

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP)
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO (SHS)
NÚCLEO DE ECOTOXICOLOGIA E ECOLOGIA APLICADA (NEEA)

BRUNA CÁRIO CORNACHIONI MORUZZI

**Efeitos de agrotóxicos utilizados no cultivo de cana-de-açúcar sobre as taxas alimentares
dos cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* e *Ceriodaphnia dubia***

São Carlos

2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

Me Moruzzi , Bruna
 Efeitos de agrotóxicos utilizados no cultivo de
 cana-de-açúcar sobre as taxas alimentares dos
 cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* e *Ceriodaphnia dubia*
 / Bruna Moruzzi ; orientadora Dra. Raquel Aparecida
 Moreira; coorientadora Dra. Laís Conceição Menezes da
 Silva. São Carlos, 2022.

 Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) --
 Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de
 São Paulo, 2022.

 1. DMA® 806 BR;. 2. fipronil; . 3. 2,4-D; . 4.
 fitoplâncton;. 5. Regent®800 WG;. 6. zooplâncton.. I.
 Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): **Bruna Cario Cornachioni Moruzzi**

Data da Defesa: 25/11/2022

Comissão Julgadora:

Resultado:

Raquel Aparecida Moreira (Orientador(a))

Aprovada

Lays de Oliveira Gonçalves Alho

Aprovada

Cinthia Bruno de Abreu

Aprovada

Prof. Dr. Marcelo Zaiat

Coordenador da Disciplina 1800091- Trabalho de Graduação

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO (USP)
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO (SHS)
NÚCLEO DE ECOTOXICOLOGIA E ECOLOGIA APLICADA (NEEA)

BRUNA CÁRIO CORNACHIONI MORUZZI

**Efeitos de agrotóxicos utilizados no cultivo de cana-de-açúcar sobre as taxas alimentares
dos cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* e *Ceriodaphnia dubia***

Trabalho de Graduação apresentado à Escola de
Engenharia de São Carlos, da Universidade de São
Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do
título de Engenheiro Ambiental.

Orientadora: Dra. Raquel Aparecida Moreira

Coorientadora: Dra. Laís Conceição Menezes da
Silva

São Carlos (SP)
2022

DEDICATÓRIA

Aos meus pais: Aluísio e Mari.

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Mari, pelo apoio constante e amor incondicional, que me fez ser uma pessoa melhor,
Ao meu pai, Aluísio (*em memória*), pelos apontamentos certos e olhares carinhosos que jamais esquecerei;

Aos meus padrinhos, Maria Rita e Eduardo pela energia amorosa e doce;

Aos meus irmãos, Andréa e Rodrigo por cuja força e companheirismo serei sempre grata;

À minha orientadora Dra. Raquel Aparecida Moreira, por todo auxílio, aprendizado e paciência;

À minha co-orientadora Dra. Laís Conceição Menezes da Silva, pela gentileza com que me acolheu e pela parceria em laboratório;

Aos que fizeram parte da minha trajetória acadêmica até aqui, todos queridos e admirados;

Aos eternos companheiros de vida, de debates e de silêncios, pela luz e força: Beatriz, Vitória, Gabriela, Danilo e Matheus;

Aos grupos de luta política: como estudante e como cidadã, pelos avanços sociais insuficientes, mas sensíveis. Deixo registrada minha gratidão e reconhecimento em período tão sério de ameaça à Democracia.

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Brasil.

RESUMO

Atualmente, a preocupação com a preservação dos ecossistemas aquáticos tem se acentuado devido a contaminação proveniente de fontes antrópicas. Dentre as principais problemáticas ambientais nacionais, pode-se citar o uso demasiado de agrotóxicos, como fipronil e 2,4-D, usados na monocultura canavieira com o intuito de maximizar a exportação de *commodities* agrícolas. Em vista disso, estudos têm mostrado efeitos negativos desses agrotóxicos em organismos não-alvo do ecossistema aquático. Entretanto, a escassez de investigação acerca desses efeitos para a biota aquática nativa e a comparação deles com espécies padronizadas de clima temperado é notória, portanto, no presente estudo foram realizadas análises das consequências de concentrações subletais dos agrotóxicos Regent® 800 WG (i.a. fipronil) e DMA® 806 BR (i.a. 2,4-D) sobre a capacidade alimentar (taxas de filtração e ingestão) de espécies monofiléticas de *Ceriodaphnia*, de ambiente tropical (*Ceriodaphnia silvestrii*) e temperado (*Ceriodaphnia dubia*). Posteriormente, foi avaliado se há recuperação nas taxas de filtração e ingestão dos cladóceros em um período de pós-exposição (sem contaminação). Também foi comparada a sensibilidade das espécies aos agrotóxicos. Os resultados mostraram que as espécies apresentaram respostas distintas no que diz respeito a atividade alimentar, referentes à exposição aos produtos formulados por 24 horas. A espécie nativa *C. silvestrii* apresentou maior sensibilidade ao fipronil, enquanto, para o 2,4-D, *C. dubia* demonstrou maior sensibilidade. Não houve diferenças significativas no período de pós-exposição para os parâmetros analisados (taxas de filtração e ingestão), indicando que ambas as espécies recuperaram a capacidade alimentar após as condições de exposição testadas. Por fim, o presente estudo contribui para aumentar as informações sobre a toxicidade de agrotóxicos para espécies autóctones, destaca que efeitos são espécie-específico e por isso, fica evidente a importância de mais estudos sobre diferentes parâmetros em indivíduos não-alvos afetados por concentrações subletais de agrotóxicos e suas possíveis implicações para o funcionamento do ecossistema aquático.

Palavras-chave: DMA® 806 BR; fipronil; 2,4-D; fitoplâncton; Regent®800 WG; zooplâncton.

ABSTRACT

Currently, concern about the preservation of aquatic ecosystems has been accentuated due to contamination from anthropic sources. Among the main national environmental problems, we can mention the use of too much pesticides, such as fipronil and 2,4-D, used in sugarcane monoculture in order to maximize the export of agricultural commodities. In view of this, studies have shown negative effects of these pesticides on non-target organisms of the aquatic ecosystem. However, the scarcity of research on these effects for native aquatic biota and the comparison of these effects with standardized species of temperate climate is notorious and, therefore, in the present study, analyses of the consequences of sublethal concentrations of the pesticides Regent[®] 800 WG (i.a. fipronil) and DMA[®] 806 BR (i.a. 2,4-D) on the feeding capacity (filtration and ingestion rates) of monophyletic species of *Ceriodaphnia*, tropical environment (*Ceriodaphnia silvestrii*) and temperate (*Ceriodaphnia dubia*). Subsequently, it was evaluated whether there is recovery in the filtration and ingestion rates of cladocerans in a period of post-exposure (without contamination). The sensitivity of the species to pesticides was also compared. The results showed that the species presented different responses regarding food activity, referring to exposure to products formulated for 24 hours. The species *C. silvestrii* showed higher sensitivity to fipronil, while for 2,4-D, *C. dubia* showed higher sensitivity. There were no significant differences in the post-exposure period for the analyzed parameters (filtration and ingestion rates), indicating that both species recovered their feeding capacity after the exposure conditions tested. Finally, the present study contributes to information on pesticide toxicity to indigenous species, highlights what effects are species-specific. Therefore, it is evident the importance of further studies on different parameters in non-target individuals affected by sublethal concentrations of pesticides, as long as their possible implications for the functioning of the aquatic ecosystem.

Keywords: DMA[®] 806 BR; fipronil; 2,4-D; phytoplankton; Regent[®] 800 WG; zooplankton.

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Composição da fase móvel aquosa (A) e orgânica (B) do método cromatográfico para o modo de ionização negativo	20
Tabela 2. Parâmetros da espectrometria de massas para os compostos analisados.....	21
Tabela 3. Faixa linear, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e coeficiente de determinação (R^2) para os analitos.....	21
Tabela 4. Concentrações dos compostos analisados nas amostras. Concentração final média de 2,4-D e Fipronil. R = réplica. Os metabólitos do fipronil foram encontrados apenas na solução-estoque, sendo nos valores de $5 \pm 0,1$ e $14,8 \pm 0,1 \mu\text{g/L}$ para fipronil sulfide e fipronil sulfona, respectivamente	22
Tabela 5. Parâmetros abióticos obtidos no teste de sensibilidade com cloreto de sódio (NaCl) para <i>C. dubia</i>	23
Tabela 6. Porcentagem de organismos imóveis (imobilidade) obtidos com o teste de toxicidade para <i>C. dubia</i> com cloreto de sódio (NaCl).....	23
Tabela 7. Parâmetros abióticos obtidos no teste de sensibilidade com cloreto de sódio.....	24
Tabela 8. Porcentagem de organismos imóveis (imobilidade) obtidos com o teste de toxicidade para <i>C. silvestrii</i> com cloreto de sódio (NaCl)	24
Tabela 9. Parâmetros abióticos obtidos com o teste de toxicidade para <i>C. dubia</i> com Fipronil ..	25
Tabela 10. Porcentagem de organismos imóveis obtidos com o teste de toxicidade para <i>C. dubia</i> com Fipronil	25
Tabela 11. Parâmetros abióticos obtidos com o teste de toxicidade para <i>C. silvestrii</i> com Fipronil	25
Tabela 12. Porcentagem de organismos imóveis obtidos com o teste de toxicidade para <i>C. silvestrii</i> com Fipronil	26
Tabela 13. Parâmetros obtidos com o teste de toxicidade para <i>C. dubia</i> com 2,4-D	26
Tabela 14. Parâmetros obtidos com o teste de toxicidade para <i>C. silvestrii</i> com 2,4-D	27
Tabela 15. Porcentagem de organismos imóveis obtidos com o teste de toxicidade para <i>C. silvestrii</i> com 2,4-D	27
Tabela 16. Respostas dos testes de alimentação realizados com cladóceros como organismo-teste após sofrerem exposição ao Fipronil e 2,4-D	33
Tabela 17. Respostas de testes de alimentação realizados com cladóceros como organismo-teste com diferentes agrotóxicos.....	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Ceriodaphnia dubia</i> : foto de fêmea partenogenética com, aproximadamente, 2 mm (RESOURCES INVENTORY COMMITTEE, 1997)	17
Figura 2. Aspectos gerais de <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> (Foto: Laís C. Menezes da Silva, 2016)... 17	
Figura 3. Desenho esquemático representando a taxa de filtração (filtration rate) e taxa de ingestão (ingestion rate).....	19
Figura 4. Dados de filtração e ingestão referentes ao cladócero <i>C. silvestrii</i> , exposto ao compostoRegent® 800 WG (i.a. fipronil) após 24h (A) e pós-exposição - 4 h (B).....	28
Figura 5. Dados de filtração e ingestão referentes ao cladócero <i>C. silvestrii</i> , exposto ao compostoDMA® 806 WG (i.a. 2,4-D) após 24h (A) e pós-exposição - 4 h (B)	29
Figura 6. Dados de filtração e ingestão referentes ao cladócero <i>C. dubia</i> , exposto ao compostoRegent® 800 WG (i.a. fipronil) após 24h (A) e pós-exposição - 4 h (B).....	31
Figura 7. Dados de filtração e ingestão referentes ao cladócero <i>C. dubia</i> , exposto ao compostoDMA® 806 WG (i.a. 2,4-D) após 24h (A) e pós-exposição - 4 h (B)	32

