



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

**“Avaliação do efeito combinado de carbofurano e temperatura para
Ceriodaphnia dubia”**

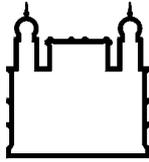
por

Tamine Martins Roldão

*Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em
Ciências na área de Saúde Pública.*

*Orientador principal: Prof. Dr. Daniel Forsin Buss
Segundo orientador: Prof. Dr. Josino Costa Moreira*

Rio de Janeiro, março de 2014.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Esta dissertação, intitulada

***“Avaliação do efeito combinado de carbofurano e temperatura para
Ceriodaphnia dubia”***

apresentada por

Tamine Martins Roldão

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Fabio Veríssimo Correia

Prof. Dr. Jaime Lopes da Mota Oliveira

Prof. Dr. Daniel Forsin Buss – Orientador principal

Catálogo na fonte
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca de Saúde Pública

R744 Roldão, Tamine Martins
Avaliação do efeito combinado de carbofurano e temperatura
para *Ceriodaphnia dubia*. / Tamine Martins Roldão. -- 2014.
60 f. : il. ; tab. ; graf.

Orientador: Buss, Daniel Forsin
Moreira, Josino Costa

Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública
Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2014.

1. Carbofurano. 2. Daphnia. 3. Toxicidade. 4.
Crustáceos. 5. *Ceriodaphnia dubia*. 6. Variação Térmica. I.
Título.

CDD - 22.ed. – 595.3

Dedico esta dissertação à minha mãe, pelo apoio e incentivo desde o início de minha formação, por ser um incrível exemplo em quem me espelhar no sonho de me tornar uma cientista. Pelas noites mal dormidas ao meu lado, enquanto me debruçava sobre o computador, só porque esta era a única forma de estarmos juntas e matarmos a enorme saudade. Por sempre me estimular, apoiar, dar suporte e estrutura para continuar trilhando o caminho que escolhi. Por se orgulhar de cada etapa conquistada. Por estar ao comigo, mesmo que distante, em todos os momentos que precisei. Por sempre ter sido mais que uma grande mãe, minha melhor amiga. Eu nada seria sem você!

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação não teria vindo à luz sem a contribuição de diversas pessoas que dedicaram precioso tempo e atenção a este trabalho. Eu não teria conseguido sem vocês!

Ao Dr. Daniel Buss por conduzir zelosa e entusiasticamente, os meus passos nesta trilha de mestranda, ensinando-me a ultrapassar barreiras, me incentivando a encarar desafios e superar angústias e ansiedades, gostaria de poder demonstrar o meu sólido apreço e admiração por ser um querido e grande chefe e orientador.

Ao Dr. Josino Moreira, por ter aberto as portas desta instituição para mim, possibilitando a ampliação dos meus conhecimentos profissionais. Obrigada também pela orientação e ajuda inestimáveis na concepção deste trabalho.

À Danielly Magalhães, amiga dedicada, paciente, generosa e crítica construtiva ao longo destes dois anos de estudo, pelo apoio em todos os momentos de minha vida profissional e pessoal. Expresso a você minha mais profunda gratidão. Aprendi e cresci muito e sempre levarei você em meu coração.

À Laura Sainz, Lia Fernandes, Natália Freitas, Priscilla Pereira e Tatiana Figueiredo, pela grande amizade e enorme apoio durante os diversos experimentos e nos momentos em que meu corpo demonstrava os efeitos das longas noites insones e por sempre trazerem alegria aos meus dias, renovando minhas energias para seguir em frente.

Aos meus queridos colegas de turma, que junto comigo passaram por todas as etapas difíceis, sempre com um sorriso carinhoso no rosto e uma grande união.

Aos meus amados amigos que compreenderam minha constante ausência, mesmo nos momentos mais difíceis de suas vidas e que precisavam mais de mim, e por terem sempre uma palavra de carinho para me incentivar e me impulsionar, nos momentos de angústia.

À meu pai por fornecer os materiais sem os quais a realização deste trabalho seria muito mais difícil.

À minha madrastra, por estar sempre ao meu lado durante todas as dificuldades e por sempre fazer o melhor possível pelo meu bem estar. Seu carinho é de valor inestimável para mim. Você é a melhor madrastra do mundo.

À Sergio Jerez e Aloisio Cordilha que sempre acreditaram em mim e se orgulharam de meus avanços profissionais.

À Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, em especial aos mestres da ENSP que com seus ensinamentos abriram um mundo de possibilidades na minha mente.

Ao Nadir Hermes e Carlos Gonçalves pela presteza e contribuições analíticas.

A todos vocês que desempenharam um papel fundamental nesta trajetória, direta ou indiretamente, os meus mais sinceros e intensos agradecimentos.

“O acaso só favorece a mente preparada”

Louis Pasteur

RESUMO

Desde 2008, o Brasil ocupa a posição de maior consumidor de agrotóxicos do mundo. Em 2001 o grupo dos agrotóxicos mais usados foi o grupo dos inseticidas. O Carbofurano é um inseticida carbamato sistêmico de amplo espectro, utilizado em todo o mundo. O Carbofurano possui meia vida no meio ambiente relativamente curta e sendo relativamente estável em condições neutras ou ácidas. Ele possui baixa tendência a volatilizar e é altamente móvel no solo, podendo lixiviar para águas subterrâneas e cursos d'água. O Carbofurano inibe a colinesterase, estimulando o sistema nervoso e causa efeitos cancerígenos, teratogênicos e genotóxicos. Estresses físicos como a mudança de temperatura podem afetar a susceptibilidade dos organismos à químicos, alterando a toxicodinâmica da interação química com o organismo, a toxicocinética, o metabolismo e estado fisiológico dos mesmos. As mudanças climáticas e o aquecimento global causados pela emissão de gases de efeito estufa, representam estressores que afetam a ocorrência de espécies levando à redução da biodiversidade. Acredita-se o aumento de 1,5-2,5°C nas temperaturas médias globais aumentam em 20-30% o risco de extinção de espécies e estudos indicam que um aumento na escala de 3°C é passível de ocorrer até o ano de 2100. Para a liberação e avaliação dos efeitos ambientais de agrotóxicos, são geralmente exigidos testes de toxicidade e o monitoramento através da avaliação ecotoxicológica é recomendado por diversos autores. *Ceriodaphnia dubia* é um microcrustáceos zooplânctônico muito utilizado como bioindicador, são filtradores, vivem em água doce e ocupam uma posição chave na cadeia alimentar. Dentre os fatores ambientais que influenciam as comunidades zooplânctônicas, a temperatura altera o ciclo de vida de muitos organismos, podendo modificar a taxa de reprodução e de filtração de várias espécies. Alterações nestes fatores podem influenciar a toxicidade de contaminantes para bioindicadores planctônicos. Diversos estudos encontraram relação entre o aumento da temperatura e o aumento da sensibilidade dos organismos e, conseqüentemente, da toxicidade dos contaminantes químicos. No entanto, esta toxicidade depende do contaminante testado. Não foram encontrados estudos sobre a avaliação do efeito combinado de Carbofurano e Temperatura sobre *Ceriodaphnia dubia*. O presente estudo visa avaliar este efeito combinado. Os resultados deste estudo, corroboraram com os de outros estudos, demonstrando que temperaturas fora da faixa ótima influenciam a reprodução, desenvolvimento e alimentação de *C. dubia*, assim como influenciam negativamente na sensibilidade do organismo ao Carbofurano. Este efeito não pode ser observado apenas através de testes agudos, no entanto, os testes crônicos possibilitaram a observação do efeito combinado. Independente da temperatura, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que as CL₅₀ estão em concentrações inferiores às encontradas em ambientes naturais no Brasil e às estabelecidas pela OMS como padrão. Assim, conclui-se que os testes crônicos podem ser ferramentas interessantes para aplicação e uso rotineiro por agências ambientais. Esta avaliação deve ser realizada de acordo com as características ambientais locais e estes fatores devem ser levados em consideração durante a compilação de legislações, já que legislações nacionais podem não ser suficientes para evitar impactos a nível local.

Palavras Chave: Carbofurano, variação térmica, *Ceriodaphnia dubia* e toxicidade.

ABSTRACT

Since 2008, Brazil is the largest consumer of pesticides in the world. In 2011 insecticides were the most used group of pesticides. Carbofuran is a systemic, carbamate insecticide of broad spectrum used worldwide. Carbofuran has a relatively short half-life in the environment and is relatively stable under neutral or acid conditions. It also has low tendency to volatilize, is highly mobile in soil and may reach groundwaters and aquatic environments. Carbofuran inhibits cholinesterase, stimulates the nervous system and causes carcinogenic, teratogenic and genotoxic effects. Physical stresses such as temperature change may affect the susceptibility of organisms to chemicals by changing the toxicodynamics, toxicokinetics, chemical interaction with the body, metabolism and physiological state of organisms. Climate change and global warming caused by the emission of greenhouse gases are stressors that affect the occurrence of species reducing biodiversity. It is believed that an increase of 1,5–2,5°C in the global average temperatures will increase the risk of extinction of species by 20–30% and studies indicate that an increase in the range of 3°C is likely to occur by the year 2100. Toxicity tests and monitoring through ecotoxicological evaluation are often required and recommended by several authors for agricultural use approval and evaluation of the environmental effects of pesticides. *Ceriodaphnia dubia* is a zooplanktonic microcrustacean widely used as bioindicator. They are filter feeders, live in fresh water and occupy a key position in the food chain. Temperature changes affect the life cycle of many organisms, may modify the reproductive and filtration rates of many species, being one of the environmental factors that have more influence on zooplankton communities. Changes in these factors can alter the toxicity of contaminants to planktonic bioindicators. Several studies have found a relationship between increased temperature and increased sensitivity of organisms to chemical contaminants. However, this change in toxicity depends on the tested contaminant. No studies assessing the combined effect of temperature and Carbofuran on *C. dubia* have been found and the present study aims to evaluate this combined effect. The results of this study corroborate those of other studies, showing that temperatures outside the optimum range influences reproduction, development and feeding of *C. dubia* as well as negatively influences the sensitivity to Carbofuran. This combined effects cannot be observed only by acute tests but can be clearly observed on chronic tests. The results obtained in this study demonstrate that, independent of temperature, acute toxicity of Carbofuran to *C. dubia* is observed at concentrations below those found in natural environments in Brazil and established by WHO as standard. Thereby, it is concluded that chronic tests are interesting tools for application and routine use by environmental agencies. This evaluation shall be conducted in accordance with local environmental characteristics and these factors must be taken into account during the compilation of laws, since national legislation may not be sufficient to avoid local impacts.

