

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

NATÁLIA CARDOSO GALLO

**Efeito dos agrotóxicos fipronil, 2,4-D e suas misturas sobre *Daphnia similis*:
Uma abordagem de múltiplos parâmetros**

São Carlos (SP)
2022

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

NATÁLIA CARDOSO GALLO

**Efeito dos agrotóxicos fipronil, 2,4-D e suas misturas sobre *Daphnia similis*:
Uma abordagem de múltiplos parâmetros**

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: Raquel Aparecida Moreira

São Carlos (SP)
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).

C172e Cardoso Gallo, Natália
 Efeito dos agrotóxicos fipronil, 2,4-D e suas
 misturas sobre *Daphnia similis*: Uma abordagem de
 múltiplos parâmetros / Natália Cardoso Gallo;
 orientadora Raquel Aparecida Moreira. São Carlos, 2022.

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

 1. zooplâncton. 2. toxicidade aguda. 3. toxicidade
 crônica. 4. misturas de agrotóxicos. 5. taxas de
 filtração e ingestão. 6. distribuição de sensibilidade
 das espécies (SSDs). I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): **Natália Cardoso Gallo**

Data da Defesa: 13/06/2022

Comissão Julgadora:

Resultado:

Dra. Raquel Aparecida Moreira (Orientador(a))

APROVADA

Dra. Mariana Miguel

APROVADA

Dra. Livia Pitombeira de Figueirêdo

APROVADA



Prof. Dr. Marcelo Zaiat

Coordenador da Disciplina 1800091- Trabalho de Graduação

DEDICATÓRIA

Dedido este trabalho a minha mãe Rosangela e meu pai Almir, por todo apoio na minha vida pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rosangela e Almir, que desde pequena acreditaram na educação como uma ferramenta transformadora e investiram esforços e recursos para que eu conseguisse atingir meus objetivos. Obrigado pelo suporte em cada etapa da minha trajetória, pela sabedoria compartilhada e por vibrarem comigo a cada conquista.

À minha irmã, Beatriz, que para mim é sinônimo de força, resiliência e empatia. Obrigada por ser uma inspiração e me mostrar o quanto ter coragem para correr atrás dos seus sonhos é não só recompensador, mas libertador. Você me mostrou nos seus gestos que, com determinação e foco, o céu é o limite.

Ao Diego, que foi o meu pilar ao longo da graduação, me ajudando a levantar nos momentos difíceis e me trazendo incontáveis momentos de alegria. Obrigada por sempre acreditar em mim e me fazer querer ser uma pessoa melhor a cada dia.

À todos os amigos que ganhei durante a permanência na universidade, com um agradecimento especial à Isabela e Rafael, que tornaram essa caminhada mais leve e prazerosa. Com vocês pude absorver ensinamentos que vão além da graduação, e levarei para a vida.

À minha orientadora, Raquel, que com seu conhecimento e profissionalismo, alinhado a paciência e leveza na condução de todo o projeto, me mostrou o caminho para conhecer mais sobre o universo da Ecotoxicologia. Sou extremamente grata pela atenção e tempo dedicado a este trabalho. Tenho uma admiração muito grande pela pessoa que você é.

Aos colegas do NEEA, que me acolheram desde o início dessa pesquisa, e contribuíram com sugestões, troca de experiências, opiniões durante o planejamento e execução dos testes, palavras de incentivo e momentos de descontração.

Aos técnicos do NEEA, Amândio e Marcelo, pelo suporte ao longo dos experimentos, além da disponibilidade para compartilhar um pouco dos aprendizados adquiridos pela experiência no laboratório ao longo dos anos.

À Universidade de São Paulo e a FAPESP, que tornaram possível o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

Gallo, Natália Cardoso. **Efeito dos agrotóxicos fipronil, 2,4-D e suas misturas sobre *Daphnia similis*: Uma abordagem de múltiplos parâmetros.** 2022. 61 f. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Curso de Engenharia Ambiental, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

O uso indiscriminado de agrotóxicos vem sendo motivo de preocupação em todo o mundo em decorrência dos graves impactos ambientais. No Brasil, dentre os agrotóxicos amplamente utilizados em monoculturas de cana-de-açúcar encontram-se o inseticida Regent® 800 WG, cujo princípio ativo é o fipronil, e o herbicida DMA® 806 BR, cujo princípio ativo é o 2,4-D. A busca pela eficiência da produção agrícola faz com que, frequentemente, diferentes produtos sejam aplicados simultaneamente e em doses maiores do que as recomendadas. Por esta razão, atualmente estudos com agrotóxicos estão também levando em consideração as misturas desses contaminantes. Dentro deste contexto, o presente estudo teve como principal objetivo investigar, através de diferentes parâmetros, os efeitos dos agrotóxicos Regent® 800 WG e DMA® 806 BR, isolados e em misturas sobre o cladóceros *Daphnia similis*. Para isso, foram realizados testes de toxicidade aguda com os compostos agindo de forma isolada e em mistura, sendo avaliado a sobrevivência dos organismos; testes de toxicidade crônica com os compostos isolados, levando em consideração três parâmetros de avaliação: reprodução, a estrutura em tamanho das fêmeas e das neonatas produzidas em todas as ninhadas do período experimental. Nesse estudo, também foram analisados os parâmetros fisiológicos de *D. similis*, através de análises das taxas de alimentação (filtração e ingestão) em cenários de exposição e pós-exposição, a fim de verificar a capacidade de recuperação alimentar dos cladóceros. Além disso, os dados gerados para *D. similis* foram comparados através de curvas de distribuição de sensibilidade das espécies (SSDs) com outras espécies de diferentes grupos taxonômicos quando expostas ao fipronil e 2,4-D. Através dos testes de toxicidade aguda com o Regent® 800 WG um valor médio de CE_{50-48h} de 66,68 µg i.a./L (95% IC 51,58 - 82,63 µg i.a./L) foi determinado para *D. similis*. Já para a exposição aguda dos organismos ao DMA® 806 BR, o valor médio encontrado foi de 327,07 mg i.a./L (95% IC 272,65 – 416,0 59 mg i.a./L). Quanto ao teste em misturas, a avaliação do modelo IA (ação independente) após adição dos parâmetros “a” e “b” apontou que o desvio que melhor explicou os dados foi DR (dependente da proporção da dose). A exposição dos cladóceros no teste crônico com o fipronil apontou uma diminuição do número de neonatas produzidas por fêmea na concentração de 16 µg i.a./L, uma concentração já encontrada em ambientes aquáticos. Para o 2,4-D não foram observadas diferenças significativas para a reprodução de *D. similis* nas concentrações testadas. Em relação ao tamanho dos cladóceros, não houve mudanças significativas das fêmeas adultas e suas três primeiras ninhadas para as concentrações testadas de fipronil. Já para o 2,4-D, não houve diferença significativa no tamanho das fêmeas adultas, porém essas diferenças foram constatadas na estrutura em tamanho das neonatas. No teste de alimentação com o inseticida, embora não tenha sido estatisticamente significativo, houve uma diminuição na taxa de alimentação dos organismos com o aumento da concentração de exposição. Para o herbicida, não houve alterações nas taxas de alimentação. Quanto à pós-exposição, tanto o fipronil quanto o 2,4-D não foram observadas mudanças significativas em suas taxas de alimentação nas concentrações testadas.

Palavras-chave: zooplâncton; toxicidade aguda; toxicidade crônica; misturas de agrotóxicos; taxas de filtração e ingestão; distribuição de sensibilidade das espécies (SSDs)

ABSTRACT

Gallo, Natalia Cardoso. Effect of pesticides fipronil, 2,4-D and their mixtures on *Daphnia similis*: A multiparameter approach. 2022. 61 f. Monograph - Environmental Engineering Course, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

The indiscriminate use of pesticides has been a matter of concern around the world due to the serious environmental impacts. In Brazil, among the pesticides widely used in sugarcane monocultures are the insecticide Regent® 800 WG, whose active ingredient is fipronil, and the herbicide DMA® 806 BR, whose active ingredient is 2,4-D. The search for efficiency in agricultural production often means that different products are applied simultaneously and in larger doses than recommended ones. For this reason, currently studies with pesticides are also considering mixtures of contaminants. Within this context, the main objective of the present study was to investigate, through different parameters, the effects of the pesticides Regent® 800 WG and DMA® 806 BR, isolated and as mixtures, on the cladoceran *Daphnia similis*. For this, tests of acute toxicity were carried out with the compounds acting in isolation and as mixture, with the survival of the organisms being evaluated; chronic toxicity tests with the isolated compounds, considering three evaluation parameters: reproduction, females' size and neonates produced in all broods during the experimental period. In this study, the physiological parameters of *D. similis* were also analyzed, through analysis of feeding rates (filtration and ingestion) in exposure and post-exposure scenarios, in order to verify the cladoceran food recovery capacity. In addition, data for *D. similis* were compared using species sensitivity distribution (SSDs) curves to other species from different taxonomic groups when exposed to fipronil and 2,4-D. Acute toxicity tests of the Regent® 800 WG showed an average EC50-48h of 66.68 µg i.a/L (95% CI 51.58 – 82.63 µg i.a/L). For DMA® 806 BR, the average value found was 327.07 mg i.a/L (95% CI 272.65 – 416.59 mg i.a./L). In both cases, *D. similis* showed lower sensitivity compared to other species. As for the test in mixtures, the evaluation of the IA model (independent action) after adding the parameters "a" and "b" indicated that the best deviation that explained the data of the mixture of the fipronil and 2,4-D formulations was DR (dose ratio dependent). The chronic test with fipronil showed a decrease in the number of neonates produced per female at a concentration of 16 µg i.a/L, a concentration already found in aquatic environments. For 2,4-D, no significant differences were observed for reproduction at the concentrations tested. Regarding cladoceran size, there were no significant changes in adult females and their first three litters for the tested concentrations of fipronil. As for 2,4-D, there was no significant difference in the size of adult females, but these differences were observed in the size structure of the neonates. In the insecticide feeding test, although it was not statistically significant, there was a decrease in the organisms feeding rate with increasing exposure concentration. For the herbicide, there were no changes in feeding rates. As for post-exposure, both fipronil and 2,4-D were not observed to significantly change their feeding rates at the concentrations tested.

Keywords: microcrustaceans; zooplankton; acute and chronic toxicity; structure in size; filtration and intake rates; pesticide mixtures; species sensitivity distribution (SSDs).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural do inseticida Fipronil.

Figura 2: Fórmula estrutural do herbicida 2,4-D.

Figura 3: Organismo-teste utilizado no presente estudo, o cladóceros *Daphnia similis*.

Figura 4: Formulações comerciais de Fipronil (Regent® 800 WG) e 2,4-D (DMA® 806 BR).

Figura 5: Distribuição de sensibilidade de espécies (SSD) construídas com base nos valores CE₅₀-48h (médias geométricas) para o fipronil obtida no presente estudo para *Daphnia similis* (em negrito), complementadas com dados para outras espécies da base de dados US-EPA (US-EPA, 2020).

Figura 6: Distribuição de sensibilidade de espécies (SSD) construídas com base nos valores CE₅₀-48h (médias geométricas) para o 2,4-D obtida no presente estudo para *Daphnia similis* (em negrito), complementadas com dados para outras espécies da base de dados US-EPA (US-EPA, 2020).

Figura 7: Isoblograma dos efeitos das misturas de Regent (i.a. fipronil) e DMA (i.a. 2,4-D) sobre a sobrevivência de *Daphnia similis*, sendo desvio dependente da proporção da dose (DR) a partir do modelo de ação independente (IA) para a mistura dos agrotóxicos comerciais.

Figura 8: Fecundidade (número de neonatas por fêmea) de *Daphnia similis* (média ± desvio padrão) após 15 dias de exposição a diferentes concentrações de fipronil dosado como Regent® 800 WG. O asterisco indica o valor significativamente diferente do controle ($p \leq 0,05$, teste de Dunnet).

Figura 9: Fecundidade (número de neonatos por fêmea) de *Daphnia similis* (média ± desvio padrão) após 15 dias de exposição a diferentes concentrações de 2,4-D dosado como DMA® 806 BR.

Figura 10: Tamanho corporal da fêmea adulta – materno (média de dez repetições ± desvio padrão) de *D. similis* após 15 dias de exposição a concentrações subletais de fipronil dosado como Regent® 800 WG.

Figura 11: Tamanho das neonatas por ninhada (média de dez repetições ± desvio padrão) de *D. similis* após 15 dias de exposição a concentrações subletais de fipronil dosado como Regent® 800 WG.

Figura 12: Tamanho corporal da fêmea adulta (média de dez repetições ± desvio padrão) de *D. similis* após 15 dias de exposição a concentrações subletais de 2,4-D dosado como DMA® 806 BR.

Figura 13: Tamanho das neonatas por ninhada (média de dez repetições ± desvio padrão) de *D. similis* após 15 dias de exposição a concentrações subletais de 2,4-D

dosado como DMA® 806 BR. Os asteriscos indicam valores significativamente diferente do controle ($p \leq 0,05$, teste de Dunnet).

Figura 14: Taxa de alimentação de *D. similis* expostas ao fipronil, em A por 24 horas e em B nos experimentos de pós-exposição, de 4 horas.

Figura 15: Taxa de alimentação de *D. similis* expostas ao 2,4-D, em A por 24 horas e em B nos experimentos de pós-exposição, de 4 horas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Transições precursor-produto e as respectivas energias de colisão (EC) selecionadas para a quantificação dos agrotóxicos empregando o modo MRM do espectrômetro de massas.

Tabela 2: Combinação fatorial das concentrações de fipronil e 2,4 do teste de toxicidade de misturas.

Tabela 3: Concentração dos compostos determinadas nas respectivas amostras do teste de toxicidade aguda. <LQ = abaixo do limite de quantificação.

Tabela 4: Concentração dos compostos determinadas nas respectivas amostras do teste de toxicidade crônica. <LQ = abaixo do limite de quantificação.

Tabela 5: Valores médios efetivos (desvio-padrão) da concentração (CE50-48h) de *Daphnia similis* expostas ao fipronil e 2,4-D, durante os testes de toxicidade aguda (ponto final de imobilidade, 48 h).

Tabela 6: Resumo da análise do teste de mistura de toxicidade aguda (mg/L) de fipronil e 2,4-D para *Daphnia similis*.

Tabela 7: Respostas de testes de alimentação realizados com cladóceros como organismo-teste com diferentes agrotóxicos.

Tabela 8: Resultado do teste de sensibilidade do cultivo de *Daphnia similis*.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	04
2. Revisão bibliográfica	05
2.1. O estudo dos efeitos tóxicos de contaminantes no meio ambiente.....	05
2.2. O uso de agrotóxicos na cana-de-açúcar.....	07
2.3. O uso dos agrotóxicos fipronil e 2,4-D.....	07
2.4. O desafio da avaliação de riscos ecológicos.....	09
3. Objetivos.....	11
3.1. Objetivos gerais.....	11
3.2. Objetivos específicos.....	11
4. Hipóteses.....	11
5. Metodologia.....	12
5.1. Cultivo e manutenção dos organismos-teste.....	12
5.2. Substâncias-teste e análises químicas.....	12
5.3. Testes de toxicidade aguda com os agrotóxicos isolados.....	14
5.4. Testes de toxicidade aguda de misturas.....	14
5.5. Curva de distribuição da sensibilidade das espécies (SSD).....	15
5.6. Teste de toxicidade crônica.....	16
5.7. Medidas de tamanho corporal de <i>Daphnia similis</i> (fêmeas adultas e neonatas de diferentes ninhadas)	17
5.8. Teste de alimentação: exposição e pós-exposição.....	17
6. Resultados e Discussão.....	19
6.1. Substâncias-teste e análises químicas.....	19
6.2. Toxicidade aguda do fipronil e 2,4-D isoladamente e em misturas para <i>D. similis</i> e a comparação da sensibilidade das espécies.....	20
6.3. Toxicidade crônica: reprodução e estrutura em tamanho.....	25
6.4. Testes de alimentação.....	30
6.5. Teste de sensibilidade.....	33
7. Conclusões.....	34
8. Referências.....	35
9. Anexos.....	41

1. INTRODUÇÃO

O número de substâncias químicas sintéticas tem se expandido muito ao longo das últimas décadas. Grandes quantidades desses contaminantes são liberados para o ambiente, contaminando tanto a água, como também o solo e o ar (Bonaventura e Johnson, 1997; Lins et al., 2021).

Com a expressiva expansão agrícola que ocorreu nas últimas décadas, a conservação da biodiversidade aquática continental em todo o mundo tem sido ameaçada (Lacher e Goldstein, 1997; Sanchez-Bayo e Hyne, 2011; Henriques, 2021). Dentre as diversas substâncias químicas que afetam os organismos de água doce, os agrotóxicos têm efeitos particularmente graves sobre a biota aquática, podendo afetar a riqueza e biodiversidade da comunidade F (Daam e Van den Brink, 2010; Yoshii, 2022). Esses compostos chegam aos corpos d'água através de diferentes processos de transporte, como, por exemplo, a influência dos ventos e água da chuva - que promove a deriva, lavagem de folhas, lixiviação, erosão e escoamento superficial (Ministério do Meio Ambiente, 2018; Zambrone, 1986). Estudos de monitoramento apontam um elevado grau de contaminação ambiental, no qual resíduos oriundos da aplicação dos agrotóxicos são encontrados em águas superficiais e subterrâneas (Dores et al., 2008), em alimentos (ANVISA, 2020), na atmosfera (Moreira et al., 2012) e nas chuvas (Nogueira et al., 2012).

