



LÊDA RIBEIRO NOGUEIRA

**TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA DO PESTICIDA
CHLORANTRANILIPROLE
SOBRE O ORGANISMO-TESTE *Ceriodaphnia dubia***

Sorocaba
2016



LÊDA RIBEIRO NOGUEIRA

**TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA DO PESTICIDA
CHLORANTRANILIPROLE
SOBRE O ORGANISMO-TESTE *Ceriodaphnia dubia***

Dissertação apresentada como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" na Área de Concentração Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Renata Fracácio

Sorocaba
2016

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO em

*ciências
ambientais*

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Unesp
Instituto de Ciência e Tecnologia – Câmpus de Sorocaba

Nogueira, Lêda Ribeiro.

Toxicidade aguda e crônica do pesticida chlorantraniliprole sobre o organismo-teste *ceriodaphnia dubia* / Lêda Ribeiro Nogueira, 2016.

81 f.: il.

Orientador: Renata Fracácio Francisco.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Ciência e Tecnologia (Câmpus de Sorocaba), 2016.

1. Pesticidas - Aspectos ambientais. 2. Toxicologia ambiental. 3. Toxicidade - Testes. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Ciência e Tecnologia (Câmpus de Sorocaba). II. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Sorocaba

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA DO PESTICIDA
CHLORANTRANILIPROLE SOBRE O ORGANISMO-
TESTE *Ceriodaphnia dubia*.

AUTORA: LÊDA RIBEIRO NOGUEIRA

ORIENTADORA: RENATA FRACACIO FRANCISCO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS AMBIENTAIS,
área: Diagnóstico, Tratamento e Recuperação Ambiental pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. RENATA FRACACIO FRANCISCO
Coordenação de Curso de Engenharia Ambiental - ICTS/ UNESP / UNESP-Sorocaba

Prof.^a Dra. SUZELEI RODGHER
Departamento de Engenharia Ambiental / Câmpus de São José dos Campos

Professor Adjunto MARIA DA GRAÇA GAMA MELÃO
Departamento de Hidrobiologia / UNIVERSIDADE FEDERAL DE SAO CARLOS

Sorocaba, 02 de setembro de 2016

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, José e Léa (in memoriam), presentes de Deus na minha vida.

Eles dois, com muita sabedoria, construíram em mim um caráter virtuoso e íntegro e contribuíram efetivamente para as minhas vitórias.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela Sua imensa graça sobre mim. Pelas alegrias e realizações durante o Mestrado. Por ter me fortalecido na caminhada até o final;

À minha família, que sempre esteve ao meu lado e me ajudou a alcançar o meu objetivo. Especialmente ao meu amado esposo, Mário Roberto, pela paciência e suporte durante todo o período dos meus testes, sobretudo, pela sua compreensão dos meus horários no laboratório.

À melhor parte de mim, meus filhos amados, Déborah, Renata e Davi, pelo apoio incondicional;

Aos meus genros queridos Jackson Filho e Guilherme Dau por estarem sempre dando força em tudo;

À minha querida sogra D. Glória Nogueira, aos meus cunhados, cunhadas e sobrinhos por todo apoio;

Aos meus irmãos, irmãs e sobrinhos pelas palavras de carinho e confiança;

À minha Igreja, especialmente ao meu Pastor, Caio Batista, pelo apoio, carinho, amizade e ensinamento oferecido a mim e à minha família;

À minha orientadora Prof^a Dr^a Renata Fracácio por ter acreditado em mim para desenvolver esta pesquisa e por ter compartilhado comigo os seus conhecimentos;

À Prof^a Dr^a Suzelei Rodgher e à Prof^a Dr^a Maria da Graça Gama Melão, por aceitarem o convite para participarem como membros titulares da banca examinadora da defesa da minha dissertação e por terem colaborado com mestria para o êxito deste trabalho.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp) - campus de Sorocaba pela infraestrutura das salas de aula, laboratórios didáticos e laboratórios de pesquisas;

Ao Coordenador Leonardo Fraceto e a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais.

À querida Secretária da Pós-Graduação, Eva Rodrigues, por tantas vezes me ajudar me lembrando dos prazos e das exigências das normas do Programa.

Às técnicas de laboratórios da Unesp Sorocaba Susan Lessa, Sandra Gavetti e Letícia Gonçalves;

Às minhas amigas do mestrado Vivian Lira, Marcela Merides, Cristina Correa, Cláudia Watanabe, Ana Lúcia Arine e Marcela Parine que estiveram comigo nas práticas do laboratório e em todas as tentativas, erros e acertos. Certamente que a nossa linda amizade tornou os momentos tensos e concentrados dos testes, em momentos de prazer e alegria, simplesmente por estarmos juntas.

A todos os amigos da Pós-Graduação e Iniciação Científica pela descontração durante as aulas, pela amizade e companheirismo.

“Tudo o que for verdadeiro, tudo o que for honesto, tudo o que for justo, tudo o que for puro, tudo o que for amável, tudo o que for de boa fama, se houver algo de excelente ou digno de louvor, seja isso que ocupe os nossos pensamentos... e a Paz de Deus que excede todo o entendimento guardará os nossos corações e as nossas mentes em Cristo Jesus.”

(Filipenses 4:7,8)

NOGUEIRA, L.R. **TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA DO PESTICIDA CHLORANTRANILIPROLE SOBRE O ORGANISMO-TESTE *Ceriodaphnia dubia***. 2016. 81 f. Dissertação (Mestrado Ciências Ambientais) Instituto de Ciência e Tecnologia de Sorocaba, UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Sorocaba, 2016.

RESUMO

Os estudos dos efeitos de agentes tóxicos nos organismos aquáticos são necessários para o estabelecimento de concentrações seguras de exposição, destacando-se o uso para a proteção da vida aquática. Nesse contexto, o pesticida emergente chlorantraniliprole tem sido utilizado desde 2007 em algumas culturas como cana-de-açúcar, arroz, milho, maçã, uva, dentre outras. Poucas informações ecotoxicológicas sobre este pesticida são relatadas na literatura considerando-se sua atuação nos ambientes de águas doces. Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os aspectos ecotoxicológicos deste inseticida sobre o organismo-teste *Ceriodaphnia dubia* por meio de testes de toxicidade aguda, buscando-se obter o valor médio de CE50 (48h) (Concentração que causa efeito em 50% da população em 48h, por meio da análise da imobilidade ou mortalidade) calculado por meio do Software ICPIN e do método de Interpolação Linear, e por meio de testes de toxicidade crônica, buscando-se adquirir os valores de CENO (maior concentração de efeito não observado na reprodução), CEO (menor concentração de efeito observado sobre os aspectos reprodutivos) e VC (valor crônico – média geométrica entre CENO e CEO). Os valores de CENO e CEO foram obtidos utilizando-se o Software BioStat 5.3 e o método de Kruskal-Wallis, a fim de se comparar a significância da redução no número de neonatos em relação ao grupo controle. As soluções-teste foram preparadas, a partir do padrão puro de chlorantraniliprole (Sigma-Aldrich, 99% de pureza) e solubilizado em acetona. O resultado para a toxicidade aguda com *C. dubia* foi de $2,9 \pm 1,11$ µg/L. Os testes de toxicidade crônica revelaram CENO de $0,61 \pm 0,33$ µg/L, CEO de $0,91 \pm 0,49$ µg/L e VC foi de 0,74 µg/L. Considerando-se a proteção da vida aquática, recomenda-se, com base na presente pesquisa, uma concentração de 0,74 µg/L do princípio ativo do pesticida chlorantraniliprole, como limite seguro.

Palavras-chave: CENO, CEO, VC, agrotóxico.

NOGUEIRA, L.R. **Acute and chronic the insecticide chlorantraniliprole on the organism-test *Ceriodaphnia dubia***. 2016. 81 f. Dissertation (MSc Environmental Sciences), Institute of Science and Technology of Sorocaba, UNESP - São Paulo State University Júlio de Mesquita Filho, Sorocaba, 2016.

ABSTRACT

Studies of the effects of toxic agents on aquatic organisms are needed to establish safe levels of exposure, especially the use for the protection of aquatic life. In this context, chlorantraniliprole emerging pesticide has been used since 2007 in some crops such as sugarcane, rice, corn, apples, grapes and others. Few ecotoxicological information is reported in the literature considering its performance in freshwater environments. Given the above, the objective of this study was to evaluate the ecotoxicological aspects of this insecticide on the *Ceriodaphnia dubia* test organism through acute toxicity tests, seeking to obtain the average value of EC50 (48h) (concentration causing effect by 50% population in 48 hours, through the analysis of inhibition of swimming or mortality), and through chronic toxicity tests, searching for acquiring the NOEC values (greater concentration effect not observed in the reproduction), LOEC (lowest observed effect concentration on the reproductive aspects) and CV (chronic value - geometric mean of NOEC and LOEC). The NOEC and LOEC values were performed using the BioStat 5.3 software and the statistical analysis Kruskal-Wallis test to compare the significance of the reduction in the number of newborns in the control group. The test solutions were prepared from the neat standard chlorantraniliprole (Sigma-Aldrich, 99% purity) and solubilized in acetone. The results for acute toxicity *C. dubia* were $2.9 \pm 1.11 \mu\text{g} / \text{L}^{-1}$. The chronic toxicity tests revealed NOEC of $0.61 \pm 0.33 \mu\text{g} / \text{L}^{-1}$, LOEC of $0.91 \pm 0.49 \mu\text{g} / \text{L}^{-1}$ and CV was $0.74 \mu\text{g} / \text{L}^{-1}$. Considering and protection of aquatic life, it is recommended based on this study, a concentration of $0.74 \mu\text{g} / \text{L}^{-1}$ of the active ingredient of the pesticide chlorantraniliprole as safe limit.

Keywords: NOEC, LOEC, CV, Pesticides

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Poluição de ambientes aquáticos: ênfase para agrotóxicos.....	14
1.2 Diamidas: ênfase ao chlorantraniliprole.....	18
1.2.1 Diamidas (flubendiamida, chlorantraniliprole e cyantraniliprole).....	18
1.2.2 Chlorantraniliprole.....	20
1.3 Limites de exposição segura para agrotóxicos: Ênfase para a ecotoxicidade aquática.....	24
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivos gerais.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3. METODOLOGIA.....	30
3.1 O organismo-teste <i>Ceriodaphnia dubia</i> : cultivo e manutenção.....	30
3.2 Teste de sensibilidade com <i>C.dubia</i>	34
3.3 Preparação das solução-estoque e da solução-diluída para os testes agudos e crônicos, respectivamente.....	35
3.4 Testes de toxicidade aguda (preliminares) com o chlorantraniliprole.....	36
3.5 Testes de toxicidade aguda (definitivos) com o chlorantraniliprole.....	37
3.6 Testes de toxicidade crônica (Preliminar) com o chlorantraniliprole.....	38
3.7 Testes de toxicidade crônica (Definitivos) com o chlorantraniliprole.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1 Toxicidade aguda.....	40
4.2 Toxicidade crônica.....	45
5. CONCLUSÃO.....	52

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
Anexo I - Testes de toxicidade Aguda com <i>C. dubia</i>	63
Anexo II - Testes de toxicidade Crônica com <i>C. dubia</i>	65
Anexo III - Testes de sensibilidade com <i>C. dubia</i>	71
Anexo IV - Resultados dos testes de sensibilidade com <i>C. dubia</i>	72
Anexo V - Carta-controle.....	75
AnexoVI - Procediemnto Operacional Padrão (POP) para o cultivo da <i>C.dubia</i>	77
AnexoVII - Preparo do Meio Oligo.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processos que afetam o destino dos agrotóxicos no ambiente.....	17
Figura 2. Fórmula estrutural das diamidas ftálicas e antranílicas.....	19
Figura 3. Microcrustáceo <i>Ceriodaphnia dubia</i>	31
Figura 4. Imagem demonstrando o cultivo da <i>C. dubia</i> mantido em incubadora com controle de temperatura e fotoperíodo.....	32
Figura 5. <i>Raphidocelis subcapitata</i> observada na câmara de Sedgewick-Rafter após diluição da amostra, para contagem.....	33
Figura 6. Demonstração do período de repique das algas em incubadora, no laboratório.....	34
Figura 7. Ilustração da preparação da solução-estoque (100 mg/L) para os testes agudos e da solução-diluída (6 mg/L) para os testes crônicos.....	35
Figura 8. Demonstração dos testes de toxicidade com <i>C. dubia</i>	36
Figura 9. Ilustração da preparação dos testes de toxicidade aguda e crônica.....	38
Figura 10. Resultados dos ensaios de toxicidade aguda com chlorantraniliprole para avaliação de mortalidade utilizando-se <i>C. dubia</i>	41
Figura 11. Análise estatística para o 1º teste de toxicidade aguda com <i>C. dubia</i>	41
Figura 12. Análise estatística para o 2º teste de toxicidade aguda com <i>C. dubia</i>	42
Figura 13. Análise estatística para o 3º teste de toxicidade aguda com <i>C. dubia</i>	42
Figura 14. Resultado dos testes de toxicidade crônica utilizando concentrações de 0,25 a 1,26 µg/L de clorantraniliprole, às quais os organismos-teste foram expostos por 8 dias, havendo diferenças significativas nos testes 1 e 3.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Demonstração do consumo de agrotóxicos nas regiões do Brasil no ano de 2016.....	15
Tabela 2. Mecanismo de ação de alguns grupos de inseticidas.....	22
Tabela 3. Relação dos formulados contendo o chlorantraniliprole como princípio ativo, comercializados no Brasil.....	24
Tabela 4. Valores máximos de parâmetros de alguns orgânicos para águas doce das classes 1 e 2 permitidos pelo CONAMA 357/2005.....	25
Tabela 5. Apresentação dos Valores Máximos Permitidos (VMP) de algumas classes de substâncias tóxicas no ambiente, segundo o CONAMA 357/2005.....	27
Tabela 6. Classificação das águas quanto à proteção e preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas, de acordo com o CONAMA Nº 357/2005.....	28
Tabela 7. Protocolos da OECD e US.EPA para proteção de organismos aquáticos não-alvo, quanto à toxicidade dos agrotóxicos.....	28
Tabela 8. Resultados das mortalidades obtidas no ensaio agudo preliminar, no qual a espécie <i>C. dubia</i> foi exposta por 48h ao chlorantraniliprole.....	40
Tabela 9. Resultados de CE50 (48h) dos testes de toxicidade aguda.....	43
Tabela 10. Valores de CE(50) e CL(50) 48h de chlorantraniliprole, obtidos na literatura para algumas espécies de invertebrados e microcrustáceos de água doce (US.EPA, 2008 e EFSA, 2013).....	44
Tabela 11. Demonstração das estatísticas médias de neonatos e desvios dos testes de toxicidade crônica I, II, III para <i>C. dubia</i>	46
Tabela 12. Comparação de EC50(48h) de inseticidas com diferentes mecanismos de ação sobre <i>Daphnia magna</i>	50

1 INTRODUÇÃO

1.1 Poluição de ambientes aquáticos: ênfase para agrotóxicos

Os agrotóxicos organossintéticos foram difundidos no Brasil com a chegada do diclorodifeniltricloroetano (DDT) após a Segunda Guerra Mundial, para combater os mosquitos vetores da malária e tifo. Em 1960, foi então introduzido o modelo agrícola conhecido como “Revolução Verde”, que visava o incremento de novas técnicas para aumentar a produtividade agrícola e acabar com a fome no mundo (SPADOTTO et al., 2004).

Segundo o Decreto 4.074, de 4 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei 7.802/1989, em seu artigo 1º, inciso IV, os agrotóxicos estão assim definidos: *“Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”*.

Conforme as pesquisas de Spadotto et al. (2004), em 1998 houve no Brasil o consumo de cerca de 307 mil toneladas de formulados a partir de 250 ingredientes ativos. Com isso, ocorreram alterações no setor agrícola, sobretudo pelo crescimento de 78% de culturas de campo e pelo aumento de 700% no consumo de agrotóxicos.

De acordo a EMBRAPA (2016), o consumo de agrotóxicos aplicados no combate às pragas na agricultura, difere nas várias regiões do país, tanto nas atividades agrícolas intensivas, quanto nas tradicionais. (Tabela 1).

Tabela 1. Demonstração do consumo de agrotóxicos nas regiões do Brasil no ano de 2016.

REGIÕES	%	NÍVEL DE CONSUMO DE AGROTÓXICOS
Norte	1,3	Baixo consumo de agrotóxicos
Nordeste	5,8	Maior concentração nas áreas de agricultura irrigadas
Centro-Oeste	22,8	Elevado consumo de agrotóxicos
Sul	31,2	Elevado consumo de agrotóxicos
Sudeste	38,9	Elevado consumo de agrotóxicos

Fonte: EMBRAPA (2016).

A EMBRAPA (2016), ainda relata a ocorrência do uso de alguns agrotóxicos nas regiões brasileiras. Na região norte, mais precisamente na região amazônica, a qualidade da água está diretamente relacionada à agricultura. O uso intensivo de agroquímicos acarreta riscos de contaminação da água subterrânea, sobretudo no nordeste do Pará, onde a monocultura de soja avança sobre todos os tipos de solos. Outrossim, como em outras localidades ocorre a utilização expressiva de agrotóxicos, algumas vezes, mais tóxicos que seus princípios ativos, expondo os aquíferos e as regiões de igarapé a riscos ambientais. Alguns estudos realizados nesta região encontraram resíduos do inseticida/acaricida, organofosforado, dimetoato que podem comprometer as águas do aquífero freático do Grupo Barreiras. Na região nordeste, no Vale do São Francisco, o sistema de produção de frutas para exportação torna o cenário ainda mais crítico, tal como na região dos aquíferos.

Na região sudeste, os estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais são os locais com mais ocorrência de organoclorados. Em um estudo de sedimentos de 11 córregos da região central do estado de São Paulo, detectaram a

presença de 16 organoclorados, embora muitos já tenham a sua utilização e comercialização proibida. No estado de Minas Gerais, estudos nos sedimentos de rios em algumas cidades identificaram a presença dos organoclorados BHC, Heptacloro epóxido, Endrin e DDT. No estado do Rio de Janeiro, a agricultura da região serrana, apresentou constantemente riscos de contaminação ambiental por agrotóxicos, visto que foram detectadas concentrações de anticolinesterásicos em valores até oito vezes acima do limite permitido pela legislação brasileira, em alguns pontos da região hídrica.

Na região Sul, foi identificada a presença do herbicida glifosato em lavouras de arroz irrigado, em concentrações acima do valor máximo permitido pela Agência de Proteção Ambiental Americana (US.EPA). Estudos detectaram resíduos de agrotóxicos em seus mananciais e em águas subterrâneas, bem como, constatou-se nas regiões costeiras a presença de agrotóxicos e nas demais regiões, as quais apresentaram níveis altos de amostras contaminadas por agentes químicos.

As águas, doce e salgada, cobrem 1.370.000.000Km³ da Terra, aproximadamente 70% da superfície, portanto, é um recurso fundamental para a existência da vida. O Brasil é um país privilegiado quanto ao volume de recursos hídricos, pois detém 12% da água doce do mundo (ANA, 2009 e VICTORINO C.J.A., 2006). No entanto, apesar do grande volume, a qualidade desse recurso tem sido alterada por meio das fontes de poluição pontual e difusa (PEREIRA, 2004; DERÍSIO, 2000). Quando ocorrem acidentes com produtos químicos ou combustíveis, há propagação desses contaminantes através da água da chuva sobre os campos agrícolas e, como consequência, as águas superficiais e subterrâneas são alcançadas através do escoamento ou da infiltração e, por fim, contaminadas.

Alguns agroquímicos utilizados para combater às pragas nas lavouras, apesar de conseguirem resultados positivos, tem comprometido negativamente o ambiente, através da dispersão de substâncias aplicadas que, além de atingirem os organismos-alvo, conseguem alcançar os corpos d'água e os solos. Sendo assim, uma vez no ambiente, os contaminantes estão sujeitos à combinações de processos que afetam o seu destino e comportamento (ADAMS et al., 2015; COSTA et al, 2008; SPADOTTO et al., 2004). Após percorrerem longas rotas, o resultado do

produto disperso é a biodegradabilidade, a adsorção e a mobilidade no ambiente (EFSA, 2013; PEREIRA, 2004 e LU, 2011) (Figura 1).

Figura 1. Processos que afetam o destino dos agrotóxicos no ambiente.



Fonte: Rebelo e Caldas (2014).