Key Words: Carbofuran, thermal variation, *Ceriodaphnia dubia*, toxicity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Estrutura química do Carbofurano 13
- Figura 2: *Ceriodaphnia dubia* 23
- Figura 3: Efeito da Temperatura sobre *Ceriodaphnia dubia* nas temperaturas 17°C (■); 23,5°C (■); 30°C (■). A) Taxa de Clearance (%); B) Idade na primeira Reprodução (dias); C) Tempo para Alcançar a Terceira Reprodução (dias); D) Fecundidade Média; E) Crescimento Populacional; Símbolos diferentes (▲, ●, ■) representam diferença estatística segundo ANOVA Tukey Post Hoc test $p < 0,05$. As barras de erro representam desvio padrão..... 38
- Figura 4: Efeito Combinado de Temperatura e Carbofurano sobre *Ceriodaphnia dubia* nas temperaturas 17°C (■); 23,5°C (■); 30°C (■). A) CE_{50} ; B) CI_{20} de Fecundidade Média; Símbolos diferentes (▲, ●) representam diferença estatística segundo ANOVA Tukey Post Hoc test $p < 0,005$. As barras de erro expressam o intervalo de confiança das amostras..... 40
- Figura 5: Porcentagem média de células de algas consumidas por *Ceriodaphnia dubia* nas condições 17°C Controle (■); 17°C 0,13 $\mu\text{g L}^{-1}$ (■); 23,5°C Controle (■); 23,5°C 0,13 $\mu\text{g L}^{-1}$ (■); 30°C Controle (■); 30°C 0,13 $\mu\text{g L}^{-1}$ (■); Símbolos diferentes (▲, ●) representam diferença estatística segundo ANOVA Tukey Post Hoc test $p < 0,05$; As barras de erro expressão o desvio padrão das amostras..... 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Propriedades físico-químicas do Carbofurano (Modificado de Rubin, 2006) ²³ . C-org: Carbono orgânico.....	14
Tabela 2:	Sensibilidade de bioindicadores a concentrações agudas de Carbofurano.....	16
Tabela 3:	Resultados da CE ₅₀ (toxicidade agudo) e CI ₂₀ (toxicidade crônica) de Carbofurano para <i>C. dubia</i> para os parâmetros avaliados nas temperaturas 17°C; 23,5°C e 30°C (Intervalo de Confiança 95%). N/D – não determinado.....	40
Tabela 4:	Parâmetros físico-químicos avaliados durante os testes.....	41

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO.....	11
1.1 – CARBOFURANO.....	11
1.2 – TOXICOLOGIA.....	18
1.3 – ORGANISMO-TESTE (<i>Ceriodaphnia dubia</i>).....	21
1.4 – MUDANÇAS CLIMÁTICAS E SEUS EFEITOS.....	23
2 – JUSTIFICATIVA.....	27
3 – OBJETIVOS.....	29
3.1 – OBJETIVO GERAL.....	29
3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4 – HIPÓTESES.....	30
5 – METODOLOGIA.....	31
5.1 – CULTIVO E MANUTENÇÃO DE <i>C.dubia</i>	31
5.1.1 – CULTURA DA ALGA USADA PARA ALIMENTAÇÃO DE <i>C. dubia</i>	31
5.2 – TESTES ECOTOXICOLÓGICOS.....	32
5.2.1 – TESTE DE TOXICIDADE AGUDA (CONCENTRAÇÃO EFETIVA PARA 50% DA POPULAÇÃO - CE ₅₀).....	33
5.2.2 – TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA (CONCENTRAÇÃO DE INIBIÇÃO- CI ₂₀).....	33
5.3 – TESTE DE EFEITO COMBINADO (CARBOFURANO E TEMPERATURA).....	34
5.4 – TAXA DE CLEARANCE.....	35
6 – RESULTADOS.....	37
6.1 – EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE <i>Ceriodaphnia dubia</i>	37
6.2 – EFEITO COMBINADO DE TEMPERATURA E CARBOFURANO PARA <i>C. dubia</i>	39
6.3 – PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS AVALIADOS DURANTE OS TESTES.....	41
7 – DISCUSSÃO.....	42
8 – CONCLUSÃO.....	46
9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – CARBOFURANO

Agrotóxicos são substâncias amplamente utilizadas nas atuais práticas agrícolas¹ com o objetivo de matar ou controlar animais e plantas para aumentar a produção. Entender os efeitos biológicos agudos destes produtos sobre os organismos-alvos é de extrema importância², mas devido aos seus efeitos tóxicos em organismos não-alvos, a maioria dos agrotóxicos pode ser gravemente prejudicial aos ecossistemas¹. Assim, há considerável interesse e importância no estudo de seus efeitos agudos (letais) e crônicos (subletais), em organismos não-alvos, incluindo humanos².

Em todo o mundo ocorrem mais de 26 milhões de intoxicações por agrotóxicos em humanos, com cerca de 220.000 mortes por ano³. Além de causar a morte, eles também podem induzir várias doenças, como incidência de doenças mentais, malformações, alterações na reprodução humana e câncer^{3,4,5}. As intoxicações podem ser agudas ou crônicas e ocorrer por exposição ocupacional durante a aplicação agrícola ou pelo consumo de alimentos contaminados por altas concentrações desta classe de compostos químicos^{3,6}.

O consumo de agrotóxicos vem crescendo significativamente de 1960 a 2005³. Ao longo dos anos 1990, a venda global permaneceu relativamente constante, entre 270 e 300 bilhões de dólares, dos quais 79% foram destinados ao consumo de inseticidas. Mundialmente, 4,6 milhões de toneladas de agrotóxicos são anualmente pulverizados no meio ambiente.

Aplicações agrícolas de agrotóxicos, feitas de forma incorreta, podem resultar na contaminação de ambientes terrestres e aquáticos, a pulverização acidental, apresenta um risco menor, porém a lixiviação e escoamento de água das áreas tratadas apresentam um risco mais grave¹. Do total de pesticidas aplicados, apenas 1% realmente atua no controle de organismos considerados pragas, o restante fica disponível no solo, corpos hídricos e atmosfera, podendo ser absorvidos por praticamente todos os organismos³.

O movimento e a persistência de agrotóxicos no sistema hidrológico também são afetados pela separação e transformação nos tecidos da biota aquática. Eles se

acumulam na biota aquática passivamente através da água ou por ingestão de sedimentos ou outros organismos contaminados².

O Brasil está entre os países que mais consomem agrotóxicos no mundo³ e de acordo com os dados do Sindicato das Indústrias de Defensivos Agrícolas⁷, 986.500 toneladas de agrotóxicos foram consumidas em 2008 e mais de um milhão de toneladas em 2009 (equivalente a 5,2 kg de produtos agrotóxicos por ano por brasileiro ou 16 litros por hectare cultivável). Ainda segundo o SINDAG⁷ as vendas em 2011 foram recordes (US\$ 8,5 Bilhões) tendo um aumento de 11% em relação a 2010. Entre as classes de pesticidas, o consumo de herbicidas caiu de 50 (anos 2000) para 33 % em 2011, além deste, o consumo de fungicidas foi de 27% tornando os inseticidas o grupo de pesticidas mais consumidos em 2011 apresentando um consumo de 40%.

Os inseticidas atuam como venenos físicos, protoplasmáticos, no estômago, como inibidores metabólicos, neurotoxinas ou mimetizando hormônios². Dentre esses, o Carbofurano é um inseticida muito utilizado em plantações agrícolas tais como alfafa, morangos, uvas, soja, trigo, amendoim, arroz, cana de açúcar, e especialmente o milho^{8,9,10,11,12,13}, com o objetivo de controlar o solo e o sistema foliar contra a alimentação de pragas insetos.

O Carbofurano (2,3-di-hidro-2, 2-dimetilbenzofurano-7-ilo) (Figura 1) é um inseticida, nematicida e acaricida, carbamato sistêmico de amplo espectro, que vem sendo utilizado em todo o mundo. Juntamente com outros carbamatos, inseticidas organofosforados e piretróides, o Carbofurano é um dos substitutos principais de agrotóxicos mais persistentes, tais como DDT¹³, devido, principalmente, a sua baixa persistência no meio ambiente^{1,14}.

Em 1974, a utilização de Carbofurano doméstico superou 3,2 milhões de Kg (7 milhões de libras) de ingredientes ativos, a maioria dos quais foram aplicados para o controle de pragas de milho^{10,13}. Segundo o relatório de uso de agrotóxicos do Departamento de Regulação de Agrotóxicos, mais de 130.000 Kg de ingredientes ativos foram usados na Califórnia, em 1999 e novamente em 2000. Como resultado do seu uso generalizado, o Carbofurano foi detectado em águas superficiais, chuva, solos, ar, alimentos e animais selvagens^{1,15,16,17}.

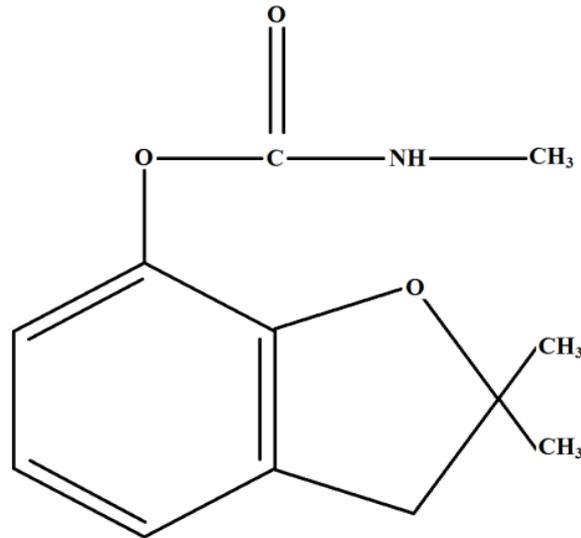


Figura 1: Estrutura química do Carbofurano.

O Carbofurano é formulado como um pó solúvel em água ou na forma líquida. Enquanto puro, ele é um sólido branco cristalino, inodoro até levemente aromático¹⁸ que possui as propriedades físico-químicas expressas na Tabela 1. Ele é aplicado sob a forma granular ou pulverizado, embora a forma granular esteja atualmente limitada nos EUA, pois em 1991 a EPA e a FMX Corporation (fabricante do produto) concordaram em proibir a forma granular deste produto químico, devido à toxicidade desta forma para as aves¹⁹.

A Meia vida no corpo de animais (tempo que leva até que metade do composto seja metabolizada e excretada do organismo)²⁰ é relativamente rápida e os resíduos terminais produzidos são polares e formados por processos químicos normalmente considerados como passos de desintoxicação metabólica¹⁰. A meia vida do Carbofurano no meio ambiente (tempo que leva até metade do composto ser degradada)²⁰ é considerada como relativamente curta. Embora Mora *et al.* (1996)¹⁴ tenham encontrado uma meia-vida para o Carbofurano em suspensões de solo em água de 1-2 dias, a sua meia-vida na maioria dos tipos de solo é geralmente indicada como por volta ou menor de 60 dias^{1,21}. Por outro lado, Yen *et al.* (1997)²² em um estudo em laboratório tenham encontrado uma meia-vida de Carbofurano em solo lodoso, de barro ou argila (pH 6,7; matéria orgânica 2,9%) de 105 dias e de 35 dias a 15°C e 35°C, respectivamente²². Em solos, a biodegradação do Carbofurano é ativada por populações bacterianas e sua meia-vida na atmosfera é de 4,6 horas¹³.

Tabela 1: Propriedades físico-químicas do Carbofurano (Modificado de Rubin, 2006)²³. C-org: Carbono orgânico.

Parâmetro	Propriedade
Peso Molecular	221,26
Fórmula molecular	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃
Ponto de Fusão	150-152°C
Solubilidade em água	351.000 µgL ⁻¹ (25°C)
Pressão de vapor	6 x 10 ⁻⁷ mmHg (25°C)
Coeficiente de partição octanol-água (K _{ow})	17-26
Lei de constância de Henry	3,9 x 10 ⁻⁹ atm m ³ /mol
Meia vida por hidrólise (dias)	27,7 (pH 7 25°C), 2,73 (pH 8 25°C), 0,54 (pH 9 25°C)
Meia vida por fotólise em água (dias)	7,95 x 10 ³ (pH 7 28°C)
Meia vida por fotólise em solo (dias)	138 (pH 5,7 27°C arenoso, 2,1% C-org, 21% umidade)
Degradação aeróbica (dias)	22 (pH 5,7 25°C arenoso, 2,1% C-org, 21% umidade)
Degradação anaeróbica (dias)	30 (pH 5,7 25°C arenoso, 2,1% C-org, 21% umidade)
Dissipação no campo (dias)	13 (pH 7,3 arenoso, 38% C-org)
Coeficiente de adsorção (K _{oc})	22

O Carbofurano é relativamente estável em condições neutras ou ácidas, mas degrada-se (hidrolisa) rapidamente em meios alcalinos. É solúvel em concentrações de até 700.000 µgL⁻¹ em água em temperaturas superiores a 25°C e em concentrações menores que 30.000 µgL⁻¹ em vários solventes orgânicos. Degrada-se a mais de 130°C¹³ e tem uma baixa tendência a volatilizar.

A hidrólise é a principal via de degradação do Carbofurano em água e sedimento e a taxa de hidrólise aumenta com o aumento do pH^{24,25,26,27}.