Os efeitos tóxicos provocados pelo uso de agrotóxicos são bastante complexos de serem estimados, uma vez que é necessário compreender as transformações químicas, físicas e biológicas envolvidas e como elas irão influenciar as relações biológicas dos ecossistemas, tanto direta como indiretamente (Sabik, 2000; Costa et al., 2008). A grande variedade de tipos de agrotóxicos e as diferentes formas pelo qual atuam (com diferentes modos de ação), torna a avaliação de seus efeitos sobre o meio ambiente ainda mais difíceis de serem previstas (Ministério do Meio Ambiente, 2018; Zambrone, 1986).

O Brasil se tornou o maior consumidor de agrotóxicos do mundo em 2008 (Rigotto et al., 2014) e permaneceu em ascensão desde então (Gomes e Barizon, 2014). Somente no ano de 2019, a legislação brasileira liberou a utilização de 474 novos agrotóxicos que anteriormente não eram permitidos (MAPA, 2019), causando preocupação entre estudiosos da área e em grande parte da população. O país

também se destaca frente à elevada produção de determinadas monoculturas, tais como soja, milho, cana-de-açúcar e café (IBGE, 2020).

No estado de São Paulo, com o intuito de maximizar a produção das monoculturas de cana-de-açúcar, diferentes tipos de agrotóxicos são aplicados conjuntamente, destacando-se dentre os mais utilizados o inseticida fipronil e o herbicida 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D). Esses contaminantes têm grande potencial de serem transportados para os ecossistemas aquáticos adjacentes às plantações através do escoamento superficial (runoff) e transporte aéreo (*spray-drift*) (Albuquerque et al., 2016; Marchesan et al., 2010; Yoshii, 2022).

Diante disso, considera-se importante entender como estes contaminantes e suas misturas podem afetar a qualidade da água e os organismos componentes da biota aquática. Assim, faz-se necessário um estudo abrangente da toxicidade dos agrotóxicos Regent® 800 WG (i.a. fipronil) e DMA® 806 BR (i.a. 2,4-D), isolados e em misturas, no qual seja envolvida uma espécie do ecossistema aquático não-alvo desses agrotóxicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O estudo dos efeitos tóxicos de contaminantes no meio ambiente

O campo da Toxicologia tem como principal objetivo o estudo da intoxicação, que consiste na manifestação de efeitos nocivos causados pela interação de substâncias químicas com um organismo, sob condições específicas de exposição, refletindo em um estado patológico. É a ciência que utiliza a experimentação para investigar a ocorrência, natureza, incidência, mecanismos e fatores de risco dos efeitos adversos de agentes químicos (Oga, 2008).

Desta forma, podemos dizer que a toxicidade é uma propriedade potencial atribuída a diferentes elementos e compostos de instaurar um estado patológico como resultado do contato ou interação com o organismo, seja em menor ou maior grau. Este grau de gravidade irá depender do ambiente, da espécie, da concentração e da biodisponibilidade (Larini, 1993).

As primeiras pesquisas envolvendo a área da Ecotoxicologia aconteceram na década de 1930 e foram resultado da preocupação pela manutenção dos ecossistemas, dentre eles, os ambientes aquáticos, levando aos primeiros testes de

toxicidade aguda - cujo objetivo era estabelecer uma relação de causa e efeito das substâncias químicas à qualidade da água e conservação da biota. O avanço nos estudos permitiu compreender a particularidade de cada organismo e sua reação aos diferentes compostos químicos, evidenciando a presença de espécies mais sensíveis e representativas do ecossistema aquático (Rand, 1995).

Ao tratar da Ecotoxicologia, podemos dividir seus estudos em três etapas: primeiro, é preciso conhecer as emissões e entradas de poluentes no ambiente, assim como a distribuição e destino nos diferentes compartimentos. Também é preciso ter conhecimento a respeito da entrada e destino nas cadeias biológicas e suas formas de transferência na alimentação considerando a cadeia trófica. Por fim, se faz necessário um estudo, tanto qualitativo quanto quantitativo, dos efeitos tóxicos dos poluentes ao ecossistema, com suas consequências para o homem (Thuhaut, 1977).

Dentre os principais objetos de estudo do campo da Toxicologia e Ecotoxicologia encontram-se os agrotóxicos. Desde a década de 1950, com a Revolução Verde, a crescente expansão da produção agrícola provocou uma série de desdobramentos, resultado das novas tecnologias utilizadas no processo de produção. O uso extensivo de agrotóxicos passou a ser utilizado com a finalidade de aumentar cada vez mais a produtividade (Ministério do Meio Ambiente, 2018).

A avaliação dos efeitos dos agrotóxicos sobre o meio ambiente é de grande complexidade. A considerável variedade de tipos de agrotóxicos e a forma como eles atuam tornam muitas vezes difícil prever quais os desdobramentos para o ambiente. Depois de aplicado, é preciso que se entendam os fatores que envolvem o deslocamento físico, assim como as transformações químicas e biológicas dos agrotóxicos. Essas transformações podem modificar as propriedades das substâncias inseridas inicialmente no ambiente e influenciar seu comportamento, levando possivelmente a formação de subprodutos indesejáveis que também podem vir a causar danos ao ecossistema (Sabik, 2000; Costa et al., 2008).

Um dos fatores de grande preocupação para as autoridades responsáveis pela preservação e manutenção do meio ambiente, consiste no fato de que o uso cada vez mais acentuado de agrotóxicos não afetam somente as plantações nos quais são amplamente utilizados, mas todo o ecossistema ao qual está inserido, tendo grande potencial de serem transportados para os ecossistemas adjacentes, causando efeitos adversos (Daam e Van den Brink, 2010).

2.2 O uso de agrotóxicos na cana-de-açúcar

O Brasil possui a maior produção de etanol a base de cana-de-açúcar, além de açúcar proveniente de cana no mundo, resultado proveniente das vastas monoculturas de cana-de-açúcar no país. Com isso, a agricultura canavieira destaca-se por sua extensão, sendo classificada como a terceira maior safra, ficando atrás somente do milho e da soja (UNICA, 2015; IBGE, 2020).

O cultivo de cana-de-açúcar no país levou a produção de 27.615 milhões de litros de etanol em 2016. Na safra 2017/2018 o Estado de São Paulo foi responsável pela produção de 13 bilhões de litros de etanol proveniente da cana, resultando em 47,14% do total produzido no país (InvestSP, 2022). No entanto, os conhecimentos em relação aos impactos da produção do etanol de cana ainda são limitados, especialmente ao considerar os desdobramentos para a água e os solos (Corbière-Nicollier et al., 2011; Fontanetti e Bueno, 2017).

Contribuindo fortemente para a economia do Estado de São Paulo, a busca pela maximização da produção das monoculturas de cana-de-açúcar levaram a aplicação de diferentes tipos de agrotóxicos nas plantações, no qual ganham destaque dentre os mais utilizados o inseticida fipronil e o herbicida 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), que possuem potencialidade de serem transportados para os ecossistemas aquáticos adjacentes através do escoamento superficial (runoff) e transporte aéreo (*spray-drift*) (Albuquerque et al., 2016; Marchesan et al., 2010, Yoshii, 2022).

2.3 O uso dos agrotóxicos fipronil e 2,4-D

Ao considerar a ocorrência de agrotóxicos em água doce no país, o fipronil é o mais recorrente, de forma que foi encontrado em 54% das 251 amostras investigadas de diferentes locais por Albuquerque et al. (2016), com concentrações variando entre 0,05 a 26,2 µg/L (Albuquerque et al., 2016; Marchesan et al., 2010, Acayaba et al., 2020). Para a região sudeste, o intervalo de concentrações já observado varia de 6 a 465 µg/L (CETESB, 2018). Quanto ao herbicida 2,4-D, o estudo de Albuquerque et al. (2016), 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; Fonseca et al., 2008; Marchesan et al., 2010).

O fipronil, de fórmula química (RS)-5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-(trifluoromethylsulfinyl)-1H-pyrazole-3-carbonitrile, é um inseticida que pertence ao grupo fenil pirazólico. Este inseticida atua diretamente no sistema nervoso central de insetos, causando a interrupção do receptor de ácido gama aminobutírico (GABA). Esse receptor possui alto grau de seletividade e, por esse motivo, acaba afetando predominantemente invertebrados - para o qual são altamente tóxicos. Essa interrupção leva a hiperexcitação dos músculos e nervos dos organismos-alvo e, como consequência, a mortalidade dos mesmos (Tingle et al., 2003; Das et al., 2006).

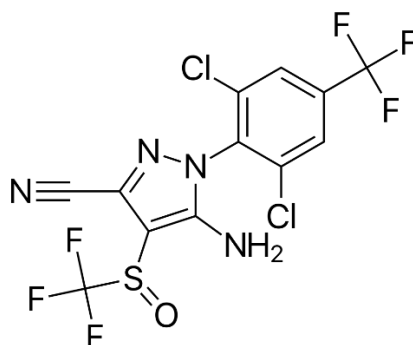


Figura 1: Fórmula estrutural do inseticida Fipronil.

O tempo de degradação do fipronil pode variar de acordo com a forma como é utilizado. O fipronil granular é o mais persistente de acordo com Ngim e Crosby (2001), de forma a possuir, quando exposto à luz, tempo de meia-vida aquosa de 5,21 dias e meia-vida no solo de 18,25 dias. Em ambientes com condições anaeróbias, sua degradação é ainda mais demorada, possuindo tempo de meia-vida entre 116 e 130 dias em águas e sedimentos (Coutinho et al., 2005). Uma vez que o fipronil e seus subprodutos possuem alto grau de toxicidade para invertebrados e peixes, afetando-os de forma aguda, a contaminação dos ambientes aquáticos por esse agrotóxico é motivo de grande preocupação (Gunasekara e Troung, 2007).

O 2,4-ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), de fórmula química C₈H₆Cl₂O₃, é um herbicida que pertence ao grupo químico ácido ariloxiacético. Desde o início de 1940, o 2,4-D tem sido utilizado em grande escala nas plantações visando o controle de ervas daninhas de folhas largas (Grisolia, 2005; Itoh et al., 2013). De acordo com

estudos divulgados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA, 2016), entre 2009 e 2012 o 2,4-D estava entre os quatro ingredientes ativos mais vendidos no Brasil entre os agrotóxicos e, após 2013-2014 passou a ocupar o segundo lugar.

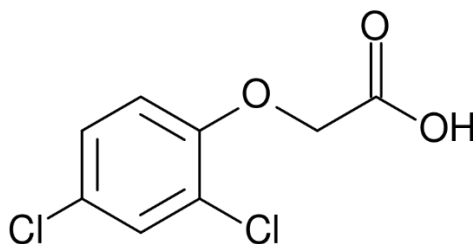


Figura 2: Fórmula estrutural do herbicida 2,4-D.

Este herbicida atua aumentando a plasticidade da parede celular da planta-alvo, além de aumentar, consideravelmente, a síntese de proteínas e etileno. Com isso, promove-se o crescimento descontrolado de divisões celulares realizadas pela planta, causando danos ao seu tecido vascular e, conseqüentemente, levando a morte da mesma (Oruç et al., 2004; Benli et al., 2007).

O 2,4-D já foi detectado em ambientes aquáticos localizados em áreas com predominância de culturas de cana-de-açúcar na região sudeste do país, em concentrações entre aproximadamente 180 e 370 µg/L (CETESB, 2018).

É importante ressaltar que, na prática, muitas vezes são aplicadas em plantações uma mistura de compostos, onde cada um desempenha diferentes funções para proteger e otimizar as plantações. Assim, ao considerarmos o estudo dos agrotóxicos, é importante não somente estudá-los separadamente, buscando entender os efeitos particulares de cada um deles, como também estudar os efeitos que causam em mistura, que é a forma como são aplicados. Por isso, atualmente, estudos com agrotóxicos também estão levando em consideração as misturas de contaminantes que possivelmente ocorrem nos ecossistemas aquáticos (Zhou et al., 2010).

Dentre os danos causados por agrotóxicos e suas misturas estão a perda de qualidade da água como um recurso para o ser humano, interferindo diretamente na saúde pública (Silva e Santos, 2007) e as possíveis alterações nas comunidades, como perda de biodiversidade, redução na abundância e modificações de grupos funcionais daquele ambiente (Edwards, 2002).

2.4 O desafio da avaliação de riscos ecológicos

O desafio enfrentado pelos avaliadores de riscos ecológicos para proteger a diversidade de espécies e os atributos funcionais dos ecossistemas frente aos contaminantes ambientais é enorme (Maltby et al., 2005), especialmente porque as espécies variam acentuadamente na sua sensibilidade aos contaminantes.

Invertebrados aquáticos são amplamente usados em estudos ecotoxicológicos, pois são relativamente fáceis de serem mantidos em condições de ensaio. A sua utilização não é ainda restringida por preocupações de ordem ética, e como grupo, eles são geralmente mais sensíveis a uma gama de poluentes (incluindo muitos agrotóxicos) do que os vertebrados ou plantas (Rand, 1995).

Muitos dos testes ecotoxicológicos que examinam os efeitos dos agrotóxicos sobre os invertebrados aquáticos têm utilizado os cladóceros para representar as espécies de zooplâncton em seus ambientes aquáticos alvo.

A espécie *Daphnia similis* é um dos cladóceros mais comumente utilizado em Ecotoxicologia Aquática, além de sua elevada sensibilidade a variados agentes tóxicos, são facilmente cultiváveis, de pequeno porte e possuem ciclo de vida relativamente curto (Rand, 1995).

Daphnia similis Claus, 1876 (Crustacea, Cladocera) é um microcrustáceo planctônico classificado na cadeia alimentar como um consumidor primário, se alimentando por filtração de material orgânico particulado em suspensão. Apresentam um comprimento máximo de 3,5 mm e são conhecidos pelo nome popular pulga d'água. (ABNT, 2016).



Figura 3: Organismo-teste utilizado no presente estudo, o cladóceros *Daphnia similis*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar os efeitos tóxicos dos agrotóxicos Regent® 800 WG (ingrediente ativo - i.a. fipronil) e DMA® 806 BR (i. a. 2,4-D), isoladamente e em mistura sobre o cladóceros *Daphnia similis* abrangendo diferentes parâmetros: sobrevivência, reprodução, estrutura em tamanho (materno e neonatas) e ingestão e filtração.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar testes de toxicidade aguda com os compostos agindo isoladamente e em misturas, a fim de determinar os efeitos que diferentes concentrações de fipronil, 2,4-D e suas misturas podem provocar na sobrevivência do organismo-teste utilizado;
- Realizar testes de toxicidade crônica com os compostos agindo de forma isolada, a fim de determinar os efeitos subletais dos agrotóxicos sobre a sobrevivência, reprodução e estrutura em tamanho maternal e das neonatas de *D. similis*;
- Avaliar as taxas de alimentação (filtração e ingestão) de *D. similis* em exposição e pós-exposição aos agrotóxicos, fipronil e 2,4-D, isoladamente;
- Construir curvas de distribuição de sensibilidade das espécies (SSDs) para comparar a sensibilidade de *D. similis* a espécies de diferentes grupos taxonômicos;

4. HIPÓTESES

- A mistura dos agrotóxicos fipronil e 2,4-D provoca efeitos potencializados na sobrevivência de *D. similis* quando comparado aos efeitos dos compostos agindo isoladamente;
- A exposição ao inseticida fipronil e ao herbicida 2,4-D, isoladamente, provoca alterações significativas na reprodução, estrutura em tamanho das fêmeas adultas e das neonatas produzidas nas três primeiras ninhadas de *D. similis*;
- Alterações significativas nas taxas de alimentação (filtração e ingestão) de *D. similis* ocorrerão quando expostas aos agrotóxicos, podendo ser prejudicada a capacidade de recuperação;
- A espécie *D. similis* é sensível aos agrotóxicos fipronil e 2,4-D, e seu nível de sensibilidade é comparável ao de outras espécies do mesmo grupo taxonômico quando expostas aos mesmos contaminantes;

5. METODOLOGIA

5.1 Cultivo e manutenção dos organismos-teste

O cultivo e todos os procedimentos experimentais com o cladóceros *Daphnia similis* seguiram as recomendações da norma ABNT NBR 12713 (2022).

As culturas foram mantidas em béquer de vidro com capacidade de 1 L, meio ASTM de dureza moderada (ASTM, 2001), renovado três vezes por semana. Os dafnídeos foram alimentados a cada renovação com a microalga *Raphidocelis subcapitata* a uma concentração de 5×10^4 células mL^{-1} e um aditivo orgânico, que trata-se de uma suspensão contendo levedura e ração para peixe (1 mL L^{-1}). Vinte indivíduos por béquer foram mantidos sob fotoperíodo de 16h (claro) / 8h (escuro) a $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

5.2 Substâncias-teste e análises químicas

A formulação comercial DMA[®] 806 BR (adquirida da Dow AgroSciences Industrial Ltda., Brasil) é composta de 67% m/v de ingrediente ativo (i.a.) 2,4-D - equivalente ácido; 80,6% m/v de i.a. 2,4 -D - equivalente sal de dimetilamina e 41,9% m/v de ingredientes inertes. O Regent[®] 800 WG (adquirido da BASF, Brasil) é composto de 80% m/v de ingrediente ativo e 20% m/v de ingredientes inertes.