Sumário

1. Introdução.....	11
1.1. Agrotóxicos utilizados na monocultura de cana-de-açúcar	11
1.2. Contaminação ambiental e humana por agrotóxicos.....	13
1.3. Efeitos do inseticida fipronil e do herbicida 2,4-D sobre organismos não-alvo.....	14
1.4. O uso de cladóceros na Ecotoxicologia	15
2. Objetivos	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. Hipótese.....	16
4. Metodologia	16
4.1. Cultivo e manutenção dos cladóceros.....	16
4.2. Testes de Sensibilidade.....	17
4.3. Testes de alimentação (taxas de filtração e ingestão) de exposição e pós-exposição.....	18
4.4. Análise Estatística.....	19
4.5. Análise Química	20
5. Resultados e discussões.....	21
5.1. Análises químicas	21
5.2. Testes de sensibilidade	22
5.2.1. Teste de Sensibilidade com cloreto de sódio (NaCl) – <i>C. dubia</i>	22
5.1.2. Teste de Sensibilidade com cloreto de sódio (NaCl) – <i>C. silvestrii</i>	23
5.2. Testes de toxicidade com os agrotóxicos	24
5.2.1. Experimentos com o inseticida fipronil	24
5.2.2. Experimentos com o herbicida 2,4-D	26
5.3. Testes de alimentação	27
5.3.1. Teste de alimentação com o cladóceros <i>C. silvestrii</i>	27
5.3.2. Teste de alimentação do cladóceros <i>C. dubia</i>	30
5.3.3. Efeitos de agrotóxicos sobre a alimentação de cladóceros	32
6. Conclusão	34
7. Referências Bibliográficas	35

1. Introdução

1.1. Agrotóxicos utilizados na monocultura de cana-de-açúcar

No início do século XVI, a cana-de-açúcar foi introduzida em terras brasileiras por Martim Affonso de Souza e, por muito tempo foi *commodity* de maior exportação do país, tornando a colônia a maior produtora e exportadora de açúcar da época (Machado, 2003). Séculos depois, durante a crise do petróleo da década de 1970, o governo federal criou o Programa Nacional do Álcool (Próalcool), o qual alavancou o desenvolvimento, a produção e o uso do álcool como combustível em substituição à gasolina (Machado, 2003). A alta produção de açúcar e etanol colocou o Brasil em um lugar de destaque no cenário internacional e, juntamente com a inserção de carros com motores *flex fuel* no mercado automotivo em 2003, intensificou ainda mais a produção e fez com que o país entrasse em um novo ciclo de cultivo da cana-de-açúcar (Gilio & de Moraes 2016).

Por suas vantagens geográficas, recursos hídricos e clima favorável, o Brasil tornou-se o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, contribuindo para o aumento da geração de etanol (Martinelli e Filoso, 2008). Em cerca de 50 anos (1961 a 2017), o país apresentou um aumento de 59,4 para 758,5 milhões de toneladas por ano na produção de cana-de-açúcar, sendo o maior produtor mundial seguido pela Índia e China (306 e 104 milhões de toneladas por ano, respectivamente) (FAO, 2019).

Neste cenário, em escala nacional, o Estado de São Paulo é responsável por 50% das áreas cultivadas de cana-de-açúcar, registrando a produtividade, estimada, atualmente, em 71.094 kg/ha (CONAB, 2022). Dados mais recentes da União da Indústria de Cana-de-Açúcar (Unica, 2019), no período de 2006 a 2017, apontam que a área de cana-de-açúcar colhida em hectare aumentou em mais de 43%, enquanto a produção em toneladas cresceu 59%. Sendo assim, segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o agronegócio é hoje um dos maiores e mais importantes setores de exportação nacional, representando cerca de 42% das exportações e responsável por aproximadamente 21% de todo o produto interno bruto do país (CEPEA, 2016). Em relação a estrutura estadual, o PIB do agronegócio do estado de São Paulo avançou fortes 8,27% em 2020, resultando na alta mais intensa desde 2010, segundo cálculos do Cepea (Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada), da Esalq/USP. Em 2020, o agronegócio paulista representou 14% do PIB do estado, sendo esta a maior participação da série histórica, iniciada em 2008. Especificadamente em relação a cana-de-açúcar, os preços e a

produção do estado aumentaram, resultando em uma participação correspondente a 80% do PIB estadual (CEPEA, 2020).

Devido a significativa contribuição para a economia, a monocultura canavieira busca por ferramentas que maximizam a produção, como a utilização de agrotóxicos. No entanto, verifica-se que muitos impactos ambientais foram desencadeados durante esse processo. Dentre os principais, o uso exacerbado desses produtos pode ocasionar a contaminação e degradação do solo e dos recursos hídricos (MMA, 2016) e, conseqüentemente, o desequilíbrio ambiental acompanhado do surgimento de pragas e doenças (NETO, 1991) e/ou a extinção da fauna e flora dos ecossistemas afetados (SMITH, 2013).

Na última década, dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa Agrícola (Sindag), ambos de 2009, afirmam que as quantidades de agrotóxicos comercializados subiram aproximadamente 44,6%, excluindo a enorme quantidade desses produtos contrabandeados no país (Carneiro e Soares, 2010). Destaca-se ainda que 1.681.001 produtores utilizaram agrotóxicos, representando um crescimento de 20,4% em relação a 2006 (IBGE, 2017). No início de 2019, existiam no Brasil cerca de 13.300 registros de agrotóxicos (Aenda, 2019) e desde 2008 o Brasil vem sendo o país com o maior consumo desses produtos (CARNEIRO et al., 2015) e se tornando responsável por cerca de 20% do consumo mundial (Peleaz et al., 2015). Com relação à comercialização dos ingredientes ativos no país, o relatório de Indicadores de Desenvolvimento Sustentável (IBGE, 2017), apresentou que entre os anos de 2000 a 2014, o consumo de ingredientes ativos (IA) por área plantada (há) cresceu 10% e que o Estado de São Paulo ocupa o segundo lugar de uso de agrotóxico com 8,8 kg/há.

Nos últimos dois anos, com o lançamento de diversos novos produtos no mercado juntamente e a escassez de fiscalização e orientação sobre o uso desses produtos o consumo se torna cada vez maior (FDCVC, 2019). As lavouras do país com maior consumo dessas substâncias são soja, milho e cana-de-açúcar (Bombardi et al., 2017), as quais representam, respectivamente, 35%, 55,4% e 11,3% do valor da produção em 2020 (IBGE, 2021), desse modo, fica evidente que a intensa utilização dos agrotóxicos causa uma preocupação ambiental devido aos potenciais efeitos aos ecossistemas (Silva et al. 2020).

Em julho de 2020, constavam 455 ingredientes ativos de agrotóxicos para uso agrícola e/ou domissanitário na lista das monografias autorizadas no Brasil, sendo 404 químicos (88,8%) e 51 biológicos (11,2%) (ANVISA, 2020). Dentre os 404 ingredientes ativos químicos, pelo menos 121 (30%) não eram autorizados na União Européia (European Commission, 2020), como por exemplo,

o inseticida fipronil. Dentre os novos agrotóxicos autorizados no Brasil entre 2019 e 2020, a cana-de-açúcar está entre as culturas agrícolas que tiveram mais de 50 novos agrotóxicos aprovados para uso, sendo 97 agrotóxicos aprovados representando 38,5%. (HESS et al., 2021).

1.2. Contaminação ambiental e humana por agrotóxicos

Devido ao avanço da contaminação ambiental por agrotóxicos, os resíduos oriundos da aplicação desses produtos são encontrados em alimentos (ANVISA, 2017), na atmosfera (Moreira et al., 2012), nas chuvas (Nogueira et al., 2012) e em águas superficiais e subterrâneas (Dores et al., 2008). O número de substâncias químicas sintéticas tem se expandido muito ao longo das últimas décadas e grandes quantidades desses contaminantes são liberados para o ambiente, contaminando tanto a água, como também o solo e o ar (Bonaventura e Johnson, 1997). Nesse contexto, os riscos que os ecossistemas aquáticos que cercam as áreas de cana-de-açúcar sofrem perda de vegetação ripária com consequente deposição de sedimentos do solo, a erosão e a entrada de nutrientes (principalmente nitrogênio e fósforo), matéria orgânica e produtos químicos, como agrotóxicos e metais (Martinelli e Filoso, 2008) devem ser consideradas.

Além disso, considerando o cenário de exposição humana a esses produtos, majoritariamente de trabalhadores rurais, no período de 2007 a 2015, observou-se crescente aumento do número de notificações de intoxicação por uso de agrotóxicos, havendo um acréscimo de 139% totalizando 84.206 casos, em decorrência do aumento da comercialização dessas substâncias (“Relatório Nacional Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos”, 2016). Ademais, é relevante ressaltar os riscos dietéticos relativos à exposição de resíduos de agrotóxicos presentes nos alimentos consumidos pela população brasileira, os quais têm a capacidade de penetrar no interior de folhas e polpas bem como nas partes externas do vegetal (ANVISA, 2017). Dessa maneira, pode-se inferir que a ampla utilização de agrotóxicos expõe de forma perigosa e frequente o consumidor, o ambiente e os trabalhadores à contaminação química (ALMEIDA et al., 2009).

O glifosato, 2,4-D, mancozebe, atrazina, acefato, clorotalonil, melationa, enxofre, imidacloprido e clorpirifos estão entre os ingredientes ativos mais vendidos no Brasil, totalizando um consumo de 487 mil toneladas por ano destes compostos (IBAMA, 2020). Especificadamente, os ingredientes ativos mais usados na monocultura de cana-de-açúcar no estado são os herbicidas 2,4-D, diuron, clomazone, MSMA, ethephon e o inseticida/formicida fipronil (2009- 2015; IEA

2016). Dentre estes, o inseticida fipronil e o herbicida 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) ganham destaque por sua potencialidade de serem transportados para os ecossistemas aquáticos adjacentes (Albuquerque et al., 2016; Marchesan et al., 2010). Sendo o herbicida 2,4-D, o segundo ingrediente ativo mais utilizado no Brasil e classificado como agente carcinogênico para humanos (IARC, 2015). O fipronil se encontra como o inseticida mais vendido no estado de São Paulo (IBAMA, 2019).

Desse modo, ao considerar a ocorrência desses compostos em água doce no país, um estudo recente destaca o fipronil como sendo o mais recorrente, de forma que foi encontrado em 54% das 251 amostras investigadas, com concentração entre 0,05 a 26,2 µg/L (Albuquerque et al., 2016; Marchesan et al., 2010). Quanto ao herbicida 2,4-D, o mesmo estudo apontou sua ocorrência principalmente no Estado do Rio Grande do Sul, provavelmente resultado da plantação de arroz irrigado na região, com concentrações variando entre 0,3 a 3,4 µg/L (Chingombe et al., 2006; Marchesan et al. 2010). No estado de São Paulo, o 2,4-D foi detectado em ambientes aquáticos localizados em áreas com predominância de culturas de cana, em concentrações entre 175,1 e 366,6 µg/L (CETESB, 2018).

1.3. Efeitos do inseticida fipronil e do herbicida 2,4-D sobre organismos não-alvo

Com relação ao inseticida fipronil, seu tempo de degradação pode diferenciar de acordo com a forma como é utilizado, sendo o de forma granular o mais persistente segundo Ngim e Crosby (2001). Quando exposto à luz, seu tempo de meia-vida aquosa é de 125 horas e meia-vida no solo de 438 horas. Em ambientes com condições anaeróbias sua degradação é mais demorada, possuindo tempo de meia-vida entre 116 e 130 dias em água e sedimento, respectivamente (Coutinho et al., 2005). Este inseticida age diretamente no sistema nervoso central de insetos, provocando a interrupção do receptor de ácido gama aminobutírico (GABA), o qual possui alto grau de seletividade e, por esse motivo, acaba afetando predominantemente invertebrados - para os quais é altamente tóxico. A interrupção do receptor GABA leva a hiperexcitação dos músculos e nervos dos organismos-alvo e, como consequência, a morte (Tingle et al., 2003; Das et al., 2006).

O ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), desde o início de 1940, tem sido utilizado em grande escala nas plantações, visando o controle de ervas daninhas de folhas largas (Grisolia, 2005; Itoh et al., 2013). Segundo estudos divulgados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA, 2014), desde 2009 ele está entre os cinco agrotóxicos mais vendidos. Este herbicida atua

aumentando a plasticidade da parede celular da planta-alvo, além de aumentar a síntese de proteínas e etileno. Com isso, ocorre um crescimento descontrolado de divisões celulares na planta, causando danos ao seu tecido vascular e, conseqüentemente, levando a morte da mesma (Oruç et al., 2004; Benli et al., 2007).

Ao considerar a expansão da utilização dos agrotóxicos e a conseqüente contaminação ambiental, reafirma-se que a conservação da biodiversidade aquática continental em todo o mundo tem sido ameaçada (Lacher e Goldstein, 1997; Sanchez-Bayo e Hyne, 2011), culminando em efeitos particularmente graves sobre a biota aquática (Daam e Van den Brink, 2010). Além disso, esses agrotóxicos possuem características tóxicas específicas para determinadas espécies, de acordo com o seu modo de ação, mas que podem causar efeitos indesejáveis a outros organismos-não alvo mesmo em baixas concentrações (Singer et al. 2010). Por isso, é extremamente necessária a realização de avaliações de toxicidade através de bioensaios com espécies representativas do ambiente de estudo. No entanto, não existe uma única espécie de organismo que represente integralmente os efeitos causados em um determinado ecossistema. Por este motivo, para avaliar os impactos e suas conseqüências para a biota aquática, recomenda-se que as avaliações ecotoxicológicas estudem os efeitos dos agrotóxicos sobre diferentes organismos em condições geoclimáticas distintas a fim de aumentar a compreensão de uma possível diferença na sensibilidade entre as espécies (Raymundo et al., 2019).

1.4. O uso de cladóceros na Ecotoxicologia

Dentre os organismos mais recomendados para testes de toxicidade em Ecotoxicologia aquática, estão os cladóceros, consumidores primários que representam as espécies zooplantônicas. Devido ao curto ciclo de vida e a grade sensibilidade às alterações ocorridas no meio ambiente, é possível observar efeitos tóxicos em várias gerações de cladóceros. A espécie *Ceriodaphnia silvestrii* possui elevada sensibilidade a variados agentes tóxicos, é facilmente cultivável em laboratório e possui ciclo de vida curto (Fonseca e Rocha, 2004; ABNT, 2017; Santos et al., 2006). Este cladóceros apresenta distribuição geográfica em regiões tropicais especificamente encontrado na América do Sul (Casali-Pereira et al. 2015; Mansano et al. 2018). Sob o mesmo ponto de vista, a representante de clima temperado da mesma família, *Ceriodaphnia dubia*, é uma espécie indicada para testes ecotoxicológicos por agências regulatórias de países de regiões temperadas (US EPA 2002a, b).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de exposição e pós-exposição dos agrotóxicos Regent[®] 800 WG (ingrediente ativo - i.a. fipronil) e DMA[®] 806 BR (i.a. 2,4-D) sobre a capacidade alimentar (taxas de filtração e ingestão) dos cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* e *Ceriodaphnia dubia*

2.2 Objetivos específicos

- I. Avaliar possíveis alterações nas taxas de filtração e ingestão durante exposição aos agrotóxicos Regent[®] 800 WG (i.a. fipronil) e DMA[®] 806 BR (i.a. 2,4-D) para as espécies de cladóceros *C. silvestrii* e *C. dubia*.
- II. Avaliar se ocorrem efeitos na recuperação da capacidade alimentar pós-exposição (sem contaminação) avaliadas através das taxas de filtração e ingestão de *C. silvestrii* e *C. dubia*.
- III. Comparar e discutir os efeitos causados pela exposição aos agrotóxicos Regent[®] 800 WG (i.a. fipronil) e DMA[®] 806 BR (i.a. 2,4-D) para as espécies de cladóceros *C. silvestrii* e *C. dubia*.

3. Hipótese

Os agrotóxicos Regent[®] 800 WG (i.a. fipronil) e DMA[®] 806 BR (i.a. 2,4-D) influenciam negativamente a capacidade alimentar (taxas de filtração e ingestão) dos cladóceros *C. silvestrii* e *C. dubia* minimizando a dinâmica dietética.

4. Metodologia

4.1. Cultivo e manutenção dos cladóceros

As espécies foram cultivadas em água reconstituída previamente preparada de acordo com ABNT (2017) mantendo as seguintes características: pH entre 7,0 e 7,5 e dureza total entre 40 e 48 mgCaCO₃ L⁻¹ (ABNT, 2017). Os organismos foram mantidos em béqueres de 2 L, com um máximo de 120 indivíduos. As manutenções das culturas foram realizadas três vezes por semana, com a troca do meio de cultivo e alimentação.

Os cultivos de *C. dubia* (Figura 1) e *C. silvestrii* (Figura 2) foram mantidos em temperatura controlada a $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ e com fotoperíodo de 12/12 horas de claro/escuro. A alga *Raphidocelis subcapitata* foi utilizada como alimento (2×10^5 células mL^{-1}) para os cultivos de *C. silvestrii* e *C. dubia*. Também foi fornecido aos cladóceros um complemento alimentar a base de ração de peixe fermentada e fermento biológico seco (Fleischmann®) (ABNT, 2017).

Figura 1. *Ceriodaphnia dubia*: foto de fêmea partenogenética com, aproximadamente, 2 mm (RESOURCES INVENTORY COMMITTEE, 1997).



Figura 2. Aspectos gerais de *Ceriodaphnia silvestrii* (Foto: Laís C. Menezes da Silva, 2016).



4.2. Testes de Sensibilidade

Inicialmente, foram realizados testes de sensibilidade com cloreto de sódio (NaCl), nas mesmas condições de cultivo (temperatura e fotoperíodo) para verificar se o cultivo inicial estava dentro da faixa de sensibilidade da carta controle do laboratório. Os procedimentos aplicados

foram baseados na norma NBR 13373:2016 (ABNT, 2016). Cada teste foi conduzido em cinco concentrações (0,6; 1,0; 1,3; 1,6 e 2,2 g/L) e um controle em quatro réplicas, cada uma contendo cinco neonatas (< 24h). As unidades experimentais foram béqueres de vidro contendo 10 ml de solução teste. Cada concentração da solução teste foi preparada a partir de uma solução estoque de 10g/L. Os testes tiveram duração de 48 horas, sem alimentação e com fotoperíodo de 12:12 claro/escuro, tendo como *endpoint* a imobilidade dos organismos.

4.3. Testes de alimentação (taxas de filtração e ingestão) de exposição e pós-exposição

Os ensaios de alimentação durante exposição e pós-exposição aos agrotóxicos foram baseados no método descrito por McWilliam e Baird (2002). Organismos juvenis (48 horas de vida) foram expostos a diferentes concentrações de fipronil sendo elas: 0,4 (F1), 0,8 (F2), 1,2 (F3), 1,6 (F4) e 2,0 µg/L (F5). E para o 2,4-D, as concentrações testadas foram: $4,0 \times 10^4$ µg/L (D1), $5,0 \times 10^4$ µg/L (D2), $6,0 \times 10^4$ µg/L (D3), $7,0 \times 10^4$ µg/L (D4) e $8,0 \times 10^4$ µg/L (D5), assim como estabelecidas e apresentadas em Silva et al. (2020), além de uma concentração fixa de 2×10^5 células mL⁻¹ da alga *R. subcapitata*, fornecidas como alimento.

Os cladóceros permaneceram durante 24 horas no escuro (período de exposição), nas soluções testecontaminadas com os respectivos agrotóxicos e alga. O delineamento experimental utilizou-se de quatro repetições por tratamento e cinco indivíduos por repetição (n = 20). Uma replicação adicional com meio de cultivo e algas, mas sem cladóceros, foi realizada para cada tratamento, para determinar quaisquer alterações da concentração inicial de algas.

Após 24 h, os organismos foram transferidos para frascos contendo meio de cultivo não contaminado com *R. subcapitata* na mesma concentração e permaneceram por 4 horas no escuro (período pós-exposição). Tanto após as 24 horas de exposição quanto após as 4 horas de pós-exposição, alíquotas de cada recipiente foram retiradas para a determinação da concentração de algas por citometria de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson) de acordo com os métodos propostos por Sarmiento (2008). Os cálculos de densidade celular foram realizados através do software FlowJo (Treestar.com, versão V10.0).

As taxas de alimentação foram calculadas pela equação de Allen et al. (1995):

$$F = V (C_0 - C_{24 \text{ ou } 4}) / t \text{ (equação 1)}$$

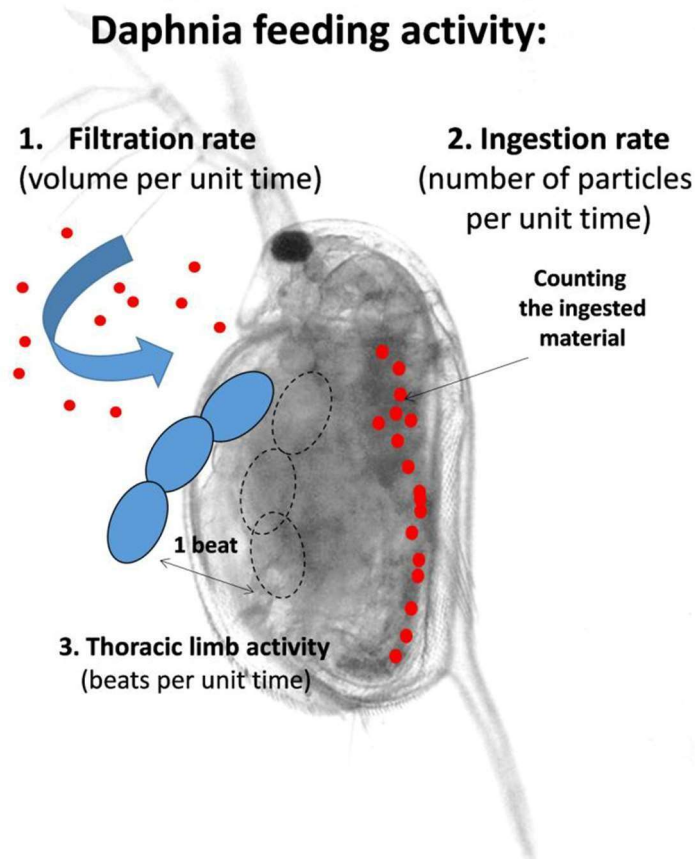
onde F é a taxa de alimentação (células individuais⁻¹ h⁻¹); V é o volume do recipiente de teste (mL); C₀ é a concentração inicial de células algais (células mL⁻¹); C_{24 ou 4} é a concentração final de células algais (células mL⁻¹) e t é a duração do experimento (24 ou 4 h).

Já as taxas de ingestão foram calculadas conforme equação abaixo, onde, I correspondem às taxas de ingestão (ind/h/células):

$$I = F \times \sqrt{C_0 \times C_t} \text{ (equação 2)}$$

A Figura 3 apresenta um desenho esquemático da diferença entre de taxa de filtração e taxade ingestão.

Figura 3. Desenho esquemático representando a taxa de filtração (filtration rate) e taxa de ingestão (ingestion rate).



Fonte: Bownil (2019).

4.4. Análise Estatística

Os dados dos ensaios foram avaliados quanto à normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade das variâncias (teste de Levene) e, em seguida, analisados usando ANOVA de uma via seguida pelo teste Dunnett (post-hoc), no caso de dados que atenderam aos critérios de normalidade e homocedasticidade. Para os dados que não atendiam a esses requisitos, foi utilizado o teste não

paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste post-hoc de Student-Newman-Keuls. Diferenças significativas entre os grupos foram aceitas em $p < 0,05$. Todos os testes estatísticos foram realizados no software Statistica 7.0 (Statsoft, 2004). Posteriormente, para a confecção dos gráficos, foi utilizado o programa Origin 2019b.