A fotólise de Carbofurano é uma via de degradação de menor importância. Bachman & Patterson (1999)²⁸ sugeriram que a taxa de fotólise deste pesticida diminui com quantidades crescentes de matéria orgânica dissolvida (MOD). Entretanto, estudos indicam que a degradação microbiana é uma importante via de degradação do Carbofurano em solos neutros. Há um consenso geral, entre os pesquisadores, de que sua aplicação repetida em solos pode resultar em um aumento da degradação microbiana^{29,30,31}, pois a população microbiana exposta seria selecionada e, assim, aqueles que restariam e se desenvolveriam melhor seriam os indivíduos com capacidade de catabolizar o produto químico³².

A oxidação e volatilização são geralmente consideradas vias de dissipação insignificantes para Carbofurano, em água^{25,32,33,34}. No entanto, as taxas de

volatilização de Carbofurano se tornam mais rápidas em solos inundados, devido à co-evaporação com a água sobre a superfície do solo³⁵.

O processo de lixiviação, que corresponde ao movimento físico de um agrotóxico no solo, carregado pela água, é influenciado pelas propriedades físicas do solo (textura e permeabilidade), fluxo hidráulico e adsorção da substância às partículas do solo³⁴. Este processo depende principalmente do K_{oc} da substância, do teor de argila e matéria orgânica do solo^{34,36}. O Carbofurano possui elevada solubilidade em água ($351.000 \mu\text{gL}^{-1}$ a 25°C) e baixo coeficiente de adsorção (K_{oc} 22). Além do baixo K_{oc} , o Carbofurano é um composto não iônico, logo apresenta baixa reatividade com o solo e, conseqüentemente, relativa mobilidade neste meio³⁴, além de escoamento superficial. Conseqüentemente, o Carbofurano tem o potencial de contaminar lagos, rios e águas subterrâneas. O Carbofurano adsorve em solos argilosos e que contenham matéria orgânica em maior quantidade do que em solos arenosos^{37,38}. De acordo com Johnson & Lavy (1995)³⁹, espera-se que haja uma partição de Carbofurano para a água, a partir do solo, imediatamente após a aplicação granular no solo. A taxa de degradação no solo também é fortemente afetada pela temperatura²². O Carbofurano é altamente móvel no solo e pode, portanto, lixiviar para águas subterrâneas e cursos d'água⁴⁰, onde não se liga a sedimentos ou partículas em suspensão e não bioacumula¹⁵. Sua alta solubilidade e baixa adsorção constituem uma ameaça para águas superficiais naturais^{1,41}.

Farmacologicamente, o efeito específico e a toxicodinâmica (A toxicodinâmica é a relação entre a concentração da substância e seu efeito no organismo através do tempo)⁴² do Carbofurano é a inibição da colinesterase, causando o acúmulo de acetilcolina nas sinapses nervosas¹ e resultando na estimulação dos sistemas centrais, parassimpático e somático motores¹³ e em sinapses nervosas do sistema nervoso central¹. Os efeitos tóxicos agudos clínicos resultantes da exposição ao Carbofurano em animais e seres humanos parecem ser completamente reversíveis e vem sendo tratados com sucesso com sulfato de atropina. No entanto, o tratamento deve ocorrer o mais rapidamente possível após a exposição, pois a toxicidade aguda pode ser fatal. Indivíduos mais jovens de várias espécies são mais susceptíveis do que os adultos^{11,13}. O Carbofurano possui efeitos cancerígenos, teratogênicos e genotóxicos, ele atravessa a barreira placentária e produz conseqüências graves^{1,43}.

O Carbofurano rompe com enzimas do metabolismo lipídico em peixes, e sua CL_{50} variou entre 1.300 e $1.420 \mu\text{gL}^{-1}$ ¹³. Como referência na Tabela 2 são

apresentadas as CL₅₀ para várias espécies. Ao se comparar várias espécies de organismos aquáticos, os vermes marinhos pareceram ser os mais sensíveis ao pesticida, enquanto os peixes os mais resistentes¹¹. Entre as espécies terrestres, as abelhas são extremamente sensíveis ao Carbofurano e as minhocas também são susceptíveis, além disso, a mortalidade de minhocas pode resultar em um aumento da probabilidade de envenenamento secundário de várias espécies¹³. O Carbofurano está frequentemente envolvido no envenenamento de animais^{1, 43,44}. Já foram relatados numerosos casos de mortes de aves, devido à ingestão direta na forma granular, após aplicações em campos. Aparentemente, esta forma é confundida com grãos de alimentos pelas aves e além da ingestão direta, o envenenamento secundário (intoxicação resultante da ingestão de insetos envenenados e pequenos pássaros) também tem sido relatado⁴⁵. Deve-se atentar para o fato que a forma líquida é tão tóxica para as aves quanto a granular, porém, a exposição a esta forma é menos provável. Em vista disso, a avaliação de risco ecológico para Carbofurano tem sido focada principalmente na forma líquida, pois é a formulação mais usada do produto⁴⁰.

O estresse físico pode afetar a susceptibilidade dos organismos ao impacto químico, alterando a toxicodinâmica (Interação de substâncias químicas com sítios específicos do organismo gerando alterações funcionais, morfológicas e bioquímicas) da interação química com o organismo¹. Assim, mesmo em taxas recomendadas de aplicação, o Carbofurano foi considerado responsável pela morte esporádica de peixes, animais, insetos e invertebrados terrestres e aquáticos¹³.

Tabela 2: Sensibilidade de bioindicadores a concentrações agudas de Carbofurano.

Ambiente	Grupo Biológico	Organismo	Sensibilidade	Referência	
Terrestre	Invertebrados	<i>Apis sp.</i>	DL ₅₀ 0,16 µg/abelha	13	
		<i>Lumbricus herculeus</i>	5h-CL ₅₀ 500 µg L ⁻¹	13	
	Vertebrados	<i>Colinus virginianus</i>	DL ₅₀ 5.000 µg/kg	46	
Aquático	Invertebrados	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	48h-CL ₅₀ 2,6 µg L ⁻¹	47	
		<i>Moina Micrura</i>	48h-CL ₅₀ 6,96 µg L ⁻¹	48	
		<i>Daphnia magna</i>	48h-CL ₅₀ 86,1 µg L ⁻¹	49	
	Peixes			48h-CL ₅₀ 18,7 µg L ⁻¹	1
			<i>Lepomis macrochirus</i>	96h-CL ₅₀ 240 µg L ⁻¹	46
			<i>Salmo gairdneri</i>	96h-CL ₅₀ 380 µg L ⁻¹	13

A Organização Mundial da Saúde (OMS)⁵⁰ estabelece $7,0 \mu\text{g L}^{-1}$ como padrão de tolerância para Carbofurano em água potável³⁴. No entanto, segundo Golombieski *et al.* (2007)⁵¹, este inseticida foi detectado na lavoura de arroz em concentrações de $22 \mu\text{g L}^{-1}$; $13 \mu\text{g L}^{-1}$; $25 \mu\text{g L}^{-1}$ e $14,4 \mu\text{g L}^{-1}$. No monitoramento da qualidade da água em bacias hidrográficas de Santa Catarina, foram detectados valores de 23,97 e $122,1 \mu\text{g L}^{-1}$ de Carbofurano³⁴.

Ambientes aquáticos abrigam uma variada biota, que inclui organismos de vários níveis tróficos, além de organismos que dependem deste meio para completar parte de seu ciclo, ou apenas para hidratação ou alimentação⁵². A contaminação destes ambientes vem aumentando ao longo dos anos, tendo em vista que estes ambientes são o destino final de uma variada gama de substâncias tóxicas naturais ou antropogênicas^{52,53}.

Dentre as fontes de contaminação aquática, encontra-se a agricultura, que além de consumir grande volume de água através da irrigação, ainda torna-se fonte de fertilizantes e pesticidas que, após serem aplicados nas plantações, alcançam os meios aquáticos através de infiltração no solo ou lixiviação⁵².

Devido à utilização em larga escala, o aumento das concentrações de pesticidas em ambientes aquáticos vem aumentando^{52,54,55}. A contaminação por pesticidas é um problema ambiental, que tem atraído a atenção do meio científico^{52,54,56}, já que ainda há necessidade de mais estudos para entender os impactos destes produtos nos ecossistemas aquáticos^{52,57}.

O monitoramento de agrotóxicos vem sendo feito com base em análises químicas de pesticidas individuais em amostras. Estas análises permitem determinar a concentração destes pesticidas e seus metabólitos na amostra coletada, porém, não revelam as complexas interações existentes. Testes ecotoxicológicos podem auxiliar no levantamento destas informações ao integrarem o efeito biológico de todos os compostos presentes em uma amostra e podem fornecer informações sobre biodisponibilidade, sinergismo e/ou antagonismo através de seus resultados⁴⁸.

1.2 – TOXICOLOGIA

A toxicologia é uma ciência multidisciplinar que conta com a colaboração de varias outras ciências, como: a medicina forense, toxicologia clinica, farmácia e farmacologia, saúde pública e a higiene industrial. A toxicologia também contribui de forma importante para a medicina veterinária e para o desenvolvimento e uso seguro de agrotóxicos. Além disso, a toxicologia tornou-se cada vez mais importante nos últimos anos para estudos ambientais⁵⁸, já que as análises físico-químicas, apesar de determinarem a concentração de uma substância na água, não permitem gerar informações sobre os efeitos destas substâncias sobre a biota⁵².

A Toxicologia é o estudo da interação entre substâncias químicas e os organismos vivos, com o objetivo de prever níveis de exposição seguros, além de auxiliar no desenvolvimento de tratamentos para os casos de superexposição a substâncias potencialmente tóxicas. Para determinar quais níveis de uma substância ou misturas de substâncias podem causar danos, seus efeitos e modos de ação, os toxicologistas realizam testes de toxicidade^{52,59,60} que podem ser realizados in vitro, com animais e, em alguns casos, humanos⁶¹. As avaliações de segurança estabelecem uma margem de segurança para compensar diferenças entre a susceptibilidade e a resposta entre os indivíduos. Assim, a toxicologia ajuda a manter a qualidade de vida relacionada ao uso adequado de produtos químicos, fazendo com que o uso responsável e ético de animais em pesquisa seja necessário para proteger a saúde humana e animal e para salvaguardar o meio ambiente⁶¹.

O estudo da toxicologia serve à sociedade de muitas maneiras, não só para proteger seres humanos e o ambiente contra efeitos deletérios de substâncias tóxicas, mas também para facilitar o desenvolvimento de agentes tóxicos mais seletivos, tais como agrotóxicos⁵⁸.

A toxicidade (efeito tóxico) pode ser aguda (concentração capaz de causar um efeito de letalidade ou imobilidade em metade da população, em exposição única por um curto período de tempo, expressa em concentração letal – CL_{50} ou concentração efetiva CE_{50} , em um período curto de tempo, que em geral é de 24-48 horas) ou crônica (exposição por um grande período de tempo – na totalidade ou em grande parte do ciclo de vida da espécie, capaz de determinar efeitos subletais alterando as funções biológicas como reprodução, crescimento e comportamento). No caso de efeitos crônicos, são utilizadas: Concentração de Inibição (CI_x) – aquela

que causa a inibição na porcentagem escolhida nos parâmetros analisados em relação ao controle - Concentração de Efeito Não Observado (CENO) – concentração mais alta onde o efeito ainda não produz resposta e que pode ser considerado o limite de não-reação do organismo ao agente estressor – e Concentração de Efeito Observado (CEO) – a menor concentração que produz efeito^{52,59,60,62,63,64}. A susceptibilidade do organismo pode variar de acordo com o órgão afetado, com a idade, genética, sexo, dieta, condições fisiológicas, estado de saúde de um organismo, indivíduos, populações ou espécies. Na avaliação da toxicidade, os testes crônicos complementam os testes agudos, tendo em vista que é possível observar efeitos fisiológicos e na reprodução dos organismos em concentrações inferiores aquelas que causam a mortalidade em curto prazo⁶³. Além disso, a interação entre diferentes tipos de impactos pode causar efeitos sinérgicos (que se somam), antagônicos (que se anulam) ou não causar alteração, e este tipo de resposta só pode ser obtida através de testes de toxicidade⁵².

As vias de exposição a substâncias tóxicas podem ser por ingestão intencional, exposição ocupacional, ambiental ou acidental. A toxicidade de uma substância pode variar de acordo com a forma de exposição, as rotas de metabolismo, tanto de desintoxicação quanto de ativação, causando desfechos tóxicos diferentes⁵⁸.