Figura 4: Formulações comerciais de Fipronil (Regent[®] 800 WG) e 2,4-D (DMA[®] 806 BR).

Fonte: Agrowap; TuttiAgro (2020).

Com a finalidade de comprovar 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). A quantificação dos compostos foi

realizada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS). Foi utilizado um cromatógrafo Agilent modelo 1200, equipado com bomba binária, injetor automático e compartimento de coluna termostaticado.

A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna Zorbax SB-C18 (2,1x30 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 NH₄OH (aditivo que favorece a ionização dos compostos).

A composição do gradiente, em função da concentração do solvente B, foi a seguinte: início com 30% e aumento para 80% em 5 minutos, mantendo essa condição por 1 minuto e retornando para 3% em 11 minutos. Entre cada corrida cromatográfica o sistema foi mantido à 30% de B por 5 minutos para recondicionamento da coluna. As amostras das estações foram analisadas no modo negativo.

Os compostos foram ionizados em uma fonte de *electrospray* no modo positivo e negativo, e foram monitorados pelo modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), de acordo com os parâmetros descritos na Tabela 1. As curvas analíticas foram construídas de acordo com a área obtida para cada composto em função de sua concentração na coluna.

Tabela 1: Transições precursor-produto e as respectivas energias de colisão (EC) selecionadas para a quantificação dos agrotóxicos empregando o modo MRM do espectrômetro de massas.

Composto	Polaridade	Fragmentor (V)	Precursor (m/z)	Quantificação		Confirmação 1		Confirmação 2	
				m/z	EC (V)	m/z	EC (V)	m/z	EC (V)
2,4-D	-	70	218,9	161	14	163	12	125	18
Fipronil	-	100	434,9	330	10	250	15	183	30

5.3 Testes de toxicidade aguda com os agrotóxicos isolados

Os ensaios foram realizados em quadruplicata, no qual cada réplica com volume de 50 mL continha cinco organismos-teste entre 6-24 horas de idade. Os recipientes-teste (copos plásticos atóxico) foram cobertos com plástico transparente e mantidos sem alimentação a temperatura de 20 ± 2 °C durante um período de 48

horas, em ambiente com fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas escuro. Após esse período, o número de organismos imóveis foi contabilizado (ABNT NBR 12713, 2016).

Nos ensaios foram determinadas a maior solução-teste a causar 100% de imobilidade dos organismos e a menor solução-teste em que não se observou a imobilidade dos organismos, de forma a definir o intervalo de soluções-teste a ser utilizado no ensaio definitivo (ABNT NBR 12713, 2016).

Para o fipronil foram utilizadas cinco concentrações provenientes de uma solução estoque de 32.000 µg i.a./L, sendo 5, 10, 25, 50 e 100 µg i.a./L. Já para o 2,4-D foram utilizadas seis concentrações preparadas a partir de uma solução estoque de 6,7 g i.a./L, sendo 0,05, 0,1, 0,2, 0,3 e 0,4 g i.a./L.

Em todos os testes, foi utilizado um controle somente com meio de cultivo. A imobilidade, expressa em CE₅₀-48h, foi calculado por meio de curvas logísticas de três-parâmetros através do software Statistica versão 7.0 (Statsoft, 2004). Esta curva é descrita pela seguinte equação: $Y_i = \max / 1 + (C_i / CI_{50i})^{\beta_i}$; 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 ; CI_{50i} é a concentração de inibição do químico i e β_i é o slope para o químico i .

Os parâmetros físico-químicos foram avaliados no início e fim de cada experimento, sendo usados pH-metro Micronal B374 para medida de pH, condutivímetro Orion modelo 145A+ para medida de condutividade e oxímetro YSI55 para medida do oxigênio dissolvido. Esses mesmos equipamentos foram utilizados para a verificação dos parâmetros físico-químicos de todos os experimentos desenvolvidos na presente pesquisa.

5.4 Testes de toxicidade aguda de misturas

Para o experimento de toxicidade aguda de misturas foram utilizadas soluções-estoques de 3,2 mg i.a./L e 6,7 g i.a./L de fipronil e 2,4-D, respectivamente. As concentrações utilizadas de fipronil e 2,4-D foram as mesmas usadas nos testes isolados e as misturas foram definidas a partir da combinação fatorial completa entre cada uma dessas concentrações. Os ensaios foram realizados da mesma forma como descrito para os testes de toxicidade aguda com os compostos isolados, exceto que foi realizado em triplicata, para cada combinação testada.

Tabela 2: Combinação fatorial das concentrações de fipronil e 2,4 do teste de toxicidade de misturas

Fipronil (µg/L)	2,4-D (mg/L)	Fipronil (µg/L)	2,4-D (mg/L)
5	-----	10	300
10	-----	10	400
25	-----	25	50
50	-----	25	100
100	-----	25	200
-----	50	25	300
-----	100	25	400
-----	200	50	50
-----	300	50	100
-----	400	50	200
5	50	50	300
5	100	50	400
5	200	100	50
5	300	100	100
5	400	100	200
10	50	100	300
10	100	100	400
10	200		

Os dados dos testes de toxicidade de mistura com o inseticida fipronil e o herbicida 2,4-D foram analisados por meio dos modelos conceituais de adição de concentração (CA) e ação independente (IA). Inicialmente, os dados observados foram comparados a partir das exposições individuais, utilizando a ferramenta MIXTOX (Jonker et al., 2005). Posteriormente, as análises foram estendidas, tal como descrito por Jonker et al. (2005) e os três desvios dos modelos de referência, sendo: sinergismo antagonismo (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 "bDR" está incluído além do parâmetro "a", permitindo que o papel de cada composto na mistura

seja identificado. E para descrever o desvio dependente do nível da dose (DL), um segundo parâmetro “bDL” é inserido além do parâmetro “a”. O valor de “a” indica o desvio em baixas e altas doses e o valor de “bDL” 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 do Anexo 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 (Anexo 1) e o desvio máximo pode ser calculado em termos de nível de efeito (Jonker et al., 2005; Freitas et al., 2014).

5.5 Curva de distribuição da sensibilidade das espécies (SSD)

Curvas da distribuição da sensibilidade das espécies (*Species Sensitivity Distribution* - SSD) foram construídas para comparar os valores de toxicidade aguda (CE₅₀) obtidos para *Daphnia similis* exposta ao inseticida fipronil e ao herbicida 2,4-D com valores correspondentes para outras espécies de invertebrados e também de vertebrados expostas aos supracitados agrotóxicos. Dados de toxicidade para os diferentes grupos taxonômicos foram compilados a partir do banco de dados USEPA ECOTOX (<http://cfpub.epa.gov/ecotox/>) e suplementado com dados da literatura aberta. Para as construções das SSDs, apenas dados laboratoriais de toxicidade aguda para organismos aquáticos de água doce foram considerados. Além disso, somente os dados que pudessem ser confirmados a partir de publicações originais foram incluídos nas SSDs. Médias geométricas foram calculadas quando mais de um valor de toxicidade foi relatado para uma dada espécie.

5.6 Teste de toxicidade crônica

Os testes de toxicidade crônica com *D. similis* foram realizados de acordo com a diretriz 211 da OCDE (OCDE, 2012), com a modificação do tempo de exposição para 15 dias para esta espécie, conforme descrito em Vacchi et al. (2016) e Godoy et al. (2018).

Nos testes de toxicidade crônica com *D. similis* foi adicionado uma neonata (entre 6 e 24 horas de idade) em cada recipiente plástico atóxico, contendo 50 mL da solução-teste de cada tratamento em 10 réplicas. A cada dois dias foram efetuadas

as trocas de água e renovação de alimento. Os testes foram mantidos em temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo de 16h (claro)/8h (escuro) e intensidade luminosa de 400 lux. O experimento teve duração de 15 dias, de forma que os organismos foram verificados e a quantidade de neonatas foi devidamente contabilizada e registrada a cada 48 horas. O número de prole viva produzida por cada animal progenitor foi contada a cada renovação do meio e somada para questões de avaliar a reprodução.

Para o experimento de toxicidade crônica foram utilizadas soluções-estoques de 6,7 g i.a./L e 32000 µg i.a./L de 2,4-D e fipronil, respectivamente. Para o herbicida foram utilizadas seis concentrações, sendo, 0,0001, 0,001, 0,005, 0,01, 0,05 e 0,100 g/L e para o inseticida foram utilizadas cinco concentrações, sendo 1, 2, 4, 8 e 16 µg i.a./L. As concentrações utilizadas foram baseadas nas concentrações de efeito não observado (CENO) determinadas nos testes de toxicidade aguda com cada agrotóxico. Para ambos os testes foi utilizado um controle somente com meio de cultivo.

As análises estatísticas do parâmetro de fecundidade (número de neonatos por fêmea) nos testes de toxicidade crônica foram realizadas através da análise de variância (One-way ANOVA) utilizando o software SigmaPlot v11.0 (Systat Software Inc., 2008). A normalidade dos dados foi testada usando o teste de Shapiro-Wilk. E o teste de Dunnett foi aplicado quando as diferenças foram obtidas em dados que seguiram uma distribuição normal em relação ao controle. Em todos os testes estatísticos, adotou-se um nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$).

5.7 Medidas de tamanho corporal de *Daphnia similis* (fêmeas adultas e neonatas de diferentes ninhadas)

As neonatas contabilizadas no teste de toxicidade crônica foram coletadas, transferidas para ependorfs e fixadas com formol 8%. As amostras foram analisadas em laboratório a partir da utilização de um microscópio estereoscópico com aumento de até 50 vezes da marca Zeiss®, de maneira a medir 5 organismos de 5 réplicas para cada uma das diferentes concentrações utilizadas de fipronil, 2,4-D e também do controle.

Após as finalizações dos testes crônicos, as fêmeas adultas foram coletadas com o auxílio da pipeta de pasteur, transferidas para ependorfs, fixadas com formol 8% e analisadas com microscópio estereoscópico com aumento de até 50 vezes da

marca Zeiss®, de forma semelhante ao procedimento com as neonatas. Foi medido um organismo por réplica, sendo cinco réplicas para cada tratamento de fipronil, 2,4-D e controle.

As análises estatísticas das medidas de tamanho corporal das *Daphnias* dos testes de toxicidade crônica foram realizadas através da análise de variância (One-way ANOVA) utilizando o software SigmaPlot v11.0 (Systat Software Inc., 2008). A normalidade dos dados foi testada usando o teste de Shapiro-Wilk. Um teste de Dunnett foi realizado quando as diferenças foram obtidas em dados que seguiram uma distribuição normal em relação ao controle. Em todos os testes estatísticos, adotou-se um nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$).

5.8 Teste de alimentação: exposição e pós-exposição

As taxas de filtração e ingestão dos cladóceros foram avaliadas em duas etapas. Primeiro, quando *D. similis* foram expostas as concentrações subletais 4, 8 e 16 µg i.a./L para o Regent (i.a. fipronil) e 0,1, 0,5 e 1 mg/L para o DMA (i.a. 2,4-D). As concentrações foram determinadas a partir dos resultados obtidos nos testes de toxicidade crônica.

O procedimento experimental foi realizado de acordo com o apresentado em Silva et al. (2015). Inicialmente, os organismos-teste com menos de 24 horas de vida foram separados dos meios de cultura e colocados em frascos de 1 litro nas mesmas condições de cultivo até atingirem quatro dias de vida. Em seguida, com os organismos com 96 horas de vida, 5 organismos de *D. similis* por triplicata ($n = 3$) foram colocados em frascos contendo 100 mL de solução teste com 5×10^4 células mL⁻¹ de *R. subcapitata* e mantidos a 20 ± 2 ° C por 24 h no escuro. Uma repetição adicional foi realizada para cada tratamento, com as algas (5×10^4 células mL⁻¹) e sem animais, a fim de determinar as diferenças da concentração inicial de algas. Após 24 h, as soluções-teste foram fixadas em formaldeído a 1% e congeladas rapidamente em nitrogênio líquido e armazenadas a -20 ° C até a análise de densidade celular. Essas amostras foram analisadas em um citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) equipado com um laser de íons de argônio azul de 15 mW (488 nm de excitação), usando um padrão interno (esferas fluorescentes de 6 µm, Fluoresbrite microesferas de carboxilato; Polysciences, Warrington, Pensilvânia, EUA). Para determinação da densidade celular, analisamos os canais FL3-H

(fluorescência vermelha) vs SSC-H (dispersão lateral) de acordo com os procedimentos de Sarmiento et al. (2008). Os dados do citômetro foram analisados no software FlowJo, versão V10.0 (Treestar.com, EUA). As taxas de filtração (equações 2 e 3) e ingestão (equação 4) foram determinadas de acordo com Villarroel et al. (1999):

$$F = \frac{V}{n} \times \frac{\ln C_0 - \ln C_t}{t} - A \quad (2)$$

$$A = \frac{\ln C_0 - \ln C'_t}{t} \quad (3)$$

$$I = F \times \sqrt{C_0 \times C_t} \quad (4)$$

Onde, F e I correspondem, respectivamente, às taxas de filtração (mL ind⁻¹ h⁻¹) e ingestão (células ind⁻¹ h⁻¹); C₀ e C_t são, respectivamente, a densidade de algas inicial (0 h) e final (24 h) (células mL⁻¹); n é o número de organismos por replicado, em uma solução de teste com um volume V (mL); A é um fator de correção para alterações nas concentrações finais de algas (C'_t) em tratamentos sem animais.

Na segunda etapa, a fim de avaliar a resposta de recuperação a exposição aos agrotóxicos, após finalizada esta primeira etapa de experimentação, os organismos-teste foram realocados para um novo frasco com meio limpo e alimento, onde permaneceram por 4 horas.

As coletas de amostras para quantificação da concentração de algas foram realizadas imediatamente após as 4 horas em que os organismos ficaram em meio limpo. Após 4 h, as soluções-teste foram fixadas em formaldeído a 1% e congeladas rapidamente em nitrogênio líquido e armazenadas a -20 ° C até a análise de densidade celular. A análise foi realizada de mesma forma como descrito para a primeira etapa do experimento.

As análises estatísticas das taxas de alimentação (filtração e ingestão) de *D. similis* dos testes de exposição e pós-exposição foram realizadas através da análise de variância (One-way ANOVA) utilizando o software SigmaPlot v11.0 (Systat Software Inc., 2008). A normalidade dos dados foi testada usando o teste de Shapiro-Wilk. Um teste de Dunnett foi realizado quando as diferenças foram obtidas em dados

que seguiram uma distribuição normal em relação ao controle. Em todos os testes estatísticos, adotou-se um nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Substâncias-teste e análises químicas

Os limites de quantificação instrumental para o 2,4-D e fipronil foram 1 µg/L e 0,1 µg/L, respectivamente. Os resultados obtidos para algumas das amostras analisadas de solução-estoque e concentrações estabelecidas para os diferentes tratamentos, encontram-se nas Tabelas 2 e 3 a seguir. Nota-se que os valores de concentração para o herbicida estão próximos dos valores esperados, no entanto, é possível observar alteração entre os valores esperados (concentrações reais) e os indicados (concentrações nominais) na análise para o fipronil, onde as concentrações reais encontram-se abaixo das concentrações nominais estabelecidas.

Tabela 3: Concentração dos compostos determinadas nas respectivas amostras do teste de toxicidade aguda. <LQ = abaixo do limite de quantificação.

Amostras	2,4-D	Fipronil
5 µg/L fipronil	<LQ	1,3 µg/L
10 µg/L fipronil	<LQ	3,5 µg/L
25 µg/L fipronil	<LQ	22,7 µg/L
50 µg/L fipronil	<LQ	35,2 µg/L
100 µg/L fipronil	<LQ	42,5 µg/L
300 mg/L 2,4-D	351 mg/L	<LQ

Tabela 4: Concentrações dos compostos determinadas nas respectivas amostras do teste de toxicidade crônica. <LQ = abaixo do limite de quantificação.

Amostra	2,4-D	Fipronil
Solução-estoque: 3,2 mg/L fipronil	<LQ	1,3 mg/L
Solução-estoque: 6,7 g/L 2,4-D	5,3 g/L	<LQ
4,0 µg/L fipronil	<LQ	2,0 µg/L
8,0 µg/L fipronil	<LQ	6,5 µg/L
16,0 µg/L fipronil	<LQ	15,6 µg/L
0,1 mg/L 2,4-D	0,2 mg/L	<LQ
50 mg/L 2,4-D	41,1 mg/L	<LQ

6.2 Toxicidade aguda do fipronil e 2,4-D isoladamente e em misturas para *D. similis* e a comparação da sensibilidade das espécies

As tabelas 1 a 9 apresentadas no Anexo 2 apresentam os valores da contagem de organismos imóveis e seus respectivos parâmetros físico-químicos dos testes definitivos de toxicidade aguda para o inseticida fipronil (Tabelas 1 a 4), para o herbicida 2,4-D (Tabelas 5 a 8) e para misturas (Tabela 9).