4.5. Análise Química

Com a finalidade de confirmar as concentrações dos agrotóxicos fipronil e 2,4-D utilizadas nos ensaios, as soluções-teste preparadas foram analisadas em parceria com a Profa. Dra. Cassiana C. Montagner do Instituto de Química da Universidade de Campinas (IQ-UNICAMP).

As amostras foram filtradas diretamente em vial de vidro âmbar de 2,0 mL, utilizando filtro de seringa de PTFE hidrofóbico com porosidade de 0,22 μm . Foram realizadas diluições, quando necessário, gerando concentrações finais dentro da faixa linear da curva de calibração. As curvas analíticas foram construídas de acordo com a área obtida para cada composto em função de sua concentração. A análise dos compostos foi realizada com a utilização da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS). Para isso, utilizou-se um cromatógrafo Agilent modelo 1200, equipado com bomba binária, injetor automático e compartimento de coluna termostaticado. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Zorbax SB-C18 (2,1 x 30 mm, tamanho de partícula de 3,5 μm) a 30 °C. A fase móvel foi constituída de água ultrapura (A) e metanol (B), previamente filtrados em membranas com 0,2 μm de porosidade, contendo 0,01% (v/v) de NH_4OH , aditivo utilizado para favorecer a formação de íons no modo negativo. A separação cromatográfica foi realizada em composição gradiente de acordo com a Tabela 1, com vazão de 0,3 mL min^{-1} .

Tabela 1. Composição da fase móvel aquosa (A) e orgânica (B) do método cromatográfico para o modo de ionização negativo.

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0,0	70	30
5,0	20	80
6,0	20	80
11,0	70	30
16,0	70	30

A identificação e a quantificação dos compostos foram realizadas por espectrometria de massas em um equipamento Agilent triplo quadrupolo (modelo 6410B). Os compostos foram

ionizados em uma fonte de *electrospray* no modo negativo e foram monitorados pelo modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), de acordo com os parâmetros descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros da espectrometria de massas para os compostos analisados.

Analito	Íon precursor → Íon produto (m/z)	Energia de fragmentação (V)	Energia de colisão (V)
2,4-D	220,9 → 163,0	70	12
	218,9 → 161,0	70	14
	218,9 → 125,0	70	18
Fipronil	434,9 → 330,0	100	10
	434,9 → 250,0	100	15
	434,9 → 183,0	100	30
Fipronil sulfeto	419,0 → 382,9	135	5
	419,0 → 313,9	135	20
	419,0 → 262,0	135	28
Fipronil sulfona	451,0 → 414,9	100	10
	451,0 → 281,9	100	28
	451,0 → 243,9	100	40

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) instrumentais foram obtidos pela relação sinal/ruído do equipamento. Para o LD utilizou-se uma razão sinal/ruído igual a 3 e para o LQ foi utilizada uma razão sinal/ruído igual a 10. O coeficiente de determinação (R^2) foi obtido a partir das curvas analíticas. Esses parâmetros estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 3. Faixa linear, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e coeficiente de determinação (R^2) para os analitos.

Analito	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R^2
2,4-D	1,0 – 500,0	0,5	1,0	0,9979
Fipronil	0,1 – 500,0	0,005	0,1	0,9981
Fipronil sulfeto	0,5 – 500,0	0,1	0,5	0,9970
Fipronil sulfona	0,1 – 500,0	0,05	0,1	0,9962

5. Resultados e discussões

5.1. Análises químicas

Foram calculadas as concentrações dos compostos analisados nas amostras (Tabela 4 e Tabela 5), conforme metodologia previamente descrita. As concentrações obtidas das análises para o 2,4-D (D1-D5) e fipronil (F1-F5), bem como soluções-estoque e controle, são apresentadas a seguir. A sigla LD (<LD) representa a ausência de detecção dentro das análises.

Tabela 4. Concentrações dos compostos analisados nas amostras. Concentração final média e o desvio padrão de 2,4-D e Fipronil. R =réplica. Os metabólitos do fipronil foram encontrados apenas na solução-estoque, sendo nos valores de 5 ± 0 , 1 e $14,8 \pm 0,1 \mu\text{g/L}$ para fipronil sulfide e fipronil sulfona, respectivamente.

Treatments	2,4D			Fipronil		
	Final Conc.	Média	Desvpad	Final Conc.	Média	Desvpad
	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/L}$		$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/L}$	
D1 (R1)	22394	22135	365	<LD	<LD	-
D1 (R2)	21877			<LD		
D2 (R1)	28838	28782	79	<LD	<LD	-
D2 (R2)	28726			<LD		
D3 (R1)	36248	36118	183	<LD	<LD	-
D3 (R2)	35989			<LD		
D4 (R1)	30045	29367	958	<LD	<LD	-
D4 (R2)	28690			<LD		
D5 (R1)	34403	34717	444	<LD	<LD	-
D5 (R2)	35031			<LD		
Estoque 2,4-D (R1)	345997	3426601	47187	<LD	<LD	-
Estoque 2,4-D (R2)	339325			<LD		
F1 (R1)	<LD	<LD	-	2,2	2,2	0,04
F1 (R2)	<LD			2,2		
F2 (R1)	<LD	<LD	-	4,2	4,0	0,2
F2 (R2)	<LD			3,9		
F3 (R1)	<LD	<LD	-	2,3	2,4	0,2
F3 (R2)	<LD			2,5		
F4 (R1)	<LD	<LD	-	3,9	3,92	0,04
F4 (R2)	<LD			3,9		
F5 (R1)	<LD	<LD	-	3,8	3,84	0,2
F5 (R2)	<LD			3,9		

Conforme indicado por Pinto et al. (2021), como os experimentos foram realizados com formulações comerciais, as diferenças observadas entre os valores nominais e reais provavelmente se devem a disparidades na composição da formulação.

5.2. Testes de sensibilidade

5.2.1. Teste de Sensibilidade com cloreto de sódio (NaCl) – *C. dúbia*

Foram obtidos como resultados das leituras dos parâmetros abióticos (pH, condutividade e oxigênio dissolvido) e imobilidade do teste de sensibilidade com o cloreto de sódio (NaCl) os dados apresentados nas tabelas 5 e 6, respectivamente para a espécie *C. dubia*.

Tabela 5. Parâmetros abióticos obtidos no teste de sensibilidade com cloreto de sódio (NaCl) para *C. dubia*.

Amostra (µg /L)	pH	Parâmetros Iniciais		Parâmetros Finais	
		Condutividade (µS)	OD (mg/L)	pH	OD (mg/L)
Controle	7,58	207	7,02	7,65	6,86
600	7,56	1267	7,09	7,64	6,86
1000	7,57	1912	7,07	7,63	6,68
1300	7,56	2370	7,02	7,64	6,76
1600	7,52	2910	6,99	7,62	6,81
2200	7,52	4000	6,98	7,59	6,78

Tabela 6. Porcentagem de organismos imóveis (imobilidade) obtidos com o teste de toxicidade para *C. dubia* com cloreto de sódio (NaCl).

Amostra (µg /L)	Organismos imóveis					%
	1	2	3	4	Total	
Controle	1/5	0/5	0/5	0/5	1	5%
600	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0%
1000	1/5	0/5	0/5	0/5	1	5%
1300	0/5	2/5	0/5	0/5	2	10%
1600	1/5	1/5	2/5	1/5	5	25%
2200	5/5	5/5	5/5	5/5	20	100%

5.1.2. Teste de Sensibilidade com cloreto de sódio (NaCl) – *C. silvestrii*

Foram obtidos como resultados das leituras dos parâmetros abióticos (pH, condutividade e oxigênio dissolvido) e imobilidade do teste de sensibilidade com o cloreto de sódio (NaCl) os dados apresentados nas tabelas 7 e 8, respectivamente para a espécie *C. silvestrii*.

Tabela 7. Parâmetros abióticos obtidos no teste de sensibilidade com cloreto de sódio para *C. silvestrii*.

Amostra (µg /L)	Parâmetros Iniciais			Parâmetros Finais	
	pH	Condutividade (µS)	OD (mg/L)	pH	OD (mg/L)
Controle	7,56	208	7,02	7,64	6,87
600	7,58	1263	7,08	7,65	6,87
1000	7,56	1909	7,06	7,64	6,66
1300	7,57	2368	7,02	7,64	6,78
1600	7,56	2909	6,97	7,63	6,82
2200	7,51	4000	6,99	7,60	6,79

Tabela 8. Porcentagem de organismos imóveis (imobilidade) obtidos com o teste de toxicidade para *C. silvestrii* com cloreto de sódio (NaCl).

Amostra (µg /L)	Organismos imóveis				Total	%
	1	2	3	4		
Controle	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0%
600	0/5	0/5	0/5	1/5	1	5%
1000	1/5	0/5	0/5	0/5	1	5%
1300	0/5	1/5	1/5	0/5	2	10%
1600	1/5	1/5	2/5	1/5	5	25%
2200	3/5	3/5	2/5	3/5	11	55%

5.2. Testes de toxicidade com os agrotóxicos

Foram realizados testes de toxicidade com os agrotóxicos (exposição de 24 h) afim de verificar se as concentrações a serem utilizadas nos testes de alimentação seriam subletais às espécies utilizadas como organismo-teste.

5.2.1. Experimentos com o inseticida fipronil

Para os experimentos com o fipronil foram obtidos os seguintes dados para os parâmetros abióticos da água (pH, condutividade e oxigênio dissolvido) e efeitos de toxicidade do fipronil (organismos imóveis) para *C. dubia* (Tabelas 9 e 10) e *C. silvestrii* (Tabelas 11 e 12).

Tabela 9. Parâmetros abióticos obtidos com o teste de toxicidade para *C. dubia* com Fipronil.

Amostra (µg /L)	Parâmetros iniciais			Parâmetros finais	
	pH	Condutividade (µS)	OD (mg/L)	pH	OD (mg/L)
Controle	7,65	128,5	7,55	7,78	7,6
0,4	7,63	195,8	7,55	7,85	7,63
0,8	7,74	193,1	7,58	7,91	7,69
1,2	7,7	193,9	7,53	7,88	7,76
1,6	7,71	196,0	7,60	7,90	7,75
2,0	7,73	195,6	7,62	7,88	7,79

Tabela 10. Porcentagem de organismos imóveis obtidos com o teste de toxicidade para *C. dubia* com Fipronil.

Organismos imóveis						
Amostra (µg /L)	1	2	3	4	Total	%
Controle	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0%
0,4	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0%
0,8	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0%
1,2	1/5	0/5	0/5	0/5	1	5%
1,6	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0%
2,0	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0%

Tabela 11. Parâmetros abióticos obtidos com o teste de toxicidade para *C. silvestrii* com Fipronil.

Amostra (µg /L)	Parâmetros Iniciais			Parâmetros Intermediários (antes das 4h)			Parâmetros Finais		
	pH	Condutividade (µS)	OD (mg/L)	pH	Condutividade (µS)	OD (mg/L)	pH	Condutividade (µS)	OD (mg/L)
Controle	7,62	167,6	8,87	7,81	173,0	7,69	7,17	66,7	7,52
0,4	7,67	172,4	9,18	7,86	174,0	7,65	7,14	65,4	7,36
0,8	7,71	170,9	7,38	7,81	175,1	7,59	7,26	72,5	7,37
1,2	7,72	169,2	7,36	7,83	174,8	7,67	7,44	78,1	7,4
1,6	7,66	169,8	9,09	7,63	174,6	7,62	7,52	79	7,41
2,0	7,45	172,1	9,04	7,73	174,2	7,68	7,45	78,4	7,27
Branco	-	-	-	7,72	174,0	7,58	7,49	76,4	7,31

Tabela 12. Porcentagem de organismos imóveis obtidos com o teste de toxicidade para *C. silvestrii* com Fipronil.