A toxicologia contribui com ferramentas para o monitoramento (avaliação da qualidade e volume da água, contínua ou periódica, com o objetivo de controlar a qualidade do corpo de água)^{64,65} através da medição dos produtos químicos em amostras biológicas e dos efeitos causados pelos mesmos nos organismos. Isso é permitido através das respostas encontradas em organismos, sejam elas comportamentais, de densidade populacional ou alterações de biomarcadores. Assim, a toxicologia é claramente uma ciência aplicada, dedicada a melhoria da qualidade de vida e da proteção do meio ambiente.

A toxicologia ambiental é basicamente o estudo do movimento e impacto de substâncias tóxicas e seus metabólitos no ambiente, na cadeia trófica e sobre o funcionamento de sistemas biológicos. Os sistemas biológicos incluem qualquer organismo vivo e seu habitat, já que um dos maiores problemas das ameaças ambientais é a perda de biodiversidade⁶⁶.

A saúde ambiental compreende os aspectos da saúde humana, incluindo a qualidade de vida, que é determinada por fatores físicos, biológicos, sociais e

psicossociais no ambiente. Também se refere à avaliação, correção e prevenção de fatores ambientais que podem causar potenciais efeitos adversos à saúde das gerações presentes e futuras. Assim as preocupações com os efeitos ambientais da liberação do comércio agrícola, levaram a uma série de estudos nos últimos anos fazendo com que a toxicologia venha se expandindo substancialmente nas últimas décadas⁵⁸.

Para a liberação de agrotóxicos e avaliação de seus efeitos ambientais, são geralmente exigidos testes de toxicidade (ensaios que objetivam a determinação de efeitos prejudiciais que possam ser causados por agentes físicos ou químicos a diversos organismos)⁶⁴ com invertebrados aquáticos^{52,59,67,68}.

Para tais ensaios, existem protocolos padronizados desenvolvidos por instituições reguladoras como *United States Environmental Protection Agency* (EPA) que visa a proteção ambiental e da saúde humana, influenciando inclusive na legislação americana; *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) que visa o monitoramento contínuo de eventos em países, geram diretrizes sobre governança ou práticas ambientais, com o objetivo de promover o desenvolvimento econômico dos países, levando em conta as implicações ambientais no desenvolvimento econômico e social e Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) que visa fornecer a base necessária para o desenvolvimento tecnológico brasileiro.

Uma subárea da toxicologia ambiental é a ecotoxicologia, que avalia impactos de contaminantes sobre populações, organismos vivos ou ecossistemas, considerando a influência de fatores ambientais^{63,69}. A ecotoxicologia permite assim, a avaliação indireta de substâncias em níveis abaixo dos limites de detecções das metodologias de análise química^{63,70} e avaliar a influência destes contaminantes em conjunto com outros fatores que possam interferir sinergicamente no efeito ambiental⁶³. Assim, os ensaios ecotoxicológicos com bioindicadores podem gerar uma avaliação segura do potencial tóxico de substâncias e meios contaminados, possibilitando a avaliação indireta de riscos ambientais. Com isto tornam-se uma ótima ferramenta para auxiliar na tomada de decisões relacionadas à preservação ambiental⁶³. A importância da avaliação ecotoxicológica, baseia-se principalmente no fato de os organismos apresentarem uma resposta de qualidade e, tendo em vista que o objetivo da monitoração é manter uma biota saudável, torna-se mais apropriado o biomonitoramento do que apenas o monitoramento de fatores físico-

químicos^{63,71}. Devido a estes fatores, o monitoramento através da avaliação ecotoxicológica é recomendado por diversos autores^{63,72,73,74}.

Dentre os critérios de seleção de um organismo-teste encontram-se: a ampla distribuição e abundância dos organismos-teste no ambiente, a facilidade de cultivo do organismo em ambiente laboratorial, as informações e descrições sobre a biologia da espécie e a sensibilidade à uma gama de substâncias além de ser um bom representante da cadeia alimentar e possuir estabilidade gênica^{62,63,73}.

Entre os bioindicadores mais utilizados encontramos algas unicelulares, espécies de microcrustáceos, como por exemplo, *Ceriodaphnia dubia*, e peixes^{52,59}. O grupo zooplânctônico dos Dafinídeos está entre os grupos que atendem a esses critérios e apresenta normas e metodologias de cultivo e teste padronizadas em vários países.

1.3 – ORGANISMO-TESTE (*Ceriodaphnia dubia*)

Dafinídeos são organismos zooplânctônicos utilizados em um grande número de publicações científicas^{52,75,76,77,78,79}. Estes organismos são bons bioindicadores para testes de toxicidade devido a sua sensibilidade a mudanças ambientais, tamanho reduzido, cultivo fácil e barato e ciclo de vida curto. Eles permitem a observação a olho nu, reprodução por partenogênese, gerando clones geneticamente idênticos e apresentam um grande número de indivíduos durante todo o ano^{52,75,80,81}.

Muitos fatores abióticos, como fotoperíodo, temperatura, salinidade, pH e concentração de oxigênio, tem influência sobre as populações zooplânctônicas fazendo com que a mortalidade, reprodução e crescimento populacional sejam alterados^{81,82,83,84,85,86}. Assim, uma alteração nestes fatores pode alterar a toxicidade de contaminantes para bioindicadores planctônicos. Dentre os fatores ambientais que influenciam as comunidades zooplânctônicas, a temperatura altera o tempo de geração e o ciclo de vida de muitos organismos, podendo modificar a taxa de reprodução e de filtração de várias espécies^{81,87,88,89,90}.

Dafinídeos são organismos exotérmicos, ou seja, eles pertencem ao grupo dos organismos cuja temperatura corpórea é diretamente dependente da temperatura ambiental⁹¹. Assim, a variação da temperatura ambiental tem grande

influência sob o metabolismo destes organismos⁹¹. Com o aumento da temperatura, aumentam-se os batimentos cardíacos, facilitam-se as reações enzimáticas e o corpo produz mais ATP, que é utilizado como fonte de energia⁹¹. No entanto, temperaturas extremamente altas (em torno de 40°C) podem causar a morte destes organismos por desnaturação das enzimas que catalisam as reações químicas necessárias para as funções metabólicas. Já quando a temperatura diminui, as reações passam a ocorrer em menor velocidade, reduzindo assim o ritmo cardíaco, o metabolismo destes organismos e aumentando o ciclo de vida^{62,63,91}. Khan & Khan (2008)⁹² determinaram que a elevação da temperatura aumenta a atividade das Daphnias, a taxa de respiração, os batimentos cardíacos e a demanda por alimento, além de diminuir o tamanho e o peso dos mesmos devido a necessidade de atender ao aumento do metabolismo.

*Ceriodaphnia dubia*⁹³ (Crustacea, Cladocera, Daphniidae) (Figura 2) é um organismo zooplanctônico de água doce, vulgarmente conhecido como pulga d'água. Seu corpo é ovalado, medindo entre 0,8 e 0,9 mm de comprimento e com 8 a 10 espinhos anais, apresenta ampla distribuição geográfica, é filtrador (consumidor primário), se alimentando predominantemente de algas unicelulares, bactérias e detritos orgânicos. Como todos os cladóceros são considerados presas universais e por isso exercem um papel importante nas cadeias tróficas dos ecossistemas de água doce^{52,59,94}.

Seu ciclo de vida compreende as fases de ovo, jovem e adulto. Seu corpo é coberto de um exoesqueleto, característico de artrópodes, e a troca dos exoesqueletos possibilita o seu crescimento e determina cada fase de seu ciclo de vida. Durante a maior parte do ano, as populações destes organismos são constituídas apenas por fêmeas que se reproduzem por partenogênese gerando clones geneticamente idênticos^{52,75,80,81}. Neste período eles podem gerar até 124 jovens em 28 dias a 24°C, sendo a primeira ninhada entre 3º e 5º dias de vida. Os machos são gerados pelas fêmeas com mais frequência na primavera ou sob condições ambientais desfavoráveis. São haploides e se reproduzem assexuadamente com as fêmeas gerando ovos de resistência, e geneticamente diferentes, chamados efípios^{81,95}. Esses ovos normalmente entram em diapausa e apenas eclodem quando o ambiente volta a se tornar favorável^{81,96,97,98,99}. Esta característica é de extrema importância para a manutenção da espécie.

Sua presença foi relatada em diversos locais pelo mundo incluindo lagos litorâneos e pântanos, geralmente entre a vegetação¹⁰⁰, tendo sido encontrados na Oceania, Ásia e Europa, sempre nas regiões mais quentes dos ecossistemas^{101,102,103,104}. Diversos autores usam e/ou recomendam $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ como a temperatura ótima para o seu crescimento, desenvolvimento e reprodução, assim como nos testes de toxicidade^{47,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122}. No entanto, a norma da ABNT (2010)⁹⁴ (aplicada no presente estudo) indica $23\text{--}27^{\circ}\text{C}$ como a faixa de temperatura ótima para *C. dubia*.



Figura 2: *Ceriodaphnia dubia*.

Diversos estudos vêm avaliando o efeito da toxicidade de uma substância em diferentes temperaturas e a grande maioria conclui que a toxicidade aumenta com o aumento da temperatura^{52,123,124,125}, porém este efeito não foi sempre observado¹²⁴.

1.4 – MUDANÇAS CLIMÁTICAS E SEUS EFEITOS

As mudanças climáticas são uma das maiores preocupações da ciência do século 21⁹². Estas mudanças podem se manifestar de várias formas tais como pelas através de mudanças na temperatura regional e global, mudanças nos padrões de chuva, a expansão e contração das camadas de gelo e variações do nível do mar¹²⁶. Há fortes indícios que as emissões de gases do efeito estufa pelos humanos já começou a influenciar nosso clima^{126,127}. Pesquisadores acreditam que, como consequência desta situação, a Terra esteja se aquecendo mais rapidamente que em qualquer outro período entre os últimos mil anos, no mínimo^{126,128}. O relatório do Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC), afirma que houve

evidências claras de um aumento de 0,6°C na temperatura global durante o século 20¹²⁹. O IPCC (2012)¹²⁹ também prevê um aumento de 1,4 a 5,8°C até 2100. Os modelos mais sofisticados sugerem que o aquecimento global causará grandes mudanças climáticas até o final do século 21, tornando menos previsíveis e aumentando a ocorrência de eventos climáticos extremos, como tempestades, enchentes e secas, e estas mudanças causarão efeitos potenciais em larga escala sobre o ambiente natural, sociedades e economias humanas, incluindo regiões costeiras, recursos hídricos saudáveis, agricultura e biodiversidade^{92,126,128,129}.

Para a biodiversidade, um dos maiores efeitos seria a ameaça aos habitats naturais, que são de primordial importância para as espécies que são incapazes de migrar em resposta as alterações climáticas, devido a sua localização geográfica ou invasão pela atividade humana^{126,128}. Um estudo realizado por Thomas *et al.* (2004)¹³⁰ indica que, sob as condições previstas pelo IPCC, em 2050 um quarto de todas as espécies pode ser extinto.

Como consequência da emissão de gases de efeito estufa, as mudanças climáticas e o aquecimento global representam estressores adicionais que afetam a ocorrência de espécies e, portanto, levam à redução da biodiversidade^{127,128}. Diversos autores apontam que 20 a 30% das espécies vegetais e animais estarão em maior risco de extinção se as temperaturas médias globais aumentarem entre 1,5 e 2,5°C^{127,128,131}. Diferentes cenários preveem um aumento das temperaturas médias globais entre 2,0 e 4,5°C até o ano de 2100, sendo que provavelmente este aumento atinja a escala de 3°C¹²⁷.

No entanto, os efeitos do aquecimento global devem ser discutidos em uma escala menor, já que estes efeitos podem ser diferenciados de acordo com os ecossistemas e regiões¹²⁷. A temperatura afeta não só a toxicocinética (processo de interação de uma substância e seus metabolitos com organismo, incluindo absorção, distribuição, excreção e metabolismo)^{42,132,133}, mas o metabolismo¹³⁴ e estado fisiológico¹³⁵ de animais¹²⁷.