Os testes de toxicidade aguda do agrotóxico Regent® 800 WG (i.a. fipronil) apresentou uma média CE₅₀-48h de 66,68 µg i.a./L (95% Intervalo de confiança - IC 51,58 - 82,63 µg i.a./L). Já para o DMA® 806 BR (i.a 2,4-D) o valor médio encontrado foi de 327,07 mg i.a./L (95% IC 272,65 - 416,59 mg i.a./L).

Tabela 5: Valores médios efetivos (desvio-padrão) da concentração (CE₅₀-48h) de *Daphnia similis* expostas ao fipronil e 2,4-D, durante os testes de toxicidade aguda (ponto final de imobilidade, 48 h).

Teste de toxicidade	Exposição	CE ₅₀	
		Fipronil (µg/L)	2,4-D (mg/L)
Aguda (48 h)	Isolado	66,68 (± 0,71)	327,07 (± 21,16)
	Misturas	54,05 (± 2,84)	355,31 (± 17,31)

Com relação ao ingrediente ativo fipronil, os valores de CE₅₀ da literatura para o grupo (Crustacea) estão entre 0,99 e 96 µg/L (Hayasaka et al., 2012; Qin et al., 2011). E ao comparar a sensibilidade do cladócero *Daphnia similis* com outros organismos utilizados na avaliação de toxicidade do agrotóxico fipronil a partir da avaliação do CE₅₀ podemos notar, como evidenciado pela Figura 5, que espécies do gênero *Chironomus*, *Hyalella* e *Ceriodaphnia*, por exemplo, apresentam maior sensibilidade quando expostas ao composto estudado em comparação com a espécie *D. similis*.

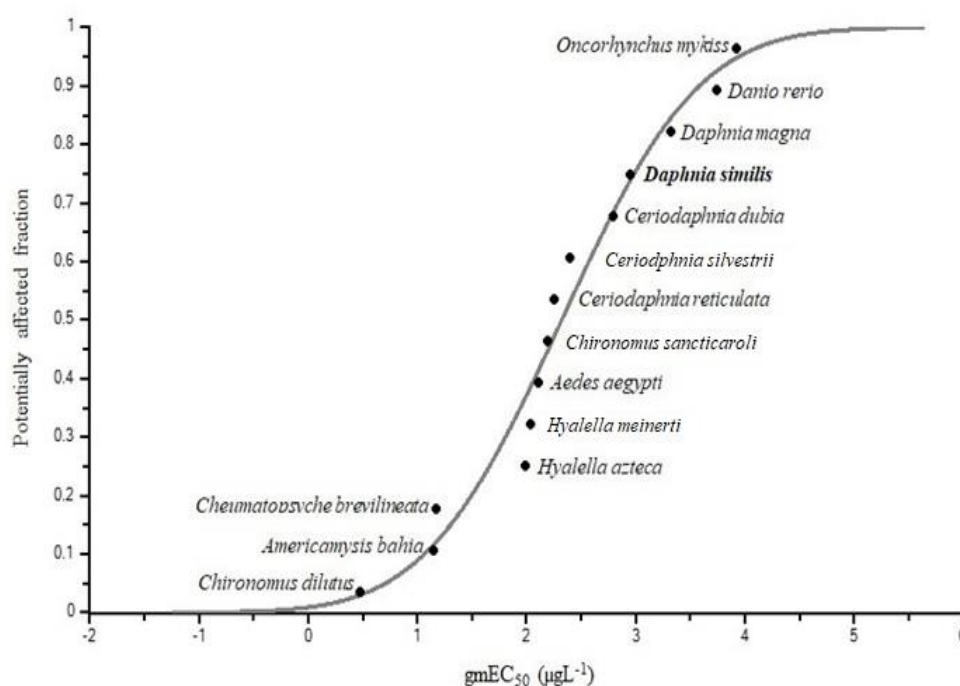


Figura 5: Distribuição de sensibilidade de espécies (SSD) construídas com base nos valores CE₅₀-48h (médias geométricas) para o fipronil obtida no presente estudo para *Daphnia similis* (em negrito), complementadas com dados para outras espécies da base de dados US-EPA (US-EPA, 2020).

Segundo a literatura, a toxicidade do ingrediente ativo do herbicida 2,4-D, para cladóceros variam de 81,8 a 422 mg/L (Milam et al., 2005; Nelson e Roline, 1998; Oris et al., 1991). Neste sentido, a média obtida nos testes com *D. similis* está dentro da faixa dos valores da sensibilidade deste grupo ao composto. De acordo com Fai, Mbida e Demefack (2015), por exemplo, a CE₅₀ encontrada para *Daphnia magna* foi de 356,61 mg/L, valores próximos ao encontrado para a *D. similis* no presente estudo.

Ao analisar a sensibilidade do cladóceros *D. similis* com outros organismos utilizados na avaliação de toxicidade do agrotóxico 2,4-D a partir da avaliação do CE₅₀ podemos notar, como evidenciado pela Figura 6, que essa espécie apresentou baixa sensibilidade quando expostas ao herbicida se comparada as outras espécies analisadas.

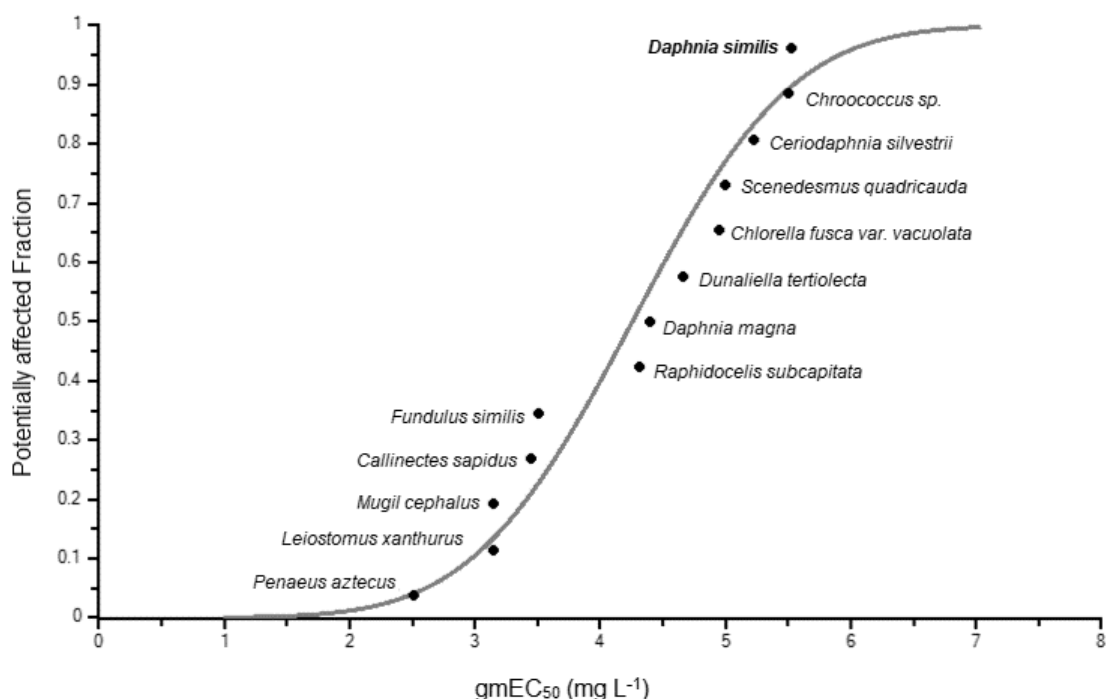


Figura 6: Distribuição de sensibilidade de espécies (SSD) construídas com base nos valores CE₅₀-48h (médias geométricas) para o 2,4-D obtida no presente estudo para *Daphnia similis* (em negrito), complementadas com dados para outras espécies da base de dados US-EPA (US-EPA, 2020).

Portanto, nossa hipótese de que a sensibilidade da espécie *D. similis* é comparável ao de outras espécies do mesmo grupo taxonômico quando expostas aos mesmos contaminantes não foi corroborada, já que demonstrou menor sensibilidade em relação a várias espécies.

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, na prática, sabemos que essas substâncias

não agem de maneira isolada no ambiente (Wu et al., 2016). Assim, devemos considerar também seus efeitos particulares e em mistura, como já vem ocorrendo em outros estudos envolvendo agrotóxicos (Zhou et al., 2010; Mansano et al., 2020; Silva et al., 2021).

Neste estudo, o modelo de referência de ação independente (IA) foi utilizado para avaliar a resposta de *D. similis* quando expostas às misturas dos agrotóxicos selecionados por serem compostos com modos de ações diferentes (Tabela 5). O ajuste dos dados ao modelo IA produziu um valor de SS de 54,74 ($p < 0,05$; $r^2 = 0,79$). Após a adição do parâmetro “a” para o modelo de IA, de modo a descrever o desvio sinergismo/antagonismo S/A, o valor de SS diminuiu para 40,65 e foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$; $r^2 = 0,84$). Após a adição dos parâmetros “a” e “b”, os desvios dependente da proporção da dose (*dose ratio-dependent* - DR) e dependente do nível da dose (*dose level-dependent* - DL) também foram significativos para o modelo IA, com valores de SS de 29,24 ($p < 0,05$; $r^2 = 0,88$) e 36,58 ($p < 0,05$; $r^2 = 0,86$), respectivamente (Figura 7). De acordo com estes resultados, o melhor desvio que explicou os dados obtidos da mistura das formulações comerciais de fipronil e 2,4-D foi o desvio DR, no qual mostrou sobre *D. similis* efeitos de sinergismo causado principalmente pela combinação com a alta concentração de 2,4-D e antagonismo causado principalmente pelo fipronil. Observa-se que DR possuiu o menor valor de resíduos (SS), além de ser significativo.

Tabela 6: Resumo da análise do teste de mistura de toxicidade aguda (mg/L) de fipronil e 2,4-D para *Daphnia similis*.

	Ação Independente			
	IA	S/A	DR	DL
max	0.98	0.98	0.98	0.98
<i>B</i> Regent (i.a. fipronil)	1.73	1.47	2.10	1.13
β DMA (i.a. 2,4-D)	7.19	7.20	7.52	5.76
EC ₅₀ for Regent	0.14	0.10	0.08	0.11
EC ₅₀ for DMA	354.63	331	361.20	339.18
a	-	2.95	-4.48	6.53
b _{DR/DL}	-	-	13.93	1.06
SS	54.74	40.65	29.24	36.58
r ²	0.79	0.84	0.88	0.86
χ^2 or F test	201.46	14.09	11.41	4.07
df	-	1.00	1.00	1.00
p (χ^2 / F)	1.82 x 10 ⁻⁴²	0.00017	0.00073	0.04

IA é o modelo de ação independente; S/A é o desvio sinergismo/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; χ^2 ou F é o teste estatístico; p (χ^2 ou F) é o nível de significância do teste estatístico; max é o valor máximo da resposta; CL₅₀ é a concentração que causa imobilidade (valores expressos em mg/L); β é o slope da curva de resposta à dose individual.

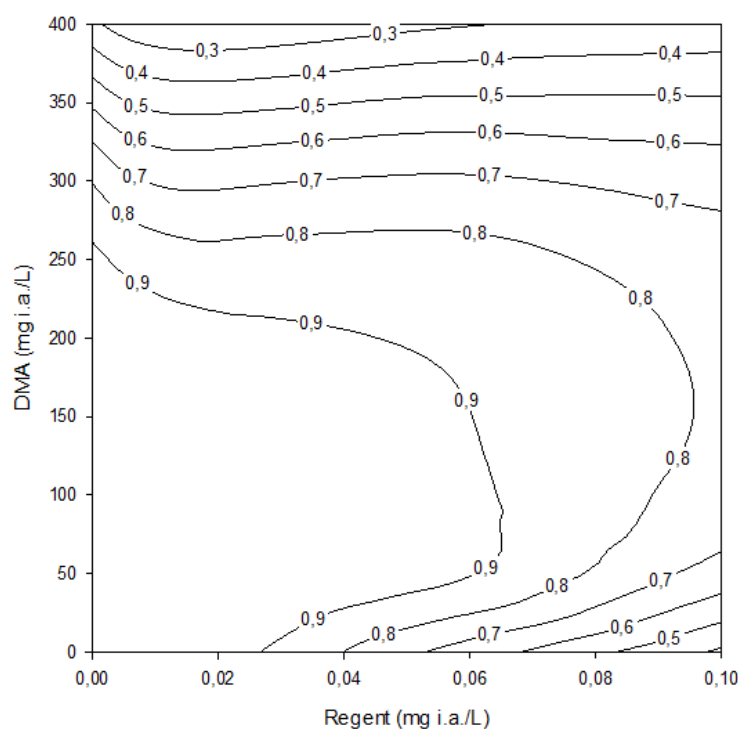


Figura 7: Isobolograma dos efeitos das misturas de Regent (i.a. fipronil) e DMA (i.a. 2,4-D) sobre a sobrevivência de *Daphnia similis*, sendo desvio dependente da proporção da dose (DR) a partir do modelo de IA para a mistura dos agrotóxicos comerciais.

Além disso, nossa hipótese de que a mistura dos agrotóxicos fipronil e 2,4-D provocaria efeitos potencializados na sobrevivência de *D. similis* quando comparado aos efeitos dos compostos agindo isoladamente, foi parcialmente corroborada, pois observou-se efeitos de sinergismo apenas em uma das combinações testadas.

Estudos envolvendo misturas tóxicas reforçam os efeitos causados por essas interações. Segundo Porter (1993), por exemplo, apesar de elementos metálicos isolados nem sempre apontarem efeitos deletérios, quando em misturas podem sofrer interações físicas, químicas e biológicas que tem significativa contribuição tóxica sobre os organismos. Para os agrotóxicos, o mesmo também já foi observado, no qual, dentre os danos causados pelos agrotóxicos e suas misturas à biota aquática estão as possíveis alterações nas comunidades, como perda de biodiversidade, redução na abundância e modificações de grupos funcionais (Edwards, 2002).

Estudos realizados por Mansano (2016), também mostraram um desvio de sensibilidade significativo ao avaliar os efeitos da mistura dos agrotóxicos diuron e carbofuran sobre o protozoário *Paramecium caudatum* e o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*. Para o protozoário *Paramecium caudatum*, a avaliação do modelo IA apontou desvio DR significativo após adição dos parâmetros “a” e “b”, no qual houve antagonismo causado principalmente pelo carbofuran e sinergismo causado principalmente pelo diuron. Já para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, a avaliação do modelo CA apontou desvio DL significativo após adição dos parâmetros “a” e “b”, que no qual houve antagonismo em baixas doses e sinergismos em altas doses, ocorrendo a mudança para sinergismo em um nível da dose menor do que a EC₅₀ (Mansano, 2016).

Notamos, então, a dificuldade de previsão dos impactos dos compostos nos sistemas aquáticos, já que não é possível estabelecer claras correlações entre os resultados dos compostos agindo isoladamente e de suas misturas. Não poderíamos afirmar, por exemplo, quais seriam os resultados de uma análise envolvendo os efeitos que uma mistura de carbofuran, diuron, fipronil e 2,4-D teriam sobre um determinado organismo. As possibilidades de interações e as alterações dos efeitos, podendo ser sinérgico, antagônico ou aditivo limitam as previsões.

Em outras palavras, as interações entre os contaminantes não obedecem a um padrão, podendo afetar de maneira diferente os variados organismos de acordo com o conjunto de substâncias presentes em determinado ambiente. Com isso, como mencionado por Maltby (2005), o desafio enfrentado pelos avaliadores de riscos

ecológicos para proteger a diversidade de espécies e os atributos funcionais dos ecossistemas frente às misturas de contaminantes ambientais é enorme.

Enserink (1991) ressalta que mesmo em casos no qual não se observam efeitos 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 potencializar os efeitos, aumentando assim os efeitos nos organismos. Finalmente, é preciso considerar que as análises de risco ecológicos que utilizam somente a toxicidade dos compostos individuais podem apontar, na realidade, para riscos subestimados, uma vez que a ação tóxica das substâncias pode ser potencializada quando em mistura.

6.3 Toxicidade crônica: reprodução e estrutura em tamanho

As tabelas apresentadas no Anexo 3 (Tabela 1 a 4) expressam os resultados da contagem de neonatas do teste de toxicidade crônica para o fipronil. A Figura 8 abaixo permite visualizar a variação da fecundidade (número de neonatas/fêmea) entre as diferentes concentrações testadas do inseticida.

Para o teste crônico com o Regent® 800 WG (i.a. fipronil), houve diminuição do número de neonatas produzidas por fêmea na última concentração testada (16 µg i.a./L) (Figura 8). Estudos com *Daphnia magna* que avaliaram os efeitos do fipronil no desenvolvimento desses organismos mostraram um valor mínimo de efeito observado de 19 µg/L (US EPA 1992). Já experimentos envolvendo *Daphnia pulex* apontaram um valor mínimo de efeito observado na reprodução de 50 µg/L (Stark e Vargas, 2005). Comparativamente, os resultados obtidos na presente pesquisa apontam maior sensibilidade em relação à *Daphnia magna* e *Daphnia pulex*, apesar da primeira apresentar valores bastante próximos dos encontrados para a *Daphnia similis*.