Os agrotóxicos, além de cumprirem o papel de proteção às culturas agrícolas de pragas, doenças e plantas daninhas, podem promover riscos ao ambiente. O uso incorreto e frequente de agrotóxicos propicia riscos de contaminação das águas superficiais e subterrâneas, por conseguinte oferecendo impactos negativos aos organismos terrestres e aquáticos (SPADOTTO et al., 2004; MARTINOU e STAVRINIDES, 2015; ZHANG et al., 2012).

A atividade agrícola no Brasil é uma importante ferramenta para a economia mundial, no entanto, os agrotóxicos quando empregados, passam por processos de bioacumulação e biomagnificação ao entrar na cadeia alimentar, podendo acarretar em desequilíbrio ecológico e afetar não somente aos organismos-alvo, como também aos organismos não-alvo, os quais não são pragas. Ademais, a aplicação frequente dos agrotóxicos proporciona a persistência do contaminante tóxico no

ambiente, por longos períodos de tempo (FRACÁCIO, 2006; SPADOTTO et al., 2004).

A persistência de uma substância ocorre quando ela é utilizada de forma inadequada, ocasionando o acúmulo de pesticidas no solo e ao longo das cadeias alimentares, o que depende de vários fatores como: do tipo de defensivo e sua formulação; da adsorção do defensivo, a qual depende da permeabilidade e do pH do solo; da umidade e temperatura do solo; da utilização pelas plantas; do arraste pela água da chuva ou de irrigação e; pela ação do vento. Portanto, o tempo de persistência de uma substância tóxica é o período necessário para o produto perder a sua atividade (AZEVEDO E CHANSIN, 2004).

1.2 Diamidas: ênfase ao chlorantraniliprole

1.2.1 Diamidas (flubendiamida, chlorantraniliprole e cyantraniliprole)

Os estudos sobre os inseticidas iniciaram por volta de 1940, a partir dos extratos da casca da planta *Ryania speciosa* (Flacourtiaceae), uma espécie nativa da América Central e do Sul (JEFFERIES et al., 1992; EDWARDS et al., 1948). Foram, então, identificadas as moléculas receptoras de rianodina RyRs, as quais possuem atividades inseticidas e que causam paralisia nos organismos-alvo.

Esses novos compostos contam com estruturas modificadas e elevada atividade inseticida através de duas amidas. Passaram então, a serem desenvolvidas as moléculas inseticidas que atuam nos receptores da rianodina, as “diamidas” (CAMPOS et al., 2015; GARZÓN et al., 2015; HUSSETH et al., 2015). Estas moléculas estão presentes nos músculos, nos neurônios, nas células epteliais e em outros, tanto de mamíferos como de insetos.

As “flubendiamidas” são as moléculas oriundas do ácido ftálico e foram descobertas pelo grupo fabricante de agroquímicos Nihon Nohyaku e desenvolvidos em conjunto com a Bayer CropScience.

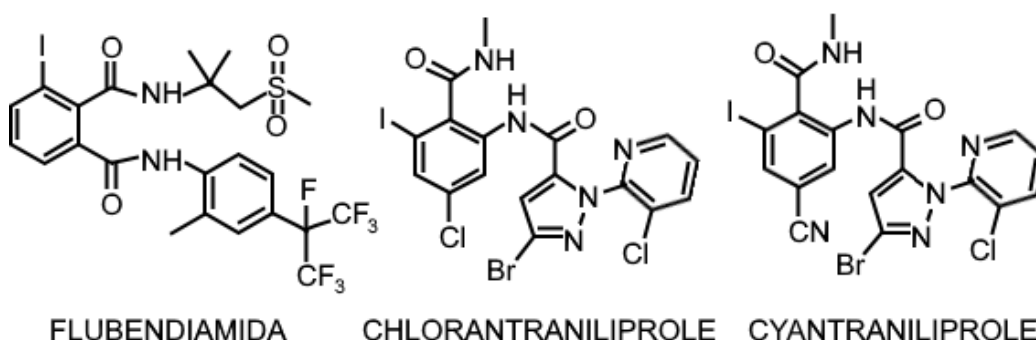
Em seguida, foi descoberto o “chlorantraniliprole” e, mais recentemente, o “cyantraniliprole”, ambos derivados do ácido antranílico e comercializados pela Dupont e Syngenta.

Os moduladores, geralmente, agem de maneira semelhante, partilhando o mesmo local de ligação com a rianodina. Tanto as diamidas do ácido ftálico quanto as do ácido antranílico possuem um novo mecanismo de ação, ligando-se a um novo sítio no RyR, da rianodina (CÓRDOVA et al., 2006).

Sendo a rianodina um inseticida natural e com afinidade a canais de Ca^{2+} , foi possível transformá-lo em inseticida sintético. Essa nova molécula causa diversos efeitos no inseto, como cessação súbita de alimentação, letargia, paralisia e por fim a morte (SATTELLE, 2008).

Atualmente, o emprego das diamidas na agricultura moderna é extremamente significativo para o controle de uma gama de insetos herbívoros e pragas, especialmente da ordem Lepidoptera (Trociska et al., 2015). No entanto, apesar das diamidas serem bastante tolerantes, após vários anos de aplicações na agricultura, relatou-se casos de desenvolvimento de resistência às diamidas para algumas espécies de lepidópteros, registrando-se, inclusive, a resistência cruzada entre flubendiamida (diamida ftálica) e o chlorantraniliprole (diamida antranílica) para algumas espécies de lagartas (RODITAKIS E. et al., 2015; THOMAS, 2013). As fórmulas estruturais estão representadas na Figura 2.

Figura 2. Fórmula estrutural das diamidas ftálicas e antranílicas.



Fonte: Liu, Ye et al. (2016).

1.2.2 Chlorantraniliprole

Devido ao crescimento da população mundial, houve um aumento significativo na demanda de alimentos e na otimização da agricultura, tornando os pesticidas um dos principais contribuintes para o crescimento da produtividade agrícola. Para tornar esta estratégia eficaz, estão sendo utilizados pesticidas pertencentes a diferentes grupos químicos, os quais desempenham um papel importante na agricultura a fim de minimizar as perdas causadas por insetos, visando a otimização da cultura (SATYAVANI et al., 2012; LARSON et al., 2012).

O chlorantraniliprole é um inseticida pertencente à classe toxicológica III e ao grupo das diamidas antranílicas (ANVISA, 2015). Esta molécula surgiu como uma nova classe promissora de inseticidas químicos, devido à sua potência e à sua especificidade, bem como ao seu novo mecanismo de ação (RODRIGUES et al., 2015; BARBEE et al., 2010; CÓRDOVA et al., 2006), está substituindo de maneira eficaz os inseticidas neonicotinóides, piretróides, organofosforados, carbamatos e organoclorados e está sendo comercializado no Brasil, pela DuPont desde de 2007 (FENOLL et al., 2015).

Está registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA sob nº 08909 e apresenta a fórmula molecular: **3-Bromo-N-[4-cloro-2-metil-6-(metilcarbamoil)fenil]-1-(3-cloropiridin-2-il)-1H-pirazole-5-carboxamida**.

O chlorantraniliprole atua através da ativação dos receptores de rianodina (RyRs), estimulando a liberação de cálcio⁺⁺ de reservas internas, o que afeta a homeostase do cálcio em células nervosas e musculares. Esses efeitos, além de provocarem a contração do músculo normal e causarem a inibição da alimentação, causam paralisia e morte dos insetos (CÓRDOVA et al., 2006; SATTELLE et al., 2008; LAVTIZAR et al., 2015). A maioria dos agroquímicos utilizados atualmente para o controle de pragas pertence à categoria dos neurotóxicos, portanto, o principal alvo de ação destes inseticidas é o Sistema Nervoso Central (SNC).

As pragas nas culturas de campo têm tido um crescimento expressivo em todo o mundo, fato decorrente principalmente da resistência a inseticidas de diversas classes químicas, portanto, torna-se essencial o incremento de novas substâncias com diferentes mecanismos de ação (GONTIJO et al., 2015).

Na Tabela 2, de acordo com o IRAC-BR (2005), os inseticidas com seus diferentes mecanismos de ação, estão assim dispostos: os organofosforados e carbamatos inibem as enzimas acetilcolinesterase e causam sintomas que atingem os sistemas respiratório, cardiovascular, prejudicam a musculatura, causam agitação, tremores, ansiedade, convulsões e coma.

Os antagonistas de GABA (ácido gama-aminobutírico) ligam-se aos receptores de GABA, suprimindo o fluxo de Cl^- para o interior do axônio, provocando a morte do inseto por hiperexcitação.

Quanto aos moduladores de canais de sódio, estes são os inseticidas que agem afetando o tempo de abertura de canais de sódio da membrana do axônio e levando o inseto à morte, por hiperexcitação.

Os agonistas ou os ativadores dos neurotransmissores de acetilcolina competem pelos seus receptores e, por não serem suscetíveis à hidrólise por acetilcolinesterase, causam a morte do inseto por hiperexcitação. Diferentemente, os ativadores dos canais de cloro ligam-se aos receptores GABA, estimulando o fluxo de Cl^- para o interior da membrana, bloqueando a transmissão do estímulo nervoso e causando a morte do inseto por imobilização e paralisia.

Os interferentes e os análogos do hormônio juvenil são inseticidas reguladores do crescimento de insetos e afetam a embriogênese.

Por fim, vem os moduladores de receptores de rianodina, os quais regulam a liberação de Ca^{++} intracelular, causando a contração muscular, que é o caso da diamida antranílica, o chlorantraniliprole.

Tabela 2. Mecanismo de ação de alguns grupos de inseticidas.

MODO DE AÇÃO	GRUPO DE INSETICIDAS	PRINCÍPIO ATIVO
Inibidores de Acetilcolinesterase	Carbamatos	Aldicarbe, Carbofuran, etc.
	Organofosforados	Parathion, Malathion, etc.
Antagonistas de canais de GABA- Cl^-	Ciclodienos	Chlordane, Endosulfan, Lindano.
	Fenilpirazóis	Ethiprole, Fipronil.
Moduladores de canais de Na^{++}	Piretróides e Piretrinas	Tetrametrin, Kadethrin, etc
	DDT e Metoxicloro	DDT e Methoxychlor.

Agonistas de receptores de Acetilcolina	Neonicotinóides	Acetamiprid, Thiamethoxan, etc.
	Nicotina	Nicotina
	Sulfoxaflor	Sulfoxaflor
Ativadores de receptores de Acetilcolina	Spinosinas	Spinosad e Spinetoran
Ativadores de canais de Cloro	Avermectinas e Mibemicinas	Abamectin, Lepimectin, etc.
Interferentes do hormônio juvenil	Análogos do hormônio juvenil	Hidroprene, Methoprene, etc.
	Fenoxicarb	Fenoxicarb
	Pyriproxyfen	Pyriproxyfen
Bloqueadores seletivos da alimentação	Pymetrozine	Pymetrozine
	Flonicamid	Flonicamid
Inibidores do crescimento de ácaro	Clofentezine e Hexythiazox	Clofentezine e Hexythiazox
	Etoxazole	Etoxazole
Moduladores dos receptores de rianodina	Diamidas	Chlorantraniliprole, Cyaniliprole e Flubendiamida

Fonte: Comitê Brasileiro de Ação à Resistência de Inseticidas - IRAC-BR (2015). (Adaptado)

A diamida antranílica, chlorantraniliprole, tem sido aplicada em diversas regiões, com resultados eficazes no combate a diversas pragas como lagartas, besouros, ácaros, percevejos, moscas-brancas, pulgões, traça-do-tomateiro e broca-pequena-do-fruto e outras pragas da ordem Lepidoptera e Helicoverpa, Coleoptera, Diptera e Hemiptera (LAHM et al., 2009) e seus usos registrados para aplicação foliar em diversas culturas agrícolas (US.EPA, 2008).

Evidencia-se com frequência a utilização deste pesticida nas culturas de arroz, abóbora, abobrinha, aveia, milho, brócolis, café, cana-de-açúcar, couve-flor,

cevada, algodão, chuchu, citros, couve, couve-chinesa, batata, couve-de-bruxelas, girassol, maçã, pepino, maxixe, melão, melancia, pêssego, repolho, soja, feijão, tomate e trigo. Além disto, também é usado para controlar pragas-chave de culturas frutíferas como maçã, pera, uva e plantas produtoras de grãos como milho e soja (ANVISA, 2014; AYALEW, 2015).

Altas concentrações de chlorantraniliprole poderão acarretar efeitos deletérios no ambiente. Ao alcançar os corpos de água o agente tóxico impacta sua estrutura e função, alterando a composição de espécies e comprometendo toda a cadeia trófica, desde comunidades de algas, as quais, devido o seu curto ciclo de vida, permite uma rápida resposta fisiológica (SATYAVANI et al., 2012; RODRIGUES et al., 2003). Além disso, o chlorantraniliprole é caracterizado como um pesticida persistente em ambientes aquáticos (DHAWAN, 2009), com mobilidade no solo e com uma meia-vida de 10 a 22 dias a 20 °C em sistemas naturais de água de sedimentos (EFSA, 2013; SHARMA, 2014).

Em algumas regiões do Brasil, os formulados com este princípio ativo, passaram a ser comercializados pelas empresas DuPont e Syngenta e são conhecidos no mercado por: Premio, Durivo, Coragem, Volian, Dermacor, Ampligo, Altacor, com está elucidado na Tabela 3.

Tabela 3. Relação dos formulados contendo o chlorantraniliprole, como princípio ativo, comercializados no Brasil.

MARCA COMERCIAL	EMPRESA REGISTRANTE	INGREDIENTE ATIVO
ALTACOR	DU PONT	CHLORANTRANILIPROLE
AMPLIGO	SYNGENTA	LAMBDA CIALOTRINA+CHLORANTRANILIPROLE
CORAGEN	DU PONT	CHLORANTRANILIPROLE
DERMACOR	DU PONT	CHLORANTRANILIPROLE
DURIVO	SYNGENTA	THIAMETOXAM + CHLORANTRANILIPROLE
PREMIO	DU PONT	CHLORANTRANILIPROLE
VOLIAM FLEXI	SYNGENTA	THIAMETOXAM + CHLORANTRANILIPROLE
VOLIAM TARGO	SYNGENTA	ABAMECTINA + CHLORANTRANILIPROLE

1.3 Limites de exposição segura para agrotóxicos: Ênfase para a ecotoxicidade aquática.

É necessário o incremento de novos ingredientes ativos ambientalmente seguros e que apresentem diferentes mecanismos de ação, afim de contribuir com o MIP - Manejo Integrado de Pragas (REGNAULT-ROGER et al., 2012). Porquanto, os pesticidas empregados na agricultura tornam-se uma ameaça para o ambiente, sobretudo pelo comportamento ambiental de degradação dos produtos químicos, os quais diferem do princípio ativo (SPADOTTO et al., 2004). De acordo com RODGHER et al. (2003) e AMIZADEH et al. (2015), os elementos químicos, de forma isolada, não asseguram a proteção da vida aquática, pela possibilidade de ocorrer o sinergismo entre todas as substâncias.

Segundo o CONAMA 357/2005 as classes de águas doce observam condições e padrões de qualidade de água, determinando valores máximos permitidos de alguns orgânicos (Tabela 4).

Tabela 4. Valores máximos de parâmetros de alguns orgânicos para águas doce das classes 1 e 2 permitidos pelo CONAMA 357/2005.

PARÂMETROS ORGÂNICOS	VALOR MÁXIMO
Acrilamida	0,5 µg/L
Alacloro	20 µg/L
Aldrin + Dieldrin	0,005 µg/L
Atrazina	2 µg/L
Benzeno	0,005 mg/L
Benzidina	0,001 µg/L
Benzo(a)antraceno	0,05 µg/L
Benzo(a)pireno	0,05 µg/L
Benzo(b)fluoranteno	0,05 µg/L
Benzo(k)fluoranteno	0,05 µg/L
Carbaril	0,02 µg/L
Clordano (cis + trans)	0,04 µg/L
2-Clorofenol	0,1 µg/L
Criseno	0,05 µg/L
2,4-D	4,0 µg/L
Demeton (Demeton-O + Demeton-S)	0,1 µg/L
Dibenzo(a,h) antraceno	0,05 µg/L
1,2-Dicloroetano	0,01 mg/L
1,1-Dicloroetano	0,003 mg/L
2,4-Diclorofenol	0,3 µg/L
Diclorometano	0,02 mg/L
DDT (p,p'-DDT + p,p'-DDE + p,p'-DDD)	0,002 µg/L
Dodeacloro pentaciclododecano	0,001 µg/L
Endossulfan (a + b + sulfato)	0,056 µg/L
Endrin	0,004 µg/L
Estireno	0,02 mg/L
Etilbenzeno	90,0 µg/L
Fenóis totais (subst. que reagem com 4-aminoantipirina)	0,003 mg/L C ₆ H ₅ OH
Glifosato	65 µg/L
Gution	0,005 µg/L
Heptacloro epoxido + Heptacloro	0,01 µg/L
Hexaclorobenzeno	0,0065 µg/L
Indeno(1,2,3-cd)pireno	0,05 µg/L
Lindano (γ-HCH)	0,02 µg/L
Malation	0,1 µg/L
Metolacloro	10 µg/L
Metoxicloro	0,03 µg/L
Paration	0,04 µg/L

PCBs - Bifenilas policloradas	0,001 µg/L
Pentaclorofenol	0,009 mg/L
Simazina	2,0 µg/L
Subst. tensoativas que reagem com o azul de metileno	0,5 mg/L LAS
2,4,5-T	2,0 µg/L
Tetracloreto de carbono	0,002 mg/L
Tetracloroeteno	0,01 mg/L
Tolueno	2,0 µg/L
Toxafeno	0,01 µg/L
2,4,5-TP	10,0 µg/L
Tributilestanho	0,063 µg/L TBT
Triclorobenzeno (1,2,3-TCB + 1,2,4-TCB)	0,02 mg/L
Tricloroeteno	0,03 mg/L
2,4,6-Triclorofenol	0,01 mg/L
Trifluralina	0,2 µg/L
Xileno	300 µg/L

Fonte: CONAMA 357/2005.

A ecotoxicidade aquática causada pelas atividades antrópicas, pode ser avaliada através da integração das análises físicas, químicas, biológicas e ecotoxicológicas ocasionadas, sobretudo, pelas atividades antrópicas (MAGALHÃES e FERRÃO-FILHO, 2008; RAND e PETROCELLI, 1985).

Testes de toxicidade são realizados, tanto para avaliar os efeitos agudos, como para detectar os efeitos crônicos (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2011; LOMBARDI, 2004; ADAMS, 1995). Preferencialmente, são selecionados organismos aquáticos que sejam sensíveis e representativos (BAZANTE et al., 2008; COELHO, 2008; ANDERSEN e BUCKLEY, 1998; SEE e BAILER, 1998).

Os testes de toxicidade aguda avaliam a mortalidade e a imobilidade em 50% dos organismos-teste, por um período de 48, 72 e 96 horas. São realizados testes que avaliam os “efeitos” em 50% da população, tanto de invertebrados como de vertebrados. Em organismos invertebrados como os microcrustáceos, estes efeitos são estimados através da Concentração Mediana Efetiva (CE50) e os efeitos manifestados em vertebrados como os peixes, são estimados através da Concentração Mediana Letal (CL50) (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2011).

Os testes crônicos são estimados a partir da Maior Concentração de Efeito Não-Observado (CENO) e da Menor Concentração de Efeito Observado (CEO). O Valor Crônico (VC) é obtido através da média geométrica entre CENO e CEO.

Segundo ZAGATTO e BERTOLETTI (2011), os testes de toxicidade são estabelecidos por associações e organizações de normatização internacionais como

a *Organization for Economic Co-Operation and Development* (OECD), *International Organization for Standardization* (ISO), *Comunidade Econômica Europeia* (ECC), *American Water Works Association* (AWWA), *Association Française de Normalisation* (AFNOR), *American Society for Testing and Materials* (ASTM), *United States Environmental Protection Agency* (US EPA), *European Food Safety Authority* (EFSA) e, no Brasil, a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

A Comunidade Econômica Europeia (ECC) definiu, por meio da Diretiva 80/778/EEC de 15 de julho de 1980, que a concentração máxima individual dos ingredientes ativos de agrotóxicos inseticidas (organoclorados, organosfosforados e carbamatos) deve ser inferior a $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ e a soma de todos os ingredientes ativos herbicidas, fungicidas, policlorobifenilos (PCBs) e policlorotrifenilos (PCTs), não pode exceder $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$.