Espécies zooplânctônicas de água doce estão sujeitas a fatores bióticos e abióticos^{122,136}. Dentre essas espécies, os cladóceros são um dos grupos que respondem rapidamente à mudanças no ambiente^{122,137}. Para os cladóceros^{122,138}, cujas espécies tropicais se reproduzem em um intervalo de 20 a 35°C^{122,139}, a temperatura é um dos fatores abióticos importantes por influenciar os processos

biológicos como crescimento, respiração, desenvolvimento, reprodução, comportamento e sobrevivência dos organismos.

A temperatura afeta animais peclotérmicos provavelmente mais do que qualquer outro fator ambiental, pois estes organismos tem uma capacidade limitada de manter a temperatura corporal em um nível constante. Portanto, a temperatura interna do animal, seu crescimento e desenvolvimento estão intimamente ligados a temperatura do ambiente^{128,132}. A habilidade de um indivíduo ou população de tolerar flutuações na temperatura pode ser determinante na sobrevivência de organismos sobre estresse térmico⁹². Assim, uma temperatura ambiental estressante, acima ou abaixo da faixa limite de tolerância do organismo, pode provocar o aumento da taxa de mortalidade dos organismos ou outros efeitos crônicos que afetam seu *fitness*, como tamanho, maturidade e taxas de alimentação e reprodutiva^{81,92,122,128,138,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154}. A faixa de temperatura ideal para o crescimento e desenvolvimento de um organismo varia de acordo com a espécie¹⁵¹.

A concentração de oxigênio dissolvido na água é reduzida com o aumento da temperatura e da salinidade. Assim, além de aumentar metabolismo, um aumento da temperatura pode diminuir a concentração de oxigênio disponível na água, no momento em que os organismos mais precisam deste para apoiar sua atividade metabólica influenciada pela temperatura. Estes fatores podem causar estresse osmótico e metabólico sob organismos peclotérmicos, o que pode torná-los mais susceptíveis a outras pressões ambientais, como poluentes químicos ou patógenos entre outros⁹².

Diversos estudos vêm sendo focados no efeito da variação de temperatura sobre os organismos^{92,122,127,128,132,144,154,155}. Alguns estudos avaliaram a sobreposição dos efeitos causados pela temperatura e a sensibilidade a contaminantes, baseando-se na interferência que o aumento da temperatura causa na exposição (mudança na solubilidade do contaminante e disponibilização para a coluna d'água), absorção (mudança no padrão e volume de alimentação do organismo) e na sensibilidade do organismo (alterada diretamente pelo gasto energético com a mudança do metabolismo e com o estresse para compensar a mudança da temperatura)^{52,92,124,123,125,156}. O efeito causado pela variação da temperatura e outros fatores sobre a fisiologia da biota aquática pode influenciar a cadeia alimentar e todo o ecossistema⁹².

Apesar de haver discordância entre resultados de pesquisa, mais estudos encontraram relação entre o aumento da temperatura e o aumento da sensibilidade dos organismos e, logo, da toxicidade dos contaminantes químicos^{52,123,124,125,144, 156}. No entanto, outros não encontraram relação para todos os contaminantes testados¹²⁴. Cairns *et al.* (1975)¹⁵⁷ enfatizaram que esta diferença na sensibilidade com o aumento da temperatura é dependente do composto químico em avaliação.

Apesar da maioria dos estudos tratar do impacto de um fator, como pesticida ou temperatura, sobre a população de cladóceros e alguns trabalhos avaliarem o efeito combinado agudo sobre estes organismos, não foi encontrado nenhum estudo que tratasse do efeito combinado de temperatura e carbofurano sobre *C. dubia*.

2 – JUSTIFICATIVA

O presente estudo se situa no campo da Saúde Pública e na Subárea de Saneamento, por contemplar questões de interesse de saúde humana e ambiental.

A Legislação Brasileira prevê que a água é um bem de domínio público e que a gestão dos recursos hídricos deve proporcionar os usos múltiplos da água. A Resolução CONAMA 357 (2005)⁶⁵ proíbe o lançamento de efluentes em níveis que possam colocar em risco os seres humanos e a biota de forma geral. Esta resolução limita uma série de potenciais contaminantes no ambiente e se baseia amplamente em parâmetros físico-químicos da água, no entanto não são eficientes para indicar o impacto ambiental causado pelos poluentes, pois não demonstram os efeitos sobre o ecossistema¹⁵⁸ e não dão resposta sobre que tipo de agente químico está sendo responsável pela toxicidade. Para solucionar esta questão, testes toxicológicos e ecotoxicológicos são indicados⁶³ e sua importância aumenta na proporção em que cresce a complexidade das transformações químicas no meio ambiente¹⁵⁹. No Brasil, a resolução CONAMA 430 (2011)⁶⁴ indica o uso de testes toxicológicos e que complementa a resolução CONAMA 357 (2005)⁶⁵ e determina as concentrações permitidas de diversos contaminantes em água, no entanto, ela não abrange o pesticida Carbofurano. Assim o presente estudo pode contribuir com informações que podem auxiliar a determinar os limites permitidos desta substância em ambientes aquáticos, além de fornecer elementos como subsidio para aplicação de técnicas ecotoxicológicas para avaliação do impacto de múltiplos estressores.

As mudanças climáticas e o aquecimento global representam estressores adicionais que afetam a ocorrência de espécies e, portanto, levam à redução da biodiversidade¹²⁸. Assim, a avaliação dos efeitos do aumento da temperatura e a sobreposição deste com a sensibilização de organismos por contaminantes químicos são de extrema importância.

Dafnídeos são organismos amplamente utilizados para testes ecotoxicológicos, com normas padronizadas para várias espécies, entre este grupo, encontram-se os organismos da espécie *Ceriodaphnia dubia* (Cladocera), que estão entre os organismos menores e mais sensíveis do grupo. Estes organismos apresentam cultura pré-estabelecida e validada no Laboratório de Avaliação e

Promoção da Saúde ambiental (IOC/FIOCRUZ) em comparação com outros laboratórios padronizados.

O Carbofurano é um inseticida em revisão pela ANVISA¹⁶⁰, porém, não foram encontrados estudos que avaliassem o efeito deste contaminante em diferentes temperaturas sobre o organismo aquático *Ceriodaphnia dubia*. Ainda, com a iminência das mudanças climáticas, principalmente em um país extenso como o Brasil, que abriga uma diversidade de ambientes e climas, a avaliação da resposta de organismos em diferentes temperaturas torna-se importante ao avaliar os efeitos tóxicos deste agrotóxico.

Para tal avaliação, testes crônicos são indicados já que estes permitem estimar as consequências a longo prazo, possibilitando a observação de efeitos tóxicos em baixas concentrações⁶³.

Segundo Khan & Khan (2008)⁹², Dafinídeos possuem mecanismos compensatórios para a variação de temperatura e devido a estes mecanismos, os indivíduos deste grupo podem se tornar mais susceptíveis a outros estressores ambientais (como por exemplo, poluentes químicos)⁹², além da mudança na quantidade de ingestão destes poluentes devido a esta modificação no metabolismo⁹². A capacidade de tolerar os estresses ambientais agravados pode ser seriamente comprometida, caso os efeitos combinados dos estressores sejam aditivos ou sinérgicos^{92,157,161,162}, tornando necessária a análise destes efeitos.

3 – OBJETIVOS

3.1 – OBJETIVO GERAL

O presente estudo visa avaliar o efeito combinado de três temperaturas (17, 23,5 e 30°C) e do pesticida Carbofurano sobre o microcrustáceo zooplanctônico *Ceriodaphnia dubia*.

3.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 – Avaliar o efeito dessas três temperaturas sobre o ciclo de vida de *C. dubia*.

3.2.2 – Avaliar a toxicidade do pesticida Carbofurano para *C. dubia*, através de ensaios ecotoxicológicos.

3.2.3 – Avaliar a susceptibilidade de *C. dubia* impactada pelo contaminante Carbofurano e pelo aumento da temperatura simultaneamente.

4 – HIPÓTESES

Neste estudo, com base no que foi descrito sobre a influência da temperatura no metabolismo, parâmetros reprodutivos e ciclo de vida de *C. dubia*, foram esperadas as seguintes respostas como possíveis explicações para o efeito combinado de Carbofurano e temperatura:

4.1 – Temperaturas mais altas podem provocar uma aceleração metabólica em *C. dubia*, provocando maior taxa de filtração e alimentação, e conseqüentemente ficando mais expostos ao pesticida Carbofurano. Isto geraria uma resposta de *C. dubia* em concentrações mais baixas de Carbofurano, sugerindo maior sensibilidade do organismo.

4.2 – Temperaturas mais altas ou mais baixas que a faixa de desenvolvimento ideal são estressoras para *C. dubia* provocando uma resposta do organismo a concentrações mais baixas de Carbofurano, sugerindo maior sensibilidade de *C. dubia* nas temperaturas fora da faixa ideal.

5 – METODOLOGIA

5.1 - Cultivo e Manutenção de *C. dubia*

A cultura preestabelecida no Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA/IOC, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ) foi iniciada a partir de exemplares previamente cultivados no Laboratório de Análise Ambiental LTDA (Labtox) do Pólo Bio-Rio na Ilha do Fundão. A manutenção do cultivo de *Ceriodaphnia dubia* no LAPSA seguiu a norma da ABNT 13.373 (2010)⁹⁴.

A água utilizada para o cultivo foi coletada em área de referência, no Parque Estadual da Pedra Branca (Rio de Janeiro – RJ, Brasil – Coordenadas: 22.96960°S / 43.43777°O). Antes do uso, a água foi filtrada através de uma membrana de fibra de vidro com porosidade entre 0,7 e 1,2 µm, mantida em geladeira e retirada próximo ao momento de uso para equilibrar a temperatura da água com a da cultura. O pH do meio foi mantido entre 7 e 7,6 e com oxigênio dissolvido superior a 4mg/L (ambos medidos através um aparelho multiparâmetro da marca Hach® Modelo Sension 378) e a dureza da água entre 40 e 48 mg de CaCO₃/L (avaliado pelo método titulométrico com EDTA). Os organismos foram mantidos em estufas na temperatura constante de 23,5°C (±1), com foto período de 12 horas (luz difusa), em recipientes de vidro de 500 mL contendo 35 indivíduos em cada recipiente. O meio de cultura foi trocado duas vezes por semana. A cultura foi alimentada diariamente com alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, na quantidade de 1 a 5 x 10⁵ células por organismo, e após 21 dias de cultivo, os neonatos e todo o lote de adultos foi descartado como indicado na norma ABNT 13.373 (2010)⁹⁴.

5.1.1 – Cultura da alga usada para alimentação de *C. dubia*

A alga *Pseudokirchneriella subcapitata* foi mantida em um meio preparado seguindo a norma ABNT 13.373 (2010)⁹⁴. Para tal, inicialmente foram preparadas as seguintes soluções: a solução 1 foi preparada com 4000 mg de Ca(NO₃)₂·4H₂O diluído em 100 mL de água deionizada; a solução 2 foi preparada com 10000 mg de KNO₃ diluído em 100 mL de água deionizada; a solução 3 foi preparada com 3000 mg de MgSO₄·7H₂O diluído em 100 mL de água deionizada; a solução 4 foi preparada com 4000 mg de K₂HPO₄ diluído em 100 mL de água deionizada; a solução 5 foi preparada com 30 mg de CuSO₄·5H₂O, 60 mg de (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 60 mg de ZnSO₄·7H₂O, 60 mg de CoCl₂·6H₂O, 60 mg de Mn(NO₃)₂·4H₂O, 60 mg de C₆H₈O₇·2H₂O, 60 mg de H₃BO₃ diluído em 100 mL de água deionizada; a solução 6

foi preparada com 1625 mg de $C_6H_5FeO_7 \cdot 5H_2O$, 625 mg de $FeCl_3 \cdot 6H_2O$, 625 mg de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ diluído em 100 mL de água deionizada; a solução 7 foi preparada com 15000 mg de $NaHCO_3$ diluído em 100 mL de água deionizada.