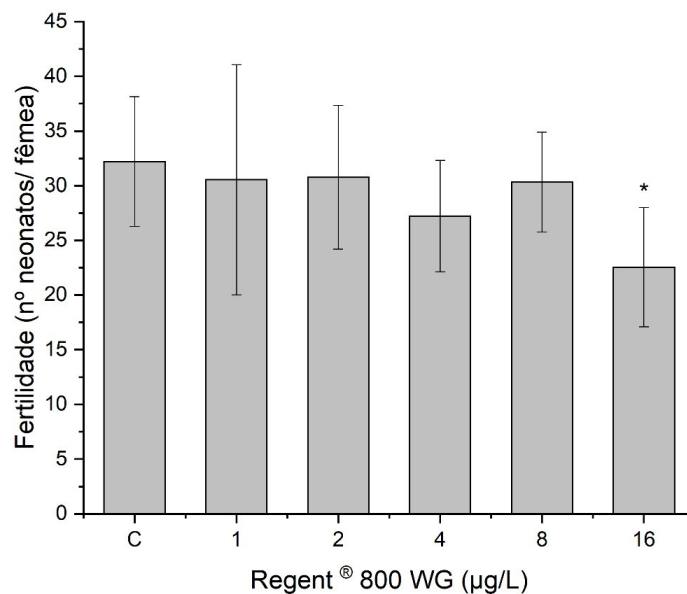


Figura 8: Fecundidade (número de neonatas por fêmea) de *Daphnia similis* (média $\pm$ desvio padrão) após 15 dias de exposição a diferentes concentrações de fipronil dosado como Regent® 800 WG. O asterisco indica o valor significativamente diferente do controle ($p \leq 0,05$, teste de Dunnett).

Estudos desenvolvidos no Brasil registraram concentrações de 0,1 a 26,2 µg/L de fipronil em rios no estado do Rio Grande do Sul (Marchesan et al., 2010; Grützmacher et al., 2008) e 4,23 µg/L em sedimento de lagoa marginal do rio Mogi-SP (Peret et al., 2010). Com base em tais registros, constata-se que a reprodução da espécie poderia ser afetada, tendo os resultados, dessa forma, relevância ecológica e a concentração de efeito apresenta potencialmente risco ambiental.

Sobre a associação dos resultados dos experimentos já realizados com *Daphnia similis*, concentrações reportadas no meio ambiente e valores estipulados em análises de risco ambiental, no caso do fipronil, existe a necessidade de maior atenção com base na sua probabilidade de exercer efeitos negativos sobre o equilíbrio da cadeia trófica dos ecossistemas aquáticos. Uma vez que o fipronil atua diretamente no sistema nervoso central de insetos e possui alto grau de seletividade, afetando predominantemente invertebrados, os efeitos observados para o organismo estudado podem ser preocupantes se consideramos os possíveis impactos à outras espécies de invertebrados do ecossistema aquático, que demonstraram possuir através da SSD ainda maior sensibilidade.

Para o teste crônico com DMA[®] 806 BR (i.a. 2,4-D) não foram constatadas diferenças significativas para as concentrações testadas, com relação ao parâmetro reprodução (número de neonatos/fêmea) (Figura 9).

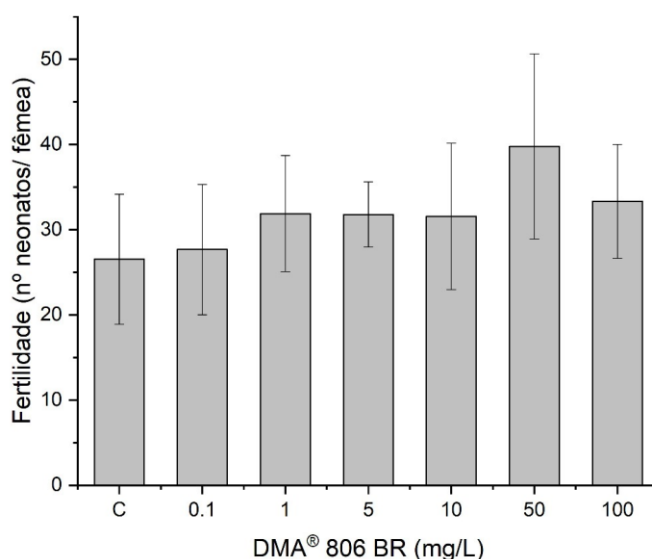


Figura 9: Fecundidade (número de neonatos por fêmea) de *Daphnia similis* (média $\pm$ desvio padrão) após 15 dias de exposição a diferentes concentrações de 2,4-D dosado como DMA[®] 806 BR.

Estudos realizados por Kashian e Dodson (2002) com *Daphnia magna* apontam que o 2,4-D não promoveu efeitos na reprodução desses organismos em concentrações até 0,1 mg/L. Matsumoto (2009) complementa os dados de fecundidade para a espécie mostrando não observar efeitos até 10 mg/L. Assim, esses resultados corroboram com os dados obtidos no presente estudo.

O herbicida 2,4-D também tem sido detectado em ambientes aquáticos próximos a cultivos agrícolas, demonstrando assim, que podem ser transportados para corpos d'água adjacentes. Segundo Marchesan et al. (2010) encontraram valores entre 0,3 a 3,4 $\mu\text{g/L}$, podendo chegar a 366,6 $\mu\text{g/L}$ de 2,4-D (CETESB, 2017). O 2,4-D é um herbicida que promove o crescimento descontrolado do número de divisões celulares da planta, levando a danos no tecido vascular e, conseqüentemente, a morte. Devido seu modo de ação diretamente sobre produtores primários, é esperado que cladóceros não sofram efeitos diretos sobre a reprodução nas concentrações testadas. No entanto, estudos indicam efeitos variados sobre invertebrados e até mesmo vertebrados, tais como descritos por Milam (2005), que

estudou os efeitos do 2,4-D em diferentes organismos-teste, incluindo os cladóceros *Ceriodaphnia dubia* e *Daphnia magna*.

Com relação as medidas de tamanho corporal de *D. similis* foram avaliadas de forma a analisar possíveis diferenças sobre esse parâmetro entre as concentrações testadas dos agrotóxicos. Inicialmente, realizou-se a medições do tamanho das fêmeas expostas durante 15 dias aos agrotóxicos e posteriormente as neonatas produzidas a cada ninhada pelas fêmeas adultas. Todas essas medidas para o teste com fipronil podem ser encontradas no Anexo 4 (Tabela 1 a 4) e as para o teste com 2,4-D no Anexo 5 (Tabela 1 a 4).

Na Figura 10 são apresentados os resultados obtidos com relação ao tamanho da fêmea exposta por 15 dias ao fipronil. Observa-se que não foram constatadas diferenças significativas no tamanho das fêmeas em exposição as diferentes concentrações do fipronil.

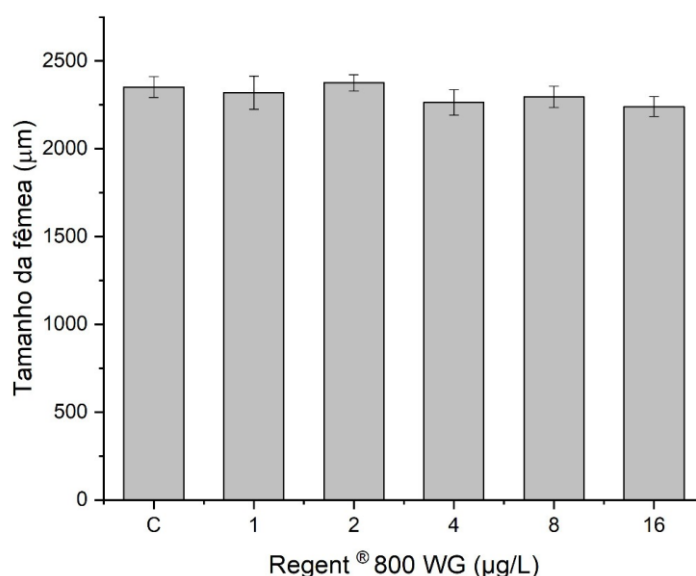


Figura 10: Tamanho corporal da fêmea adulta – materno (média de dez repetições $\pm$ desvio padrão) de *D. similis* após 15 dias de exposição a concentrações subletais de fipronil dosado como Regent® 800 WG.

A análise comparativa entre as três ninhadas também mostrou não haver diferença significativa entre o tamanho das neonatas nas concentrações de fipronil expostas (Figura 11).

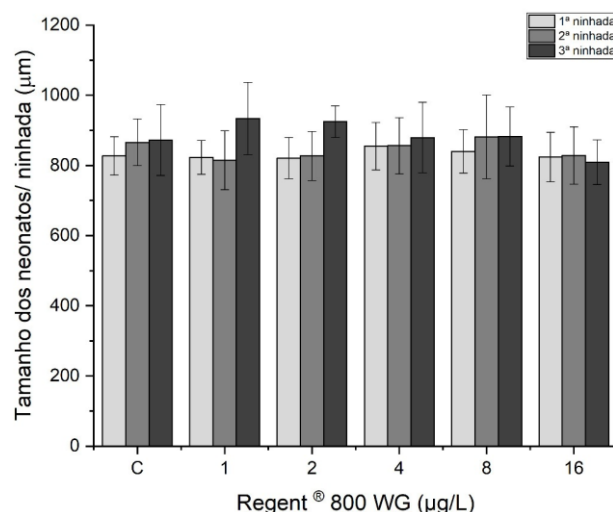


Figura 11: Tamanho dos neonatos por ninhada (média de dez repetições $\pm$ desvio padrão) de *D. similis* após 15 dias de exposição a concentrações subletais de fipronil dosado como Regent® 800 WG.

Já para o agrotóxico DMA® 806 BR (i.a. 2,4-D), apesar de não haver diferenças significativas no tamanho das fêmeas adultas para as diferentes concentrações do herbicida (Figura 12), essas diferenças foram encontradas nas três ninhadas para a concentração de 1 mg/L e 100 mg/L, além da terceira ninhada para as concentrações de 10 mg/L e 50 mg/L (Figura 13). Com isso, é possível inferir que a presença desse composto no ambiente natural pode levar a alterações no desenvolvimento das neonatas de diferentes ninhadas, podendo assim ocasionar um desequilíbrio no ecossistema decorrente, por exemplo, em alterações na capacidade natural de crescimento dessa população.

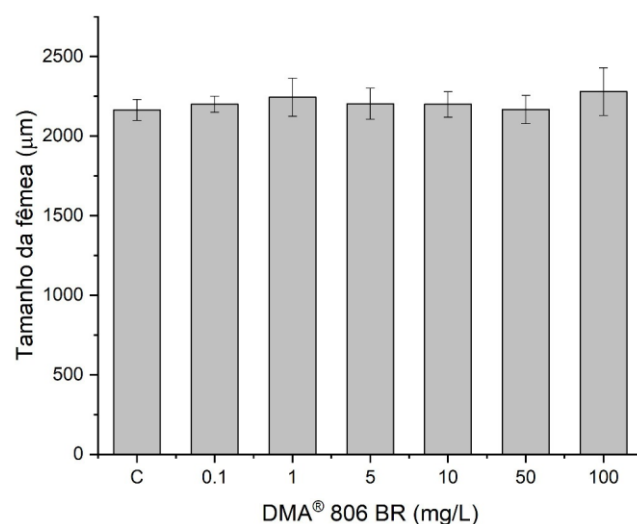


Figura 12: Tamanho corporal da fêmea adulta (média de dez repetições $\pm$ desvio padrão) de *D. similis* após 15 dias de exposição a concentrações subletais de 2,4-D dosado como DMA® 806 BR.

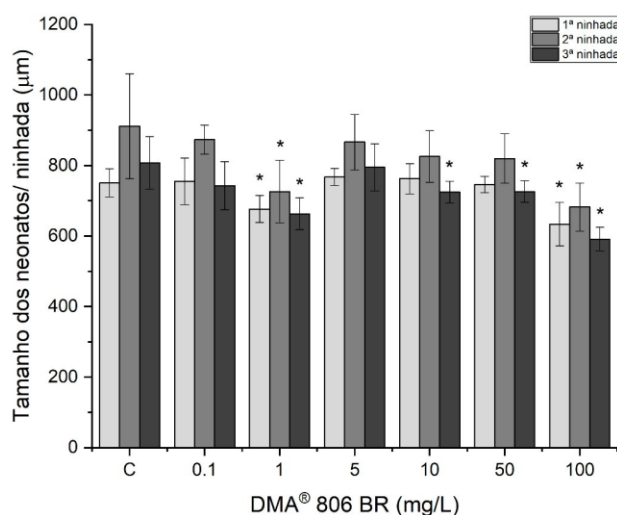


Figura 13: Tamanho dos neonatos por ninhada (média de dez repetições $\pm$ desvio padrão) de *D. similis* após 15 dias de exposição a concentrações subletais de 2,4-D dosado como DMA® 806 BR. Os asteriscos indicam valores significativamente diferente do controle ($p \leq 0,05$, teste de Dunnet).

Dessa forma, nossa hipótese de que a exposição ao inseticida fipronil e ao herbicida 2,4-D, isoladamente, provocaria alterações significativas na reprodução, estrutura em tamanho das fêmeas adultas e das neonatas produzidas nas três primeiras ninhadas de *D. similis*, foi parcialmente corroborada, já que somente o fipronil causou menor reprodução e somente o 2,4-D causou efeitos (diminuição) na estrutura em tamanho das ninhadas de *D. similis*.

6.4 Testes de alimentação

As taxas de alimentação dos organismos foram comparadas com a taxa de alimentação dos controles, que continham apenas água de cultivo, algas e os organismos, sem a presença de nenhum dos contaminantes. No teste de exposição (24 h) com o inseticida fipronil, foi possível observar uma diminuição na taxa de filtração dos organismos, que foi mais acentuada para a concentração de 16 $\mu\text{g/L}$, embora não tenha sido estatisticamente significativo ($p = 0,275$). Para as taxas de ingestão não foram observadas diferenças significativas ($p = 0,403$). E com relação aos experimentos de pós-exposição, diferenças estatísticas também não foram observadas. Quando comparado ao grupo controle, tanto a filtração ($p = 0,426$) quanto ingestão ($p = 0,379$) não foram alteradas.

Para o 2,4-D, também não foram observadas diminuições nas taxas de alimentação de *D. similis*, tanto para filtração ($p = 0,174$), quanto ingestão ($p = 0,212$) durante a exposição de 24 horas aos compostos. E nos experimentos de pós-exposição, de 4 horas, as taxas de filtração ($p = 0,162$) e ingestão ($p = 0,159$) também não foram alteradas, quando comparadas ao controle.

As Figuras 14 e 15 abaixo mostra quais foram as taxas de alimentação em relação ao controle para cada uma das concentrações testadas para o fipronil e 2,4-D, respectivamente.

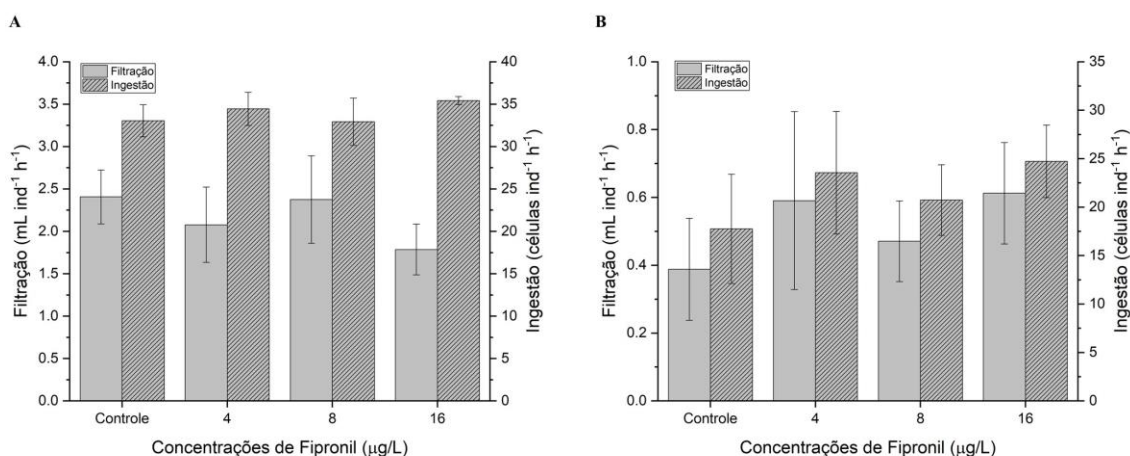


Figura 14: Taxa de alimentação de *D. similis* expostas ao fipronil, em A por 24 horas e em B nos experimentos de pós-exposição, de 4 horas.