Amostra (µg /L)	Organismos imóveis				Total	%
	1	2	3	4		
Controle	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0%
0,4	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0%
0,8	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0%
1,2	1/5	0/5	0/5	0/5	1	5%
1,6	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0%
2,0	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0%

5.2.2. Experimentos com o herbicida 2,4-D

Para os experimentos com o 2,4-D foram obtidos os seguintes dados para os parâmetros abióticos da água (pH, condutividade e oxigênio dissolvido) e efeitos de toxicidade do 2,4-D (organismos imóveis) para *C. dubia* (Tabela 13) e *C. silvestrii* (Tabelas 14 e 15). Para *C. dubia* não houve organismos imóveis.

Tabela 13. Parâmetros obtidos com o teste de toxicidade para *C. dubia* com 2,4-D.

Amostra (µg /L)	pH	Parâmetros Iniciais			Parâmetros Intermediários (antes das 4h)			Parâmetros Finais		
		Condutividade (µS)	OD (mg/L)		Condutividade (µS)	OD (mg/L)	pH	Condutividade (µS)	OD (mg/L)	
Controle	7,89	174,4	7,68		7,64	79,9	7,82	7,17	173	7,69
4,0 x 10 ⁻⁴	7,90	187,6	7,75		7,47	47,4	7,83	7,14	174	7,65
5,0 x 10 ⁻⁴	7,83	193,7	7,44		7,47	38,4	7,80	7,26	175,1	7,59
6,0 x 10 ⁻⁴	7,88	196,1	7,73		7,45	37,2	7,79	7,44	174,8	7,67
7,0 x 10 ⁻⁴	7,89	200,0	7,69		7,48	44,2	7,89	7,52	174,6	7,62
8,0 x 10 ⁻⁴	7,89	205,0	7,69		7,55	81,2	7,85	7,45	174,1	7,68
Branco	-	-	-		7,47	29,7	7,84	7,49	174,0	7,58

Tabela 14. Parâmetros obtidos com o teste de toxicidade para *C. silvestrii* com 2,4-D.

Parâmetros Iniciais	Parâmetros Intermediários (antes das 4h)	Parâmetros Finais
---------------------	---	-------------------

Amostra (µg /L)	pH	Condutividade (µS)	OD (mg/L)	pH	Condutividade (µS)	OD (mg/L)	pH	Condutividade (µS)	OD (mg/L)
Controle	7,74	169,8	7,53	7,69	179,0	7,41	7,64	79,9	7,82
4,0 x 10 ⁻⁴	7,71	186,9	7,54	7,77	188,5	7,28	7,47	47,4	7,83
5,0 x 10 ⁻⁴	7,69	188,9	7,52	7,75	195,2	7,17	7,47	38,4	7,80
6,0 x 10 ⁻⁴	7,71	192,0	7,52	7,75	196,1	7,19	7,45	37,2	7,79
7,0 x 10 ⁻⁴	7,69	206,0	7,60	7,73	209,0	7,11	7,48	44,3	7,89
8,0 x 10 ⁻⁴	7,68	201,0	7,43	7,75	205,0	7,07	7,55	81,2	7,85
Branco	-	-	-	7,85	173,2	7,30	7,47	29,7	7,84

Tabela 15. Porcentagem de organismos imóveis obtidos com o teste de toxicidade para *C. silvestrii* com 2,4-D.

Organismos imóveis						
Amostra (µg /L)	1	2	3	4	Total	%
Controle	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0%
4,0 x 10 ⁻⁴	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0%
5,0 x 10 ⁻⁴	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0%
6,0 x 10 ⁻⁴	0/5	0/5	1/5	0/5	1	5%
7,0 x 10 ⁻⁴	1/5	0/5	0/5	0/5	0	5%
8,0 x 10 ⁻⁴	0/5	0/5	0/5	0/5	0	0%

5.3. Testes de alimentação

As análises estatísticas dos experimentos possibilitaram a compreensão dos efeitos dos agrotóxicos Regent® 800 WG (i.a. fipronil) e DMA® 806 BR (i.a. 2,4-D) sobre as taxas de filtração e ingestão dos cladóceros quando expostos durante 24 horas aos produtos formulados. Também permitiu o entendimento da capacidade de recuperação dos organismos submetidos ao teste de pós-exposição (sem contaminação) por um período de 4 horas.

5.3.1. Teste de alimentação do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*

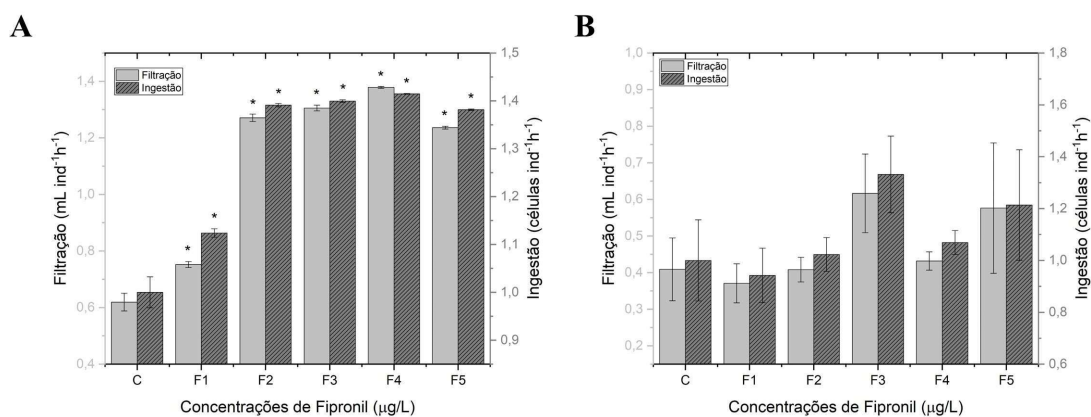
Em relação aos experimentos com a *C. silvestrii*, após as 24 horas de exposição aos agrotóxicos, os resultados mostraram, no caso do fipronil, que os cladóceros expostos tratamentos F1, F2, F3, F4, e F5 diferem do controle tanto em relação à filtração quanto ingestão, respectivamente (One Way ANOVA; F5 = 442,70, $p < 0.05$; Dunnet test, $p < 0.05$) e (One Way ANOVA; F5 = 166,07, $p < 0.05$; Dunnet test, $p < 0.05$; Figura 4). Observou-se que, as taxas de filtração e ingestão aumentaram concomitantemente com o aumento de concentração de fipronil. Desse modo, tal

resultado pode pressupor o aumento de vulnerabilidade e a construção de uma situação de estresse no cladócero, uma vez que o organismo possivelmente usou sua alimentação como meio de acelerar o metabolismo, demonstrando uma tentativa de desintoxicação (Araújo et al., 2019). Assim, o aumento das taxas de filtração e ingestão podem ser considerados fatores de distúrbios alimentares causado pela exposição do organismo ao fipronil.

Schamphelaere e Janssen (2004) também observaram que a exposição de *Daphnia magna* ao metal cobre (Cu) causou aumento nas taxas alimentares desse organismo. Foi ressaltado que alterações na alimentação do organismo estão intrinsicamente relacionadas a outros parâmetros vitais como sobrevivência, desenvolvimento, crescimento e reprodução do organismo (Maltby, 1994). Estudos demonstram que a avaliação na taxa de alimentação em cladóceros, na maioria dos casos é mais sensível do que a avaliação de mortalidade e reprodução (Taylor et al., 1998; Barata and Baird, 2000; Pereira et al., 2017).

Em contrapartida, os resultados de pós-exposição ao fipronil não apresentaram diferenças estatísticas significativas nas taxas de filtração e ingestão em comparação ao controle e assim, indicam uma provável recuperação da espécie *C. silvestrii* no período após 4 horas em meio não contaminado (One Way ANOVA; $F_5 = 1,123$, $p = 0,384$; One Way ANOVA; $F_5 = 1,193$, $p = 0,352$, respectivamente (Figura 4B).

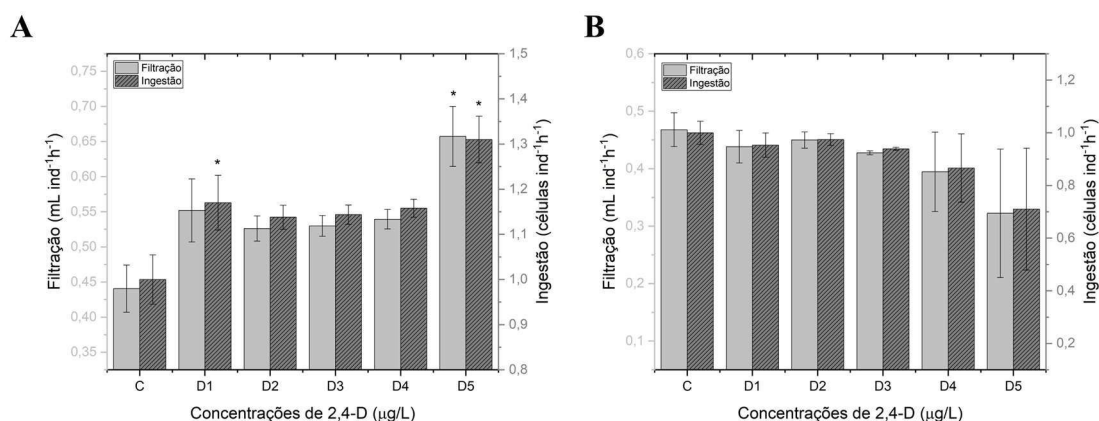
Figura 4. Dados de filtração e ingestão referente ao cladócero *C. silvestrii*, exposto ao composto Regent® 800 WG (i.a. fipronil) após 24h (A) e pós-exposição - 4 h (B).



Quanto aos testes realizados com o produto formulado de 2,4-D, foi possível observar que após o período de exposição de 24 horas, os efeitos referentes a taxa de filtração diferiram

estatisticamente para os organismos expostos ao tratamento D5, quando comparados aos do controle (One Way ANOVA; $F_5 = 5,07$, $p < 0.05$; Dunnet test, $p < 0.05$; Figura 5A). Na análise da taxa de ingestão, o controle difere estatisticamente das amostras D1 e D5 (One Way ANOVA; $F_5 = 5,38$, $p < 0.05$; Dunnet test, $p < 0.05$; Figura 5A). Portanto, para as amostras que continham o herbicida, observou-se através das análises, que ambas as taxas mantiveram uma constância independentemente da elevação nas concentrações de 2,4-D. Para as análises de pós-exposição, não foi observada nenhuma variação significativa nas taxas de filtração e ingestão (One Way ANOVA; $F_5 = 1,143$, $p = 0,374$; One Way ANOVA; $F_5 = 0,582$, $p = 0,714$; respectivamente (Figura 5B).

Figura 5. Dados de filtração e ingestão referente ao cladócero *C. silvestrii*, exposto ao composto DMA® 806 WG (i.a. 2,4-D) após 24h (A) e pós-exposição - 4 h (B).



Os resultados deste estudo, corroboram com os encontrados em Silva et. al. (2021), onde *C. silvestrii* foi exposta a estes dois agrotóxicos, tanto isolados quanto em mistura por um período de 4 dias e não foram observadas variações nas taxas de filtração pós-exposição. Tal fato também foi observado quando os cladóceros *D. magna* foram expostos ao inseticida carbaril, o qual não houve alteração da atividade alimentar do organismo em período de pós-exposição (De Coninck et al., 2013).