Para preparar o meio de cultura foi necessário misturar 1 mL das soluções 1, 2, 3, 4 e 7 com 0,5 mL das demais soluções. Após adicionar esses volumes o meio de cultura é avolumado para completar a 1L com água ultrapura e em seguida, o pH do meio foi ajustado para a faixa de 6 a 8 com Ácido Clorídrico (HCl) ou Hidróxido de Sódio (NaOH). Em seguida, o meio foi autoclavado por 15 minutos a $121^\circ C$ e manuseado em ambiente asséptico, sendo a cultura mantida entre 23 e $25^\circ C$ sob iluminação (12:12 Claro/escuro) e aeração constante. Após a abertura do lote de alga, a mesma foi mantida em condições de cultivo por um período de quatro a sete dias. Antes do uso, a alga foi centrifugada e o sobrenadante retirado visando eliminar o excesso de meio. Em seguida foi ressuspensa em água de cultivo para evitar a introdução de nutrientes tóxicos aos organismos-teste. Em sequência, as algas foram contadas em câmara de contagem de Neubauer através de um microscópio ótico com o objetivo de determinar o volume de alga que foi colocado na cultura de *C. dubia* durante a sua manutenção.

5.2 – TESTES ECOTOXICOLÓGICOS

A partir das culturas pré-estabelecidas no LAPSA, o organismo-teste foi exposto a diferentes concentrações de Carbofurano, visando determinar as concentrações letais e subletais para estes organismos.

Para o preparo das soluções foi utilizado o princípio ativo de Carbofurano da marca Sigma–Aldrich® 98% de pureza, através do qual inicialmente foi preparada uma solução mãe de 10 mg/L já corrigida para a pureza do padrão analítico usado. A partir desta solução foram feitas as soluções usadas para nos testes nas concentrações determinadas abaixo. As soluções utilizadas foram validadas através de análise por CL – MS (Cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massa).

5.2.1 - Teste de Toxicidade Aguda (Concentração Efetiva para 50% da população - CE₅₀)

Para os testes de toxicidade aguda com *Ceriodaphnia dubia*, os organismos foram expostos por 48 horas a soluções teste compostas por água Minalba® e Carbofurano nas seguintes concentrações: Controle (sem Carbofurano), 0,5 µgL⁻¹, 1 µgL⁻¹, 2 µgL⁻¹, 4 µgL⁻¹, e 8 µgL⁻¹. Para este teste não foi adicionado alimento e a temperatura foi mantida constantemente em 23,5°C. Os organismos foram expostos em recipientes de vidro de 50 mL contendo 30 mL da solução teste. Foram montadas 3 réplicas de cada concentração e de seu controle, com 10 organismos de 6 – 24 horas de nascidos em cada. Ao final de 48h os organismos mortos ou imóveis foram contados e a CE₅₀ (Concentração efetiva média para morte/imobilidade de 50% da população-alvo) foi calculada pelo método de Trimmed Spearman-Kärber.

5.2.2 – Teste de Toxicidade Crônica (Concentração de Inibição– CI₂₀)

O teste de toxicidade crônica foi realizado com 10 organismos expostos individualmente, às diferentes concentração-teste e controle em recipientes de 30 mL contendo 15 mL de solução. As concentrações de Carbofurano utilizadas foram: 0,01 µgL⁻¹, 0,02 µgL⁻¹, 0,03 µgL⁻¹, 0,07 µgL⁻¹, 0,10 µgL⁻¹, 0,13 µgL⁻¹, 0,33 µgL⁻¹. As réplicas foram observadas diariamente e as soluções foram trocadas a cada 48 horas, caracterizando um regime semi-estático. A cada troca de soluções foi adicionado alimento. O ensaio terminou quando 60% das fêmeas adultas reproduziram no mínimo 15 neonatos. O teste foi considerado válido quando no controle foi obtida uma sobrevivência no mínimo 80%, quando 60% ou mais das fêmeas do controle produziram 3 ninhadas ou quando o número médio de jovens gerados por fêmea era igual ou maior do que 15 indivíduos.

Foram contabilizados na avaliação de fecundidade, o número total de neonatos gerados por cada fêmea, mesmo aquelas que foram a óbito durante os experimentos. Os organismos mortos durante o teste devido à manipulação, ou por serem machos, não foram contabilizados. Foram avaliadas as diferenças estatísticas entre as réplicas das concentrações e o controle e foram excluídas as concentrações onde o efeito tóxico sobre a sobrevivência foi significativo.

Ao final do experimento a concentração que causou 20% de inibição (CI₂₀) com relação ao controle foram estimadas para cada parâmetro observado. Os seguintes parâmetros foram analisados: Fecundidade Média (número médio de

neonatos por postura), Idade na Primeira Reprodução (expressa em dias)⁶³ e Tempo Para Alcançar a Terceira Reprodução (expresso em dias). Foi também calculada a taxa de crescimento populacional, utilizando a equação proposta por Lampert & Sommer (1997)¹⁶³ e aplicada por Flores *et. al*, (2011)¹²²:

$$CP = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{t}$$

onde:

N_t é a densidade final

N_0 é a densidade Inicial

t é o tempo em dias.

A CI_{20} foi realizada através do programa estatístico Linear Interpolation, Versão 2.0, disponibilizado pela Environmental Protection Agency (EPA), que neste caso determinou a concentração que apresenta 20% de diferença estatística quando comparada ao controle, já que estudos têm mostrado que uma diferença estatística entre 20 e 30% é normalmente observado na CENO^{114,164}.

5.3 – TESTE DE EFEITO COMBINADO (CARBOFURANO E TEMPERATURA)

Segundo Oetken *et al.* (2009)¹²⁷, o aumento mais provável das temperaturas médias globais até o ano de 2100 será de 3°C. Nossos cultivos de *C. dubia* foram realizados a 23,5°C, seguindo a norma ABNT 13.373 (2010)⁹⁴, que indica a faixa de temperatura entre 23 e 27°C como controle (situação de não-estresse) para testes de toxicidade. De forma a aplicar a previsão de aumento de temperatura como um fator de estresse para *C. dubia*, estipulamos 3°C acima do valor máximo da norma para os testes (ficando em 30°C ± 0,5°C). Estando este valor 6,5°C acima de nossa temperatura-controle, estipulamos 6,5°C abaixo de nossa temperatura-controle (17,0°C ± 0,5°C). Ambas as temperaturas podem ser consideradas potencialmente causadoras de estresse para estas populações^{92,122,140,150}.

Após estas baterias de testes e com as concentrações e temperaturas já determinadas, foram realizados os testes de efeito combinado onde foram

determinadas as Cl_{20} para cada parâmetro observado, em cada uma das três temperaturas.

Os testes agudos foram realizados como descrito no item 5.2.1, porém foram utilizados neonatos de fêmeas que já estavam sendo cultivadas e aclimatadas nas temperaturas determinadas (17; 23,5 e 30°C). Da mesma forma, foram realizados os testes de toxicidade crônica sob as mesmas condições descritas no item 5.2.2, sendo que repetidos nas temperaturas de 17°C (Concentrações: 0,01 μgL^{-1} , 0,02 μgL^{-1} , 0,03 μgL^{-1} , 0,07 μgL^{-1} , 0,10 μgL^{-1} , 0,13 μgL^{-1} , 0,33 μgL^{-1} , 0,67 μgL^{-1} e 1 μgL^{-1}) e 30°C (Concentrações: 0,01 μgL^{-1} , 0,02 μgL^{-1} , 0,03 μgL^{-1} , 0,07 μgL^{-1} , 0,10 μgL^{-1} , 0,13 μgL^{-1}).

5.4 - TAXA DE CLEARANCE

O consumo de alimento e a capacidade de filtração (chamados “*Clearance*”, em inglês) são alguns dos parâmetros que foram demonstrados em outros estudos como sendo modificados pela mudança da temperatura⁹². Estes parâmetros são indicadores da mudança no metabolismo dos organismos e por tanto foram também analisados.

Foi utilizada a metodologia de Lürling, *et. al* (2003)¹⁶⁵ com modificações. Foram analisadas as seguintes condições: controle negativo usando água de manutenção, (não contaminada) com alga no volume determinado para cultura e sem o organismo-teste, controle positivo (mesmo meio acima) com o organismo-teste, amostra teste negativa contendo água de manutenção com alga no volume determinado para cultura e Carbofurano na concentração de 0,13 μgL^{-1} mas sem o organismos-teste e amostra teste positiva (mesmo meio acima) com o organismo-teste. Para as amostras com organismo-teste, foram utilizado indivíduos com 8 dias de aclimação nas temperaturas determinadas, divididos em 3 réplicas, contendo 10 indivíduos cada. Os testes foram realizados em um recipiente de vidro de 50 mL contendo 30 mL de solução. O teste teve duração de 3 horas e as amostras foram homogeneizadas a cada 30 minutos durante o teste.

Com o objetivo de avaliar conjuntamente os efeitos da temperatura e dos pesticidas para o cálculo do *Clearance*, e eliminar a interferência do crescimento da alga tanto nas amostras controles quanto naquelas que continham carbofurano, todos os dados foram transformados em percento. já que as contagens de células

iniciais não foram iguais, dificultando a interpretação das análises. Os cálculos foram realizados tanto com as amostras controle quanto com as amostras teste e foram realizados através da fórmula:

$$\textit{Taxa de Clearance} = \left(\frac{\textit{Contagem de algas FINAL com } C. dubia \times 100}{\textit{Contagem de algas FINAL sem } C. dubia} - 100 \right) \times -1$$

6 – RESULTADOS

6.1 – EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE *Ceriodaphnia dubia*

Para avaliar o efeito da temperatura sobre *Ceriodaphnia dubia*, foram analisados os seguintes parâmetros: Fecundidade Média (número de neonatos dividido pelo número de posturas); Idade na Primeira Reprodução (expressa em dias); Idade na Terceira Reprodução (expresso em dias); taxa de *Clearance* (expresso em porcentagem) e o Crescimento Populacional, como mostra a Figura 3.

A temperatura foi um importante fator no ciclo de vida de *C. dubia*, causando efeitos em todos os parâmetros avaliados (Figura 3 A – E). À temperatura de 17°C *C. dubia* se alimentou cerca de três vezes mais do que no controle (Figura 3 A), embora com um retardamento para atingir a primeira e a terceira reprodução (Figuras 3 B e C) e com menor fecundidade média (menos filhotes por ninhada) (Figura 3 D). Como resultado deste atraso no tempo de reprodução e com a geração de menos filhotes por ninhada, o crescimento populacional observado também foi menor do que nas outras temperaturas (Figura 3 E). Já à 30°C, tempo de reprodução foi menor do que no controle (Figuras 3 B e C) e combinou com um maior consumo de algas (Figura 3 A). No entanto, apesar de terem produzido mais ninhadas por unidade de tempo, as ninhadas geraram menos neonatos (Figura 3 D), resultando em um crescimento populacional similar ao do controle. Por sua vez, o controle produziu menos ninhadas, mas com um número de filhotes por ninhada maior do que à temperatura 30°C (Figura 3 E).

Considerando a Fecundidade Média o padrão encontrado foi que a temperatura controle (23,5°C) apresentou maior Fecundidade Média que 17 e 30°C, sendo as duas últimas semelhantes. O consumo de alga (taxa de *Clearance*) se comportou de forma oposta, sendo 23,5°C a temperatura que apresentou menor consumo. A idade na primeira e terceira reprodução apresentaram um padrão decrescente com o aumento da temperatura.