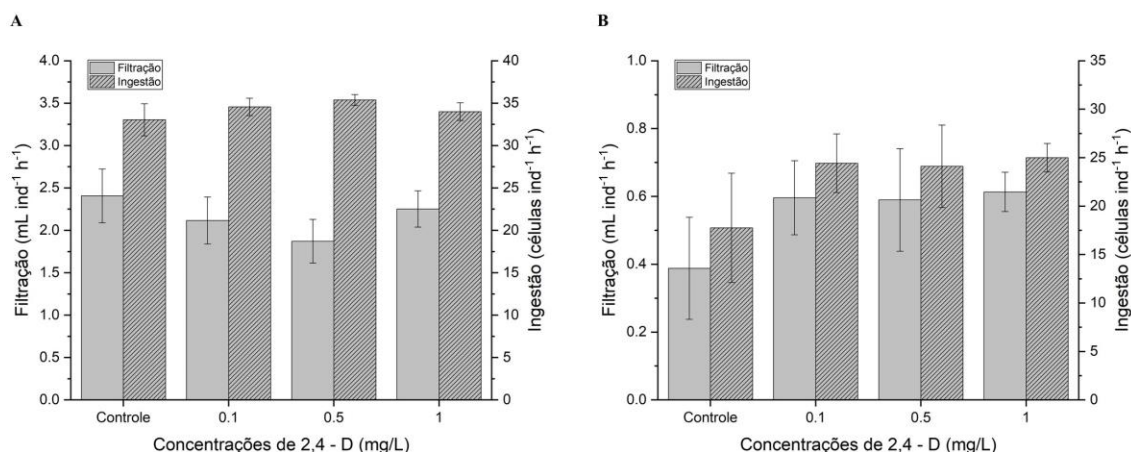


Figura 15: Taxa de alimentação de *D. similis* expostas ao 2,4-D, em A por 24 horas e em B nos experimentos de pós-exposição, de 4 horas.

A Tabela 6 mostra o resultado de testes de alimentação realizados com cladóceros expostos a diferentes agrotóxicos. Nela, podemos observar o composto, a resposta observada, a forma de avaliação do teste de alimentação e a metodologia de análise.

Tabela 7: Respostas de testes de alimentação realizados com dafnídeos 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
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).

Um estudo realizado por Barata (2006) observou as taxas de alimentação de *Daphnia magna* em exposição a deltametrina e cyhalotrina. A taxa de alimentação dos organismos foi avaliada a partir da estimativa espectofotométrica da densidade de alga no meio. Ambos os compostos mencionados – deltametrina e cyhalotrina – possuem a mesma classificação e são considerados inseticidas. Os resultados apontaram a diminuição da taxa de alimentação em função da presença dos agrotóxicos no meio, o que difere do resultado obtido para o fipronil - que também é um inseticida, pois apesar da queda da taxa de alimentação mais acentuada observada para esse composto, os valores não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle.

Uma vez que a literatura apresenta carência de informações de testes de alimentação utilizando como organismo-teste *Daphnias*, sob exposição de herbicidas, o resultado obtido para este agrotóxico também foi analisado tendo como base de comparação os compostos descritos na Tabela 6. De maneira semelhante, o 2,4-D difere dos dados por não apresentar taxas de alimentação significativamente diferentes do controle.

Quanto à pós-exposição, tanto o fipronil quanto o 2,4-D não apresentaram alterações significativas nas taxas de alimentação de *D. similis* nas concentrações testadas. Ainda assim, observa-se um leve aumento da taxa de alimentação dos organismos submetidos a tratamento em relação ao controle, que poderia ser explicado pelo fato de que o controle estaria mais “bem alimentado” e, por isso, não necessitaria do aumento da ingestão de alimentos. No entanto, são necessários estudos futuros para avaliar tal suposição. Assim, a hipótese de que alterações significativas nas taxas de alimentação (filtração e ingestão) de *D. similis* ocorreriam quando expostas aos agrotóxicos, podendo ser prejudicada a capacidade de recuperação, avaliada nos testes de pós-exposição aos contaminantes não foi corroborada.

6.5 Teste de sensibilidade

A tabela a seguir (Tabela 8) apresenta os resultados para o teste agudo realizado antes do início dos experimentos para a avaliação da sensibilidade do cultivo de *Daphnia similis* quando expostas à substância de referência KCl que seria utilizado para a verificação da saúde (condição fisiológica) dos organismos-teste. Essa etapa é cumprida rotineiramente por diferentes pesquisadores do laboratório a fim de ser observada se a espécie se encontra na faixa de sensibilidade estabelecida para o laboratório. Durante a execução de todos os experimentos esse requisito foi cumprido.

Tabela 8: Resultado do teste de sensibilidade do cultivo de *Daphnia similis*.

Amostra	Variáveis da amostra			Organismos imóveis/mortos				Efeito		Variáveis finais	
	pH	OD	Cond	1	2	3	4	Total	%	pH	OD
Controle	7,56	7,48	163,4	0	0	0	0	0	0	7,38	7,67
400 mg/L	7,45	7,46	863	0	0	0	0	0	0	7,42	7,82
480 mg/L	7,38	7,5	1001	0	0	0	0	0	0	7,45	7,7
576 mg/L	7,31	7,43	221	0	1	1	0	2	10	7,38	7,68
690 mg/L	7,24	7,33	1395	0	3	0	0	3	15	7,42	7,66
830 mg/L	7,25	7,42	1675	5	5	5	5	20	100	7,43	7,61

7. CONCLUSÕES

Os resultados dos testes agudos com os compostos isolados mostraram haver maior toxicidade do fipronil do que o 2,4-D para o cladóceros *D. similis*. Ao comparar a sensibilidade de *D. similis* com outras espécies através de SSDs, é possível notar que, no caso do agrotóxico fipronil, espécies do gênero *Chironomus*, *Hyalella* e *Ceriodaphnia*, por exemplo, apresentam maior sensibilidade quando comparadas à *D. similis*. Já para o 2,4-D, *D. similis* apresentou baixa sensibilidade quando exposta ao herbicida se comparada as outras espécies analisadas. Com relação ao teste de misturas dos agrotóxicos, ficou evidente que as interações entre os contaminantes podem afetar a espécie de maneiras distintas da ação individual dos produtos,

levando a sérios riscos ambientais que, muitas vezes, não são passíveis de serem previstos em avaliações de risco que levam em consideração somente a toxicidade dos compostos isolados. Assim, novos estudos na área de misturas tóxicas seriam de grande contribuição no sentido de desenvolvimento de técnicas de prevenção e mitigação dos impactos. Os testes de toxicidade crônica apontaram uma diminuição do número de neonatas por fêmea apenas na maior concentração testada para o fipronil. No entanto, as medidas de estrutura em tamanho dos cladóceros apresentaram diferenças significativas nos testes com 2,4-D, no qual as três ninhadas para a concentração de 1 mg/L e 100 mg/L, além da terceira ninhada para as concentrações de 10 mg/L e 50 mg/L apresentam alterações. Com isso, fica evidenciando que efeitos de desequilíbrio na população da espécie podem ocorrer. O teste de alimentação não mostrou diferenças significativas. No entanto, comparando os resultados obtidos com outros estudos podemos inferir que, provavelmente, em concentrações ambientais maiores do que as testadas, mudanças significativas na taxa de alimentação de *D. similis* possam ser observadas. Assim, mais estudos sobre o tema também se mostram necessários.

8. REFERÊNCIAS

- ACAYABA, R.D., ALBUQUERQUE, A.F., RIBESSI, R. L., UMBUZEIRO, G.A., MONTAGNER, C. C. 2020. Occurrence of pesticides in waters from the largest sugar cane plantation region in the world. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-12.
- ABNT - Associação Brasileira de Normas técnicas. 2022. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp.* (Crustacea, Cladocera). NBR 12713. Brasil.
- ALBUQUERQUE, A.F., RIBEIRO, J.S., KUMMROW, F., NOGUEIRA, A.J.A., MONTAGNER, C.C., UMBUZEIRO, G.A. 2016. Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 18, 779-787.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2017. Acessado em <http://portal.anvisa.gov.br/noticias//asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/divulga-do-relatorio-sobre-residuos-de-agrotoxicos-em-alimentos/219201?inheritRedirect=false>. Acesso em 02/09/2017.
- 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. *Aquatic Toxicology*, 78(1), 1–14.
- 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). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 88, 296-299.
- BOWNIK, A. 2019. Physiological endpoints in daphnid acute toxicity tests. *Science of The Total Environment*, 700, 134400.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. 2018. Qualidade das águas interiores no Estado de São Paulo – Série Relatórios. 303 p. Acessado em <https://cetesb.sp.gov.br/aguasinteriores/wpcontent/uploads/sites/12/2018Bro-de-Qualidade_das%C3%81guas-Interiores-no-Estado-deS%C3%A3oPaulo2017.pdf>. Acesso em 19 de dezembro de 2018.
- CORBIÈRE-NICOLLIER, T., BLANC, I., ERKMAN, S. 2011. Towards a global criteria based framework for the sustainability assessment of bioethanol supply chains: Application to the Swiss dilemma: Is local produced bioethanol more sustainable than bioethanol imported from Brazil?. *Ecological Indicators*, 11(5), 1447-1458.
- 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: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 15, 65-72.

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.

DAS, P.C., CAO, Y., CHERRINGTON, N., HODGSON, E., ROSE, R.L. 2006. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*, 164, 200-214.

DORES, E. F.G.C., CARBO, L., RIBEIRO, M. L., DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. 2008. Pesticide levels in ground and surface waters of primavera do leste region, Mato Grosso, Brazil. *Journal of Chromatographic Science*, 46(7), 585–590.

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.

FAI, P. B. A., MBIDA, M., DEMEFACK, J. M., YAMSSI, C. 2015. Potential of the microbial assay for risk assessment (MARA) for assessing ecotoxicological effects of herbicides to non-target organisms. *Ecotoxicology*, 24(9), 1915–1922.

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.

GODOY, A.A., DOMINGUES, I., NOGUEIRA, A.J.A., KUMMROW, F. 2018. Ecotoxicological effects, water quality standards and risk assessment for the anti-diabetic metformin. *Environmental Pollution*, 243, 534-542.

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.

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

GRUTZMACHER DD, GRUTZMACHER AD, AGOSTINETTO D, LOECK AE, ROMAN R, PEIXOTO SC, et al. 2008. Monitoring of pesticides in two water sources in southern Brazil. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*. 12(6), 632–7.

GUNASEKARA, A.S., TRUONG, T., GOH, K.S., SPURLOCK, F., TJEERDEMA, R.S. 2007. Environmental fate and toxicology of fipronil. *Journal of Pesticide Science*, 32, 189-199.

HAYASAKA, D. et al. 2012. Differences in susceptibility of five cladoceran species to two systemic insecticides, imidacloprid and fipronil. *Ecotoxicology*, 21(2), 421–427.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente dos Recursos Naturais Renováveis. 2016. Boletins, 2009–2014: Vendas de ingredientes ativos por UF. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Acesso em 04/08/2017.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção Agropecuária. Disponível em < Produção Agropecuária no Brasil | IBGE>. Acesso em 01/06/2022.

INVESTSP – Agência Paulista de Promoção de Investimentos e Competitividade. 2022. Setores de negócios, Agronegócio, Cana-de-açúcar. Disponível em <<https://www.investe.sp.gov.br/setores-de-negocios/agronegocios/cana-de-acucar/>>. Acesso em 09/11/2022.

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 Microbiology Ecology, 84, 124-132.

KASHIAN D.R., DODSON S.I. 2002. Effects of common-use pesticides on developmental and reproductive processes in *Daphnia*. Toxicology and Industrial Health, 18, 225–235.

LACHER, T.E. AND GOLDSTEIN, MI. 1997. Tropical ecotoxicology: status and needs. Environmental Toxicology and Chemistry, 16(1), 100-111.

LINS, E.A.M., MENEZES, F.M.M., CUNHA, L.V.F.C, PAIVA, S.C. 2021. Análise dos possíveis impactos ambientais causados por agrotóxicos em plantio de cana-de-açúcar na cidade de Escada, Pernambuco. 4º Congresso Sul-Americano de Resíduos Sólidos e Sustentabilidade. 1-6.

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. Environmental toxicology and chemistry 24, 379–388.

MANRIQUE, W.G., FIQUEIREGO, M.A.P., MACHADO-NETO, J.G. 2013. Dissipation and environmental risk of fipronil on aquatic environment. The Biologist (Lima). 11(1), 107-117.

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.

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. Ciência Rural, 40, 1053-1059.

MATSUMOTO K., HOSOKAWA M., KURODA K., ENDO G. 2009. Toxicity of agricultural chemicals in *Daphnia magna*. Osaka City Med J 55, 89–97.

MILAM C.D., FARRIS J.L., DWYER F.J., HARDESTY D.K. 2005. Acute toxicity of six freshwater mussel species (Glochidia) to six chemicals: implications for Daphnids and *Utterbackia imbecillis* as surrogates for protection of freshwater mussels (Unionidae). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 48, 166–173

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) – Informações técnicas: Registros concebidos de 2005 a 2019. Disponível em <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/informacoes-tecnicas>. Acesso em 11/03/2020.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. Segurança química - Agrotóxicos. 2020. Acessado em <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>>. Acesso em 10/03/2020.

MOREIRA, J.C., PERES, F., SIMÕES, A.N., PIGNATI, W.A., DORES, E.C., VIEIRA, S.N., STRÜSSEMANN, C., MOTT, T. 2012. Contaminação de águas superficiais e de chuva por agrotóxicos em uma região do estado do Mato Grosso. Ciência & Saúde Coletiva, 18, 1557-1568.

NELSON, S. M.; ROLINE, R.A. 1998. Evaluation of the Sensitivity of Rapid Toxicity Tests Relative to Daphnid Acute Lethality Tests. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 60(2), 292–299,

NGIM, K.K., CROSBY, D.G. 2001. Abiotic processes influencing fipronil and desethiofipronil dissipation in California, USA, rice fields. Environmental Toxicology and Chemistry, 20(5), 972-977.

NOGUEIRA, E.N., DORES, E.F.G.C., PINTO, A.A., AMORIM, R.S.S., RIBEIRO, M.R., LOURENCETTI, C. 2012. Currently used pesticides in water matrices in Central-western Brazil. Journal of the Brazilian Chemical Society, 23, 1476-1487.

ORIS, J. T.; WINNER, R. W.; M, M. V. 2010. A four-day survival and reproduction toxicity test for *Ceriodaphnia dubia*. Environmental Toxicology and Chemistry, 10(2), 217–224.

ORUÇ, E.O., SEVGILER, Y., UNER, N. 2004. Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. Comparative Biochemistry & Physiology - Part C. 137, 43-51.

PORTER, W.P., GREEN, S.M., DEBBINK, N.L., CARLSON, I., 1993. Groundwater pesticides: interactive effects of low concentrations of carbamates aldicarb and methomyl and the triazine metribuzin on thyroxine and somatotropin levels in white rats. Journal of Toxicology and Environmental Health, 40, 15–34.

RAND, G.M. 1995. Introduction to aquatic toxicology. In: Fundamentals of Aquatic Toxicology: effects, environmental fate and risk assessment. Palm Beach, Florida: Taylor and Francis Publisher.

HENRIQUES, A.F.R. 2021. Impact of agricultural expansion in the neutral and adaptive genetic variability of wild bees. Tese de mestrado em Biologia Evolutiva e Desenvolvimento, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências.

RIGOTTO, R.M., VASCONCELOS, D.P., ROCHA, M.M. 2014. Pesticide use in Brazil and problems for public health. *Cadernos de Saúde Pública*. 30(7), 1360-1362.

SANCHEZ-BAYO, F., HYNE, R.V., 2011. Comparison of environmental risks of pesticides between tropical and non-tropical regions. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 7(4), 577-586.

SARMENTO, H., UNREIN, F., ISUMBISHO, M., STENIUTE, S., GASOL, J.M., Descy, J.-P., 2008. Abundance and distribution of picoplankton in tropical, oligotrophic Lake Kivu, eastern Africa. *Freshwater Biology* 53, 756-771.

STARK, J.D., VARGAS, R.I. 2005. Toxicity and hazard assessment of fipronil to *Daphnia pulex*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62, 11–16.

SILVA, A.R.R., CARDOSO, D.N., CRUZ, A., LOURENÇO, J., MENDO, S., SOARES, A.M.V.M., LOUREIRO, S. 2015. Ecotoxicity and genotoxicity of a binary combination of triclosan and carbendazim to *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 115:279–290.

TINGLE, C.C., ROTHER, J.A., DEWHUST, C.F., LAUER, S., KING, W.J. 2003. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 176, 1-66.

ÚNICA - União da Indústria de Cana de Açúcar. 2015. Acessado em <<http://www.unica.com.br/noticia/25950095920326811142/safra-2015-por-cento2F2016-no-centro-sul-deve-atingir-590-milhoes-de-toneladas-de-cana-processadas-por-cento2C-com-prioridade-para-a-producao-de-etanol>>. Acesso em 2/4/17.

VACCHI, F.I., DER OHE, P.C.V., ALBUQUERQUE, A.F., VENDEMIATTI, J.A.S., AZEVEDO, C.C.J., HON ORIO, J.G., SILVA, B.F., ZANONI, M.V.B., HENRY, T.B., NOGUEIRA, A.J.A., UMBUZEIRO, G.A., 2016. Occurrence and risk assessment of an azo dye - the case of Disperse Red 1. *Chemosphere* 156, 95e100.