No Brasil, o CONAMA 357/2005, determinou valores máximos permitidos para essas substâncias tóxicas serem lançados no ambiente. Como se pode observar na Tabela 5.

Tabela 5. Apresentação dos Valores Máximos Permitidos (VMP) de algumas classes de substâncias tóxicas no ambiente, segundo o CONAMA 357/2005.

SUBSTÂNCIAS	VALORES MÁXIMOS PERMITIDOS
Compostos organofosforados e Carbamatos totais	$10,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ a $1,0 \text{mg.L}^{-1}$ (para águas de classe 1 a 8)
Compostos Organoclorados (pesticidas, solventes, etc)	$0,05 \text{mg.L}^{-1}$
Outras substâncias em concentrações que podem ser prejudiciais	De acordo com limites a serem fixados pelo CONAMA

Fonte: CONAMA/2005.

Segundo o Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA 357/2005 - Art.3º, as águas doces, salobras e salinas do Território Nacional estão classificadas, estabelecendo-se os seus devidos fins para seus usos, descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Classificação das águas quanto à proteção e preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas, de acordo com o CONAMA Nº 357/2005.

Classes das águas	Proteção e preservação de organismos aquáticos de águas doces	Proteção e preservação de organismos aquáticos de águas salinas	Proteção e preservação de organismos aquáticos de águas salobras
Classe Especial	Sim	Sim	Sim
Classe 1	Sim	Sim	Sim
Classe 2	Sim	Não	Não
Classe 3	Não	Não	Não
Classe 4	Não	-	-

Fonte: CONAMA, 2005. (Adaptado)

Os organismos aquáticos estão protegidos pela OECD e US.EPA, quanto as contaminações por agentes químicos (Tabela 7).

Tabela 7. Protocolos da OECD e US.EPA para proteção de organismos aquáticos não-alvo, quanto à toxicidade de agrotóxicos.

Toxicidade	Nº Protocolo OECD e US.EPA	Tipo De Produto
Microcrustáceo (agudo)	202 e 850.1010	*PT e **PF
Microcrustáceo (crônico)	211 e 850.1300	*PT

*PT: Produto Técnico; **PF: Produto Formulado. (adaptado Rebelo e Caldas, 2014)

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- Avaliar a toxicidade aguda e crônica do pesticida chlorantraniliprole sobre o microcrustáceo *C. dubia*.
- Contribuir com informações ecotoxicológicas para avaliação de risco ambiental do composto.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar a Concentração Efetiva Média CE50 (48h) para *C. dubia*.
- Estabelecer CENO (Maior Concentração de Efeito Não Observado), CEO (Menor Concentração de Efeito Observado) e VC (Valor Crônico) do pesticida chlorantraniliprole para a *C. dubia*.

3 METODOLOGIA

3.1 Cultivo e manutenção do microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*

Para a realização dos testes, foi necessário o cultivo e a manutenção do microcrustáceo da espécie *Ceriodaphnia dubia*, utilizada como organismo-teste, e da microalga *Raphidocelis subcapitata* (anteriormente conhecida como *Selenastrum capricornutum* e *Pseudokirchneriella subcapitata*), a qual foi utilizada como alimento do referido organismo-teste. Tais procedimentos seguiram as normas (adaptadas) da ABNT NBR 13373 (2010) e ABNT NBR 12648 (2011), respectivamente. O cultivo e testes ecotoxicológicos foram realizados no LATHIS (Laboratório de Toxicologia de Contaminantes Ambientais e Histologia) – Unesp de Sorocaba.

A escolha do organismo-teste (Figura 3), se deu pela ampla faixa de sensibilidade às substâncias tóxicas; pela importância ecológica; pela facilidade de cultivo em laboratório e pelas informações literárias sobre a espécie e seu ciclo de vida (HOFFMAN, 2003).

C. dubia é popularmente conhecida como “pulga d’água”, devido a seu movimento vertical na coluna d’água com pequenos saltos. Mede 0,8 – 0,9 mm de comprimento e sua reprodução se dá por partenogênese. Possui 5 ou 6 pares de patas achatadas e 2 pares de antenas cefálicas, as quais são utilizadas para captura de alimento. Para sua locomoção, usa as antenas, em especial o segundo par, que é bifurcada e com inúmeras cerdas rígidas. Seu ciclo de vida varia entre 1 e 2 semanas. Os ovos são incubados na cavidade dorsal e dão origem a novos indivíduos (ESTEVES, 2011).

Figura 3. Microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*.



Fonte: CFB, 2016.

Para o cultivo da *C. dubia*, foram selecionados 16 a 20 organismos, separados em lotes por faixas etárias, ficando assim distribuídos: (0 - 1 semana), (1 - 2 semanas) e (2 - 3 semanas). Os organismos foram mantidos em incubadoras da marca TECNAL, modelo TE-4020 LED, com temperatura entre 23°C e 27°C, com fotoperíodo de 16h/luz e 8h/escuro.

O cultivo dos organismos se deu em recipientes de vidro com água reconstituída, devidamente vedados com papel filme de PVC contendo pequenas perfurações na superfície para a entrada de ar.

A água de cultivo foi reconstituída a partir de água mineral comercial, ajustada para os seguintes parâmetros físicos e químicos: pH (7,0 a 7,6), condutividade (72 a 212 $\mu\text{S}/\text{Cm}$), temperatura (23°C a 27°C), oxigênio dissolvido ($> 3 \text{ mg}/\text{L}$) e dureza (40 a 48 $\text{mg CaCO}_3/\text{L}$).

A cada 2 dias a água dos lotes da cultura era renovada, ocorrendo semanalmente a triagem dos organismos, a qual era organizada pelo tempo de vida para o controle das idades de cada lote. Neste momento, ocorria também a contagem e a separação dos neonatos. Tal procedimento auxiliava no monitoramento da cultura e na formação de novos lotes reserva (Figura 4). Todos os procedimentos de cultivo seguiram as recomendações das normas (adaptadas) da ABNT NBR 13373 (2010).

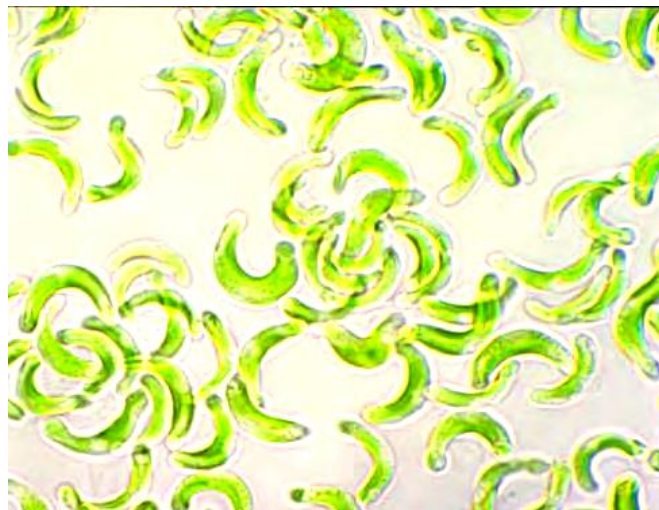
Figura 4. Imagem demonstrando o cultivo da *C. dubia* mantido em incubadora com controle de temperatura e fotoperíodo.



Fonte: Acervo pessoal

Os organismos-teste cultivados no laboratório foram alimentados diariamente com alga da espécie *R. subcapitata* (Figura 5), na proporção de 0,2 mL/organismo, além do alimento composto à base de ração de peixe fermentada (Tetramin) e fermento biológico (Anexo VI), a cada 2 dias, de acordo as normas (adaptadas) da ABNT NBR 13373 (2010).

Figura 5. *Raphidocelis subcapitata* observada na câmara de Sedgewick-Rafter após diluição da amostra, para contagem.



Fonte: www.nies.go.jp

O cultivo da microalga *R. subcapitata* (Figura 6) ocorreu em meio OLIGO, cujo preparo está descrito no Anexo VII, de acordo com a norma (adaptada) da ABNT NBR 12648 (2011).

O meio Oligo foi autoclavado e, posteriormente, em temperatura ambiente, inoculou-se 1mL de solução algácea concentrada, para cada litro de meio Oligo.

Adaptou-se um sistema de cultivo no qual o frasco era vedado cuidadosamente e levado à incubadora à temperatura variando de 23 a 27 °C, sob aeração e luz contínua. Assim que o crescimento exponencial do cultivo era atingido (geralmente entre 4 a 7 dias), o processo era finalizado.

Figura 6. Demonstração do período de repique das algas em incubadora, no laboratório.



Fonte: Acervo pessoal.

Parte da alga produzida era concentrada para ser utilizada em futuros repiques, sendo assim, reservada em lotes na geladeira à 4°C. A outra parte da alga resultante do processo era utilizada na alimentação da cultura do microcrustáceo.

O procedimento para o controle do cultivo se deu através da contagem das células da solução algácea, feita periodicamente, na câmara Sedgewick-Rafter e no microscópio óptico. A quantidade de células era calculada a partir da seguinte equação: $Q = M \cdot A \cdot D$

Onde:

Q = Quantidade de células de *R. subcaptata* por mL de solução;

M = Média do número de células/mm² da câmara de Sedgewick Rafter;

A = Área total da câmara;

D = Diluição utilizada para a contagem

3.2 Teste de sensibilidade com *C.dubia*

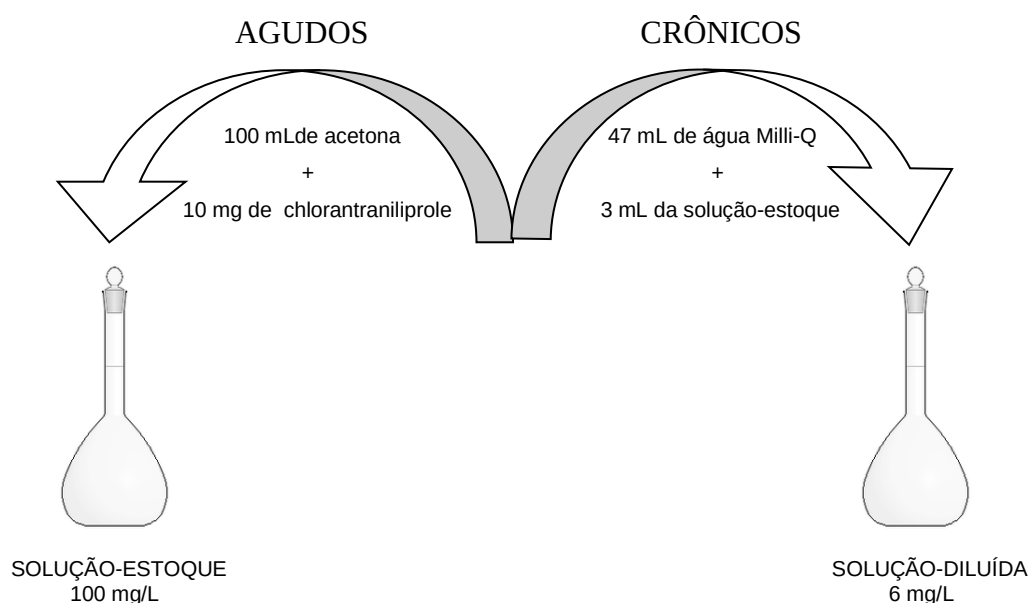
A cultura da *C. dubia* passou mensalmente por um Teste de Sensibilidade dos organismos (ANEXO IV), onde os resultados gerados auxiliavam na elaboração da Carta-Controlle (ANEXO V).

3.3 Preparação da solução-estoque e da solução-diluída para os testes agudos e crônicos, respectivamente.

A solução-estoque na concentração de 100 mg/L de chlorantraniliprole utilizada para os testes de toxicidade aguda, foi preparada com 10 mg de chlorantraniliprole (Padrão Puro Pestanal® 32510 - Sigma Aldrich) + 100 ml de acetona (Acetona - Sigma Aldrich P.A 99.5%), esta usada para solubilizar a solução. Para realizar tal preparo, utilizou-se um Balão Volumétrico (1L) e micropipetas analíticas. Após o preparo, a solução foi acondicionada em frasco âmbar e armazenada à -4°C (freezer).

Para o preparo da solução-diluída, foi necessário fazer uma diluição da solução-estoque de 100 mg/L para uma concentração de 6,0 mg/L. Esta solução foi em seguida acondicionada em frasco âmbar e armazenada à 4°C (geladeira). As soluções-teste para os ensaios, agudos e crônicos foram preparadas no início de cada teste. Os preparos de ambas as soluções estão esquematizadas na Figura 7.

Figura 7. Ilustração da preparação da solução-estoque (100 mg/L) para os testes agudos e da solução-diluída (6 mg/L) para os testes crônicos.



Fonte: Autoria própria.

3.4 Teste de toxicidade aguda (preliminar) com chlorantraniliprole

Foi realizado um teste preliminar de toxicidade aguda com a finalidade de se estabelecer uma faixa de concentração de chlorantraniliprole, que permitisse o cálculo da CE(50)48h. As concentrações deste ensaio foram definidas com base nos resultados da literatura de testes crônicos (21 dias), com a espécie do microcrustáceo *Daphnia magna*, onde apresentaram uma CENO de 4,47 µg/L (US.EPA, 2008 e EFSA, 2013).

O teste preliminar contou com o preparo de soluções do chlorantraniliprole com 5 concentrações intermediárias com uma progressão geométrica de fator 3 (0,5 µg/L; 1,5 µg/L; 4,5 µg/L; 13,5 µg/L, 40,5 µg/L) (Tabela 8 e ANEXO I).

Este teste consistiu em um controle somente com água de cultivo, 5 concentrações pré-estabelecidas do pesticida e mais 5 concentrações compostas por água de cultivo + acetona (por ser o solvente da solução) na quantidade proporcional a cada concentração do teste.

Cada concentração foi composta por 10 réplicas, contendo 1 organismo-teste inserido em um volume de 20 mL em béqueres de vidro (50 ml) (Figura 8).

Figura 8. Demonstração dos testes de toxicidade com *C. dubia*.



Fonte: Acervo particular

Na montagem do experimento, foram oferecidos como alimento 0,02 mL/organismo de “alimento composto” e 1 a 5×10^5 células/organismo de “solução algal”, sendo a alga ministrada diariamente.

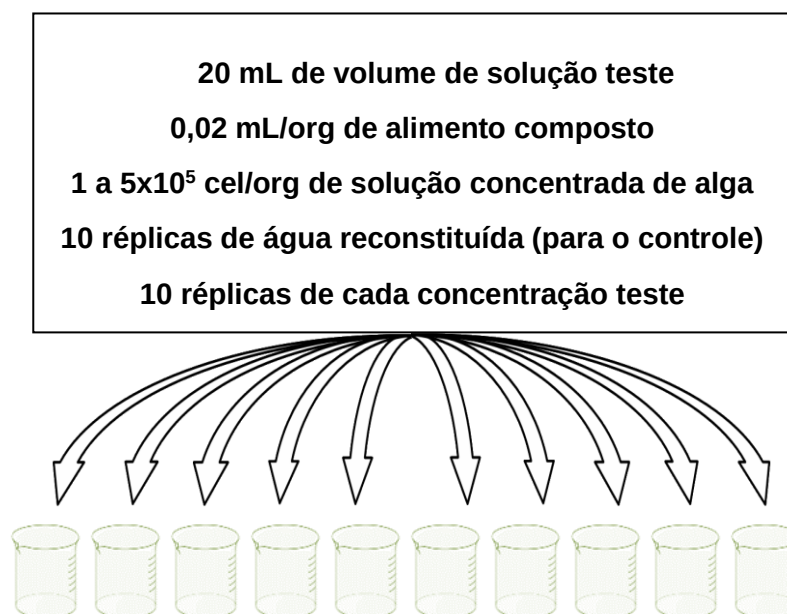
O experimento foi mantido por 48h em incubadora marca TECNAL, modelo TE-4020 LED, com temperatura entre 23°C e 27°C, com fotoperíodo de 16h/luz e 8h/escuro, segundo as recomendações (adaptadas) da ABNT NBR 13373/2010.

3.5 Testes de toxicidade aguda (definitivos) com chlorantraniliprole

Para medir a toxicidade aguda do chlorantraniliprole sobre a *C. dubia* foram definidas 5 concentrações em progressão geométrica utilizando fator 1,5. Estas novas concentrações foram estabelecidas a partir da concentração de 4,5 µg/L (do teste preliminar), por ter apresentado um resultado significativo de 50% de mortalidade dos organismos-teste.

As concentrações ficaram definidas assim: 0,88 µg/L; 1,3 µg/L; 2,0 µg/L; 3,0 µg/L, 4,5 µg/L. Os experimentos foram realizados em três períodos: 13/03/2015; 10/04/2015 e 05/06/2015 (ANEXO I) e utilizou-se lotes de diferentes períodos da cultura de *C. dubia*, a fim de se comprovar a reprodutibilidade dos dados obtidos para CE(50) 48h. Os procedimentos para a execução dos testes foram idênticos aos citados anteriormente no item **3.4** e como se pode ver na Figura 9.

Figura 9. Ilustração da preparação para os testes de toxicidade aguda e crônica com *C. dubia*.



Fonte: Autoria própria

A partir dos resultados para os testes agudos, os quais avaliaram a mortalidade e imobilidade em 48 horas, foram calculadas as estatísticas dos testes 1, 2 e 3, utilizando o Software ICPIN e o método de Interpolação Linear. Confirmadas nas Figuras 11, 12 e 13, a seguir.

3.6 Teste de toxicidade crônica (Preliminar) com chlorantraniliprole

Foi realizado um teste preliminar para encontrar uma concentração inicial e, conseqüentemente realizar os três testes definitivos (Anexo I).

As concentrações dos ensaios crônicos foram definidas a partir do valor médio de CE(50)48h de 2,9 µg/L (obtidos por meio da análise de três testes agudos descritos no item 3.5), dividindo-o por 10, ou seja, de 0,29 µg/L.

Ficaram estabelecidas 5 concentrações: 0,13 µg/L; 0,19 µg/L; 0,29 µg/L; 0,44 µg/L e 0,65 µg/L para a realização dos ensaios crônicos preliminares.

Este ensaio preliminar foi realizado com neonatos de *C. dubia* com idade entre 6h a 24h. A duração do ensaio foi de 7 a 8 dias, com troca total da solução-teste a cada 48h. O alimento fornecido diariamente foi a alga da espécie *R. subcapitata* (1

a 5×10^5 células/organismo) e a cada renovação de solução, foi ministrado o alimento composto (0,02 mL/indivíduo). O ensaio permaneceu em incubadora com controle da temperatura (23 a 27°C) e fotoperíodo (16h-luz e 8h-escuro).

Os procedimentos para a execução deste teste foram idênticos aos citados anteriormente no item **3.4**.

3.7 Testes de toxicidade crônica (definitivos) com chlorantraniliprole

Foram realizados três testes crônicos definitivos com as concentrações ajustadas a partir do teste preliminar. Ficaram assim definidas: 0,25 µg/L; 0,37 µg/L; 0,56 µg/L; 0,84 µg/L; 1,26 µg/L.

Esta faixa permitiu o cálculo das variáveis acima citadas, para a proposta de um valor de exposição ambiental seguro para a proteção da vida aquática, com base no organismo-teste *C. dubia*. (ANEXO II).

Foram totalizados três ensaios que permitissem o cálculo de CENO, CEO e VC para o clorantraniliprole. Para estes testes avaliou-se a reprodução em comparação ao grupo controle, por meio de análise estatística que utilizou o Software BioStat 5.3 (Ayres, 2007) e o método de Kruskal-Wallis.

Tanto o ensaio preliminar quanto os definitivos foram realizados com neonatos de *C. dubia* com idade entre 6h a 24h. A duração dos ensaios foi de 7 a 8 dias, com troca total da solução-teste a cada 48h. O alimento fornecido diariamente foi a alga da espécie *R. subcapitata* (1 a 5×10^5 células/organismo) e a cada renovação de solução, foi ministrado o alimento composto (0,02 mL/indivíduo).