Diante dos dados obtidos, observou-se que o cladócero *C. silvestrii* apresenta maior sensibilidade ao composto fipronil quando comparado ao 2,4-D. Além disso, estudos anteriores, indicam que o inseticida é mais tóxico do que o herbicida para esse grupo taxonômico quando analisados diferentes parâmetros (sobrevivência, reprodução e taxa intrínseca de crescimento populacional) (Silva et. al., 2020; Moreira et al. 2020).

Por conseguinte, apesar da premissa de que não houve diferenças estatísticas significativas quanto a pós- exposição, é importante ressaltar que as espécies, em ambientes naturais, estão continuamente

expostas a determinado contaminante e/ou são expostas a mais tempo e mais de uma vez a diferentes compostos e.g., os agrotóxicos (Wu et al., 2016). Segundo Enserink (1991), mesmo em casos no qual não se observam efeitos deletérios sobre determinada espécie em testes isolados, o contato e interação de diferentes substâncias pode levar a alterações dos efeitos sobre os organismos, no qual, em ação conjunta, os agentes tóxicos podem causar efeitos potencializados. Assim, apesar dos testes de toxicidade isolados serem importantes e ajudar no entendimento dos impactos causados pelo uso de substâncias e seus efeitos sob organismos do ecossistema aquático, devemos considerar também seus efeitos em mistura, como já vem ocorrendo em outros estudos envolvendo agrotóxicos (Zhou et al., 2010; Mansano et al., 2020; Silva et al., 2021). Por isso, em estudos futuros, ao ser analisada a toxicidade de agrotóxicos sobre a capacidade alimentar de cladóceros, a inclusão de misturas desses compostos pode retratar importantes respostas, não obtidas quando são analisados efeitos de forma isolada.

5.3.2. Teste de alimentação do cladóceros *C. dubia*

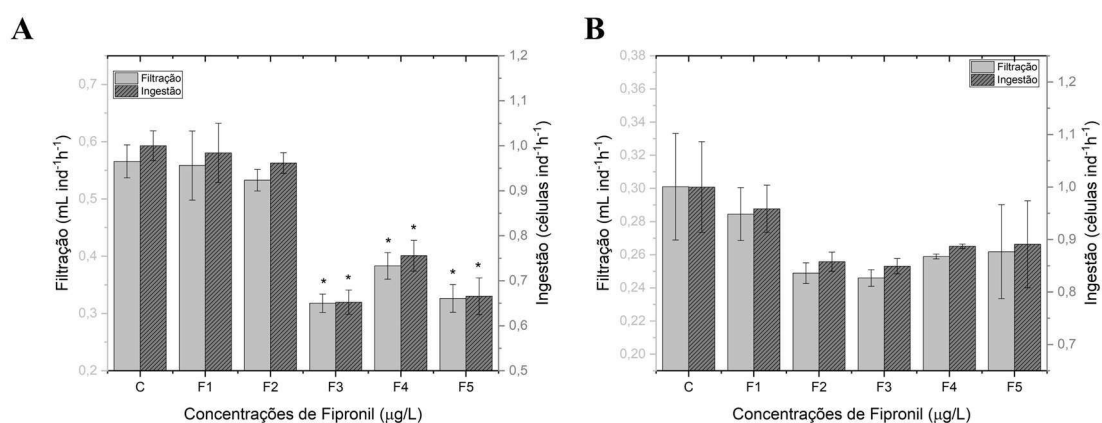
Nos experimentos realizados com a *C. dubia* em exposição ao fipronil, tanto as taxas de filtração quanto ingestão no período após as 24 horas de exposição, observou-se diferenças estatísticas dos tratamentos F3, F4 e F5 em relação ao controle, respectivamente (One Way ANOVA; $F_5 = 13,34$, $p < 0.05$; Dunnet test, $p < 0.05$) e (One Way ANOVA; $F_5 = 16,866$, $p < 0.05$; Dunnet test, $p < 0.05$; Figura 6A). Com base nessa análise, pode-se inferir que a partir da concentração F2, as concentrações de fipronil podem ser decisivas para a inibição das taxas de alimentação e de ingestão.

Essa diminuição significativa de taxas de alimentação pode estar relacionada a presença de partículas adsorvidas nos apêndices de filtragem e esse acúmulo pode ter prejudicado a sua capacidade de alimentação, assim como demonstram estudos anteriores com alto acúmulo e baixa depuração de NPs (Zhao e Wang, 2011; Zhu et al., 2010) e aglomerados aderidos ao aparelho de filtragem (Asghari et al., 2012; Ribeiro et al., 2014). Em suma, agrotóxicos são substâncias com potencial de alteração na taxa de alimentação dos cladóceros, uma vez que, a alimentação desses organismos é dependente do movimento do apêndice, que é coordenado pelo sistema nervoso e que por sua vez, pode ter sua função prejudicada pela exposição a inseticidas (Villarreal et al., 1999).

A análise estatística de pós-exposição não apresentou nenhuma alteração significativa para as taxas de filtração (One Way ANOVA; $F_5 = 1,294$, $p = 0,31$; Figura 6B) e ingestão (One Way ANOVA; $F_5 = 1,256$, $p = 0,355$; Figura 6B). Isso pode indicar que o curto período de análise (4

horas) não constata efeitos que podem ocorrer em exposições mais prolongadas. Embora as avaliações com agrotóxicos realizadas a curto prazo apresentem a potencialidade de levar a perdas individuais e populacionais para as espécies em questão, o que ocasiona uma série de alterações na estrutura da comunidade aquática (Beketov e Liess, 2008; Liess, 2002; Liess et al., 2006), experimentos de longo prazo realizados com inseticidas apontam que esses efeitos podem permanecer ao longo das gerações (Hanson et al., 2007; Liess e Beketov, 2011). Especificamente, no caso de aplicações com o fipronil, após a utilização sucessiva deste e do inseticida imidacloprida, organismos como artrópodes, macroinvertebrados, zooplâncton e comunidades de peixes sofreram efeitos tóxicos suficientes para desestabilizar o sistema aquático por dois anos (Hayasaka et al., 2012).

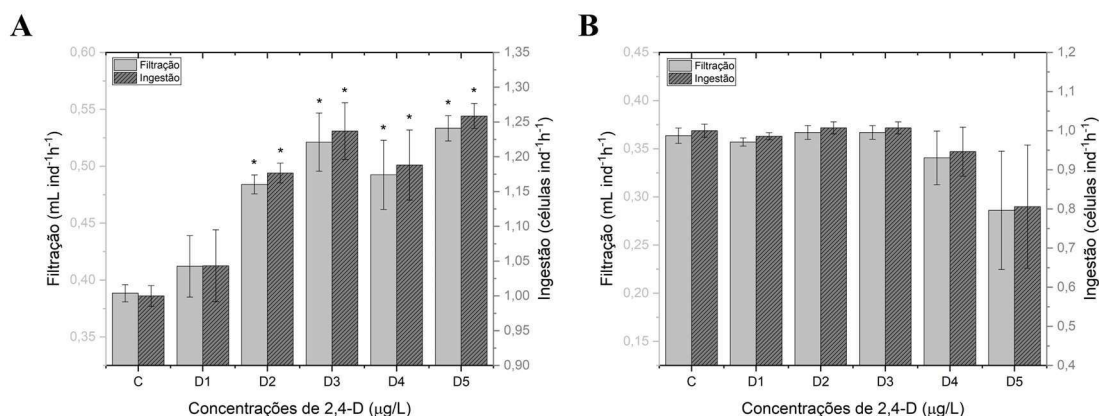
Figura 6. Dados de filtração e ingestão referente ao cladócero *C. dubia*, exposto ao composto Regent® 800 WG (i.a. fipronil) após 24h (A) e pós-exposição - 4 h (B).



Em relação aos testes executados com o produto formulado de 2,4-D e *C. dubia*, os resultados estatísticos demonstram que no período de 24 horas, as amostras D2, D3, D4 e D5 diferem consideravelmente do controle, em ambas as taxas de filtração e ingestão, respectivamente (One Way ANOVA; $F_5 = 8,136$, $p < 0.05$; Dunnet test, $p < 0.05$) e (One Way ANOVA; $F_5 = 8,745$, $p < 0.05$; Dunnet test, $p < 0.05$; Figura 7A). Estudos apontam que o consumo de alimentos pode representar até 40% do gasto de energia de cladóceros (Philippova et al., 1988; Barber et al., 1994) e que, os compostos como o herbicida 2,4-D diminuem o metabolismo (Barber et al., 1994) e consequentemente, diminuem a filtração e ingestão desse grupo de cladóceros. No entanto, os efeitos dessa análise demonstram que as taxas de filtração e ingestão foram maiores quando o organismo estava exposto ao composto, demonstrando a importância de aumentar o número de estudos com diferentes organismos, pois os efeitos de xenobióticos são espécie-específico.

Em contrapartida, não foi possível observar diferenças expressivas no comportamento de filtração (One Way ANOVA; $F_5 = 1,25$, $p = 0,327$; Figura 11) e ingestão (One Way ANOVA; $F_5 = 1,246$, $p = 0,329$; Figura 7B) no período de pós-exposição. Os resultados de pós-exposição dos cladóceros *C. dubia* demonstraram majoritariamente respostas de equilíbrio das taxas de filtração e ingestão, quando comparadas ao controle. No entanto, houve uma diminuição nas taxas de filtração e ingestão na concentração máxima do experimento, embora não tenha sido significativa estatisticamente. Pode-se ter como hipótese, o fato de que o zooplâncton possa ter diminuído a sua energia gasta com alimentação e filtração para utilizar seu gasto energético para atender outras atividades vitais como respiração, movimentação e desintoxicação.

Figura 7. Dados de filtração e ingestão referente ao cladócero *C. dubia*, exposto ao composto DMA® 806 WG (i.a. 2,4-D) após 24h (A) e pós-exposição - 4 h (B).



Ao comparar os resultados nos dois gráficos, não foi possível estabelecer um padrão em relação as taxas de filtração e ingestão às concentrações de 2,4-D, o que torna evidente que houve um desequilíbrio funcional da espécie, devido a oscilação de ambas as taxas, provavelmente ocasionado pela adição de agrotóxico aos testes. Por fim, pode-se observar maior sensibilidade da

C. dubia ao composto 2,4-D quando comparada à resposta de *C. silvestrii* a esse herbicida.

5.3.3. Efeitos de agrotóxicos sobre a alimentação de cladóceros

Por fim, foi possível sumarizar os resultados obtidos no presente estudo através da tabela 16.

Tabela 16. Respostas dos testes de alimentação realizados com cladóceros como organismo-teste após sofrerem exposição ao Fipronil e 2,4-D

Composto (Agrotóxico)	Cladóceros	Período	Resposta observada na alimentação (ingestão e filtração)
Fipronil	<i>C. silvestrii</i>	Após 24h	Aumento
Fipronil	<i>C. silvestrii</i>	Após 4h	Oscilação
2,4-D	<i>C. dubia</i>	Após 24h	Aumento
2,4-D	<i>C. dubia</i>	Após 4h	Diminuição
Fipronil	<i>C. dubia</i>	Após 24h	Oscilação
Fipronil	<i>C. dubia</i>	Após 4h	Oscilação
2,4-D	<i>C. silvestrii</i>	Após 24h	Aumento
2,4-D	<i>C. silvestrii</i>	Após 4h	Diminuição

Apesar das espécies *C. dubia* e *C. silvestrii* apresentarem similaridade tanto no ciclo de vida e na sensibilidade a substâncias químicas, os resultados obtidos para *C. silvestrii*, expressam maior realismo as condições dos ambientes tropicais e subtropicais. Por isso os testes com as espécies são de suma importância para fundamentar leis e normas que estabelecem limites de concentrações seguras para o descarte de produtos nos corpos d'água visando a proteção da vida aquática.