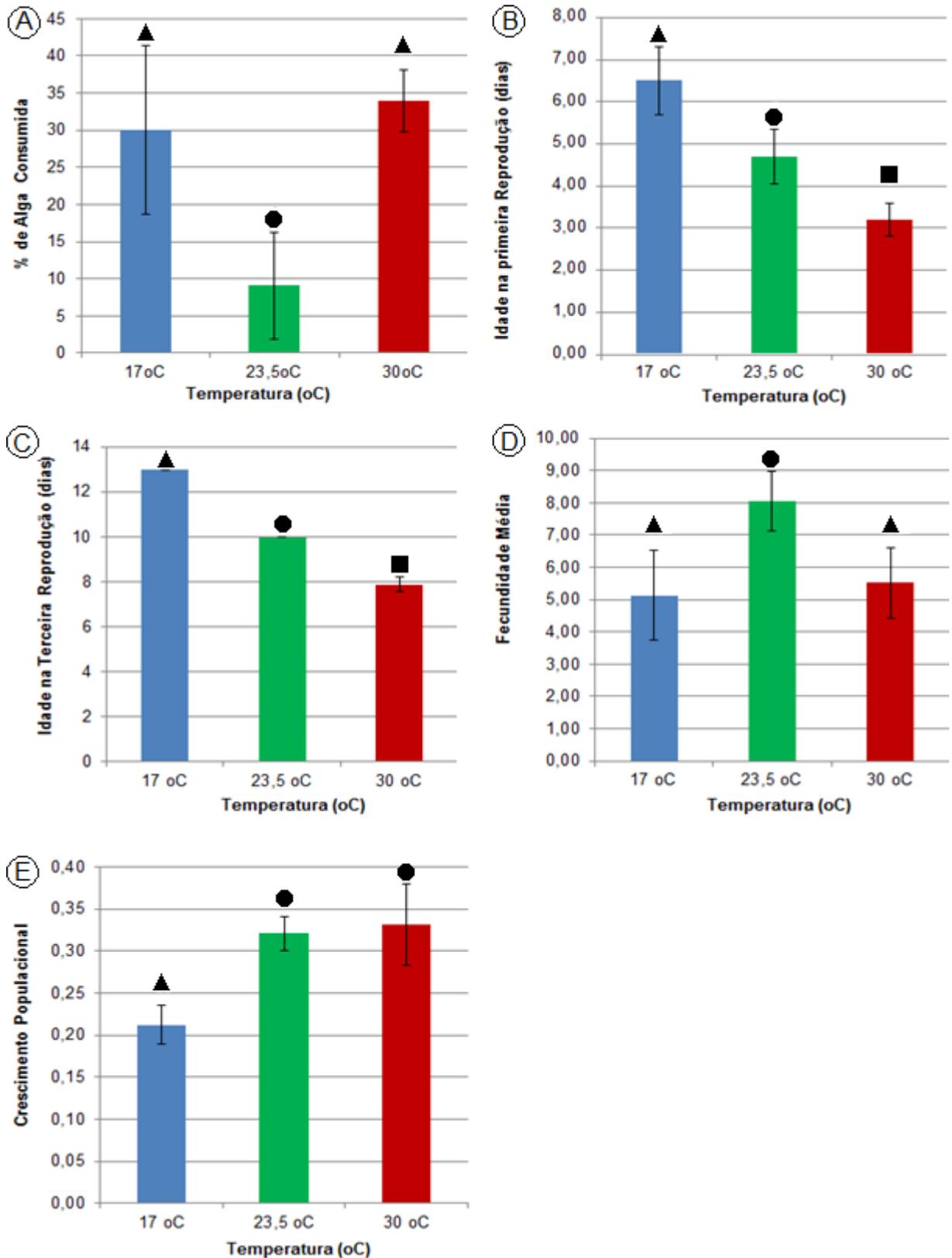


Figura 3: Efeito da Temperatura sobre *Ceriodaphnia dubia* nas temperaturas 17°C (■); 23,5°C (■); 30°C (■). A) Taxa de Clearance (%); B) Idade na primeira Reprodução (dias); C) Tempo para Alcançar a Terceira Reprodução (dias); D) Fecundidade Média; E) Crescimento Populacional; Símbolos diferentes (▲, ●, ■) representam diferença estatística segundo ANOVA Tukey Post Hoc test $p < 0,05$. As barras de erro representam desvio padrão.

6.2. – EFEITO COMBINADO DE TEMPERATURA E CARBOFURANO PARA *C. dubia*

O teste de toxicidade aguda (48h-CE₅₀) demonstrou que a 30°C a mortalidade de *C. dubia* foi maior em concentrações mais baixas de Carbofurano (30°C – 1,94 µgL⁻¹; 17°C – 2,71 µgL⁻¹; 23,5°C – 2,83 µgL⁻¹), sugerindo maior sensibilidade que nas temperaturas mais baixas (Tabela 3 e Figura 4 A).

Dos parâmetros crônicos avaliados, tanto fecundidade média quanto o consumo de algas apresentaram resposta em temperaturas de 17 e 30°C em relação à temperatura controle (23,5°C) (Figura 4 B e 5). Ambas as respostas podem ser explicadas pelo efeito combinado dos dois impactos. À temperatura de 17°C, a Cl₂₀ de fecundidade média (Tabela 3 e Figura 4 B) para *C. dubia* foi 40% menor que na temperatura controle. Além disto, o consumo de alga foi 38% menor na solução contendo carbofurano do que a na solução controle para esta temperatura (Figura 5). Na temperatura de 23,5°C não houve diferença no consumo de alga com a adição de carbofurano.

À 30°C, a Cl₂₀ de fecundidade média para *C. dubia* foi 95% menor que na temperatura controle (Tabela 3 e Figura 4 B). Além disto, o consumo de alga (Figura 5) foi 86,59% menor na solução contendo carbofurano do que na solução controle para esta temperatura. A avaliação destes resultados em conjunto demonstrou que à temperatura de 30°C apresenta uma influência mais expressiva do que as temperaturas mais baixas.

O consumo de alga no controle foi maior nas temperaturas 17 e 30°C, no entanto, com a adição de Carbofurano o consumo em 30°C cai mais drasticamente que a 17°C (Figura 5). Assim, podemos concluir que o efeito combinado entre temperatura e Carbofurano foi mais evidente em 30°C que em 17°C.

A idade na primeira reprodução e a idade na Terceira Reprodução não apresentaram variação nos testes realizados, mostrando que estes foram parâmetros principalmente influenciados pela temperatura.

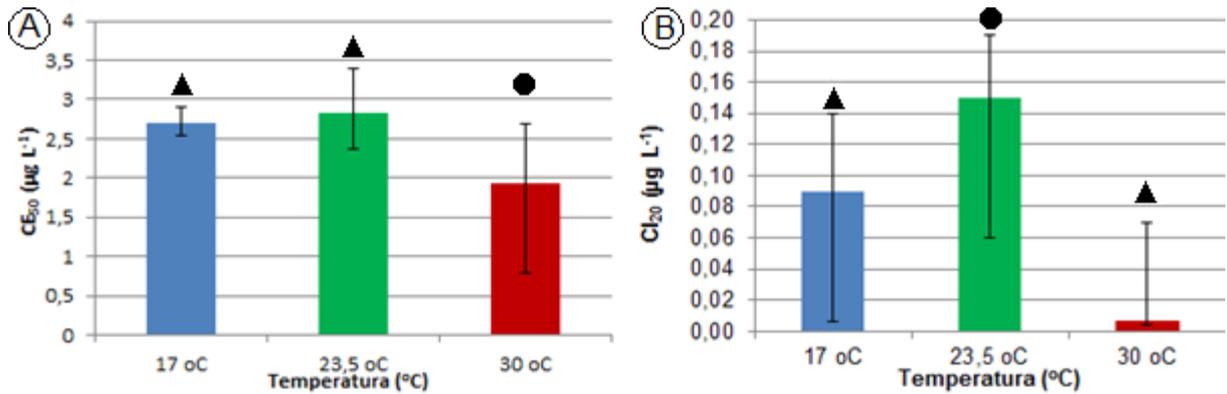


Figura 4: Efeito Combinado de Temperatura e Carbofurano sobre *Ceriodaphnia dubia* nas temperaturas 17°C (■); 23,5°C (■); 30°C (■). A) CE₅₀; B) CI₂₀ de Fecundidade Média; Símbolos diferentes (▲, ●) representam diferença estatística segundo ANOVA Tukey Post Hoc test $p < 0,005$. As barras de erro expressam o intervalo de confiança das amostras.

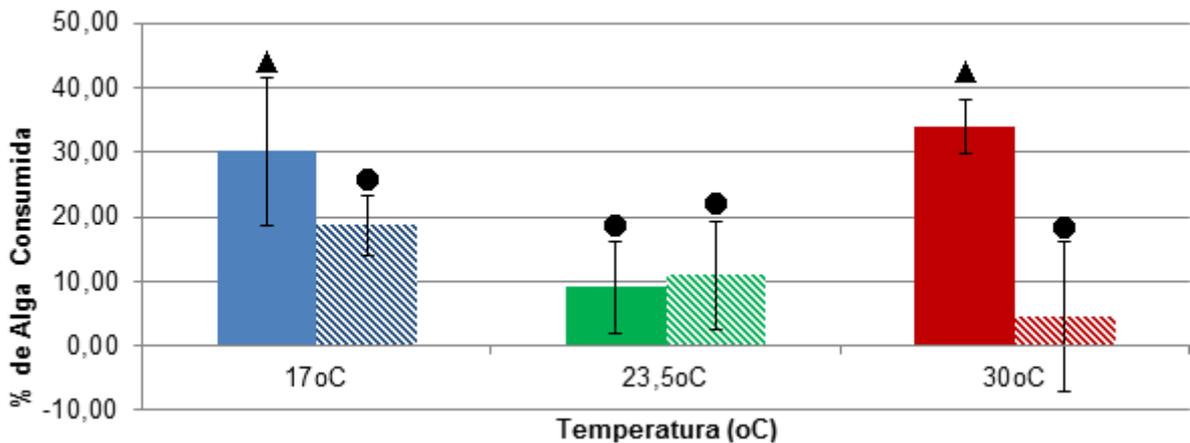


Figura 5: Porcentagem média de células de algas consumidas por *Ceriodaphnia dubia* nas condições 17°C Controle (■); 17°C 0,13 µg L⁻¹ (▨); 23,5°C Controle (■); 23,5°C 0,13 µg L⁻¹ (▨); 30°C Controle (■); 30°C 0,13 µg L⁻¹ (▨); Símbolos diferentes (▲, ●) representam diferença estatística segundo ANOVA Tukey Post Hoc test $p < 0,05$. As barras de erro expressão o desvio padrão das amostras.

Tabela 3: Resultados da CE₅₀ (toxicidade agudo) e CI₂₀ (toxicidade crônica) de Carbofurano para *C. dubia* para os parâmetros avaliados nas temperaturas 17°C; 23,5°C e 30°C (Intervalo de Confiança 95%). N/D – não determinado

Parâmetro	17°C	23,5°C	30°C
CE ₅₀ (µg L ⁻¹)	2,71 (2,54 – 2,90)	2,83 (2,36 – 3,39)	1,94 (0,8 – 2,69)
Fecundidade Média (neonatos/ninhada) (µg L ⁻¹)	0,09 (0,006 – 0,14)	0,15 (0,06 – 0,19)	0,007 (0,0045 – 0,07)
Idade na Primeira Ninhada (µg L ⁻¹)	N/D	N/D	N/D
Crescimento Populacional (µg L ⁻¹)	0,51	0,26	0,05 (0,01 – 0,11)

6.3 – PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS AVALIADOS DURANTE OS TESTES

De acordo com os métodos padronizados da ABNT, foram medidos parâmetros físico-químicos no começo e no fim de cada teste. Os parâmetros avaliados foram: Oxigênio dissolvido, dureza e pH e seus resultados estão descritos na tabela abaixo (Tabela 4). Segundo a norma da ABNT (2010)⁹⁴ O pH do meio deve ser mantido entre 7 e 7,6 e a dureza da água entre 40 e 48 mg de CaCO₃/L, com oxigênio dissolvido superior a 4mg/L. Assim, os resultados obtidos em nossos testes podem ser considerados válidos por estarem dentro da faixa aceitável.

Tabela 4: Parâmetros físico-químicos avaliados durante os testes.