Os ensaios permaneceram em incubadora com controle da temperatura (23 a 27°C) e fotoperíodo (16h-luz e 8h-escuro). Os procedimentos para o preparo e execução dos testes foram idênticos aos citados anteriormente no item **3.4**. Os parâmetros pH, dureza e condutividade foram monitorados a cada troca, para análise de possíveis interferências na reprodução, de acordo com a ABNT NBR 13373 /2010.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Toxicidade aguda

Conforme citado no item 3.4 os resultados do teste agudo preliminar realizado com *C. dubia* expostas por 48h ao pesticida chlorantraniliprole, revelaram que a CE(50) 48h permaneceu entre as concentrações de 1,5 µg/L e 4,5 µg/L, com mortalidade correspondente a 20% e 40%, respectivamente. Observado no Anexo I e Tabela 8.

Tabela 8. Resultados das mortalidades obtidas no ensaio agudo preliminar, no qual a espécie *C. dubia* foi exposta por 48h ao chlorantraniliprole.

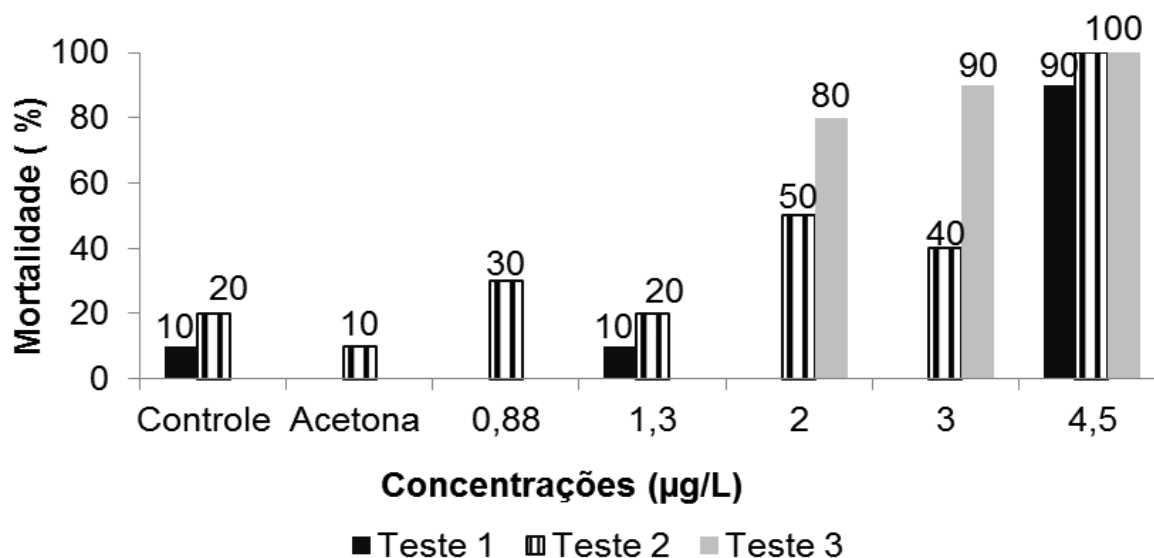
Mortalidade(%)						
Controle	Acetona	0,5 µg/L	1,5 µg/L	4,5 µg/L	13,0 µg/L	40,5 µg/L
10	20	0	20	40	100	100

Considerando-se que, para o cálculo de CE(50) 48h, o ideal é ter uma faixa de concentrações, sobretudo, onde não ocorram mortalidades acima de 20% e uma concentração com 100% de mortalidade, de acordo com as normas adaptadas da ABNT NBR 13373 (2010).

Sendo assim, a partir deste resultado, foram determinadas as novas concentrações para os três testes definitivos de toxicidade aguda. Conforme Anexo 1.

Os 3 ensaios definitivos utilizaram a mesma faixa de concentrações, no entanto, as porcentagens de mortalidade variaram devido a possível oscilação da faixa de sensibilidade dos organismos. (Figura 10).

Figura 10. Resultados dos ensaios de toxicidade aguda com chlorantraniliprole para avaliação de mortalidade utilizando-se *C. dubia*.



Os resultados dos três testes de toxicidade aguda estão expressados estatisticamente, através das Figuras 11, 12 e 13, a seguir.

Figura 11. Análise estatística para o 1º teste de toxicidade aguda com *C. dubia*.

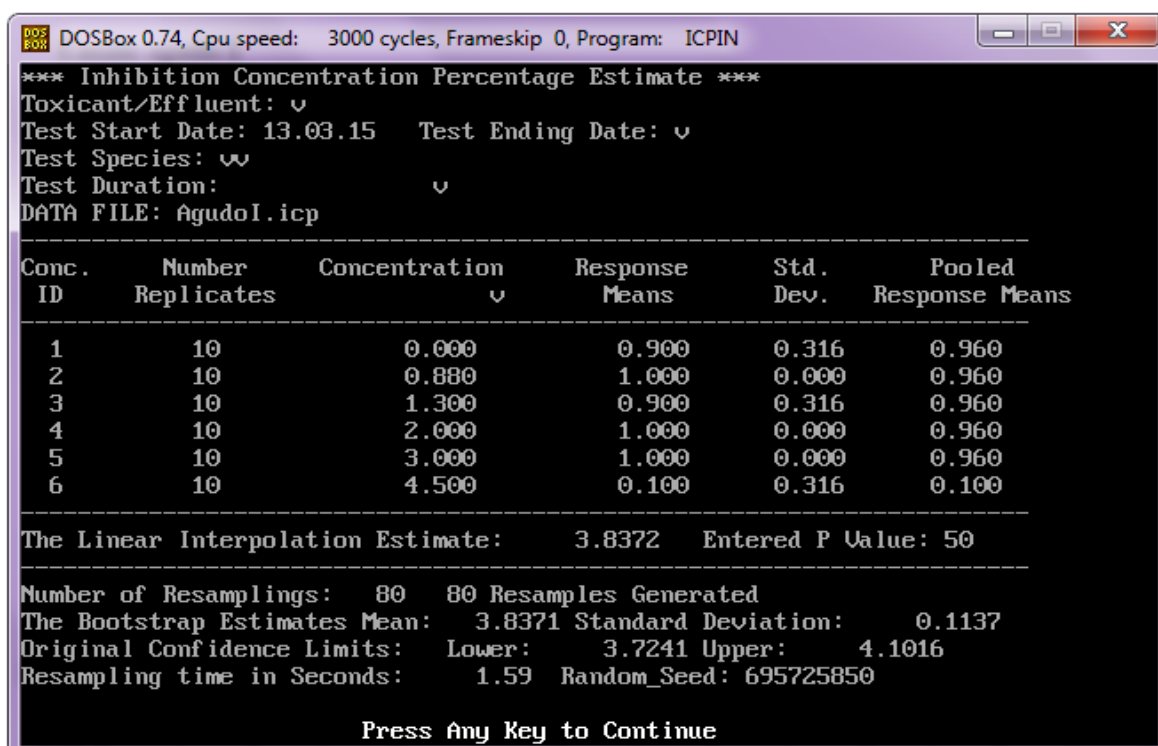


Figura 12. Análise estatística para o 2º teste de toxicidade aguda com *C. dubia*.

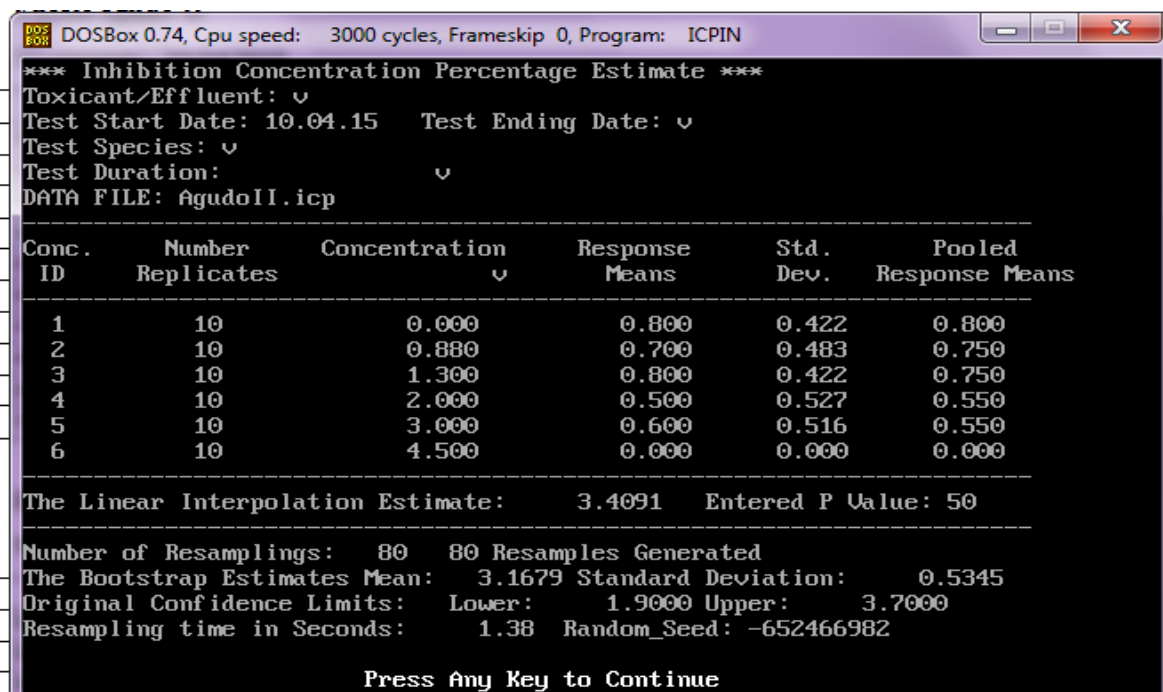
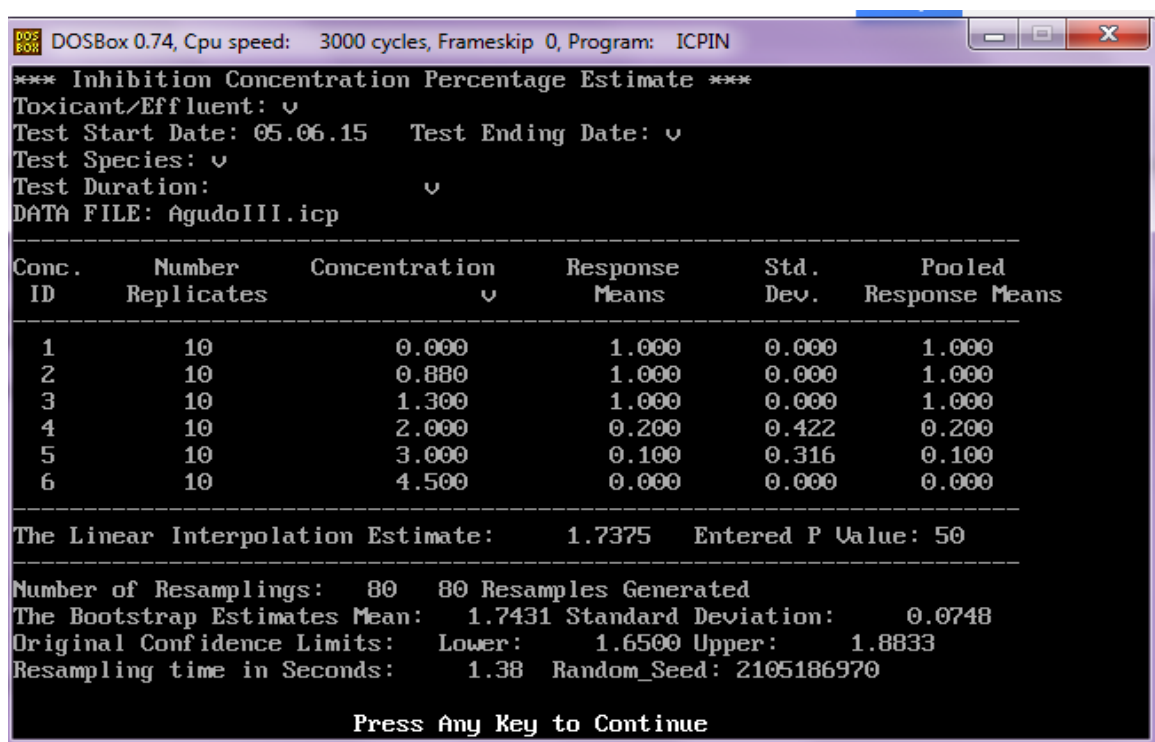


Figura 13. Análise estatística para o 3º teste de toxicidade aguda com *C. dubia*.



Obteve-se um valor máximo e mínimo de CE(50)48h de 3,84 µg/L e 1,74 µg/L, nos testes 1 e 3, respectivamente (Tabela 9).

Tabela 9. Resultados de CE50 (48h) dos testes de toxicidade aguda.

	1º Teste	2º Teste	3º Teste
	µg/L		
CE50 (48h)	3,84	3,41	1,74

Diante dos resultados estatísticos, foi calculado um valor médio de CE(50) 48h entre os três testes realizados e determinou-se, então, que a CE50 (48h) para *C. dubia* sob os efeitos do inseticida chlorantraniliprole foi de $2,9 \pm 1,11$ µg/L.

Na Tabela 10 pode-se constatar os limites ambientalmente seguros para algumas espécies de organismos aquáticos descritos na literatura (EFSA, 2013 e US.EPA 2008).

Tabela 10. Valores de CE(50) e CL(50) 48h de chlorantraniliprole, obtidos na literatura para algumas espécies de invertebrados e microcrustáceos de água doce (US.EPA, 2008 e EFSA, 2013).

INVERTEBRADOS DE ÁGUA DOCE	ORDEM	CE50 e CL50(48h)
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Cladocera	CE50 2,9 µg/L *
<i>Daphnia magna</i>	Cladocera	CE50 9,4 µg/L**
<i>Daphnia magna</i>	Cladocera	CE50 11,6 µg/L
<i>Centropilum triangulifer</i>	Ephemeroptera	CL50 11,6 µg/L
<i>Chimarra atterima</i>	Trichoptera	CL50 11,7 µg/L
<i>Gammarus pseudolimnaeus</i>	Amphipoda	CL50 35,1 µg/L
<i>Chironomus riparius</i>	Diptera	CL50 85,9 µg/L
<i>Hyallella azteca</i>	Amphipoda	CL50 >389 µg/L
<i>Soyedina carolinenses</i>	Plecoptera	CL50 978 µg/L

* presente pesquisa.

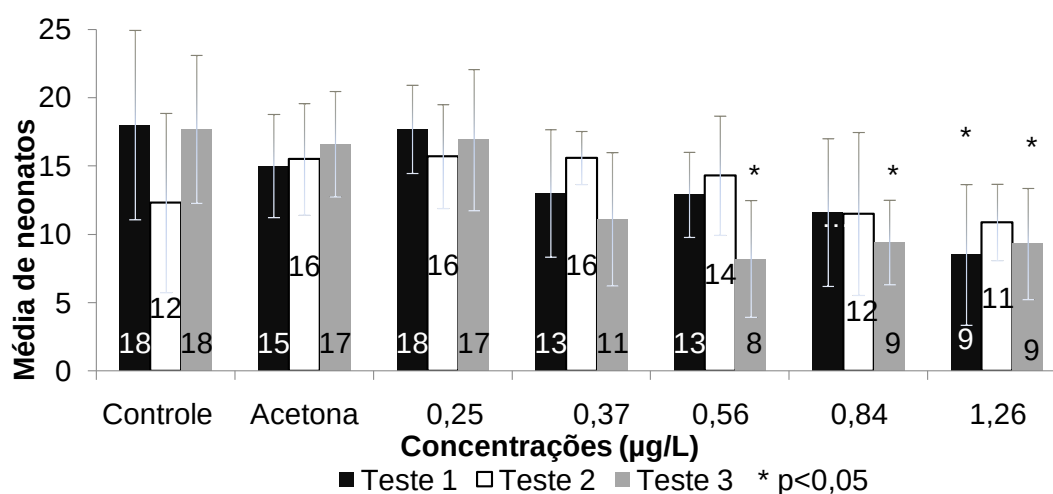
** Lavtizar et al. (2015).

4.2 Toxicidade crônica

A partir dos resultados dos testes de toxicidade aguda, iniciaram-se os ensaios crônicos, os quais avaliaram os efeitos do chlorantraniliprole sobre a reprodução da *C. dubia*, a longo prazo.

Foram realizados 4 testes, sendo 1 preliminar e 3 definitivos, contudo, somente 2 dos definitivos apresentaram resultados significativos em relação ao grupo controle, os testes 1 e 3. (Figura 14).

Figura 14. Resultado dos testes de toxicidade crônica utilizando concentrações de 0,25 a 1,26 µg/L de clorantraniliprole, às quais os organismos-teste foram expostos por 7 dias, havendo diferenças significativas nos testes 1 e 3.



*Diferença significativa

De acordo com o gráfico acima, observa-se que houve diferença significativa somente nos testes 1 e 3. Sendo assim, pode-se constatar que no teste 1 (preto) a CEO ficou em 1,26 µg/L e a CENO em 0,84 µg/L. No teste 3 (cinza) a CEO ficou em 0,56 µg/L e a CENO em 0,37 µg/L. Ficou determinado para os testes 1 e 3, um valor médio de $0,91 \pm 0,49$ µg/L para CEO e de $0,61 \pm 0,33$ µg/L para CENO e, a partir destas médias, foi calculado o VC de 0,74 µg/L (Tabela 11).

Tabela 11. Demonstração das estatísticas médias de neonatos e desvios dos testes de toxicidade crônica I, II, III para *C. dubia*.

Concentrações	Controle	Acetona	0,25	0,37	0,56	0,84	1,26
Neonatos	µg/L						
Média e desvio I	18±6,93	15±3,77	17,7±3,23	13±4,67	12,9±3,11	11,6±5,40	8,5±5,13
Média e desvio II	12,3±6,57	15,5±4,06	15,7±3,80	15,6±1,96	14,3±4,37	11,5±5,97	10,9±2,80
Média e desvio III	17,7±5,40	16,6±3,90	16,9±5,20	11,1±4,90	8,2±4,30	9,4±3,10	9,3±4,10

Lavtizar et al. (2015) avaliaram também os efeitos crônicos do chlorantraniliprole sobre a espécie de microcrustáceo, *Daphnia magna* e de acordo com os seus resultados não foram observados efeitos crônicos significativos para *D. magna*, ao longo de 21 dias de exposição ao pesticida. Todavia, na presente pesquisa foram observados os efeitos crônicos de reprodução ao longo de 7 dias para *Ceriodaphnia dubia*.

Em 2015, Rodrigues et al., utilizaram em suas pesquisas os insetos *Chironomus riparius* no período larval. Estes colonizam ambientes aquáticos como lagos, rios, riachos, poças de água, além de serem considerados organismos bentônicos na fase larval de suas vidas. Eles tiveram como objetivo, examinar as respostas sub-letais do *C. riparius* aos efeitos do chlorantraniliprole e encontraram a CEO de 3,1 µg/L em 28 dias de exposição ao pesticida e a CL50 (48h) de 77,5 µg/L. Ao final, atestaram que os impactos causados pelo inseticida chlorantraniliprole sobre *C. riparius* comprometeram negativamente o desenvolvimento e crescimento da espécie. Seus resultados corroboram a pesquisa da EFSA (2013), onde estabeleceram a CENO de 2,5 µg/L para *C. riparius* em 28 dias de teste com o mesmo pesticida para o meio aquoso, assim como o valor de 5,0 µg/L para o sedimento.

O valor obtido na presente pesquisa (2,9 µg/L) possui valor menor do que os resultados previamente relatados pelo EPA (2008) e EFSA (2015) de 11,6 µg / L para diversas espécies de invertebrados de água doce. Pode-se observar CE50(48h) maiores para a cladocera *D. magna* de 11,6 µg/L, para a Ephemeroptera *Centroptilum triangulifer* de 11,6 µg/L e CL50 (48h) de 11,7 µg/L para a Trichoptera *Chimarra atterima* (Tabela 9). Assim como comparandando-o com os resultados de Lavitzar et al. (2015) para *D. magna* de 9,4 µg/L.

Nas pesquisas de Lavitzar et al. (2014) sobre a transformação do chlorantraniliprole em meio aquoso, eles observaram uma rápida degradação do produto. No entanto, apesar dessa característica encontrada, quando os organismos-teste deste estudo foram expostos a concentrações elevadas inicialmente para os testes agudos, foi observado um efeito de imobilidade e mortalidade em 2 dias de exposição ao pesticida. Vale ressaltar que em todos os seus testes de toxicidade crônica houve a renovação da solução-teste.