VILLAROEL, 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.

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.

YOSHII, M.P.C, ESPÍNDOLA, E.L.G., DAAM, M.A., 2022. Efeitos do herbicida 2,4-D e do inseticida fipronil, isolados e em mistura, em macrófitas aquáticas e fauna associada. Tese de doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental, Universidade de São Paulo.

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

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.

Anexo 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	$b_i > 0$ – antagonismo onde a toxicidade da mistura é causada principalmente pelo toxicante i	
	$a < 0$ – sinergismo, exceto para aquelas proporções de misturas onde um valor de b positivo significativo indica antagonismo	$b_i < 0$ – sinergismo onde a toxicidade da mistura é causada principalmente pelo toxicante i	
Dependente do nível da dose (DL)		$b_{DL} > 1$ – mudança em nível da dose	$b_{DL} > 2$ – mudança em nível da dose
	$a > 0$ – antagonismo em nível da dose baixo e sinergismo em nível da dose alto	do que CE_{50}	menor do que CE_{50}
		$b_{DL} = 1$ – mudança em CE_{50}	$b_{DL} = 2$ – mudança em CE_{50}
	$a < 0$ – sinergismo em nível da dose baixo e antagonismo em nível da dose alto	$0 < b_{DL} < 1$ – 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	$1 < b_{DL} < 2$ – 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

Anexo 2 - Parâmetros e resultados para os testes de toxicidade aguda envolvendo os agrotóxicos Regent® 800 WG (i.a. fipronil) e DMA® 806 BR (i.a 2,4-D)

Tabela 1. Resultado do teste 1 de toxicidade aguda para o fipronil.

Amostra	Variáveis da amostra			Organismos imóveis/mortos				Efeito		Variáveis finais	
	pH	OD	Cond	1	2	3	4	Total	%	pH	OD
Controle	7,38	7,36	158,9	0	0	0	0	0	0	7,48	7,1
5 µg/L	7,4	7,36	157,4	0	0	0	0	0	0	7,5	7,01
10 µg/L	7,4	7,33	158,2	0	0	0	0	0	0	7,52	6,94
25 µg/L	7,38	7,34	157,6	1	1	0	0	2	13,33	7,51	9,92
50 µg/L	7,39	7,35	158	2	2	2	0	6	40	7,51	6,99
100 µg/L	7,36	7,35	159,9	5	5	5	0	15	100	7,53	7,01

Tabela 2. Resultado do teste 2 de toxicidade aguda para o fipronil.

Amostra	Variáveis da amostra			Organismos imóveis/mortos				Efeito		Variáveis finais	
	pH	OD	Cond	1	2	3	4	Total	%	pH	OD
Controle	7,72	7,59	158,4	0	0	0	0	0	0	7,8	7,06
5 µg/L	7,72	7,45	156,8	0	1	0	0	1	5	7,75	6,99
10 µg/L	7,65	7,41	155,9	0	0	0	0	0	0	7,73	7,01
25 µg/L	7,53	7,5	156,3	1	1	0	1	3	15	7,68	7,08
50 µg/L	7,49	7,54	155,1	1	2	1	2	6	30	7,63	6,96
100 µg/L	7,5	7,58	154,3	4	4	4	4	16	80	7,61	7,01

Tabela 3. Resultado do teste 3 de toxicidade aguda para o fipronil.

Amostra	Variáveis da amostra			Organismos imóveis/mortos				Efeito		Variáveis finais	
	pH	OD	Cond	1	2	3	4	Total	%	pH	OD
Controle	7,34	7,12	157,9	0	0	0	0	0	0	7,31	7,05
5 µg/L	7,36	6,85	157	0	0	1	0	1	5	7,41	6,72
10 µg/L	7,32	6,87	156,7	0	0	0	0	0	0	7,33	6,8

25 µg/L	7,42	6,88	158	1	0	1	1	3	15	7,45	6,81
50 µg/L	7,46	6,91	156,3	2	2	2	2	8	40	7,51	8,86
100 µg/L	7,48	6,85	153,7	3	5	3	2	13	65	7,55	6,79

Tabela 4. Resultado do teste 4 de toxicidade aguda para o fipronil.

Amostra	Variáveis da amostra			Organismos imóveis/mortos				Efeito		Variáveis finais	
	pH	OD	Cond	1	2	3	4	Total	%	pH	OD
Controle	7,36	7,09	157,5	0	0	0	0	0	0	7,8	7,06
5 µg/L	7,38	6,83	157,1	0	0	0	0	0	0	7,75	6,99
10 µg/L	7,31	6,84	156,7	0	0	0	0	0	0	7,73	7,01
25 µg/L	7,42	6,88	158,1	1	1	1	0	3	15	7,68	7,08
50 µg/L	7,45	6,9	156,3	2	1	2	1	6	30	7,63	6,96
100 µg/L	7,44	6,82	153,7	3	4	4	4	15	75	7,61	7,01

Tabela 5. Resultado do teste 1 de toxicidade aguda para o 2,4-D.

Amostra	Variáveis da amostra			Organismos imóveis/mortos				Efeito		Variáveis finais	
	pH	OD	Cond	1	2	3	4	Total	%	pH	OD
Controle	7,44	7,89	163,2	0	0	0	0	0	0	7,59	7,59
50 mg/L	7,44	8,06	175,4	0	0	0	0	0	0	7,57	7,6
100 mg/L	7,45	8	195,1	1	0	0	0	1	5	7,57	7,72
200 mg/L	7,43	8,08	235	0	0	1	1	2	10	7,56	7,69
300 mg/L	7,43	8,06	266	2	3	3	2	10	50	7,54	7,62
400 mg/L	7,4	8	302	3	5	4	2	14	70	7,56	7,66

Tabela 6. Resultado do teste 2 de toxicidade aguda para o 2,4-D.

Amostra	Variáveis da amostra			Organismos imóveis/mortos				Efeito		Variáveis finais	
	pH	OD	Cond	1	2	3	4	Total	%	pH	OD
Controle	7,45	7,5	157,1	0	0	0	0	0	0	7,58	7,02
50 mg/L	7,48	7,53	174,6	0	0	0	0	0	0	7,51	6,93

100 mg/L	7,42	7,58	191,2	0	0	0	0	0	0	7,5	6,95
200 mg/L	7,42	7,58	223	0	1	0	1	2	10	7,44	6,96
300 mg/L	7,4	7,49	265	1	1	0	2	4	20	7,47	6,85
400 mg/L	7,39	7,53	300	5	4	4	5	18	90	7,42	6,8

Tabela 7. Resultado do teste 3 de toxicidade aguda para o 2,4-D.

Amostra	Variáveis da amostra			Organismos imóveis/mortos				Efeito		Variáveis finais	
	pH	OD	Cond	1	2	3	4	Total	%	pH	OD
Controle	7,4	7,36	165,4	0	0	0	0	0	0	7,56	7,26
50 mg/L	7,44	7,33	173,6	0	0	0	0	0	0	7,54	7,29
100 mg/L	7,43	7,33	207	0	0	0	0	0	0	7,52	7,21
200 mg/L	7,45	7,35	223	0	0	0	1	1	5	7,55	7,26
300 mg/L	7,41	7,34	262	0	4	1	4	9	45	7,52	7,24
400 mg/L	7,4	7,33	295	2	3	2	4	11	55	7,56	7,26

Tabela 8. Resultado do teste 4 de toxicidade aguda para o 2,4-D.

Amostra	Variáveis da amostra			Organismos imóveis/mortos				Efeito		Variáveis finais	
	pH	OD	Cond	1	2	3	4	Total	%	pH	OD
Controle	7,33	7,31	164,3	0	0	0	0	0	0	7,46	7,31
50 mg/L	7,42	7,26	172,6	0	0	0	0	0	0	7,55	7,28
100 mg/L	7,4	7,31	201	0	0	0	0	0	0	7,51	7,33
200 mg/L	7,4	7,33	221	1	2	1	1	5	25	7,55	7,31
300 mg/L	7,39	7,29	263	3	3	1	2	9	45	7,48	7,28
400 mg/L	7,42	7,29	284	3	4	4	3	14	70	7,5	7,29

Tabela 9. Resultado do teste de toxicidade aguda para misturas.

Amostra		Variáveis da amostra			Organismos imóveis/mortos			Efeito		Variáveis finais	
Fipronil	2,4-D	pH	OD	Cond	1	2	3	Total	%	pH	OD
Controle		7,28	6,91	161,3	0	0	0	0	0	7,51	7,3
5 µg/L	-----	7,43	6,39	151,4	0	0	0	0	0	7,57	7,25

10 µg/L	-----	7,36	6,84	155,4	0	0	0	0	0	7,59	7,35
25 µg/L	-----	7,38	6,86	154,1	1	0	1	2	13,3	7,61	7,34
50 µg/L	-----	7,37	6,94	154,2	2	2	2	6	40	7,6	7,35
100 µg/L	-----	7,37	7,01	152,2	0	0	0	0	0	7,6	7,36
-----	50 mg/L	7,35	6,94	169,8	0	0	0	0	0	7,57	7,26
-----	100 mg/L	7,32	6,96	187,5	0	0	0	0	0	7,57	7,13
-----	200 mg/L	7,36	6,92	214	0	0	0	0	0	7,55	7,24
-----	300 mg/L	7,35	7,01	257	0	2	2	4	26,7	7,55	7,18
-----	400 mg/L	7,27	7,05	284	3	2	5	10	66,7	7,54	7,19
5 µg/L	50 mg/L	7,29	6,97	168,9	0	0	0	0	0	7,56	7,22
5 µg/L	100 mg/L	7,28	6,98	185	0	0	0	0	0	7,56	7,25
5 µg/L	200 mg/L	7,31	6,95	223	0	0	0	0	0	7,56	7,3
5 µg/L	300 mg/L	7,29	9,97	250	3	0	1	4	26,7	7,55	7,23
5 µg/L	400 mg/L	7,27	7,14	281	1	3	4	8	53,3	7,53	7,05
10 µg/L	50 mg/L	7,3	7,03	172,9	0	0	0	0	0	7,56	7,15
10 µg/L	100 mg/L	7,32	7,06	187	0	0	0	0	0	7,55	7,22
10 µg/L	200 mg/L	7,32	7,07	224	0	0	0	0	0	7,53	7,17
10 µg/L	300 mg/L	7,27	7,07	252	1	1	1	3	20	7,56	7,2
10 µg/L	400 mg/L	7,25	7,06	281	3	2	2	7	46,7	7,56	7,14
25 µg/L	50 mg/L	7,32	7,08	170,9	0	0	0	0	0	7,54	7,25
25 µg/L	100 mg/L	7,33	6,97	182,6	0	0	0	0	0	7,54	7,23
25 µg/L	200 mg/L	7,31	7,04	223	2	0	1	3	20	7,57	7,18
25 µg/L	300 mg/L	7,27	7,07	249	0	0	2	2	13,3	7,56	7,18
25 µg/L	400 mg/L	7,21	7,02	286	2	5	2	9	60	7,54	7,15
50 µg/L	50 mg/L	7,29	6,99	172,1	0	0	0	0	0	7,52	7,21
50 µg/L	100 mg/L	7,3	7	186,5	1	0	0	1	6,7	7,55	7,19
50 µg/L	200 mg/L	7,27	7,04	214	1	0	0	1	6,7	7,56	7,17
50 µg/L	300 mg/L	7,22	7,13	260	1	2	1	4	26,7	7,54	7,17
50 µg/L	400 mg/L	7,23	7,09	279	4	2	4	10	66,7	7,54	7,18
100 µg/L	50 mg/L	7,27	7,13	168,8	0	0	1	1	6,7	7,56	7,2
100 µg/L	100 mg/L	7,28	7,06	181,4	0	1	2	3	20	7,53	7,22
100 µg/L	200 mg/L	7,22	7,1	220	2	2	0	4	26,7	7,53	7,21
100 µg/L	300 mg/L	7,21	7,06	251	3	2	1	6	40	7,54	7,19
100 µg/L	400 mg/L	7,23	7,03	278	3	3	4	10	66,7	7,57	7,19

Anexo 3 - Parâmetros e resultados para os testes crônicos envolvendo os agrotóxicos Regent® 800 WG (i.a. fipronil) e DMA® 806 BR (i.a 2,4-D)

Tabela 1. Parâmetros do teste de toxicidade crônica para o fipronil.

Amostra	Dia	Variáveis da amostra					
		pH A	pH D	OD A	OD D	Cond A	Cond D
Controle	0	7,22	7,55	7,63	7,68	156,6	158,5
	2	7,56	7,61	7,48	7,58	153,6	153,4
	4	7,41	7,69	6,83	7,71	153,8	152
	6	7,44	7,15	6,64	7,28	185,9	165,9
	9	7,14	7,58	6,7	7,4	160,3	162
	12	7,56	7,39	7,39	7,7	160,2	164,6
	14	7,59	7,48	7	7,01	159	160
1 µg/L	0	7,16	7,54	7,53	7,67	155,3	162,3
	2	7,38	7,62	7,38	7,53	150,2	160,5
	4	7,44	7,6	7,02	7,69	158	156,1
	6	7,52	7,2	6,6	7,29	195,4	165
	9	7,11	7,68	6,75	7,55	161,1	163,1
	12	7,56	7,42	7,45	7,74	161,1	162,5
	14	7,55	7,19	6,96	6,99	161,4	163,9
2 µg/L	0	7,11	7,49	7,4	7,63	154,8	164,9
	2	7,34	7,5	7,38	7,43	153,1	159,5
	4	7,42	7,6	7,01	7,71	158,2	159,3
	6	7,48	7,19	6,45	7,3	191,4	166,6
	9	7,13	7,65	6,78	7,56	161,6	165,5
	12	7,56	7,42	7,3	7,61	160,7	163,6
	14	7,5	7,26	6,91	6,92	160,2	171,7
4 µg/L	0	7,08	7,47	7,34	7,62	156,9	162,7
	2	7,28	7,3	7,31	7,6	155,7	159,5
	4	7,35	7,54	6,88	7,61	156,8	157,3

	6	7,44	7,2	6,63	7,24	187,6	164,8
	9	7,13	7,66	6,74	7,61	161,9	164,1
	12	7,56	7,43	7,35	7,67	162,4	164,6
	14	7,5	7,26	6,91	6,92	160,2	171,7
8 µg/L	0	7,06	7,35	7,39	7,66	156,7	164
	2	7,21	7,32	7,25	7,67	155,8	159,9
	4	7,33	7,39	6,95	7,7	158,1	159,4
	6	7,39	7,2	6,62	7,23	182,9	170,3
	9	7,13	7,64	6,73	7,39	161,3	165,2
	12	7,55	7,43	7,33	7,73	161,6	164,6
	14	7,46	7,26	7,08	7	159,8	169,5
16 µg/L	0	7,04	7,32	7,33	7,69	156,5	166,7
	2	7,15	7,32	7,17	7,65	155,7	166,2
	4	7,32	7,32	6,97	7,69	158,6	160,3
	6	7,42	7,19	6,69	7,25	191,9	167
	9	7,12	7,63	6,67	7,3	161,1	166,3
	12	7,53	7,42	7,28	7,85	161,8	164,2
	14	7,46	7,24	6,95	6,79	159,4	169,1

Tabela 2. Resultado do teste de toxicidade crônica para o fipronil.

Amostra	Dia	Organismos imóveis/mortos									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	10	4	9	0	5	8	9	0	7	6
	6	11	6	5	0	4	5	9	8	11	10
	9	0	2	6	4	5	5	8	11	7	7
	12	5	7	13	15	0*	8	6	12	7	7
	14	2	8	0	4	0	6	11	2	1	8
	Total	28	27	33	23	14	32	43	33	33	38

1 µg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	7	3	7	8	0	8	5	4	9	4
	6	8	5	10	10	5	9	7	5	7	5
	9	8	4	8	7	4	6	6	0*	6	0*
	12	6	7	8	8	6	5	8	0	7	0
	14	6	10	8	7	3	6	8	0	6	0
	Total	35	29	41	40	18	34	34	9	35	9
2 µg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	9	8	7	8	6	6	8	0	6	0*
	6	9	5	4	8	7	4	9	5	6	0
	9	8	2	5	10	6	3	8	7	6	0
	12	8	2	3	7	6	7	5	14	6	0
	14	5	11	5	8	7	3	6	0	4	0
	Total	39	28	24	41	32	23	36	26	28	0
4 µg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	6	7	6	2	0	7	6	6	6	6
	6	6	8	6	3	2	7	6	7	7	7
	9	0	8	5	3	3	8	3	6	8	6
	12	0	3	4	0	11	4	7	6	8	4
	14	6	6	3	4	6	4	5	5	5	5
	Total	18	32	24	12	22	30	27	30	34	28
8 µg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	9	0	4	7	5	8	0	7	5	8
	6	8	7	7	6	4	11	6	9	8	7
	9	8	9	9	6	7	8	9	8	8	3
	12	2	7	4	3	9	5	6	7	7	4

	14	6	4	5	3	0	5	0	5	5	6
	Total	33	27	29	25	25	37	21	36	33	28
16 µg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	7	5	9	0	5	5	7
	6	8	4	6	4	0	4	5	4	6	7
	9	4	4	4	5	0	4	6	5	6	6
	12	7	0*	12	0*	5	3	12	5	5	5
	14	0	0	4	0	3	5	3	4	3	5
	Total	19	8	26	16	13	25	26	23	25	30

**Daphnia* adulta morreu durante o experimento.

Tabela 3. Parâmetros do teste de toxicidade crônica para o 2,4-D.