Estudos anteriores também demonstraram diferentes efeitos de agrotóxicos sobre a alimentação de cladóceros e estão apresentados na tabela 17. Nela, podemos observar o composto, a resposta observada, a forma de avaliação do teste de alimentação e a metodologia de análise.

Tabela 17. Respostas de testes de alimentação realizados com cladóceros como organismo-teste com diferentes agrotóxicos.

Composto (Agrotóxico)	Resposta observada na alimentação	Forma de avaliação	Metodologia
-----------------------	-----------------------------------	--------------------	-------------

Acetaprimida	Diminuição	Atividade do membro torácico	Análise digital de vídeo
Cipermetrina	Diminuição	Atividade do membro torácico	Análise digital de vídeo

Deltametrina	Diminuição	Taxa de alimentação	Estimativa espectofotométrica da densidade de alga no meio
Carbaryl	Sem efeito	Filtração	Determinação da mudança do número de células no meio
Fenvalerato	Diminuição	Filtração	Determinação da mudança do número de células no meio
Tetradifon	Diminuição	Taxa de alimentação	Determinação da mudança do número de células no meio
Endosulfan	Diminuição	Filtração, taxa de ingestão	Determinação da mudança do número de células no meio
Diazinon	Diminuição	Filtração, taxa de ingestão	Determinação da mudança do número de células no meio
Cyhalotrina	Diminuição	Atividade do membro torácico, taxa de alimentação	Estimativa espectofotométrica da densidade de alga no meio

Fonte: Adaptado de Bownil (2019).

O zooplâncton possui um papel ecológico importante, desde participar da cadeia alimentar, ingerindo microorganismos como bactérias, protozoários e microalgas. São considerados como organismos estratégicos na dissipação energética dos ecossistemas aquáticos e na manutenção e orientação das teias tróficas aquáticas (Roche; Rocha, 2005). Desse modo, a inibição ou estímulo da atividade alimentar pode resultar em alterações na estrutura e dinâmica de funcionamento ecossistêmico (Ngai & Srivastava, 2006).

Desse modo, o desequilíbrio da atividade alimentar em cladóceros ocasionada pela presença de compostos como fipronil e 2,4-D e outros agrotóxicos como indicado na tabela 17 pode afetar diretamente a cadeia trófica aquática. O cenário pode ser mais preocupante em relação a comunidade zooplancônica que vive em corpos d'água localizados próximos a áreas agrícolas ou industriais, onde a concentração desses contaminantes pode ser maior do que as testadas no presente estudo para o fipronil, como por exemplo, o fipronil já foi detectado em uma concentração ambiental de até 465 µg/L no estado de São Paulo (CETESB 2018) e ao redor do mundo as concentrações variaram de 0,7 a 153 µg/L de fipronil (Fang et. al., 2019).

6. Conclusão

Este estudo mostrou que apesar das espécies serem monofiléticas, ambas apresentaram respostas distintas no que diz respeito a capacidade alimentar (filtração e ingestão), quando expostas aos agrotóxicos fipronil e 2,4-D por 24 horas. Sendo que, *C. silvestrii* apresentou maior sensibilidade ao fipronil, enquanto que, *C. dubia* demonstrou maior sensibilidade ao 2,4-D. Na avaliação de pós-exposição, em meio sem contaminação, ambas as espécies não apresentaram diferenças estatísticas nas taxas de filtração e ingestão, demonstrando um possível mecanismo de recuperação dos efeitos da exposição aos compostos.

7. Referências Bibliográficas

- ABRASCO - Associação Brasileira de Saúde Coletiva, 2012. Grupo Inter GTs de Diálogos e Convergências da ABRASCO Comissão Executiva do Dossiê Rio de Janeiro. World Nutrition.
- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2017. Aquatic Ecotoxicology – Chronic Toxicity – Test with *Ceriodaphnia* spp. (Crustacea, Cladocera), Rio de Janeiro, Brazil.
- ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2011. NBR 12648. Ecotoxicologia aquática – toxicidade crônica – método de ensaio com algas (Chlorophyceae). Rio de Janeiro, 24 p.
- AENDA – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS DEFENSIVOS GENÉRICOS. Produtos registrados no Brasil – fevereiro 2019. Aenda, 2019
- AFNOR - Association Française de Normalisation, 1980. Essais des eaux. Détermination de l'inhibition de *Scenedesmus subspicatus* par une substance. Norme Exp. T90-T304.
- Albuquerque, A.F. et al., 2016. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. Environ. Sci.: Processes Impacts, 00, pp.1-9.
- Allen, Y., Calow, P., Baird, D.J., 1995. A mechanistic model of contaminant-induced feeding inhibition in *Daphnia magna*. Environ. Toxicol. Chem. 14 (9): 1625-1630.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regularização de produtos agrotóxicos. Monografias autorizadas. 2020. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>>. Acesso em: jul. 2020.
- Araújo, G.S., Pinheiro, C., Pestana, J.L.T., Soares, A.M.V.M., Abessa, D.M.S., Loureiro, S., 2019. Toxicity of lead and mancozeb differs in two monophyletic *Daphnia* species. Ecotoxicol. Environ. Saf. 178, 230–238. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.03.095>
- Aruoja, V., Dubourguier, H.C., Kasements, K., Kahru, A., 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. Sci. Total Environ. 407, 1461-1468.
- Asghari, S., Johari, S.A., Lee, J.H., Kim, Y.S., Jeon, Y.B., Choi, H.J., Yu, I.J., 2012. Toxicity of various silver nanoparticles compared to silver ions in *Daphnia magna*. J. Nanobiotechnol. 10 (14), 1-11.
- Beketov, M.A., Liess, M., 2008. Acute and delayed effects of the neonicotinoid insecticide thiacloprid on seven freshwater arthropods. Environ. Toxicol. Chem. 27, 461–470.
- Barata, C., Baird, D.J., 2000. Determining the ecotoxicological mode of action of chemicals from measurements made on individuals: results from instar-based tests with *Daphnia magna* Straus. Aq. Toxicol. 48, 195–209. [https://doi.org/10.1016/S0166-5534\(99\)00038-7](https://doi.org/10.1016/S0166-5534(99)00038-7)

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.

Baun, A., Kloeft, L., Bjerg, P. L. & Nyholm, N., 1999, Toxicity testing of organic chemicals in groundwater polluted with landfill leachate. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18(9): 2046-2053.

Barata, C., Baird, D.J., 2000. Determining the ecotoxicological mode of action of chemicals from measurements made on individuals: results from instar-based tests with *Daphnia magna* Straus. *Aquatic Toxicology* 48, 195–209. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(99\)00038-7](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00038-7)

Berner, D.B. 1986. Taxonomy of *Ceriodaphnia* (Crustacea: Cladocera) in U.S. Environmental Protection Agency cultures. EPA/600/4-86/032.

Bonaventura, C. and Johnson, FM. 1997. Healthy environments for healthy people: bioremediation today and tomorrow. *Environmental Health Perspectives*, vol. 105, no. 1, p. 5-20. PMID:9114274 PMCID:PMC1470315.

Benli, A.Ç.K., Sarakaya, R., Sepici-Dincel, A., Selvi, M., Sahin, D., Erkoç, F. 2007. Investigation of acute toxicity of (2,4-dichlorophenoxy) acetic acid (2,4-D) herbicide on crayfish (*Astacus leptodactylus* Esch. 1823). *Pestic Biochem and Physiol*, 88, 296–299.

Beketov, M.A., Liess, M., 2008. Acute and delayed effects of the neonicotinoid insecticide thiacloprid on seven freshwater arthropods. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 461–470.

Bownik, A. & Szabelak, 2021 A. Short-term effects of pesticide fipronil on behavioral and physiological endpoints of *Daphnia magna*. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 33254–33264.

Campos, B., Rivetti, C., Rosenkranz, P., Navas, J.M., Barata, C., 2013. Effects of nanoparticles of TiO₂ on food depletion and life-history responses of *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 130 - 131, 174 - 183.

Carneiro, F. F. et al. Dossiê Abrasco: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. EPSJV/Expressão Popular, 2015.

Casali-Pereira MP, Daam MA, Resende JC, Vasconcelos AM, Espíndola ELG, Botta CM ,2015. Toxicity of Vertimec® 18 EC (active ingredient abamectin) to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. *Chemosphere* 139:558–564.

CEPEA - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada; PIB do Agronegócio – Dados de 1995 a 2015. Universidade de São Paulo, 2016.

CEPEA- Esalq/USP - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. PIB do Agronegócio de São Paulo, 2022. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/pib-do-agronegocio-de-sao-paulo.aspx>.

CETESB, 2018. Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2017, Relatórios. Série Relatórios / CETESB, São Paulo.

Chingombe, P., Saha, B., Wakeman, R. J., 2006. Effect of surface modification of activated carbon on the sorption of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid and benazolin from water. J of Coll and Interf Sci 297:434-442.

da Conceição, A. A., Albertoni, E. F., Milesi, S. V. & Hepp, L. U., 2020. Influence of Anthropic Impacts on the Functional Structure of Aquatic Invertebrates in Subtropical Wetlands. Wetlands 40, 2287–2296. CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento; Acompanhamento da Safra Brasileira, 2016. V. 2 – Safra 2015/2016 – N4.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira, a 2022. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras>

Coutinho, F. B., Tanimoto, S. T., Galli, A., Garbellini, G. S., Takayama, M., Amaral, R. B., Mazo, L. H., Avaca, L. A., Machado, S.A.S., 2005. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. Pesticidas: R de Ecotoxicol e Meio Amb. 15, 65-72.

Das, P.C., Cao, Y., Cherrington, N., Hodgson, E., Rose, R.L., 2006. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. Chem-Biol Interac 164:200-214.

Day, K., Kaushik, N.K., 1987. Short-term exposure of zooplankton to the synthetic pyrethroid, fenvalerate, and its effects on rates of filtration and assimilation of the alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 16, 423–432. <https://doi.org/10.1007/BF01055263>

De Coninck, D. I., De Schamphelaere, K. A., Jansen, M., De Meester, L., Janssen, C. R., 2013. Interactive effects of a bacterial parasite and the insecticide carbaryl to life-history and physiology of two *Daphnia magna* clones differing in carbaryl sensitivity. Aquat. Toxicol. 130 -131, 149 – 159.

De Schamphelaere, K.A.C., Janssen, C.R., 2004. Effects of chronic dietary copper exposure on growth and reproduction of *Daphnia magna*. Environ. Toxicol. and Chem. 23, 2038 -2047.

De Schamphelaere, K. A. C., Vandenbrouck, T., Muysen, B. T. A., Soetaert, A., Blust R., De Coen, W., Janssen, C. R. (2008). Integration of molecular with higher-level effects of dietary zinc exposure in *Daphnia magna*. Comparative Biochemistry & Physiology Part D Genomics Proteomics, 3, 307-314.

Dickman, E. M., Newell, J. M., González, M. J., Vanni, M. J., 2008. Light, nutrients, and food-chain length constrains planktonic energy transfer efficiency across multiple trophic levels. Department of Zoology, Miami University, Oxford. OH 45056.

Edwards, C.A. 2002. Assessing the effects of environmental pollutants on soil organisms, communities, processes and ecosystem. European Journal of Soil Biology, 38(3-4), 225-231.

Enserink, E.L., Maas-Diepeveen, J.L., Van Leeuwen, C.J., 1991. Combined Effects of Metals; an Ecotoxicological Evaluation. Water Research 25, 679–687.

Evens, R., De Schamphelaere, K. A. C., De Laender, F., & Janssen, C. R. ,2012. The effects of Zn-contaminated diets on *Daphnia magna* reproduction may be related to Zn-induced changes of the dietary P content rather than to the dietary Zn content itself. Aq. Toxicol., 110- 111, 9-16.