Nas pesquisas de Sumon et al. (2016) sobre os cultivos de arroz associado com cultivo de camarão, eles puderam constatar que as aplicações de pesticidas como o chlorantraniliprole sobre a agricultura, podem causar efeitos diretos reduzindo a abundância dos organismos pelo aumento da mortalidade ou pela redução da fecundidade ou mesmo podem alterar padrões de comportamento normais, da fisiologia, causando toxicidade aguda e crônica nas populações de microcrustáceos cultivados. Concluíram que a aplicação de pesticidas na produção de arroz pode levar à contaminação dos ambientes aquáticos, os quais podem se dispersar através da deriva de pulverização, do escoamento e da lixiviação do produto.

Na Etiópia, Ayalew (2015), pesquisou alguns pesticidas utilizados no combate à *Tutta absoluta*, a praga do tomateiro e 10 inseticidas de 4 classes diferentes fizeram parte do seu estudo, dentre eles as diamidas. Como resultado, a infestação no fruto foi significativamente menor, em áreas tratadas com o inseticida diamida chlorantraniliprole, causando menos danos às frutas.

Outras pesquisas foram realizadas para analisar os efeitos do chlorantraniliprole sobre a praga do tomateiro, *T. absoluta* e constataram a sua eficiência (Karaagac S. U., 2015) e alguns resultados descrevem os efeitos do chlorantraniliprole.

Takao (2011), utilizando algumas espécies de invertebrados estudou a atividade do inseticida chlorantraniliprole. Verificou que sobre as principais pragas do tomateiro, as doses de 20, 40 e 80 g i.a.ha⁻¹, são eficiente para o controle de *Liriomyza huidobrensis* e *Tuta absoluta* e as doses de 40 e 80 g i.a.ha⁻¹ são eficientes para *Bemisia tabaci* biótipo B e *Frankliniella schultzei*. Pelos resultados obtidos nos seus experimentos, constatou-se que o novo inseticida poderá ser utilizado no controle das principais pragas do tomateiro, constituindo-se como nova opção para o manejo das pragas na cultura do tomate e, associado aos neonicotinóides. Constatou também que as aplicações sequenciais e frequentes de inseticidas de grupos mais antigos e de maior toxicidade como organofosforado, carbamatos e piretróides devem ser evitadas.

Martinou et al. (2014) testaram os efeitos letais de 6 inseticidas com mecanismos de ação diferentes, dentre eles o chlorantraniliprole, sobre o *Macrolophus pygmaeus*, predador natural da *Tuta absoluta*, no entanto, não houve diferença significativa, causada pelo clorantraniliprole, sobre o predador. Em 2015, esses mesmos pesquisadores estudaram os efeitos subletais de 2 inseticidas, sendo um deles o chlorantraniliprole, sobre os predadores da *Ephestia kuehniella*. Nesse estudo, não houve efeito crônico sobre as espécies predadoras, *Macrolophus pygmaeus* e *Nesidiocoris tenuis* ao se alimentarem dos ovos.

Nas pesquisas de Abees et al. (2015) foram testadas a toxicidade aguda e crônica do chlorantraniliprole sobre a espécie de inseto *Bracon nigricans*, predador natural da *T. absoluta*, não sendo evidenciados resultados significativos contra o inseto predador. Já nos resultados dos trabalhos de Campos et al. (2015) constataram alguns efeitos negativos do chlorantraniliprole sobre dois predadores naturais, o *Amphiareus constrictus* e *Blaptostethus pallescens* Poppius, com redução do número de ninfas no estágio adulto, alterando assim a próxima geração da população.

As mutações que afetam o mecanismo de ação dos insecticidas são muito comuns e estão relacionados com a resistência dos organismos ao ingrediente ativo. Li X. et al. (2015) avaliaram a suscetibilidade da traça da couve, *Plutella xylostella*, ao chlorantraniliprole e, após diferentes ensaios, constataram a sua resistência à diamida.

No entanto, Shane et al. (2015) estudaram os efeitos de 4 inseticidas, dentre eles o chlorantraniliprole, sobre a espécie *Drosophila melanogaster* e constataram que, devido aos diversos mecanismos de ação dos inseticidas, a espécie em questão foi menos suscetível à diamida. Enquanto que, nas pesquisas de Campos et al. (2015), as diamidas foram altamente eficazes contra *T. absoluta*, evidenciando-se a resistência cruzada entre elas.

Em Karnataka, na Índia, foi realizada uma pesquisa de campo na Universidade de Ciências Agrícolas, no distrito de Dharwad, onde foram observados os efeitos de diferentes inseticidas sobre a broca da soja, *Cydia ptychora* e os resultados revelaram que a ação do chlorantraniliprole foi significativamente superior na redução da população de larvas (Vinod M. e Patil R.H., 2015).

Robles-Vargas (2015) pesquisou os efeitos de organoclorados e carbamatos sobre *D. magna* e *C. dubia* e concluiu que houve uma grande variação nos valores de EC50 e crônicos. Quando testou o organoclorado Lindano sobre a *D. magna* encontrou uma EC50(48h) de 1700 µg/L e 45 µg/L para *C. dubia*, valores maiores que os encontrados na literatura, sendo 15 vezes maior do que o determinado neste estudo. Para o carbamato Carbaril a EC50(48h) ficou estabelecida em 12 µg/L para ambas as espécies citadas, valor também maior que os determinados na literatura, sendo 4,5 vezes maior do que a apresentada nesta pesquisa. Os resultados para os testes crônicos para o organoclorado Lindano foram estabelecidos em 340 µg/L para *D. magna* e 13 µg/L para *C. dubia*, sendo assim 17,5 maior que o valor crônico apresentado no presente estudo.

Na presente pesquisa, os resultados da toxicidade causada por clorantraniliprole nos testes crônicos registraram um valor 3,9 vezes menor do que os resultados dos testes de toxicidade aguda.

Observa-se que, apesar de não haver significância no teste crônico II, houve uma redução de mais de 50% em relação ao número de neonatos na maior concentração testada (1,26 µg/L) quando comparado ao grupo controle, como se pode visualizar na Tabela 11. Este fato pode ser atribuído à provável variação da faixa de sensibilidade dos organismos-teste durante todos os experimentos.

Alguns valores encontrados na literatura para testes agudos com *Daphnia magna* foram maiores e outros menores que o resultado da presente pesquisa (CE(50) 48h de 2,9 µg/L para *C. dubia*). Conforme apresenta abaixo a Tabela 12.

Nas pesquisas abaixo relacionadas utilizou-se como organismo-teste a *D. magna*, espécie diferente ao da presente pesquisa, além de utilizarem diversos inseticidas com princípios ativos e mecanismos de ação diferentes. No entanto considera-se o mesmo período de exposição (48h).

Tabela 12. Comparação de EC50(48h) de inseticidas com diferentes mecanismos de ação sobre *Daphnia magna*.

INSETICIDA	EC50(48h)	REFERÊNCIA
chlorantraniliprole	9.4 µg/L	Lavtzar et al. (2015)
chlorantraniliprole	11.6 µg/L	US.EPA (2008)
cyantraniliprole	20 µg/L	EFSA (20013)
flubendiamide	>60 µg/L	EFSA (20013)
imidacloprid	84,000 µg/L	Pavlaki et al. (2011)
thiamethoxam	>100,000 µg/L	FAO (2014)
thiacloprid	>85,100 µg/L	FAO (2010)
clothianidin	100,800–119,000 µg/L	US.EPA (2003)
carbaryl	0.016 µg/L	FAO (2007)
pirimicarb	16.0 µg/L	Andersen et al. (2006)
methomyl	28.7 µg/L	Fernández-Alba et al. (2002)
aldicarb	583.0 µg/L	Moore et al. (1998)
chlorpyrifos	0.6 µg/L	Moore et al. (1998)
malathion	28.1 µg/L	Rassoulzadegan, M.; Akyurtlakli, N (2002)
dimethoate	1100 µg/L	Andersen et al. (2006)
diazinon	0.7–1.25 µg/L	Turner, L. (2002)
permethrin	0.32 µg/L	WHO (2011)
λ-cyhalothrin	0.39 µg/L	Barata et al. (2006)
deltamethrin	0.15 µg/L	Barata et al. (2006)

Fonte: Lavtizar et al. (2015). (adaptado)

A variação nos resultados encontrados na literatura para os diversos inseticidas pode estar relacionada ao novo mecanismo de ação do chlorantraniliprole que utiliza a contração muscular, enquanto os organoclorados, carbamatos e os demais atuam diretamente no SNC, causando excitação, descontrole motor e bloqueio de impulsos nervosos.

As diamidas, tanto o chlorantraniliprole (antranílica), quanto a flubendiamida (ftálica), se mostram eficientes devido seu novo mecanismo de ação. Porém, segundo o IRAC deve-se ter cautela quanto ao incremento desses inseticidas, para que não sejam agregados cocomitantemente no mesmo programa de gerenciamento, para se evitar a resistência cruzada das espécies nas populações de insetos a essas substâncias.

No entanto, é de suma importância que o Brasil fomente programas de manejo afim de se identificar possíveis impactos e se estabelecer novos parâmetros que limitem o lançamento destes inseticidas nos ecossistemas de modo geral (Ansante et al., 2015). Devido ao excelente desempenho do inseticida chlorantraniliprole e por possuir características de qualidades ecotoxicológicas, ele poderá ser inserido em planos de gestão ambiental como o MIP – Manejo Integrado de Pragas (Ansante et al., 2015; Doker et al., 2015; Zhang, 2015; Gradish et al., 2010).

Segundo as pesquisas de Lavtizar et al. (2015), o chlorantraniliprole demonstrou ser o representante mais tóxicos dentro de seu próprio grupo, os inseticidas diamidas, corroborando os resultados do EFSA (2013), que afirma que este inseticida é muito tóxico para os invertebrados aquáticos e organismos que vivem nos sedimentos, para toxicidades aguda e crônica.

Embora o chlorantraniliprole seja um inseticida qualificado e esteja substituindo com eficiência os já existentes no mercado, é importante que os estudos e as pesquisas avaliem os seus impactos negativos, sobretudo para estabelecer um limite ambientalmente seguro.

Portanto, a presente pesquisa constatou que o chlorantraniliprole demonstrou ser o representante mais tóxicos da classe das diamidas, para os microcústáceos e, diante do exposto, este estudo propôs um limite de exposição segura de 0,74 µg/L com base em testes de toxicidade com *C. dubia*, afim de garantir a proteção da vida aquática.

5 CONCLUSÃO

A presente pesquisa avaliou os efeitos do pesticida chlorantraniliprole sobre o microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia* e relatou os impactos causados à espécie. Apresentou resultados para toxicidade aguda, através da CE50 (48h) de $2,9 \pm 1,11 \mu\text{g/L}$.

Os testes de toxicidade crônica revelaram CENO (Maior Concentração de Efeito Não Observado) de $0,61 \pm 0,33 \mu\text{g/L}$ e CEO (Menor Concentração de Efeito Observado) de $0,91 \pm 0,49 \mu\text{g/L}$.

O VC (Valor Crônico) encontrado e estabelecido, pela presente pesquisa, como concentração recomendável do princípio ativo do pesticida chloraniliaprole para proteção da vida aquática foi de $0,74 \mu\text{g/L}$.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBES. K, BIONDI. A, KURTULUS. A, RICUPERO. M, RUSSOA, SISCARO. G. Combined-NonTarget Effects of Insecticide and High Temperature on the Parasitoid *Bracon nigricans*. PLOS ONE 10(9): e0138411. doi:10.1371/journal.pone.0138411.n 2015.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica-Método de ensaio com *Ceriodaphnia spp* (Crustacea, Cladocera), 2010.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (*Chlorophyceae*), 2011.

ADAMS, A.; GORE, J.; MUSSER, F.; COOK, D.; CATCHOT, A.; WALKER, T.; AWUNI G. A. Impact of water management on efficacy of insecticide seed treatments against rice water weevil (*Coleóptera: Curculionidae*) in Mississippi rice. JOURNAL OF ECONOMIC ENTOMOLOGY. Volume: 108 . Edição: 3. Páginas: 1079-1085. Doi; 10.1093/jee/tov095. 2015.

ADAMS, W. J. Aquatic Toxicology Testing Methods. In: Hoffman, D. J. et al. Handbook Of Ecotoxicology. Boca Raton, Lewis Publishers, 1995. p. 25-46.

AGENCIA NACIONAL DE ÁGUAS – ANA. Fatos e tendências. Brasília (setembro)2009. Acesso em 15/02/2015 arquivos.ana.gov.br/imprensa/publicacoes/fatosetendencias/edicao_2.pdf.

AMIZADEH M.; HEJAZI M. J.; NIKNAM G.; ARZANLOU M. Compatibility and interaction between *Bacillus thuringiensis* and certain insecticides: perspective in management of *Tuta absoluta* (*Lepidoptera: Gelechiidae*). BIOCONTROL SCIENCE AND TECHNOLOGY. Volume: 25. Edição: 6. Páginas: 671-684. DOI: 10.1080/09583157.2015.1007030. 2015.

ANDERSEN, H. B. & BUCKLEY, J. A., 1998, Acute Toxicity of Ammonia to *Ceriodaphnia dubia* and a Procedure to Improve Control Survival. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. New York. 61: 116-122.

ANSANTE, TF ; RIBEIRO, LD¹; BICALHO, KU ; FERNANDES, JB; DA SILVA, MFDF ; VIEIRA, PC ; VENDRAMIM, JD. Secondary metabolites from Neotropical Annonaceae: Screening, bioguided fractionation, and toxicity to *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (*Lepidoptera: Noctuidae*). INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS Volume: 74. Páginas: 969-976. Doi: 10.1016/j.indcrop.2015.05.058. 2015.

ANVISA – AGENCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Consulta Pública nº 85, de 29 de setembro de 2014 D.O.U. de 1º/10/2014.

ARAGÃO, M. A; ARAÚJO, R.P.A. *Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos*. In: Zagatto, Pedro A.; Bertoletti, Eduardo. *Ecotoxicologia Aquática - Princípios e Aplicações*. São Carlos: Editora Rima, 2008. 117-152.

AYALEW, G. Efficacy of selected insecticides against the South American tomato moth, *Tuta absoluta* Meyrick (*Lepidoptera: Gelechiidae*) on tomato in the Central Rift Valley of Ethiopia. *AFRICAN ENTOMOLOGY*. Volume: 23 Edição: 2 Páginas: 410-417. 2015.

AYRES, M. 2007. *BioEstat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Sociedade Civil Mamirauá. 364p.

AZEVEDO, F. A. AND CHASIN A. A. DA MATTA “*As bases toxicológicas da Ecotoxicologia*”. 1ª Edição; Páginas 93-98. Editora Rima. São Carlos-SP, 2004.

BARBEE, GC ; MCCLAIN, WR ; LANKA, SK ; STOUT, MJ. Acute toxicity of chlorantraniliprole to non-target crayfish (*Procambarus clarkii*) associated with rice–crayfish cropping systems. *PEST MANAGEMENT SCIENCE*. Volume: 66. Edição: 9. Páginas: 996-1001. DOI: 10.1002/ps.1972. 2010.

BAZANTE R-YAMAGUISHI *; LOMBARDI J. V., MERCANTE C. T. J., CARUSO N. P. P. ; MOREIRA L. E. B. ; PEREIRA J. S. Análise Ecotoxicológica em Viveiro de Produção de Tilápia (*Oreochromis niloticus*), Utilizando o Cladocero *Ceriodaphnia dubia* como Organismo-Teste. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v. 4, n. 1-3, 2009, 55-64 doi: 10.5132/jbse.2009.01.008. 2008.

CAMPOS M. R; SILVA T. B. M; SILVA W. M; SILVA J. E; SIQUEIRA H. A. A. Susceptibility of *Tuta absoluta* (*Lepidoptera: Gelechiidae*) Brazilian populations to ryanodine receptor modulators. *PEST MANAGEMENT SCIENCE*. Volume: 71. Edição: 4. Páginas: 537-544. DOI: 10.1002/ps.3835. 2015.

CARVALHO, M. M. Estudo da atuação dos metais zinco e cádmio sobre os aspectos reprodutivos da espécie *Ceriodaphnia dubia* geração parental e F1. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Unesp Câmpus de Sorocaba. 2016.

CETESB (COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL). *Métodos de Avaliação da Toxicidade de Poluentes a Organismos Aquáticos. Cursos e Treinamentos*. CETESB Volume I. São Paulo, 2005. 312p.

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - Os POPs da Convenção. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br/institucional/stockholm-convention/118-os-pops-da-convencao> .Acesso em 15/07/2014.

CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental de São Paulo, Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes e organismos aquáticos, São Paulo, 2002. 27p.

CFB – Center for Freshwater Biology. Departament of Biological Sciences of University of New Hampshire. Disponível em: http://cfb.unh.edu/cfbkey/html/Organisms/CCLadocera/FDaphnidae/GCeriodaphnia/Ceriodaphnia_dubia/ceriodaphniadubia.html. Acesso em 06/ 07/ 2016.

COELHO, K. S. Estudos ecotoxicológicos com ênfase na avaliação da toxicidade de surfactantes aniônicos aos cladóceros *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de São Carlos – UFSCAR, 2008. 146f.

CONAMA (Conselho Nacional Do Meio Ambiente). Resolução 357 – de 17 de março de 2005. 23p.

CORDOVA, D., BENNER, E. A.; SACHER, M. D.; RAUH, J. J.; SOPA, J .S.; LAHM, G. P.; SELBY, T. P. Anthranilic diamides: a new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. *Pesticide Biochemistry Physiology*, Maryland Heights, v. 84, n.1, p.196-214. 2006.

COSTA C. R.; OLIVI P.; BOTTA C.M.R.; ESPINDOLA E.G.L. - QUÍMICA NOVA, VOL. 31, Nº 7, 1820-1830 - SCIELO BRASIL, 2008.

DHAWAN, A. K.; SAINI, SARIKA.; SINGH, KAMALDEEP.; ANEJA, ANAND. Persistence and residual toxicity of some insecticides against *Phenacoccus solenopsis* on cotton (*Gossypium* spp). *INDIAN JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCES*. Volume: 79. Edição: 3. Páginas: 203-206. 2009.

DERÍSIO, JOSÉ CARLOS “*Introdução ao controle de poluição ambiental*” 2ª Edição. Páginas 58-60. Editora Signus. São Paulo-SP, 2000.

DPR’s – Departamento de Regulação do Pesticida. Filial Monitoramento Ambiental, 1001 I Rua Sacramento, Califórnia 95814. Summary of new insecticide active ingredient for tracking using surface water monitoring field 2005-2010.2013. Disponível em: http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/ehapreps/analysis_memos/newhart_goh_2013.pdf. Acesso em: 10/07/2016.

DOKER, I; PAPPAS, ML ; SAMARAS, K ; TRIANTAFYLLOU, A ;KAZAK, C ; BROUFAS, GD. Compatibility of reduced-risk insecticides with the non-target

predatory mite *Iphiseius degenerans* (Acari: Phytoseiidae). PEST MANAGEMENT SCIENCE. Volume: 71. Edição: 9. Páginas: 1267-1273. DOI: 10.1002/ps.3921. 2015.

EDWARDS, G.A.; WEIANT E. A.; SLOCOMBE A. G. **The action of ryanodine on the contractile process in striated muscle**. SCIENCE. Whashington. v.108. p.330-332. 1948.

EFSA - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance [chlorantraniliprole]. EFSA Journal 2013;11(6):3143. [107 pp.]. DOI:10.2903/j.efsa.2013.3143. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal © European Food Safety Authority. CONCLUSION ON PESTICIDE PEER REVIEW , Parma, Italy. 2013.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTA_G01_40_210200792814.html. Acesso em: 27/01/2015.

ESTEVES, F.A. *Fundamentos da Limnologia*. 2ª Edição. Páginas 453, 454, 455. Editora: Interciência. Rio de Janeiro, 2011.

FENOLL, J.; GARRIDO I.; CAVA J.; HELLÍN P.; FLORES P.; NAVARRO S. Photometabolic pathways of Chlorantraniliprole in aqueous slurries containing binary and ternary oxides of Zn AND Ti. ELSEVIER - Chemical Engeneering Journal, 2015.

