Os experimentos foram realizados em copos de polipropileno não-tóxicos contendo 15 mL de solução-teste e um neonato em cada réplica (A) e mantidos em incubadora com temperatura controlada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h luz: 12 h escuro (B) (Fotos: Adrislaine S. Mansano, 2016).

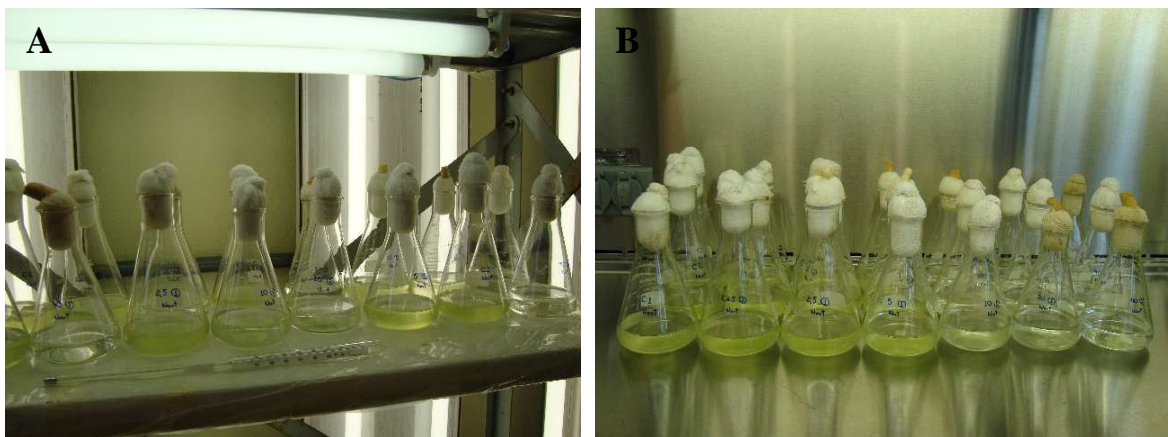


Figura 10. Vista geral do teste de toxicidade crônica utilizando a alga *Raphidocelis subcapitata* como organismo-teste. Os experimentos foram realizados em frasco Erlenmeyer de vidro de 250 mL de capacidade contendo 100 mL de solução-teste e foram mantidos sob iluminação contínua (4306 lux), temperatura controlada a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e agitação manual três vezes ao dia (A). A manipulação dos frascos-teste foi realizada somente dentro da câmara de fluxo laminar para garantir condições assépticas e evitar contaminação no teste (B) (Fotos: Adrislaine S. Mansano, 2016).



Figura 11. Vista geral do teste de toxicidade de mistura utilizando a alga *Raphidocelis subcapitata* como organismo-teste. **A)** Frascos-teste no início do experimento; **B)** Frascos-teste após 96 horas de exposição às misturas dos compostos; **C)** Frascos-teste dentro da câmara de fluxo laminar para retirada de sub-amostras (Fotos: Adrislaine S. Mansano, 2016).