Amostra	Dia	Variáveis da amostra					
		pH A	pH D	OD A	OD D	Cond A	Cond D
Controle	0	7,06	7,48	7,18	7,78	155,1	160,6
	2	7,54	7,46	7,21	7,54	157,8	162,5
	4	7,59	7,58	7,86	7,58	156,7	163,2
	6	7,52	7,41	7,18	7,8	161,5	164,4
	9	7,45	7,48	7,39	7,59	155,4	159,7
	12	7,42	7,49	7,28	7,64	159,3	163,1
	14	7,29	7,45	6,98	7,15	157	160,3
0,5 mg/L	0	7,06	7,49	7,17	7,82	158	159,7
	2	7,52	7,52	7,23	7,58	159,6	163,1
	4	7,54	7,62	7,87	7,5	143,1	162,1
	6	7,49	7,48	7,24	7,85	160,5	165,2
	9	7,44	7,5	7,4	7,54	158,4	162,3
	12	7,39	7,56	7,35	7,56	159	164,2
	14	7,32	7,61	7,01	7,48	159	163,5
1 mg/L	0	7,13	7,46	7,21	7,87	159,1	162
	2	7,5	7,66	7,3	7,56	159,4	164,5
	4	7,38	7,63	7,69	7,46	153,3	163,7
	6	7,47	7,51	7,21	7,68	160,2	164,8

	9	7,45	7,52	7,34	7,54	158,9	161,6
	12	7,41	7,55	7,27	7,58	159	163,4
	14	7,33	7,58	7	7,42	158,8	164,3
5 mg/L	0	7,09	7,36	7	7,76	156,4	155,9
	2	7,49	7,65	7,29	7,46	158,4	162,5
	4	7,3	7,62	7,82	7,42	154,4	160,4
	6	7,45	7,5	7,15	7,73	159	163,9
	9	7,45	7,53	7,35	7,4	157,9	160,4
	12	7,39	7,62	7,26	7,52	157,9	161,7
	14	7,31	7,66	7,11	7,48	157,9	163,5
10 mg/L	0	7,08	7,29	7,13	7,81	155,6	164,1
	2	7,42	7,6	7,5	7,46	158,4	162,5
	4	7,24	7,61	7,8	7,38	153,5	161,1
	6	7,39	7,52	7,15	7,56	156,8	161,4
	9	7,4	7,52	7,43	7,39	156	159,7
	12	7,35	7,55	7,2	7,45	156,7	163,5
	14	7,32	7,54	7,05	7,49	155,7	162,4
50 mg/L	0	7,03	7,23	7,1	7,71	170,9	174,7
	2	7,43	7,61	7,32	7,51	159,9	172,6
	4	7,16	7,58	7,71	7,3	170,8	176,9
	6	7,38	7,5	7,11	7,48	174,2	179,3
	9	7,41	7,51	7,24	7,38	172,3	175
	12	7,35	7,54	7,27	7,46	176,4	176,2
	14	7,32	7,56	6,93	7,33	173	174,8
100 mg/L	0	7,01	7,12	7,09	7,72	185,7	193,5
	2	7,39	7,5	7,26	7,52	186,4	193,5
	4	7,09	7,54	7,61	7,17	182,6	197,6
	6	7,36	7,49	7,06	7,39	188,5	193,1
	9	7,39	7,47	7,23	7,25	186,7	190,6
	12	7,28	7,56	7,16	7,34	190,8	190
	14	7,28	7,55	6,86	7,33	188,4	189,9

Tabela 4. Resultado do teste de toxicidade crônica para o 2,4-D.

Amostra	Dia	Organismos imóveis/mortos									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	10	4	0	0	6	11	10	0	7	7
	6	11	6	4	5	6	0*	8	10	5	3
	9	0	6	0	8	7	0	0*	11	6	4
	12	4	5	4	9	7	0	0	6	5	6
	14	5	6	4	3	10	0	0	8	4	9
	Total	30	27	12	25	36	11	18	35	27	29
10 µg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	8	9	8	10	7	2	9	9	0	0
	6	8	9	9	6	5	13	9	10	6	2
	9	5	3	6	6	5	0	4	6	7	6
	12	4	5	5	6	6	4	6	4	3	5
	14	7	2	5	7	6	3	6	3	0	3
	Total	32	28	33	35	29	22	34	32	16	16
100 µg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	9	0	0	10	8	9	9	9	12	8
	6	3	3	7	9	5	5	7	8	4	8
	9	6	0*	0	7	5	6	7	7	0	7
	12	5	0	5	6	5	5	6	6	11	5
	14	10	0	4	5	9	8	9	7	0	6
	Total	33	3	16	37	32	33	38	37	27	34
500 µg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	8	7	10	9	0	4	6	8	8
	6	10	7	4	6	6	9	8	3	7	7
	9	0	5	7	5	10	8	8	7	7	6
	12	11	6	4	6	0*	4	5	4	5	6
	14	3	8	11	8	0	7	7	10	7	9
	Total	24	34	33	35	25	28	32	30	34	36

1 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	6	8	7	11	7	9	9	0	9	7
	6	4	6	10	6	1	3	7	0	1	0
	9	8	10	0	7	7	8	10	5	6	7
	12	6	6	3	7	7	8	4	6	5	10
	14	7	11	2	7	9	8	10	4	9	11
	Total	31	41	22	38	31	36	40	15	30	35
50 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	6	7	8	7	9	7	7	7	0	20
	6	3	7	8	1	7	14	6	9	11	4
	9	7	9	9	10	8	14	11	8	0	9
	12	8	5	8	7	8	10	7	0*	12	8
	14	14	11	12	14	11	13	12	0	0	4
	Total	38	39	45	39	43	58	43	24	23	45
100 mg/L	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	7	5	0	0	0	6	6	0	0*	0
	6	0	3	5	6	8	6	3	6	0	6
	9	14	10	6	8	2	13	13	0	0	12
	12	8	6	7	8	12	9	7	21	0	8
	14	10	14	10	5	4	9	11	0	0	6
	Total	39	38	28	27	26	43	40	27	0	32

**Daphnia* adulta morreu durante o experimento.

Anexo 4 - Medida do tamanho de *D. similis* do teste crônico com Regent® 800 WG (i.a. fipronil)

Tabela 1. Medida do tamanho das daphnias adultas do teste de toxicidade crônica com fipronil.

Amostra	Medida(μm)	Amostra	Medida(μm)	Amostra	Medida(μm)
C(1)	2320	2(1)	2360	8(1)	2360
C(2)	2280	2(2)	2320	8(2)	2320
C(3)	2360	2(3)	2360	8(3)	2200
C(4)	2360	2(4)	2400	8(4)	2320
C(5)	2440	2(5)	2440	8(5)	2280
1(1)	2360	4(1)	2320	16(1)	2320
1(2)	2200	4(2)	2360	16(2)	2240
1(3)	2240	4(3)	2200	16(3)	2160
1(4)	2400	4(4)	2200	16(4)	2240
1(5)	2400	4(5)	2240	16(5)	2240

Tabela 2. Medida do tamanho das neonatas da primeira ninhada do teste de toxicidade crônica com fipronil.

Amostra	Medida Real(μm)				
C(1)	750	725	725	700	700
C(2)	700	675	700	725	700
C(3)	875	825	850	850	875
C(4)	0	0	0	0	0
C(5)	675	700	700	700	700
1(1)	750	725	750	700	0
1(2)	750	725	725	725	725
1(3)	725	700	725	700	700
1(4)	700	725	725	700	700
1(5)	725	725	725	0	0

2(1)	700	700	650	675	675
2(2)	700	725	725	725	725
2(3)	750	725	750	750	775
2(4)	850	825	850	850	825
2(5)	675	725	700	725	700
4(1)	750	750	725	725	700
4(2)	750	700	750	725	725
4(3)	750	725	750	750	750
4(4)	900	875	875	875	850
4(5)	850	725	725	0	0
8(1)	825	800	800	800	800
8(2)	700	700	725	750	0
8(3)	750	750	725	725	750
8(4)	700	675	700	725	0
8(5)	750	700	750	750	750
16(1)	725	700	725	700	700
16(2)	700	725	725	675	725
16(3)	775	750	750	0	0
16(4)	700	725	750	750	725
16(5)	750	750	750	750	725

Tabela 3. Medida do tamanho das neonatas da segunda ninhada do teste de toxicidade crônica com fipronil.

Amostra	Medida Real(μm)				
C(1)	750	775	800	900	875
C(2)	1075	1100	950	975	950
C(3)	750	750	875	700	750
C(4)	775	1050	750	775	750
C(5)	775	975	1000	925	900
1(1)	775	800	800	800	800

1(2)	750	750	750	775	0
1(3)	725	800	725	725	725
1(4)	725	750	675	750	775
1(5)	775	675	825	825	725
2(1)	800	800	750	775	750
2(2)	750	750	775	750	750
2(3)	775	750	750	750	0
2(4)	775	775	725	750	0
2(5)	775	825	800	775	875
4(1)	725	725	750	0	0
4(2)	775	750	775	775	725
4(3)	875	1025	875	0	0
4(4)	825	875	875	800	825
4(5)	900	925	875	825	900
8(1)	725	850	850	825	825
8(2)	825	825	800	800	850
8(3)	775	800	800	800	825
8(4)	800	750	775	775	775
8(5)	800	775	825	775	0
16(1)	825	800	800	800	0
16(2)	775	875	800	775	850
16(3)	875	800	725	0	0
16(4)	750	775	850	725	750
16(5)	775	775	775	750	0

Tabela 4. Medida do tamanho das neonatas da terceira ninhada do teste de toxicidade crônica com fipronil.

Amostra	Medida Real(μm)				
C(1)	850	800	825	800	0
C(2)	850	875	900	825	875

C(3)	850	900	850	850	750
C(4)	750	750	775	725	0
C(5)	900	850	0	0	0
1(1)	825	850	825	825	800
1(2)	725	775	750	725	0
1(3)	800	825	850	800	850
1(4)	875	875	775	850	0
1(5)	875	850	900	875	825
2(1)	800	700	950	0	0
2(2)	875	875	875	825	825
2(3)	850	850	900	875	850
2(4)	725	775	775	825	825
2(5)	750	800	800	775	775
4(1)	875	925	925	950	925
4(2)	800	825	875	925	900
4(3)	825	900	850	0	0
4(4)	875	875	850	850	825
4(5)	725	725	725	0	0
8(1)	875	950	825	975	800
8(2)	725	825	775	825	825
8(3)	925	825	875	825	825
8(4)	825	800	725	900	750
8(5)	850	875	875	875	850
16(1)	900	900	825	0	0
16(2)	1025	800	775	0	0
16(3)	800	900	875	750	0
16(4)	775	900	775	775	775
16(5)	775	800	800	800	750

Anexo 5 - Medida do tamanho de *D. similis* do teste crônico com DMA® 806 BR (i.a 2,4-D)

Tabela 1. Medida do tamanho das daphnias adultas do teste de toxicidade crônica com 2,4-D.

Amostra	Medida(μm)	Amostra	Medida(μm)
C(1)	2120	100(1)	2240
C(2)	2240	100(8)	2240
C(10)	2120	100(4)	2320
C(6)	0	100(5)	2280
C(2)	2160	100(6)	2280
C(3)	2120	500(8)	0
C(5)	2240	500(7)	2240
C(4)	2240	500(10)	2280
C(9)	2080	500(9)	2240
C(7)	0	500(6)	2040
10(4)	2200	500(3)	2240
10(10)	2120	500(1)	2120
10(1)	2240	500(2)	2200
10(5)	2240	500(4)	2240
10(6)	2200	500(5)	0
10(3)	2120	1000(7)	2160
10(2)	2240	1000(6)	2200
10(7)	2240	1000(9)	1960
10(9)	2160	1000(5)	2240
10(8)	2240	1000(3)	2200
50(7)	2320	1000(10)	2160
50(8)	1960	1000(2)	2240
50(10)	2320	1000(4)	2080
50(9)	2280	1000(1)	2200
50(1)	2280	1000(8)	2240
50(6)	2320	100'(7)	2280
50(3)	2320	100'(4)	2280
50(4)	2200	100'(8)	2280
50(2)	2120	100'(9)	2680
50(5)	2320	100'(1)	2280

100(2)	2000	100'(5)	2200
100(7)	2240	100'(10)	2240
100(3)	2120	100'(3)	2240
100(9)	2120	100'(2)	2120
100(10)	2200	100'(6)	2200

Tabela 2. Medida do tamanho das neonatas da primeira ninhada do teste de toxicidade crônica com 2,4-D.

Amostra	Medida Real(μm)				
C(2)	680	640	660	680	0
C(7)	680	660	660	640	620
C(8)	720	720	680	680	620
C(5)	680	660	660	680	680
C(1)	660	640	660	660	660
10(4)	660	680	640	660	660
10(3)	680	660	660	700	660
10(1)	640	660	680	620	640
10(5)	660	660	660	640	640
10(2)	640	660	660	620	640
50(4)	560	540	580	600	620
50(1)	620	600	600	580	560
50(2)	660	600	620	620	620
50(3)	600	600	600	580	560
50(5)	600	600	600	560	620
100(5)	660	720	680	680	720
100(6)	680	660	700	680	700
100(1)	680	680	700	680	700
100(7)	680	700	660	660	640
100(4)	660	660	620	600	600
500(2)	680	640	660	680	640
500(3)	700	740	700	720	740

500(5)	660	660	660	660	620
500(7)	700	640	680	680	0
500(4)	620	620	640	680	660
1000(5)	700	680	700	700	680
1000(6)	660	640	660	660	660
1000(7)	660	680	680	680	660
1000(9)	680	700	680	700	680
1000(1)	640	640	600	640	680
100'(1)	580	540	520	540	560
100'(6)	560	560	560	540	560
100'(2)	580	500	500	520	0
100'(7)	540	580	560	580	520

Tabela 3. Medida do tamanho das neonatas da segunda ninhada do teste de toxicidade crônica com 2,4-D.

Amostra	Medida Real(μm)				
C(4)	800	820	800	820	800
C(5)	720	720	720	740	720
C(3)	740	720	700	0	0
C(1)	780	820	780	840	820
C(2)	720	680	700	720	680
10(5)	740	800	680	820	0
10(3)	660	720	740	680	700
10(4)	600	700	780	700	700
10(2)	700	680	680	740	700
10(1)	720	720	700	700	700
50(4)	580	0	0	0	0
50(2)	620	640	640	660	640
50(1)	600	720	640	0	0
50(3)	640	600	640	620	640

50(5)	640	620	660	620	660
100(4)	720	680	680	660	700
100(1)	720	700	740	0	0
100(5)	720	720	760	720	0
100(2)	640	0	0	0	0
100(3)	720	720	760	780	800
500(2)	740	760	760	760	740
500(4)	780	760	780	800	760
500(3)	740	720	760	0	0
500(5)	680	640	620	680	680
500(1)	720	740	700	720	700
1000(4)	720	680	680	700	700
1000(1)	740	660	720	0	0
1000(3)	820	820	800	820	880
1000(2)	780	720	780	800	780
1000(5)	700	760	740	740	0
100'(2)	500	500	520	0	0
100'(4)	540	560	600	580	580
100'(3)	520	460	480	500	480
100'(6)	600	580	560	580	580
100'(5)	560	560	600	560	620

Tabela 4. Medida do tamanho das neonatas da terceira ninhada do teste de toxicidade crônica com 2,4-D.

Amostra	Medida Real(μm)				
C(9)	780	800	760	780	760
C(10)	760	760	760	740	0
C(8)	720	720	740	780	760
C(4)	840	720	700	720	640
C(5)	700	780	780	760	760

10(1)	760	740	740	800	780
10(7)	760	780	720	800	0
10(9)	860	780	800	860	860
10(8)	760	800	760	760	740
10(3)	620	660	680	660	640
50(3)	680	640	640	660	680
50(2)	700	700	700	680	700
50(5)	680	720	720	740	720
50(1)	740	660	660	700	680
50(4)	620	600	660	620	620
100(7)	800	760	740	780	720
100(5)	760	760	780	780	760
100(4)	780	800	720	760	740
100(6)	760	740	800	740	800
100(1)	780	780	800	780	760
500(5)	700	720	720	740	740
500(6)	780	760	780	800	760
500(4)	780	740	760	720	0
500(2)	700	820	680	840	0
500(3)	800	780	820	800	800
1000(7)	760	740	780	760	760
1000(6)	740	740	760	740	720
1000(4)	740	760	800	740	800
1000(1)	720	720	720	740	720
1000(2)	720	740	740	740	760
100'(4)	740	740	700	680	760
100'(3)	560	560	540	580	560
100'(6)	600	600	620	600	640
100'(2)	640	600	640	640	620
100'(5)	640	680	0	0	0