European Commission. Plants – EU pesticides database. 2020b. Disponível em: <<http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=active-substance.selection&language=EN>>. Acesso em: jul. 2020.

Fang, W., Peng, Y., Muir, D., Lind, J., Zhang, X., 2019. A critical review of synthetic chemicals in surface waters of the US, the EU and China. *Environ. Int.* 131, 104994.

FAO, 2019. Countries by commodity [WWW Document]. FAOSTAT. URL http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity. Acessado em fevereiro de 2020.

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. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.05.012>

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

Gibbons D, Morrissey C, Mineau P. ,2015. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environ Sci Pollut Res* 22:103–118.

Griffitt, R.J., Luo, J., Gao, J., Bonzongo, J.C., Barber, D.S., 2008. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (9), 1972-1978.

Gilio, L. & de Moraes, M.A.F.D., 2016. Sugarcane industry's socioeconomic impact in São Paulo, Brazil: A spatial dynamic panel approach. *Energy Economics*.

Grisolia, C.K. 2005. Agrotóxicos: mutação, câncer e reprodução. Brasília: Editora Universidade de Brasília. 392 p.

Hanson, M.L., Graham, D.W., Babin, E., Azam, D., Coutellec, M.-A., Knapp, C.W., Lagadic, L., Caquet, T., 2007. Influence of isolation on the recovery of pond mesocosms from the application of an insecticide. I. Study design and planktonic community responses. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1265–1279.

Hayasaka D, Korenaga T, Suzuki K, Sánchez-Bayo F, Goka K ,2012 Differences in susceptibility of five cladoceran species to two systemic insecticides, imidacloprid and fipronil. *Ecotoxicology* 21: 421–427.

Hussain A, Audira G, Malhotra N, Uapipatanakul B, Chen JR, Lai YH, Hsiao CD ,2020 Multiple screening of pesticides toxicity in Zebrafish and *Daphnia* based on locomotor activity alterations. *Biomol.* 10:1224.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos recursos Naturais Renováveis ,2014. Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos. Disponível em: [<http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/tudo>], Acesso: 10/01/ 2020.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializa-cao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>>. Acesso em: jul. 2020.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis . Relatório de comercialização de agrotóxicos: Boletim 2019. Available at: <http://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de696agrotoxicos#sobreosrelatorios>. Acesso: 06/10/2021.

IBGE - IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Produção Agrícola Municipal 2020. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/31672-pam-2020-valor-da-producao-agricola-nacional-cresce-30-4-e-chega-a-r-470-5-bilhoes-recorde-da-serie>

I. Barber, D.J. Baird, P. Calow, 1994. Effect of cadmium and ration level on oxygen consumption, RNA concentration and RNA-DNA ratio in two clones of *Daphnia magna* Dtraus, Aq. Toxicol. 30 249–258.

IEA – Instituto de Economia Agrícola. Banco de dados, São Paulo. ,2016. Disponível em: www.iea.sp.gov.br/>. Acesso: 20/08/2021.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Exposição no trabalho e no ambiente. **Agrotóxico**. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

Islama, F., Wanga, J., Farooq, M.A., Khan, M.S.S., Xu, L., 2018. Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. Environ. Int. 111, 332e351.

Itoh, K., Kinoshita, M., Morishita, S., Chida, M., Suyama, K. 2013. Characterization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid-degrading fungi in Vietnamese soils. FEMS Microbiol Ecol 84:124-132.

Liess, M., Beketov, M., 2011. Traits and stress: keys to identify community effects of low levels of toxicants in test systems. Ecotox. 20, 1328–1340. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0689-y>

Liess, M., Pieters, B.J., Duquesne, S., 2006. Long-term signal of population disturbance after pulse exposure to an insecticide: rapid recovery of abundance, persistent alteration of structure. Environ. Toxicol. Chem. 25, 1326–1331. <https://doi.org/10.1897/05-466r.1>

Liess, M., 2002. Population response to toxicants is altered by intraspecific interaction. Environmental Toxicology and Chemistry 21, 138–142. <https://doi.org/10.1002/etc.5620210120>

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, 1716–1726. <https://doi.org/10.1002/etc.198>

Lu, G., Yang, H., Xia, J., Zong, Y., Liu, J., 2017. Toxicity of Cu and Cr nanoparticles to *Daphnia magna*. Water Air Soil Pollut. 228, 1e13.

Machado, F.B.P., 2003. Brasil, a doce terra – História do Setor. ProCana. Disponível em: [<https://www.jornalcana.com.br/brasil-a-doce-terra-historia-do-setor/>], Acesso: 10/01/2020.

Maltby, L., 1994. Stress, shredders and streams: Using Gammarus energetics to assess water quality. pp. 98–110. In: Sutcliffe, D.W. (ed.) Water quality & stress indicators in marine and freshwater systems: linking levels of organisation. Ambleside, UK, Freshwater Biological Association.

Mansano, A.S., Souza, J.P., Cancino-Bernardi, J., Venturini, F.P., Marangoni, V.S., Zucolotto, V., 2018. Toxicity of copper oxide nanoparticles to Neotropical species *Ceriodaphnia silvestrii* and *Hyphessobrycon eques*. Environ. Pollut. 243: 723-733.

Mansano, A. S. Efeitos dos agrotóxicos diuron e carbofuran, isolados e em mistura, sobre organismos aquáticos e avaliação de risco ecológico. Tese de doutorado em Ecologia e Recursos Naturais - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2016.

McWilliam, R.A., Baird, D.J., 2002. Postexposure feeding depression: a new toxicity endpoint for use in laboratory studies with *Daphnia magna*. Environ. Toxicol. Chem. 21 (6): 1198-1205.

Marchesan, E., Sartori, G.M.S., Avila, L.A., Machado, S.L.O., Zanella, R., Primel, E.G., Macedo, 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. Cienc Rural 40:1053-1059.

Martinelli, L.A., Filoso, S., 2008. Expansion of sugarcane ethanol production in Brazil: environmental and social challenges. Ecol. Appl. 18, 885–898.

Ngai JT, Srivastava DS (2006) Predator accelerate nutrient cycling in a bromeliad ecosystem. Science, 214, 963-963.

Ngim, K.K., Crosby, D.G., 2001. Abiotic processes influencing fipronil and desethiofipronil dissipation in California, USA, rice fields. Environ Tox Chem 20(5): 972-977.

Oruç, E.O., Sevgiler, Y., Uner, N., 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. Comp Biochem and Physiol-Part C. 137, 43-51.

Pelaez, V.M., Silva, L.R. da, Guimarães, T.A., Ri, F.D., Teodorovicz, T., 2015. A(des)coordenação de políticas para a indústria de agrotóxicos no Brasil. Rev.Bras. de Inov. 14, 153–178. <https://doi.org/10.20396/rbi.v14i0.8649104>

Pereira, A.S., Cerejeira, M.J., Daam, M.A., 2017. Toxicity of environmentally realistic concentrations of chlorpyrifos and terbuthylazine in indoor microcosms. Chem. 182, 348–355. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.032>

Pinto TJDS, Freitas JS, Moreira RA, Silva LCM, Yoshii MPC, Lopes LFDP, Goulart BV, Vanderlei MR, Athayde DB, Fraga PD, Ogura AP, Schiesari L, Montagner CC, Daam MA, Espindola ELG (2021a). Functional responses of *Hyalella meinerti* after exposure to environmentally realistic concentrations of 2,4-D, fipronil, and vinasse (individually and in mixture). Aquat Toxicol 231:105712.

Reginatto, Valéria. Avaliação do ensaio de toxicidade com a alga *Scenedesmus subspicatus* para o estudo de efluentes industriais. Universidade Estadual de Campinas —Instituto de química. Tese doutorado. 1998.

Ribeiro, F., Gallego-Urrea, J.A., Jurkschat, K., Crossley, A., Hasselov, M., Taylor, C., & Soares, A.M.V.M., Loureiro, S., 2014. Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. *Sci. Total Environ.* 466, 232e241.

Rocha, O., Wisniewski, M. J. S., & Matsumura-Tundisi, T., 2011. Checklist of freshwater Cladocera from São Paulo State, Brazil. *Biota Neo.*, 11(1a).

Roche, K.F.; Rocha, O. Aspectos de predação por peixes e, lagos e represas, com enfoque na planctivoria. In: Roche, K.F.; Rocha, O. *Ecologia trófica de peixes com ênfase na planctivoria em ambientes lênticos de água doce no Brasil*. 1 ed. São Carlos: Rima. 2005, p.1-24.

Santos, M.A.P.F., Melão, M.G.G., Lombardi, A.T., 2006. Life history characteristics and production of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera) under different experimental conditions. *Acta Limnol. Bras.* 18, 199–212.

Silva, L.C.M., Moreira, R.A., Pinto, T.J.S., Ogura, A.P., Yoshii, M.P.C., Lopes, L.F.P., Montagner, C.C., Goulart, B.V., Daam, M.A., Espíndola, E.L.G., 2020. Acute and chronic toxicity of 2,4-D and fipronil formulations (individually and in mixture) to the Neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. *Ecotoxicology* 29: 1462-1475.

Singer, H. et al., 2010. Determination of biocides and pesticides by on-line solid phase extraction coupled with mass spectrometry and their behaviour in wastewater and surface water. *Environ. Poll.*, 158(10), pp.3054–3064.

Souza, J.P., Venturini, F.P., Santos, F., Zucolotto, V., 2018. Chronic toxicity in *Ceriodaphnia dubia* induced by graphene oxide. *Chemosphere* 190, 218e224.

Systat, 2008. Systat Software, Incorporation SigmaPlot for Windows version 11.

Tingle, C.C., Rother, J.A., Dewhust, C.F., Lauer, S., King, W.J., 2003. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Rev Environ Contam Toxicol.* 176, 1-66.

Taylor, G., Baird, D.J., Soares, A.M.V.M., 1998. Surface binding of contaminants by algae: Consequences for lethal toxicity and feeding to *Daphnia magna* straus. *Environ. Toxicol. and Chem.* 17, 412–419. <https://doi.org/10.1002/etc.5620170310>

T.G. Philippova, A.L. Postnov, 1988. The effect of food quantity on feeding and metabolic expenditure in Cladocera, *Intern. Revue der gesamten Hydrobiol. und Hydrog.* 73 601–615.

USEPA - United States Environmental Protection Agency., 2002. *Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms*. Washington, DC.

Villarroel, M.J., Ferrando, M.D., Sancho, E., Andreu, E., 1999. *Daphnia magna* Feeding Behavior after Exposure to Tetradifon and Recovery from Intoxication. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 44, 40–46. <https://doi.org/10.1006/eesa.1999.1817>

Wang C, Qian Y, Zhang X, Chen F, Zhang Q, Li Z, Zhao M ,2016. A metabolomic study of fipronil for the anxiety-like behavior in zebrafish larvae at environmentally relevant levels. *Environ Poll.*211:252–258.

Wu, X., Cobbina, S.J., Mao, G., Xu, H., Zhang, Z., Yang, L., 2016. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 8244–8259.

Xiao, Y., Peijnenburg, W.J., Chen, G., Vijver, M.G., 2016. Toxicity of Copper nanoparticles to *Daphnia magna* under different exposure conditions. *Sci. Total Environ.* 563, 81-88.

Zhu, X., Chang, Y., Chen, Y., 2010. Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. *Chemosphere* 78 (3), 209e215.

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. *Journal of Environmental Science*, 22(3), 433-440.

Zhao, J., Wang, Z., Liu, X., Xie, X., Zhang, K., Xing, B., 2011. Distribution of CuO nanoparticles in juvenile carp (*Cyprinus carpio*) and their potential toxicity. *J. Hazard Mater.* 197, 304e310.