FRACÁCIO, R. Pesticidas organoclorados em peixes (*Danio rerio* e *Poecilia reticulata*) – Sub-bacia do rio Monjolinho (São Carlos-SP). Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP. 203p). Estudos limnológicos e ecotoxicológicos (laboratoriais e insitu), com ênfase na avaliação da toxicidade de metais e de pesticidas organoclorados em peixes (*Danio rerio* e *Poecilia reticulata*) – Sub-bacia do rio Monjolinho. 2006.

GARZÓN, A.; MEDINA, P.; AMOR, F.; VIÑUELA, E.;BUDIA, F. Toxicity and sublethal effects of six insecticides to last instar larvae and adults of the biocontrol agents *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) and *Adalia bipunctata* (L.) (Coleoptera: Coccinellidae). Chemosphere. Volume 132. Pages 87–93. 2015.

GONTIJO L. M.; CELESTINO, D.; QUEIROZ O. S.; GUEDES R. N. C; PICANCO M. C. Impacts of azadirachtin and chlorantraniliprole on the developmental stages of pirate bug predators (Hemiptera: Anthocoridae) of the tomato pinworm *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). FLORIDA ENTOMOLOGIST. Volume: 98. Edição: 1. Páginas: 59-64. 2015.

GRADISH A. E.; SCOTT-DUPREE C.D.; SHIPP L.; HARRIS C. R. .; FERGUSON G. Effect of reduced risk pesticides for use in greenhouse vegetable production on

Bombus impatiens (Hymenoptera: Apidae). PEST MANAGEMENT SCIENCE. Volume: 66. Edição: 2. Páginas: 142-146. DOI: 10.1002/ps.1846. 2010.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. Environ. Sci. Technol., v. 11, n. 7, p. 714-719, 1977.

HOFFMAN, D.J. Wildlife toxicity testing. In: Hoffman et al. Handbook of Ecotoxicology. Washington: CRC Press LLC. 2a. ed., Capítulo 4. 2a. ed., 2003.

HUGH A. SMITH. Departamento de Agricultura, UF / Serviço de Extensão IFAS da Universidade da Flórida, IFAS, Florida A & Programa de Extensão Cooperativa M University e Conselhos de comissários do condado de Cooperação dos Estados Unidos. 2013. Disponível em <http://edis.ifas.ufl.edu>. Acesso em 05/07/2016.

HUSSETH, A.S.; GROVES, RL; CHAPMAN, S.A.; NAULT, B.A. Evaluation of diamide insecticides co-applied with other agrochemicals at various times to manage *Ostrinia nubilalis* in processing snap bean. PEST MANAGEMENT SCIENCE. Volume: 71. Edição: 12. Páginas: 1649-1656. DOI: 10.1002/ps.3973. 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE (2003) *Levantamento sistemático da produção agrícola, vol. 5*. Rio de Janeiro.

IRAC - BR - COMITÊ BRASILEIRO DE AÇÃO À RESISTÊNCIA DE INSETICIDAS, 2015. Disponível em: <http://www.irac-online.org/documents/moa-classification/>. Acesso em: 23/07/2016.

JEFFERIES, P. A.; TOIA, R. F.; BRANNIGAN, B.; PESSAH, I. CASIDA, J. E. Ryania insecticide: analysis and biological activity of 10 natural ryanoids. Journal of Agriculture and Food Chemistry, Washington, v. 40, p. 142-146, 1992.

KARAAGAC S. U. Enzyme Activities and Analysis of Susceptibility Levels in Turkish *Tuta absoluta* Populations to Chlorantraniliprole and Metaflumizone Insecticides. PHYTOPARASITICA Volume: 43 Edição: 5 Páginas: 693-700. 2015.

KYOUNGAH SEE AND JOHN BAILER. “Added Risk and Inverse Estimation for Count Responses in Reproductive Aquatic Toxicology Studies”. Department of Mathematics and Statistics, Center for Environmental Toxicology and Statistics, Miami University, Oxford, Ohio 45056, U.S.A Vol.54; No 1 Páginas 67-73, 1998.

LAHM, G.P., STEVENSON, T.M., SELBY, T.P., FREUDENBERGER, J.H., CORDOVA, D., FLEXNER, L., BELLIN A, C., DUBAS, C.M., SMITH, B.K., HUGHES A, K., HOLLINGSHAUS, J.G., CLARK, C.E., BENNER A., E. Rynaxypyr: a new

insecticidal anthranilic diamide that acts as a potent and selective ryanodine receptor activator. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 6274–6279. 2007.

LAHM, G.P., CORDOVA, D., BARRY, J.D. New and selective ryanodine receptor activators for insect control. *Bioorg Med Chem* 17. Elsevier Ltd., pp. 4127–4133. 2009.

LARSON J. L.; REDMOND C. T.; POTTER D.A. Comparative impact of an anthranilic diamide and other insecticidal chemistries on beneficial invertebrates and ecosystem services in turfgrass. *PEST MANAGEMENT SCIENCE*. Volume: 68. Edição: 5. Páginas: 740-748. DOI: 10.1002/ps.2321. 2012.

LAVTIZAR, VESNA; HELMUS, R.; RICK, KOOLS S.A. E.; DOLENC, D.; VAN GESTEL, C.A.M. ; TREBSE, P.; WAAIJERS, S.L.; KRAAK, M.H.S. Daphnid Life Cycle Responses to the Insecticide Chlorantraniliprole and Its Transformation Products. *ENVIRONMENTAL SCIENCE & TECHNOLOGY*. Volume: 49 Edição: 6 . p. 3922-3929. DOI: 10.1021/es506007q. 2015.

LAVTIZAR, V.; VAN GESTEL, C. A. M.; DOLENC, D.; TREBŠE, P. Chemical and photochemical degradation of chlorantraniliprole and characterization of its transformation products. *Chemosphere*. 95, 408–414 DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.09.057. 2014.

LI X.; Guo, L.; Zhou, X.; Gao, X.; Liang, P. miRNAs regulated overexpression of ryanodine receptor is involved in chlorantraniliprole resistance in *Plutella xylostella* (L.). *SCIENTIFIC REPORTS*. Volume: 5. Número do artigo: 14095. DOI: 10.1038/srep14095. 2015.

LOMBARDI, J.L. Fundamentos de Toxicologia Aquática. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T.; TAKEMOTO, R.M.; LIZAMA, M.A.P. (eds.). *Sanidade de Organismos Aquáticos*. Editora Varela. São Paulo – SP, 2004. p. 263-272.

LU, J. L. Insecticide Residues in Eggplant Fruits, Soil, and Water in the Largest Eggplant-Producing Area in the Philippines. *Article Water, Air, & Soil Pollution* September 2011, Volume 220, Issue 1, pp 413-422. 2011.

MAGALHÃES, D.P.; FERRÃO-FILHO, A.S. Ecotoxicology as a tool to monitoring aquatic ecosystems. *Oecologia Australis* Vol. 12. No 3. 2008.

MARTINOU, A. F.; STAVRINIDES, M. C. Effects of sublethal concentrations of insecticides on the functional response of two mirid generalista predators. *PLOS ONE*. Volume; 10. Edição 12. Número do artigo: e0144413. Doi: 10.1371/journal. Pone.0144413. 2015.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria n. 36 - BSB, de 19 de janeiro de 1990. Normas e padrão da potabilidade de água destinada ao consumo humano. Brasília (DF); 1990.

MMA – MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/sedr_proecotur/_publicacao/140_publicacao09062009025910.pdf. Acesso em 15/07/2014.

MMA - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>. Acesso em 19/01/2016.

MOSCARDINI V. F.; GONTIJO P.C.; MICHAUD J. P.; CARVALHO G. A. Efeitos subletais de inseticidas no tratamento de sementes sobre *Coleomegilla maculata* e *Hippodamia convergens*. ECOTOXICOLGY Volume: 24 Edição 5 Páginas: 1152-1161 Publicado: JUL 2015.

NIES - Teste de inibição do crescimento de algas. Ed. Novembro 2006. Disponível em: http://www.nies.go.jp/biology/mcc/home_j.htm. Acesso em: 16/01/2016.

OLIVEIRA-FILHO, E.C.; DA-MATTA, A.C.; CABRAL, L.L. Comparison between four and seven-day Ceriodaphnia dubia survival and reproduction test protocols using oil refinery effluent samples.” Brazilian Archives of Biology and Technology. Vol. 51 Edição 1. Páginas 137-142. (2008).

PEREIRA R. S. Identificação e Caracterização das Fontes de Poluição em Sistemas Hídricos – Revista Eletrônica de Recursos Hídricos. IPH-UFRGS. V.1 n.1 20-36. 2004.

PESTANA, J.L.T.; NOVAIS, S.C.; LEMOS M.F.L.; SOARES, A.MVM. Cholinesterase activity in the caddisfly *Sericostoma vittatum*: Biochemical enzyme characterization and in vitro effects of insecticides and psychiatric drugs. ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY. V.104. P. 263-268. 2014.

RAND, G.M. e PETROCELLI, S.R. Fundamentals of aquatic toxicology. Washington, Publinshing. Hemisphere. 665 p. 1985.

ROBLES-VARGAS D. “Toxicity of Agrochemicals on Freshwater Invertebrates”. LARRAMENDY M. L.; SOLONESKI S. Toxicity and Hazard of Agrochemicals. Chapter 7. 168 pages. DOI:10.5772/60762. 2015.

RODGHER, S. et al. Ecotoxicological analysis of the water and sediment from middle and low Tietê River Cascade Reservoirs (State of São Paulo, Brazil). Acta Limnol. Bras., v. 15, n. 3, p. 81-93, 2003.

RODITAKIS E.; SKARMOUTSOU C.; STAUERAKAKI M.; DEL ROSARIO MARTINEZ-AGUIRRE M. D. R.; GARCIA-VIDAL L.; BIELSA P.; HADDI K.; RAPISARDA C.; RISON J. L.; BASSI A.; TEIXEIRA L. A. Determination of baseline susceptibility of

European populations of *Tuta absoluta* (Meyrick) to indoxacarb and chlorantraniliprole using a novel dip bioassay method. PEST MANAGEMENT SCIENCE. Volume: 69. Edição: 2. Páginas: 217-227. DOI: 10.1002/ps.3404. 2013.

RODITAKIS E.; VASAKIS E.; GRISPOU M.; STAVRAKAKI M.; NAUEN R.; GRAVOUIL M.; BASSI A. First report of *Tuta absoluta* resistance to diamide insecticides. JOURNAL OF PEST SCIENCE. Volume: 88. Edição: 1. Páginas: 9-16. DOI: 10.1007/s10340-015-0643-5. 2015.

RODRIGUES, L.H.R.; ARENZON, A.; RODRIGUEZ, M.T.R.; FONTOURA, N.F. Avaliação da sensibilidade de *Raphidocelis subcapitata* (Chlorococcales, Chlorophyta) ao sulfato de cobre e sulfato de zinco através de ensaios de toxicidade crônica. Biociências, v. 11, p. 137-144, 2003.

RODRIGUES A C.M.; GRAVATO C.; QUINTANEIRO C.; GOLOVKO O.; ŽLÁBEK V.; BARATA C.; SOARES A. M.V.M.; PESTANA J. L.T. Life history and biochemical effects of chlorantraniliprole on *Chironomus riparius*. Portugal. Science of the Total Environment 508 (2015) 506–513. Journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv. 2015.

SATYAVANI G.; CHANDRASEHAR G.; VARMA K.K; GOPARAJU A.; AYYAPPAN S.; REDDY P. N.; MURTHY P. B. “*Toxicity Assessment of Expired Pesticides to Green Algae Pseudokirchneriella subcapitata*”.International Scchorlarly Research Network – ISRN Toxicology Vol. 2012, 2012.

SATTELLE D. B.;CORDOVA D.; CHEEK T. R. Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals.Invert Neurosci. (2008) 8:107–119 DOI 10.1007/s10158-008-0076-4.

SEE K. AND BAILER A. J. Added Risk and Inverse Estimation for Count Responses in Reproductive Aquatic Toxicology Studies. Department of Mathematics and Statistics, Center for Environmental Toxicology and Statistics, Miami University, Oxford, Ohio 45056, U.S.A. 1998.

SHARMA, A. K.; ZIMMERMAN, WILLIAM T.; LOWRIE, C., SIMON C. Hydrolysis of Chlorantraniliprole and Cyantraniliprole in Various pH Buffer Solutions. JOURNAL OF AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY Volume: 62 Edição: 16 Páginas: 3531-3536. Publicado: APR 23 2014.

SPADOTTO C. A.; GOMES M. A. F.; LUCHINE L. C.; ANDRÉA M. M. Monitoramento do Risco Ambiental de Agrotóxicos: princípios e recomendações. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 29 p.-- (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 42).

SUMON K. A.; RICO A. ; TER HORST M. M. S.; VAN DEN BRINK P. J.; HAQUE M. M.; RASHID H. "Risk assessment of pesticides used in rice-prawn concurrent systems in Bangladesh". SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT. Volume: 568 Páginas: 498-506 Publicado: OCT 15. 2016.

TAKAO W. "Atividade do inseticida chlorantraniliprole, sobre as principais pragas do tomateiro" Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Campus de Ilha Solteira – Unesp, 2011. 54f.

TEIXEIRA, L.A.F.; GUT, L. J.; WISE, J. C.; ISAACS, R. et al "Lethal and sublethal effects of Chlorantraniprole on three espécies of Ragholetis fruit flies (Diptera: Tephritidae) Pest Manegement Science. Vol. 65. Edição 2. Páginas 137-143. 2009.

THOMAS P. S. ; GEORGE P. L.; THOMAS M. S.; KENNETH A. H.; DANIEL C., I. BILLY A.; JAMES D. B.; ERIC A. B.; MARTIN J. C.; THOMAS F. PAHUTSKI. Discovery of cyantraniliprole, a potent and selective anthranilic diamide ryanodine receptor activator with cross-spectrum insecticidal activity. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters - Published by Elsevier Ltd. 2013.

TROCZKA B. J.; WILLIAMS A. J.; WILLIAMSON M. S.; FIELD L. M.; LUEMMEN P.; EMYR DAVIES T. G. Stable expression and functional characterisation of the diamondback moth ryanodine receptor G4946E variant conferring resistance to diamide insecticides. Scientific Reports. SCIENTIFIC REPORTS. 2015.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms. 4a. Ed., US Environmental Protection Agency, Washington: EPA, 2002. 335p.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). Pesticide Fact Sheet for Chlorantraniliprole. Disponível em: https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-090100_01-Apr-08.pdf. Acesso em: 23/07/2015.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). Technical Overview of Ecological Risk Assessment Analysis Phase: Ecological Effects Characterization Disponível em http://www.epa.gov/oppefed1/ecorisk_ders/toera_analysis_eco.htm Acesso em 06/07/2014.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). Pesticide Product Label, DuPont Altacor. (26-02-2014). Disponível em: http://www.epa.gov/pesticides/chem_search/ppls/000352-00730-20140206.pdf Acesso em: 15/07/2014.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). Office of Pesticide Programs' Aquatic Life Benchmarks (2014-06-05). Disponível em http://www.epa.gov/oppefed1/ecorisk_ders/aquatic_life_benchmark.htm Acesso em 06/07/2014.

VICTORINO, C.J.A. Planeta água morrendo de sede: uma visão analítica na metodologia do uso e abuso dos recursos hídricos. EDIPUC-RS, 2007. 131 P, ISBN 978-85-7430-661-2; 2007.Vinod, Madhurima; Patil, R.H. Bio-efficacy of insecticides and biorationals against pink pod borer, *cydia ptychora* (meyrick) infesting soybean. Journal of Experimental Zoology India. Volume:18. Edição:2. Páginas:899-903.2015.

VINOD M. AND PATIL R. H. Bio-efficacy of insecticides and biorationals against pinkpod borer, *cydia ptychora* (meyrick) infesting soybean. DEPARTMENT OF AGRICULTURAL ENTOMOLOGY, COLLEGE OF AGRICULTURE, UNIVERSITY OF AGRICULTURAL SCIENCES, Dharwad - 580 005, India. 2015.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações. 1 ed. São Paulo, SP, Brasil. Editora Rima, 2006. p.1-13.

ZHANG, J.; BAILER A.J.; ORIS J.T. et al. "*Bayesian approach to potency estimation for aquatic experiments when a toxicant affects both fecundity and survival.*" Environmental Toxicology and Chemistry. Vol.31. Edição 8. Páginas 1920-1930. 2012.

ZHANG, XIAO. Sublethal effects of four synthetic insecticides on the generalist predator *Cyrtorhinus lividipennis*. Journal of pest science [1612-4758] vol:88 iss:2 pg:383 -392. 2015.

Anexo I - Testes de toxicidade Aguda com *C. dubia*

*V=vivo/M=morto/N=neonato

Ensaio agudo (Preliminar)

Montagem: 07/03/2015 Dur: 45 pH: 8,01 Cond: 168,30 OD: 6,01

Desmontagem: 09/03/2015 Dur: 45 pH: 8,03 Cond: 160,01 OD:5,30

	Controle	Acetona	0,5 µg/L	1,5 µg/L	45 µg/L	13,0 µg/L	40,5 µg/L
01	V 4N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	M 0N	M 0N
02	V 4N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	M 0N	M 0N
03	V 5N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	M 0N	M 0N
04	V 1N	V 0N	V 0N	V 0N	M 0N	M 0N	M 0N
05	V 1N	V 0N	V 0N	V 0N	M 0N	M 0N	M 0N
06	V 1N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	M 0N	M 0N
07	V 2N	V 0N	V 0N	V 0N	M 0N	M 0N	M 0N
08	V 1N	V 0N	V 0N	V 0N	M 0N	M 0N	M 0N
09	V 2N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	M 0N	M 0N
10	V 2N	V 0N	V 0N	V 0N	M 0N	M 0N	M 0N
	pH 8,02 OD 6,33 Cond 168,14 Dur 51	pH 7,571 OD 7,19 Cond 169,21 Dur 57	pH 8,01 OD 7,21 Cond 161,01 Dur 55	pH 8,01 OD 6,03 Cond 198,6 Dur 55	pH 8,03 OD 7,54 Cond 198,26 Dur 54	pH 8,04 OD 6,12 Cond 198,75 Dur 55	pH 8,23 OD 6,01 Cond 191,6 Dur 55

Ensaio agudo I

Montagem: 13/03/2015 Dur: 45 pH: 8,215 Cond: 170,90 OD: 6,45

Desmontagem: 16/03/2015 Dur: 45 pH: 8,32 Cond: 161,44 OD:5,55

	Controle	Acetona	0,88µg/L	1,3µg/L	2,0µg/L	3,0µg/L	4,5µg/L
01	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 3N	V 0N	M 0N
02	V 0N	V 3N	V 0N	V 0N	V 0N	V 2N	M 0N
03	V 0N	V 2N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	M 0N
04	V 0N	V 2N	V 0N	V 0N	V 0N	V 2N	M 0N
05	V 2N	V 2N	V 0N	V 1N	V 0N	V 3N	M 0N
06	V 0N	V 3N	V 0N	V 0N	V 1N	V 0N	V 0N
07	M 0N	V 3N	V 0N	V 1N	V 0N	V 0N	M 0N
08	V 0N	V 3N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	M 0N
09	V 0N	V 2N	V 0N	M 0N	V 0N	V 0N	M 0N
10	V 0N	V 4N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	M 0N
	pH 8,039 OD 6,11 Cond 166,44 Dur 52	pH 7,674 OD 7,29 Cond 168,36 Dur 58	pH 8,106 OD 7,40 Cond 161,16 Dur 55	pH 8,437 OD 6,36 Cond 200,6 Dur 61	pH 8,240 OD 7,79 Cond 199,26 Dur 61	pH 8,743 OD 6,91 Cond 103,75 Dur 60	pH 8,529 OD 6,76 Cond 195,6 Dur 62

Ensaio agudo II

Montagem: 10/04/2015 Dureza: 44 pH: 8,222 Cond: 160,69 OD:5,28
Desmontagem: 13/04/2015 Dureza: 45 pH: 8,17 Cond: 161,44 OD: 5,04

	Controle	Acetona	0,88µg/L	1,3µg/L	2,0µg/L	3,0µg/L	4,5µg/L
01	V 0N	V 0N	M 0N	V 0N	V 0N	V 0N	M 0N
02	V 0N	V 0N	V 0N	V 1N	V 0N	V 0N	M 0N
03	M 0N	V 0N	V 0N	V 0N	M 0N	V 0N	M 0N
04	V 0N	V 0N	V 0N	V 2N	V 0N	M 0N	M 0N
05	V 2N	V 0N	M 0N	V 0N	M 0N	M 0N	M 0N
06	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	M 0N
07	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	M 0N	M 0N	M 0N
08	V 0N	V 0N	M 0N	M 0N	M 0N	M 0N	M 0N
09	V 0N	V 0N	V 0N	M 0N	V 0N	V 0N	M 0N
10	M 0N	M 0N	V 0N	V 0N	M 0N	V 0N	M 0N
	pH 8,571 OD 7,33 Cond204,3 Dur 46	pH 8,199 OD 6,77 Cond205,7 Dur 48	pH 7,969 OD 7,32 Cond201,8 Dur 55	pH 7,840 OD 7,89 Cond207,3 Dur 54	pH 7,810 OD 8,01 Cond207,0 Dur 50	pH 7,798 OD 7,98 Cond203,5 Dur 57	pH 6,57 OD 7,98 Cond201,2 Dur 65

Ensaio agudo III

Montagem: 05/06/2015 Dureza: 43 pH: 8,215 Cond: 165,82 OD: 4,68
Desmontagem: 07/06/2015 Dureza: 44 pH: 7,236 Cond: 166,88 OD: 5,08

	Controle	Acetona	0,88µg/L	1,3µg/L	2,0µg/L	3,0µg/L	4,5µg/L
01	V 0N	V 1N	V 4N	V 2N	M 0N	M 0N	M 0N
02	V 1N	V 3N	V 4N	V 1N	M 0N	M 0N	M 0N
03	V 2N	V 2N	V 3N	V 3N	M 1N	M 1N	M 0N
04	V 1N	V 3N	V 4N	V 0N	M 0N	M 0N	M 0N
05	V 0N	V 5N	V 0N	V 3N	V 0N	V 0N	M 0N
06	V 1N	V 3N	V 3N	V 2N	M 0N	M 0N	M 0N
07	V 0N	V 2N	V 4N	V 1N	M 0N	M 0N	M 0N
08	V 1N	V 2N	V 3N	V 0N	M 2N	M 0N	M 0N
09	V 2N	V 1N	V 5N	V 1N	V 0N	M 0N	M 0N
10	V 0N	V 0N	V 6N	V 3N	M 0N	M 0N	M 0N
	pH 8,440 OD 6,50 Cond 188,72 Dur 45	pH 8,522 OD 6,69 Cond 190,06 Dur 48	pH 8,576 OD 7,58 Cond 190,28 Dur 48	pH 8,499 OD 7,65 Cond 195,03 Dur 48	pH 8,471 OD 6,88 Cond 192,54 Dur 48	pH 8,411 OD 6,11 Cond 194,04 Dur 48	pH 8,82 OD 7,21 Cond 194,08 Dur 48

Anexo II - Testes de toxicidade Crônica com *C. dubia*

*V=vivo/M=morto/N=neonato

Ensaio Crônico (Preliminar)

Montagem: 06/ 09/ 15 Dureza: 44 pH: 8,501 Cond: 171,03 OD: 6,03
1ª Troca 09/ 09/ 15 Dureza: 44 pH: 8,156 Cond: 170,38 OD: 5,46

	Controle	Acetona	0,13µg/L	0,19µg/L	0,29µg/L	0,44µg/L	0,65µg/L
01	V 5N	V 4N	V 4N	V 4N	V 4N	V 4N	V 4N
02	V 1N	V 4N	V 3N	V 2N	V 4N	V 4N	V 3N
03	V 6N	V 4N	V 5N	V 5N	V 3N	V 2N	V 0N
04	V 3N	V 6N	V 5N	V 5N	V 9N	V 1N	V 5N
05	V 4N	V 3N	V 6N	V 5N	V 3N	V 4N	V 3N
06	V 3N	V 3N	V 5N	V 4N	V 3N	V 4N	V 4N
07	V 4N	V 4N	V 3N	V 4N	V 4N	V 3N	V 5N
08	V 4N	V 3N	V 1N	V 7N	V 4N	V 3N	V 0N
09	V 3N	V 2N	V 4N	V 1N	V 4N	V 4N	V 3N
10	V 5N	V 5N	V 5N	V 3N	V 2N	V 3N	V 3N
	pH 8,443 OD 6,38 Cond 173,2 Dur 48	pH 8,723 OD 6,22 Cond 184,2 Dureza 46	pH 8,517 OD 6,18 Cond 183,6 Dur 46	pH 8,572 OD 6,64 Cond 191,5 Dur 48	pH 8,612 OD 6,61 Cond 182,1 Dur 47	pH 8,675 OD 7,32 Cond 182,1 Dur 47	Ph 8,745 OD 7,11 Cond 182,3 Dur 47

2ª Troca 12/ 09 15 Dureza: 44 pH: 8,303 Cond: 167,49 OD: 6,49

	Controle	Acetona	0,12µg/L	0,18µg/L	0,27µg/L	0,41µg/L	0,61µg/L
01	V 5N	V 5N	V 0N	V 6N	V 1N	V 2N	V 0N
02	V 4N	V 11N	V 2N	V 3N	V 2N	M 2N	V 1N
03	V 5N	V 2N	M 2N	V 6N	V 6N	V 0N	V 2N
04	V 1N	V 12N	M 0N	V 2N	V 0N	V 8N	M 0N
05	V 7N	V 4N	V 10N	M 2N	V 3N	V 0N	V 8N
06	V 8N	V 8N	V 6N	V 6N	M 0N	V 9N	V 0N
07	V 8N	V 5N	V 3N	V 3N	V 0N	V 8N	V 5N
08	V 2N	V 3N	V 0N	V 1N	M 0N	V 1N	V 0N
09	V 6N	V 10N	V 3N	V 2N	V 0N	V 4N	M 0N
10	V 3N	V 13N	V 10N	V 4N	V 0N	V 7N	V 0N
	pH 8,856 OD 7,87 Cond 201,6 Dur 55	pH 8,763 OD 8,22 Cond 181,0 Dur 50	pH 8,776 OD 6,94 Cond 205,2 Dur 55	pH 8,793 OD 8,96 Cond:200,9 Dureza:55	pH: 8,835 OD 8,75 Cond 209,2 Dur 55	pH 8,749 OD 8,98 Cond 183,4 Dur 52	pH 8,675 OD 6,94 Cond 182,2 Dur 52

Desmontagem 13/ 09/ 15

	Controle	Acetona	0,12µg/L	0,18µg/L	0,27µg/L	0,41µg/L	0,61µg/L
01	M 0N	V 10N	V 9N	V 6N	M 3N	V 9N	V 10N
02	V 0N	V 2N	V 12N	V 7N	V 1N	M 0N	V 7N
03	V 4N	V 6N	M 0N	V 4N	V 7N	V 0N	M 3N
04	V 7N	V 17N	M 0N	V 7N	V 8N	V 7N	V 0N
05	V 7N	M 7N	V 8N	M 0N	V 2N	V 8N	V 7N
06	V 11N	V 12N	V 7N	V 10N	M 0N	V 8N	V 6N
07	V 9N	V 8N	V 9N	V 7N	V 2N	V 9N	V 7N
08	V 2N	V 7N	V 6N	V 7N	M 0N	V 9N	V 0N
09	V 7N	V 9N	V 7N	V 7N	V 6N	V 5N	M 0N
10	V 5N	V 8N	V 11N	V 8N	V 11N	V 7N	V 5N
	pH 8,807 OD 8,75 Cond 169,3 Dur 47	pH 8,489 OD 8,30 Cond 171,5 Dur 44	pH 8,463 OD 8,73 Cond 184,1 Dur 47	pH 8,521 OD 8,60 Cond 183,8 Dur 46	pH 8,543 OD 6,91 Cond 183,2 Dur 45	pH 8,487 OD 6,83 Cond 176,0 Dureza 45	pH 8,442 OD 8,93 Cond 175,6 Dur 44

Ensaio Crônico I

Montagem: 11 /10 /2015 Dureza: 44 pH: 8,468 Cond: 179,91 OD: 6,55
 1ª Troca 14 /10 /2015 Dureza: 44 pH: 8,561 Cond: 168,31 OD: 5,67

	Controle	Acetona	0,25µg/L	0,37µg/L	0,56µg/L	0,84µg/L	1,26µg/L
01	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N
02	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N
03	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N
04	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N
05	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N
06	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N
07	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N
08	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N
09	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N
10	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N
	pH 8,78 OD 7,99 Cond 201,6 Dur 55	pH 8,66 OD 7,52 Cond 198 Dur 55	pH 7,54 OD 6,54 Cond 202 Dur 51	pH 8,22 OD 7,91 Cond 201,1 Dur 53	pH 8,04 OD 7,65 Cond 198,2 Dur 55	pH 8,12 OD 7,95 Cond 180,4 Dur 54	pH 8,33 OD 6,44 Cond 179,2 Dur 54

2ª Troca 17/ 10/ 2015 Dureza: 44 pH: 8,32 Cond: 172,44 OD: 5,81

	Controle	Acetona	0,25µg/L	0,37µg/L	0,56µg/L	0,84µg/L	1,26µg/L
01	V 10N	V 14N	V 14N	V 8N	V 5N	V 6N	V 1N
02	V 2N	V 6N	V 10N	V 9N	V 6N	V 9N	V 5N
03	V 11N	V 7N	V 8N	V 7N	V 4N	V 7N	V 4N
04	V 10N	V 8N	V 11N	V 10N	V 5N	V 6N	V 4N
05	V 8N	V 4N	V 8N	V 10N	V 8N	V 10N	V 2N
06	V 11N	V 10N	V 6N	V 6N	V 10N	V 0N	V 2N
07	V 15N	V 12N	V 8N	V 7N	V 8N	V 9N	V 9N
08	V 13N	V 10N	V 11N	V 7N	V 5N	V 8N	V 6N
09	V 13N	V 8N	V 8N	V 7N	V 1N	V 6N	V 6N
10	V 0N	V 10N	V 10N	V 1N	V 6N	V 4N	V 2N
	pH 8,04 OD 7,99 Cond 202 Dur 51	pH 8,88 OD 7,92 Cond 185 Dur 52	pH 7,58 OD 6,84 Cond 201 Dur 55	pH 8,21 OD 7,99 Cond 201,1 Dur 54	pH 8,82 OD 7,25 Cond 200,1 Dur 56	pH 8,71 OD 7,28 Cond 198,4 Dur 53	pH 8,67 OD 6,74 Cond 188,2 Dur 51

Desmontagem 18 / 10 / 2015

	Controle	Acetona	0,25µg/L	0,37µg/L	0,56µg/L	0,84µg/L	1,26µg/L
01	V 9N	V 1N	V 10N	V 5N	V 6N	V 8N	V 4N
02	V 7N	V 6N	V 8N	V 0N	V 6N	V 0N	V 6N
03	M 10N	V 8N	V 7N	V 4N	V 7N	V 7N	M 3N
04	V 10N	V 9N	V 6N	V 10N	V 6N	V 7N	V 6N
05	V 8N	V 7N	V 10N	V 9N	V 7N	V 6N	V 0N
06	V 10N	V 10N	V 8N	V 6N	V 9N	V 0N	V 4N
07	V 10N	V 9N	V 9N	V 6N	V 7N	V 9N	V 9N
08	V 10N	V 7N	V 7N	V 9N	V 7N	V 8N	V 8N
09	V 10N	V 4N	V 6N	V 6N	V 7N	M 1N	V 4N
10	V 3N	M 0N	V 12N	V 3N	V 7N	V 5N	V 2N
	pH 8,89 OD 7,69 Cond 200,1 Dur 56	pH 8,65 OD 7,12 Cond 193,1 Dureza 55	pH 7,21 OD 6,64 Cond 202,2 Dur 53	pH 8,54 OD 7,86 Cond 206,1 Dur 55	pH 8,23 OD 7,85 Cond 202,1 Dur 55	pH 8,11 OD 7,88 Cond 183,2 Dur 56	pH 8,25 OD 6,84 Cond 188,3 Dur 55

Ensaio Crônico II

Montagem: 22 /10 /2015 Dureza: 45 pH: 8,468 Cond: 180,91 OD: 6,67
 1ª Troca 25 /10 /2015 Dureza: 44 pH: 8,561 Cond: 166,51 OD: 5,47

	Controle	Acetona	0,25µg/L	0,37µg/L	0,56µg/L	0,84µg/L	1,26µg/L
01	V 0N	V 1N	V 0N	V 1N	V 3N	V 0N	V 1N
02	V 2N	V 2N	V 2N	V 3N	V 2N	V 0N	V 0N
03	V 2N	V 2N	V 0N	V 2N	V 3N	V 1N	V 0N
04	V 0N	V 1N	V 1N	V 2N	V 2N	V 0N	V 0N
05	V 1N	V 1N	V 1N	V 4N	V 1N	V 0N	V 1N
06	V 0N	V 3N	V 2N	V 2N	V 0N	V 2N	V 0N
07	V 1N	V 2N	V 4N	V 4N	V 3N	V 0N	V 0N
08	V 3N	V 3N	V 3N	V 3N	V 1N	V 2N	V 0N
09	V 2N	V 1N	V 4N	V 4N	V 1N	V 0N	V 0N
10	V 2N	V 1N	V 3N	V 3N	V 4N	V 0N	V 0N
	pH 8,66 OD 7,69 Cond 200,6 Dur 54	pH 8,67 OD 7,32 Cond 199 Dur 55	pH 7,55 OD 7,51 Cond 200,1 Dur 52	pH 8,33 OD 7,84 Cond 191,3 Dur 53	pH 8,05 OD 7,75 Cond 188,2 Dur 54	pH 8,52 OD 7,32 Cond 173,4 Dur 54	pH 8,63 OD 6,74 Cond 171,3 Dur 54

2ª Troca 28/ 10/ 2015 Dureza: 44 pH: 8,11 Cond: 168,34 OD: 5,69

	Controle	Acetona	0,25µg/L	0,37µg/L	0,56µg/L	0,84µg/L	1,26µg/L
01	V 0N	V 4N	V 5N	V 7N	V 6N	V 8N	V 5N
02	V 4N	V 3N	V 6N	V 5N	V 4N	V 4N	V 3N
03	V 5N	V 6N	V 5N	V 5N	V 5N	V 5N	V 2N
04	V 2N	V 6N	V 6N	V 6N	V 3N	V 7N	V 3N
05	V 4N	V 2N	V 5N	V 5N	V 7N	V 4N	V 5N
06	V 0N	V 6N	V 5N	V 5N	V 9N	V 9N	V 4N
07	V 8N	V 9N	V 6N	V 6N	V 4N	V 3N	V 4N
08	V 5N	V 8N	V 9N	V 5N	V 9N	V 3N	V 5N
09	V 3N	V 7N	V 8N	V 7N	V 7N	V 3N	V 7N
10	V 5N	V 5N	V 8N	V 6N	V 0N	V 4N	V 6N
	pH 8,01 OD 7,61 Cond 199,2 Dur 52	pH 8,48 OD 7,45 Cond 191 Dur 52	pH 7,66 OD 6,01 Cond 200 Dur 55	pH 8,44 OD 7,83 Cond 201,2 Dur 55	pH 8,31 OD 7,21 Cond 199,1 Dur 56	pH 8,56 OD 7,01 Cond 185,4 Dur 54	pH 8,65 OD 6,04 Cond 196,1 Dur 52

Desmontagem 29 / 10 / 2015

	Controle	Acetona	0,25µg/L	0,37µg/L	0,56µg/L	0,84µg/L	1,26µg/L
01	M 0N	V 6N	V 6N	V 10N	M 0N	V 10N	V 5N
02	V 10N	V 6N	V 6N	V 7N	V 2N	V 6N	V 6N
03	V 8N	V 7N	V 5N	V 3N	V 8N	V 11N	V 7N
04	V 4N	V 10N	V 9N	V 9N	V 7N	V 7N	V 5N
05	V 10N	V 8N	V 8N	V 7N	V 8N	V 6N	V 7N
06	V 0N	V 10N	V 7N	V 6N	V 10N	V 9N	V 5N
07	V 12N	V 7N	V 9N	V 7N	V 6N	V 4N	V 6N
08	V 10N	V 12N	V 10N	V 5N	V 11N	M 0N	V 8N
09	V 12N	V 7N	V 8N	V 6N	V 5N	V 5N	V 10N
10	V 8N	V 5N	V 8N	V 7N	V 10N	V 7N	V 6N
	pH 8,02 OD 7,01 Cond 199,1 Dur 55	pH 8,65 OD 6,98 Cond 195,1 Dureza 55	pH 7,01 OD 6,94 Cond 201,2 Dur 54	pH 8,94 OD 7,99 Cond 203,1 Dur 55	pH 8,93 OD 7,31 Cond 201,1 Dur 55	pH 8,44 OD 7,98 Cond 191,2 Dur 56	pH 8,33 OD 6,76 Cond 198,3 Dur 56

Ensaio Crônico III

Montagem: 22/11/2015 Dureza: 43 pH: 8,76 Cond: 178,4 OD: 7,55
 1ª Troca 25/11/2015 Dureza: 45 pH: 8,67 Cond: 178,31 OD: 6,67

	Controle	Acetona	0,25µg/L	0,37µg/L	0,56µg/L	0,84µg/L	1,26µg/L
01	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N
02	V 0N	V 0N	V 0N	V 4N	V 0N	V 2N	V 5N
03	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 5N	V 2N	V 0N
04	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 4N	V 3N
05	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 3N
06	V 3N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N
07	V 0N	V 0N	V 3N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N
08	V 0N	V 0N	V 4N	V 5N	V 0N	V 0N	V 4N
09	V 4N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 0N	V 3N
10	V 0N	V 0N	V 0N	V 4N	V 0N	V 0N	V 4N
	pH 8,58 OD 7,32 Cond 202,6 Dur 54	pH 8,66 OD 7,12 Cond 198,2 Dur 55	pH 7,54 OD 6,84 Cond 200,1 Dur 55	pH 8,22 OD 7,81 Cond 200,1 Dur 56	pH 8,04 OD 7,34 Cond 199,2 Dur 52	pH 8,12 OD 7,65 Cond 199,0 Dur 54	pH 8,33 OD 6,32 Cond 192 Dur 56

2ª Troca 28/11/ 2015 Dureza: 46 pH: 8,42 Cond: 197,31 OD: 6,91

	Controle	Acetona	0,25µg/L	0,37µg/L	0,56µg/L	0,84µg/L	1,26µg/L
01	V 10N	V 15N	V 9N	V 7N	V 3N	V 6N	V 6N
02	V 10N	V 11N	V 12N	V 9N	V 8N	V 4N	V 1N
03	V 15N	V 12N	V 16N	V 9N	V 3N	V 6N	V 10N
04	V 18N	V 14N	V 11N	V 13N	V 12N	V 6N	V 8N
05	V 14N	V 13N	V 15N	V 5N	V 8N	V 9N	V 6N
06	V 7N	V 11N	V 7N	V 7N	V 3N	V 3N	V 7N
07	V 14N	V 17N	V 13N	V 10N	V 7N	V 7N	V 3N
08	V 14N	V 18N	V 12N	V 4N	V 5N	V 7N	V 10N
09	V 6N	V 16N	V 14N	V 2N	V 6N	V 7N	V 2N
10	V 13N	V 8N	V 14N	V 4N	V 8N	V 5N	V 1N
	pH 8,12 OD 7,89 Cond 198,1 Dur 56	pH 7,98 OD 7,01 Cond 198,2 Dureza 53	pH 7,88 OD 7,84 Cond 203 Dur 55	pH 8,31 OD 7,69 Cond 201,1 Dur 54	pH 8,67 OD 7,87 Cond 198,7 Dur 55	pH 8,56 OD 7,88 Cond 197,2 Dur 53	pH 8,97 OD 6,56 Cond 189,2 Dur 54

Desmontagem 29/11/2015

	Controle	Acetona	0,25µg/L	0,37µg/L	0,56µg/L	0,84µg/L	1,26µg/L
01	V 0N	V 7N	V 6N	V 5N	M 2N	V 4N	M 3N
02	V 0N	V 4N	V 7N	V 0N	V 0N	V 5N	M 1N
03	V 7N	V 3N	V 8N	V 0N	V 4N	V 4N	V 4N
04	V 9N	V 7N	V 0N	V 5N	V 6N	V 6N	V 0N
05	V 8N	V 0N	V 6N	V 2N	V 0N	V 0N	V 6N
06	V 5N	V 3N	M 0N	V 0N	V 0N	V 5N	V 0N
07	V 5N	V 0N	V 0N	V 6N	V 2N	V 0N	M 0N
08	V 6N	V 4N	V 5N	V 3N	V 0N	V 0N	V 0N
09	V 7N	V 0N	V 1N	M 0N	V 0N	V 2N	V 3N
10	V 2N	V 3N	V 6N	V 7N	V 0N	M 0N	V 0N
	pH 8,99 OD 7,59 Cond 200,1 Dur 56	pH 8,15 OD 8,12 Cond 193,2 Dur 55	pH 8,02 OD 7,64 Cond 202,1 Dur 53	pH 7,21 OD 7,11 Cond 209,1 Dur 55	pH 7,23 OD 7,15 Cond 202,1 Dur 55	pH 8,23 OD 7,11 Cond 183,5 Dur 56	pH 8,01 OD 6,74 Cond 188 Dur 55

Anexo III - Teste de Sensibilidade *Ceriodaphnia dubia*

Este teste avalia a inibição da capacidade reprodutiva através da CE50 (concentração inibitória a 50% da população exposta). Para cada concentração e para o controle (contendo somente água de diluição, a qual avalia as condições do ensaio). Prepara-se 10 réplicas contendo 1 organismo de 6 a 24h de idade. Conforme o quadro a seguir.

Soluções/Concentrações	Nº de réplicas
Controle	10
0,30g/L de NaCl	10
0,45g/L de NaCl	10
0,67g/L de NaCl	10
1,0g/L de NaCl	10
1,5g/L de NaCl	10

Os organismos são inseridos na montagem dos ensaios, com duração de 7 dias e, se necessário, 8 a 10 dias, caso não tenha atingido o número mínimo de neonatos (15 neonatos) em 6 réplicas no mínimo, para a validação do ensaio. Momento em que ocorre a desmontagem do ensaio.

A troca da água da cultura ocorre 2 vezes no decorrer do ensaio, ocasião em que é doado o alimento composto. A suspensão algácea é administrada à cultura, diariamente, na proporção de 0,02 mL por organismo.

Anexo IV - Resultados dos Testes de Sensibilidade com *Ceriodaphnia dubia*

DEZEMBRO DE 2014

Tratamento	Mortalidade (%)	Média pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD (mgL ⁻¹)	Dureza (mg de CaCO ₃ L ⁻¹)
Controle	10	8,2±0,3	166,5±15,1	-	46±1
0,3	60	8,2±0,3	871,1±66,6	-	47±0
0,45	80	8,2±0,3	1.085,4±13,2	-	47±2
0,67	90	8,1±0,3	1.539,7±50,8	-	47±0
1	90	8,0±0,3	2.174,3±115,4	-	47±1
1,5	90	8,1±0,3	3.471±308,2	-	45±1

JANEIRO DE 2015

Tratamento	Mortalidade (%)	Média pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD (mgL ⁻¹)	Dureza (mg de CaCO ₃ L ⁻¹)
Controle	0	8,4±0,3	160,0±14,1	-	45±5
0,3	10	8,1±0,2	735,6±25,1	-	44±1
0,45	20	7,4±1,6	1.018,3±29,7	-	44±1
0,67	70	8,2±0,3	1.440±42	-	44±0
1	60	8,1±0,1	2.195,6±195,7	-	43±1
1,5	60	8,1±0,2	3.017,1±214,7	-	43±1

FEVEREIRO DE 2015

Tratamento	Mortalidade (%)	Média pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD (mgL ⁻¹)	Dureza (mg de CaCO ₃ L ⁻¹)
Controle	0	7,9±0,2	164,9±4,9	3,6±0,5	46±2
0,3	10	7,8±0,1	770,8±50,5	3,7±0,5	45±2
0,45	10	7,6±0,0	955,9±33,2	5,2±1,1	44±1
0,67	10	7,6±0,2	1.398,8±7,3	5,4±0,9	44±1
1	0	7,7±0,2	2.035,7±38,2	5,5±0,4	42±1
1,5	80	7,7±0,0	3.201,5±578,7	5,1±0,5	39±3

MARÇO DE 2015

Tratamento	Mortalidade (%)	Média pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD (mgL ⁻¹)	Dureza (mg de CaCO ₃ L ⁻¹)
Controle	0	8,1±0,1	211,7±57,2	8,6±0,0	48±2
0,3	0	8,1±0,0	819±53,9	8,6±0,0	45±4
0,45	10	8,0±0,1	1.086,6±98,7	8,3±0,0	47±4
0,67	50	8,0±0,0	1.542,3±132,9	8,3±0,0	46±4
1	50	7,9±0,1	2.542,0±485,5	8,6±0,0	46±5
1,5	100	7,7±0,1	3.440,0±91,0	8,2±0,0	44±2

ABRIL DE 2015

Tratamento	Mortalidade (%)	Média pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD (mgL ⁻¹)	Dureza (mg de CaCO ₃ L ⁻¹)
Controle	0	8,2±0,0	156,4±42,4	-	47±4
0,3	0	7,9±0,1	801,4±30,9	-	47±4
0,45	10	7,9±0,1	1.028,4±39,6	-	48±5
0,67	40	7,7±0,1	1.434,5±91,3	-	47±4
1	100	7,8±0,1	1.841±0,0	-	48±5
1,5	100	7,5±0,0	3.671±0,0	-	48±5

MAIO DE 2015

Tratamento	Mortalidade (%)	Média pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD (mgL ⁻¹)	Dureza (mg de CaCO ₃ L ⁻¹)
Controle	0	8,2±0,1	206,4±6,3	7,2±0,0	46±1
0,3	20	7,9±0,0	867,5±5,6	8,1±0,0	45±2
0,45	30	7,6±0,2	1.091,8±7,5	8,4±0,0	41±1
0,67	20	7,9±0,1	1.524,8±32,6	8,7±0,0	44±1
1	0	7,9±0,0	2.259,0±42,0	8,5±0,0	45±0
1,5	80	7,9±0,0	2.179,0±50,0	8,2±0,0	44±1

JUNHO DE 2015

Tratamento	Mortalidade (%)	Média pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD (mgL ⁻¹)	Dureza (mg de CaCO ₃ L ⁻¹)
Controle	0	7,7±0,2	164,9±29,8	6,1±0,7	45±2
0,3	40	7,7±0,3	882,1±57,1	5,2±0,8	44±1
0,45	40	7,6±0,3	1.131,9±184,6	5,8±1,1	44±1
0,67	0	7,6±0,4	1.456,9±34,7	8,7±2,9	44±1
1	40	7,5±0,4	2.124,7±105,5	6,5±0,3	43±1
1,5	100	7,5±0,3	2.888,0±658,0	7,9±2,3	42±2

JULHO DE 2015

Tratamento	Mortalidade (%)	Média pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD (mgL ⁻¹)	Dureza (mg de CaCO ₃ L ⁻¹)
Controle	0	7,2±0,2	114,9±22,2	6,5±0,5	45±2
0,3	0	7,2±0,3	772,1±52,4	5,9±0,9	44±1
0,45	40	7,7±0,3	1.221,9±143,1	5,6±1,1	44±1
0,67	0	7,5±0,4	1.457,9±32,1	7,7±2,5	44±1
1	0	7,5±0,2	2.654,7±102,1	6,8±0,3	43±1
1,5	80	7,2±0,1	2.852,3±302,0	7,4±2,2	46±1

AGOSTO DE 2015

Tratamento	Mortalidade (%)	Média pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD (mgL ⁻¹)	Dureza (mg de CaCO ₃ L ⁻¹)
Controle	30	8,3±0,1	194,4±101	-	46±1
0,3	40	8,1±0,1	758±49,0	-	45±2
0,45	60	8,1±0,2	1.042,0±93,1	-	46±2
0,67	50	8,1±0,2	1.496,6±175,3	-	45±2
1	60	8,0±0,1	1.951,9±31,4	-	44±2
1,5	80	8,1±0,3	3.136±515,0	-	44±3

SETEMBRO DE 2015

Tratamento	Mortalidade (%)	Média pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD (mgL ⁻¹)	Dureza (mg de CaCO ₃ L ⁻¹)
Controle	10	8,1±0,1	235,4±24	8,8±2,8	54±2
0,3	10	8,1±0,1	860,1±25,3	9,3±2,1	49±2
0,45	20	7,8±0,1	1.185,5±103,5	9,0±2,5	48±1
0,67	0	7,6±0,1	1.608,7±36,9	8,7±2,9	48±1
1	20	7,9±0,1	2.263,7±57,8	8,8±2,5	46±2
1,5	100	8,0±0,0	3.414±0,0	4,4±0,0	47±0

OUTUBRO DE 2015

Tratamento	Mortalidade (%)	Média pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD (mgL ⁻¹)	Dureza (mg de CaCO ₃ L ⁻¹)
Controle	30	8,4±0,1	244,4±14	7,8±2,8	54±2
0,3	30	8,1±0,1	832,1±21,3	8,2±2,1	49±2
0,45	40	7,9±0,1	1.323,5±102,5	8,0±2,5	48±1
0,67	46	7,1±0,1	1.545,7±32,9	8,8±2,9	48±1
1	80	8,0±0,1	2.546,7±54,8	8,6±2,5	46±2
1,5	100	8,1±0,0	3.214±0,1	5,4±0,0	47±0

NOVEMBRO DE 2015

Tratamento	Mortalidade (%)	Média pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$)	OD (mgL-1)	Dureza (mg de $\text{CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$)
Controle	10	8,3 $\pm$ 0,1	194,4 $\pm$ 101	-	45 $\pm$ 1
0,3	10	8,1 $\pm$ 0,1	758 $\pm$ 49,0	-	45 $\pm$ 2
0,45	20	8,1 $\pm$ 0,2	1.042,0 $\pm$ 93,1	-	45 $\pm$ 2
0,67	0	8,1 $\pm$ 0,2	1.496,6 $\pm$ 175,3	-	46 $\pm$ 2
1	30	8,0 $\pm$ 0,1	1.951,9 $\pm$ 31,4	-	46 $\pm$ 2
1,5	80	8,1 $\pm$ 0,3	3.136 $\pm$ 515,0	-	44 $\pm$ 3

Anexo V - Carta-Controle

Por meio dos testes de Sensibilidade com *C. dubia* determinou-se a CE50 dos testes conforme o método Trimmed Spearman-Kärber de acordo com Hamilton (1977), os valores estabelecidos podem ser visualizados na tabela 10 abaixo:

Tabela 11. Valores de CE50 estabelecidos por meio dos Testes de Sensibilidade com *C. dubia*.

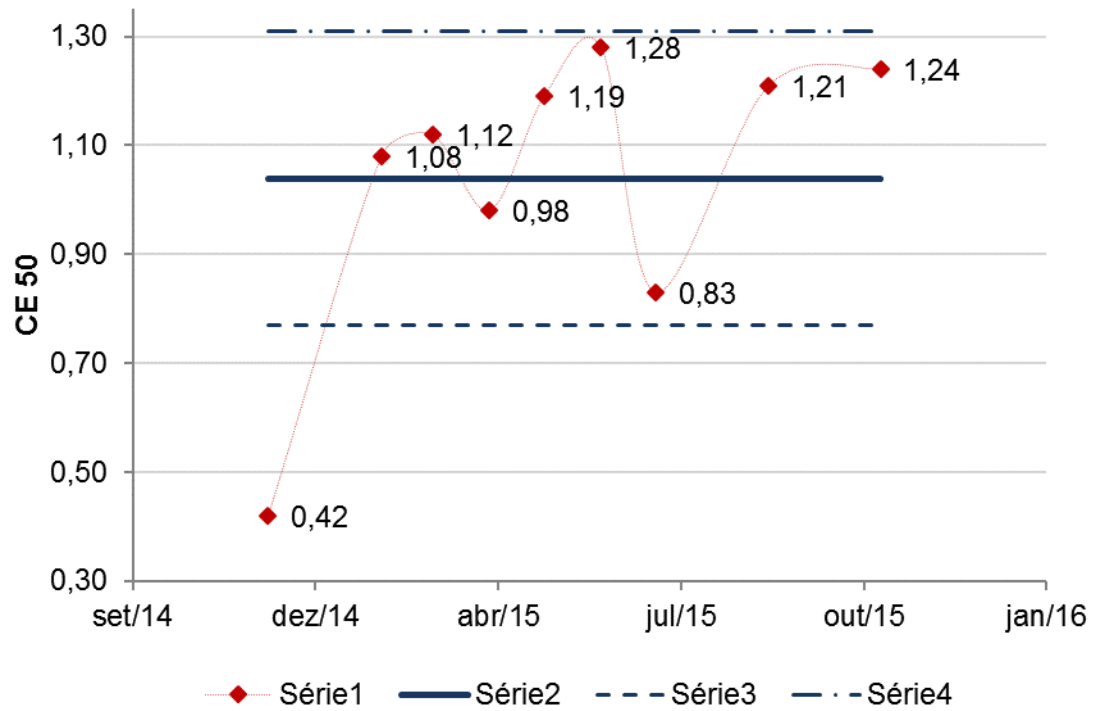
DATA DO TESTE	CE50 (g/ L)	LIMITE INFERIOR (g/L)	LIMITE SUPERIOR (g/L)
DEZEMBRO DE 2014	0,42	0,35	0,65
JANEIRO DE 2015	-	-	-
FEVEREIRO DE 2015	1,08	0,81	1,33
MARÇO DE 2015	1,12	0,55	2,09
ABRIL DE 2015	0,98	0,58	0,78
MAIO DE 2015	1,19	1,10	1,38
JUNHO DE 2015	1,28	1,16	1,39
JULHO DE 2015	0,83	0,65	0,96
AGOSTO DE 2015	-	-	-
SETEMBRO DE 2015	1,21	1,08	1,27
OUTUBRO DE 2015	-	-	-
NOVEMBRO DE 2015	1,24	1,07	1,4

Fonte: Nogueira, 2016.

A carta-controle referente ao ano de 2015 foi elaborada a partir dos valores de CE50 citados acima na tabela 10.

Os valores de CE50 referentes aos meses de janeiro, agosto e outubro de 2015, não foram considerados na Carta Controle, pois não apresentaram requisitos suficientes para geração do valor de CE50 (CARVALHO, 2016), porém podem ser demonstrados no Anexo II do presente estudo.

Figura 15. Controle de sensibilidade das culturas de *Ceriodaphnia dubia* utilizando a substância de referência cloreto de sódio. Média acumulada (média das CE50 obtidas mensalmente) = 1,04 g/L; Limite superior = 1,31 g/L; Limite inferior = 0,77 g/L.



Fonte: Nogueira, 2016.

Anexo VI - Procedimento Operacional Padrão (POP) para o cultivo da *Ceriodaphnia dubia* no Lathis.

Preparo de água reconstituída:

1 - Limpeza do aquário (a cada renovação de água)

Lavar os aquários com detergente apropriado (Extran) e enxaguar com água da torneira, sendo o último enxague com água deionizada. Quando estiver com água, manter o aquário sempre tampado e com bomba de aeração.

2 - Medição da dureza

Para medir a dureza da água reconstituída, utiliza-se alguns materiais, como:

- Proveta de 100 mL;
- Béquer de plástico;
- Bureta e suporte.
- Negro de Eriocromo;
- Pipeta de 2 mL;
- NH_4Cl (Cloreto de amônio, na geladeira);
- Solução de EDTA (na geladeira);
- Erlenmeyer de 250 mL;
- Espátula de metal;

Colocar 100mL de água do cultivo no erlenmeyer, adicionar 1,5 mL de solução de NH_4Cl e acrescentar o eriocromo para que atinja um tom rosa claro. Completar a bureta com solução de EDTA. Por último, fazer a titulação até que atinja a nova cor azul dimetileno.

Obs: A dureza deve estar entre 40 e 48 mg CaCO_3/L .

- **Ajuste de dureza < 40 mg CaCO₃/L**

São necessários os seguintes materiais:

- Solução 1;
- Solução 2;
- Régua ou fita métrica;
- Calculadora;
- Proveta de 100 mL.

O resultado da dureza dá-se, subtraindo-se o valor encontrado, de 44 (dureza ideal), multiplicado por 0,5 e pelo volume total de água do aquário. O valor encontrado corresponde a quantidade em mL de Solução 1 a ser adicionada no aquário. Em seguida, divide-se por 2 o valor desta solução e será o total administrado da Solução 2.

- **Ajuste da dureza < 50 mg CaCO₃/L**

Para o cálculo da dureza elevada utiliza-se a seguinte equação:

$$C^1V^1 = C^2V^2$$

Onde:

C^1 = concentração atual da dureza acima de 50;

V^1 = volume de água no aquário;

C^2 = dureza ideal (44);

V^2 = volume esperado para aquário no valor 44 (ideal)

Obs: Ao final, para ajustar, o volume de água a ser da torneira a ser adicionada ao aquário corresponde a $V^2 - V^1$.

3 - Preparo do EDTA

Em balança analítica mede-se 3,723g de EDTA e coloca-se em 1L de água destilada, em balão volumétrico de 1L. Agita-se até que a solução fique homogênea e depois acondicionada em frasco âmbar. Armazenar em geladeira à temperatura entre 4 a 10°C.

4 - Preparo NH_4Cl

Na capela, pesar 16,9g de NH_4Cl (cloreto de amônio) em balança analítica; dissolver o NH_4Cl em 143 mL de NH_4OH (hidróxido de amônio)

5 - SOLUÇÃO 1

Pesar 3g de Sulfato de Cálcio Dihidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e completar um balão volumétrico de 2L com água destilada. Acrescentar uma pulga magnética e colocar o balão em agitação e brando aquecimento brando por 24h para solubilização. Armazenar em frasco âmbar em temperatura ambiente.

6 - SOLUÇÃO 2

Adicionar a um balão volumétrico de 2L, 0,4g de KCl (Cloreto de Potássio); 9,6g de NaHCO_3 (bicarbonato de sódio); 12,2g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sulfato de Magnésio Heptahidratado). Completar o volume até o menisco de 2L com água destilada. Agitar bem e armazenar em frasco âmbar. Manter sob refrigeração entre 4 e 10°C.

7 - PREPARAÇÃO DO ALIMENTO COMPOSTO PARA *CERIODAPHNIA DUBIA*.

Para o preparo do alimento composto, coloca-se 5 g de ração para peixe em 1mL de água processada, adaptando sistema de aeração para que a ração permaneça em suspensão por uma semana.

Após esse período, filtrar e acondicionar em pequenos compartimentos na geladeira à temperatura entre 4 a 10°C, para ser utilizado posteriormente, somente no momento do preparo. Deverá apresentar um teor de sólidos totais de 2,5 g/L e 3,1 g/L, condição suficiente para oferecer 0,02 mL por organismo.

Os cubos devem ser descongelados e filtrados. A solução consiste na mistura de partes iguais da ração de peixe (processada) e do fermento biológico, previamente diluído (0,50 mg em 50 mL de água deionizada).

O alimento pronto deve ser acondicionado em recipientes tampados e levados à geladeira em temperatura entre 4 a 10°C. Podem ser conservados e utilizados em até 7 dias.

Anexo VII - Preparo de MEIO OLIGO

Tabela 12. Soluções para preparo do meio de cultura L.C. Oligo:

Solução	Reagentes	Quantidade mg	Preparo
1	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4 000	Dissolver e completar para 100 mL com água processada
2	KNO_3	10 000	Dissolver e completar para 100 mL com água processada
3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3 000	Dissolver e completar para 100 mL com água processada
4	K_2HPO_4	4 000	Dissolver e completar para 100 mL com água processada
5	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	30	Dissolver e completar para 1 000 mL com água processada
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	60	
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	60	
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	60	
	$\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	60	
	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	60	
	H_3BO_3	60	
6	$\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1 625	Dissolver e completar para 1 000 mL com água processada
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	625	
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	625	
7	NaHCO_3	15 000	Dissolver e completar para 1 000 mL com água processada

Fonte: ABNT NBR 12.648 (2011).

Em um balão volumétrico de 1L adiciona-se 1 mL de cada uma das soluções 1, 2, 3 e 4; e 0,5 mL das soluções 5 e 6, por fim, mais 1 mL da solução 7. Completa-se o volume até 1000 mL de água deionizada. Ajusta-se o pH do meio entre 6,0 e 8,0 com ácido clorídrico (HCl) ou hidróxido de sódio (NaOH). A solução permanecerá sob agitação durante uma hora. Autoclava-se o meio por 15 min a 121 °C, após resfriamento realiza-se o repique.