	Oxigênio Dissolvido (mgL ⁻¹ O ₂)	Dureza (mgL ⁻¹ CaCO ₃)	pH
17°C Controle (Inicial – Final)	6,5 – 6,4	40,5 – 40,1	7,27 – 7,47
17°C Maior Concentração (Inicial – Final)	6,6 – 6,4	43,8 – 44,7	7,26 – 7,53
23,5°C Controle (Inicial – Final)	6,5 – 6,4	40,5 – 40,3	7,2 – 7,4
23,5°C Maior Concentração (Inicial – Final)	6,6 – 6,4	47,1 – 42,0	7,4 – 7,5
30°C Controle (Inicial – Final)	6,6 – 6,4	40,5 – 40,7	7,3 – 7,3
30°C Maior Concentração (Inicial – Final)	6,5 – 6,3	43,7 – 42,2	7,3 – 7,5

7 – DISCUSSÃO

Neste estudo a Fecundidade Média e o crescimento populacional foram menores à temperatura de 17°C, com um retardo na reprodução e um aumento no consumo de alga em relação ao controle. Os resultados encontrados no presente estudo corroboraram aqueles encontrados por Flores *et al.* (2011)¹²² e Savage *et al.* (2004)¹⁵¹, que observaram que temperaturas inferiores reduzem o metabolismo, influenciam negativamente o Crescimento Populacional de *C. dubia* e atrasam o início da reprodução (maturidade), quando comparados com os resultados encontrados para temperaturas mais elevadas. Estes autores afirmam ainda que 15°C é uma temperatura abaixo da faixa ideal para crescimento populacional, corroborando com o presente estudo, que encontrou em 17°C uma faixa de temperatura inferior a ideal para o crescimento populacional. Outros estudos que avaliaram o efeito da temperatura sobre cladóceros descrevem que a redução no metabolismo pode ser explicada pela maior alocação de energia no crescimento e menor na reprodução. Assim, em temperaturas mais baixas os organismos serão maiores e com fecundidade médias menores^{146,141,144,148}. Segundo Lynch (1977)¹⁴¹, a taxa de crescimento diminui com o início da reprodução e que o aumento do esforço reprodutivo reduz o crescimento futuro. Uma vez que os organismos estão alocando energia no crescimento e mudas, a reprodução fica prejudicada, no entanto a demanda por alimento é aumentada para suprir a necessidade de energia para este crescimento^{140,144}.

A fecundidade média, idade na primeira e terceira reprodução foram reduzidas em 30°C, enquanto o consumo de alga foi superior e o crescimento populacional foi similar ao controle. Este resultado mostra concordância com o estudo de *Daphnia laevis*⁸¹, onde se observou uma diminuição na população desta espécie quando as temperaturas ficam acima daquela propícia para seu desenvolvimento, demonstrando que a longo prazo o aumento da temperatura seria prejudicial à densidade populacional^{81,140,144,146,148,154}. Khan & Khan (2008)⁹² observaram que para *Daphnia magna* o aumento em até 6°C na temperatura é representado por uma maior atividade, aumento das taxas de respiração, batimentos cardíacos, demanda por oxigênio e das taxas de hemoglobina devido ao aumento do metabolismo e ainda redução no tamanho e massa corporal. O aumento do metabolismo também demanda maior energia, que pode ser suprida pelo aumento

da ingestão de alimento e mobilização da gordura armazenada. Diversos autores descreveram que população diminui, assim como o tamanho do corpo e a produção de ovos, em temperaturas mais altas^{101,102,103,104,140}. A maturidade dos organismos também foi influenciada, ocorrendo precocemente em temperaturas superiores, o que também foi observado para *Daphnia Curvirostris* (exceto redução de tamanho), *Daphnia pulex* e *Daphnia magna*^{142,143,145, 146,149,150}.

Assim, é provável que devido à demanda energética causada pelo aumento do metabolismo ser maior em temperaturas mais elevadas, o esforço reprodutivo seja mais energeticamente custoso para os organismos. A redução do tamanho também influencia a reprodução, já que necessitariam de maior espaçamento para acomodar os embriões, ventilação mais ativa dentro da bolsa embrionária e haveria perda de recursos para aplicar no desenvolvimento dos embriões, fato este que poderia reduzir o potencial de reprodução futura^{149,150,166,167,168,169}. De acordo com o sugerido por Gophen (1976)¹⁴⁰ para *Ceriodaphnia*, além destes fatores outra explicação seria que a respiração se torna mais rápida em temperaturas maiores, não sendo acompanhada pela ingestão e excreção de alimentos, gerando um déficit energético, já que cladóceros usam seus membros torácicos para se alimentar e obter oxigênio. Em temperaturas altas eles batem estes membros mais rápido pra suprir a demanda do aumento do metabolismo por oxigênio, fazendo com que o trato digestório fique cheio mais rápido, já que o processamento do alimento não acompanha a velocidade com a qual o alimento é consumido^{140,144}. Assim o aumento da alimentação e a redução da fecundidade média podem ser explicados pelos custos combinados de desenvolvimento (ou seja, muda) e da respiração causando uma grande demanda de energia e o alocamento da mesma para atender a demanda metabólica do organismo reduzindo a energia disponível para o crescimento somático (reduzindo o tamanho) e reprodução (gerando menos filhotes)¹⁴⁴.

Neste estudo foi encontrada CE₅₀ de Carbofurano para *Ceriodaphnia dubia* na temperatura de 23,5°C (2,83 µg L⁻¹), corroborando o único estudo encontrado, que realizou a avaliação toxicológica de Carbofurano para *C. dubia*. Segundo Norberg-King *et al.* (1991)⁴⁷, a CL₅₀ (48h) de Carbofurano para *C. dubia* foi de 2,6 µg L⁻¹ na temperatura de 25°C (EPA R-20-04, 2009). Para Iwai *et al.* (2011)⁴⁸ a CL₅₀ de Carbofurano para *Moina Micrura* foi de 6,96 µg L⁻¹. Para *Daphnia magna* diversos valores foram encontrados: 86,1 µg L⁻¹¹⁷⁰ e 18,7 µg L⁻¹¹. A comparação entre os

resultados descritos na literatura, mostram que nossos resultados apresentam-se na mesma ordem de magnitude dos resultados de outros estudos estando dentro de um nível de variação aceitável para comparações inter-laboratoriais.

Ainda no do tocante à CL_{50} , observou-se que *Ceriodaphnia dubia* foi igualmente sensível ao inseticida Carbofurano nas temperaturas 17 e 23,5°C. O mesmo não pode ser observado na temperatura 30°C, que apresentou uma sensibilidade maior que as temperaturas inferiores. Este resultado indica que a temperatura superior pode ser mais estressante para o organismo que temperaturas mais baixas, tornando o organismo mais sensível. Cairns *et al.* (1975)¹⁵⁷ enfatizaram que a interação de organismos com algumas substâncias tóxicas é complexa, podendo ser mais letal em temperaturas mais altas, enquanto a toxicidade de alguns outros produtos químicos podem não ser afetada por temperaturas elevadas.

Diversos estudos demonstraram que macroinvertebrados foram mais sensíveis a contaminantes químicos com o aumento da temperatura^{52,123,124,156}. Ao comparar os resultados obtidos no presente estudo com os encontrados na literatura, foi possível observar que *C. dubia* apresentou maior sensibilidade que os outros cladóceros testados (Tabela 2), mostrando que esta espécie é uma boa bioindicadora de toxicidade para ambientes de água doce^{1, 47, 48}.

Apesar da CE_{50} em 30°C ter apresentado diferença estatística em relação ao controle, em 17°C isto não pode ser observado. Nos testes crônicos foi possível caracterizar melhor os efeitos combinados com as temperaturas testadas. Os parâmetros fecundidade média e crescimento populacional foram os mais afetados pelas temperaturas de 17°C e 30°C do que em 23,5°C. Já o consumo de alga apresentou uma redução nas amostras que continham carbofurano, quando comparado com o consumo em amostras que não continham carbofurano nas temperaturas 17 e 30°C, esta resposta não foi observada na temperatura 23,5°C.

Estes resultados demonstram que o efeito combinado dos estressores influenciou os parâmetros de vida dos organismos testados. Segundo Moore & Folt (1993)¹⁴⁴ comportamentos associados com forrageamento (taxas de ingestão, natação e velocidade de respiração) são reduzidos na presença de substâncias tóxicas em concentrações subletais e estes comportamentos podem reduzir o tamanho dos organismos^{171,172,173}.

No presente estudo as Cl_{20} em 23,5°C foram de 0,15 μgL^{-1} (0,066– 0,19 μgL^{-1}) para Fecundidade Média. Estes resultados são comparáveis aos observados por

Norberg-King *et al.* (1991)⁴⁷ que encontraram a CENO de 1,3 $\mu\text{g L}^{-1}$ a 25°C de Carbofurano para *C. dubia* e com os resultados de Iwai *et al.* (2011)⁴⁸, onde a CENO de Carbofurano para *Moina Micrura* foi de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ enquanto a CEO foi de 2,5 $\mu\text{g L}^{-1}$.

O fato da Fecundidade Média apresentar o maior CI₂₀ na temperatura de 23,5°C, demonstra que o estresse térmico aumenta a suscetibilidade de *Ceriodaphnia dubia* ao inseticida Carbofurano. Este padrão foi observado tanto em temperaturas mais baixas como nas mais altas em relação à temperatura controle. Neste caso, a Fecundidade Média em 17°C foi afetada em uma concentração superior àquela observada em 30°C e isso pode ser justificado pelo metabolismo em 17°C ser mais lento que em 30°C, o que torna o organismo menos suscetível ao composto químico.

Em 17 e 30°C, *C. dubia* consumiu menos alga em amostras contendo Carbofurano, em relação ao controle. Este resultado demonstra um efeito combinado dos estressores sobre *C. dubia*. Estes resultados corroboram com os efeitos sobre a Fecundidade Média na qual *C. dubia* foi mais sensível ao Carbofurano nas temperaturas extremas do que em 23,5°C.

No Brasil Carbofurano já foi encontrado em amostras de bacias hidrográficas em concentrações entre 23,97 e 122,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ ³⁴, estes valores são superiores àqueles estabelecidos como padrão internacional de tolerância para Carbofurano em água potável que determinam 7,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ ⁵⁰; 10,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ ¹⁷⁴; 40,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ ¹⁷⁵; 90 $\mu\text{g L}^{-1}$ ¹⁷⁸. Estas concentrações ainda são mais elevadas do que a que exerce efeito agudo em *C. dubia* sob condições ideais de sobrevivência. Esta constatação expressa a necessidade de revisão da legislação, já que a água potável não deve apresentar efeito agudo sobre bioindicadores ou a biota. Estes valores expressam também que as concentrações ambientais encontradas no Brasil tem potencial para causar danos graves a corpos d'água e impactar toda a cadeia alimentar e o ecossistema expostos a este contaminante. Assim, é importante atentar para o uso racional e seguindo as normas de manejo dos pesticidas aplicados em lavouras no Brasil, como por exemplo o período de aplicação, com o objetivo de evitar a contaminação de ambientes aquáticos e o impacto a organismos não-alvo e a biota de forma geral.

8 - CONCLUSÃO

O aumento e diminuição da temperatura intensificaram o efeito tóxico do carbofurano para *C. dubia*. Este efeito foi melhor observado em testes de toxicidade crônica do que em testes de toxicidade aguda, demonstrando a importância do uso deste tipo de bioensaio para monitoramento de ambientes impactados. Os parâmetros Fecundidade Média e Crescimento populacional foram bons indicadores para o teste de toxicidade crônica. São, portanto, ferramentas interessantes para o uso rotineiro pelas agências ambientais.

O ambiente aquático é dinâmico e diverso e o uso de concentrações limites são necessárias, mas não são eficazes para garantir a proteção da biota. A interferência de outros fatores ambientais, como a temperatura, pode transformar os efeitos tóxicos e por isso o uso de bioensaios é fundamental para o monitoramento. Em um país de dimensões continentais, como o Brasil, com uma variedade de ecossistemas e uma grande diversidade biológica, uma legislação nacional apenas não é suficiente para evitar impactos a nível local. Ainda há necessidade de avaliações locais, com legislações específicas, visando reduzir ao máximo os impactos causados por atividades antrópicas no ambiente. Assim, estudos de fatores combinados, como o presente, são importantes para criação de um banco de dados para inferir sobre a criação de limites de concentrações menos danosas à biota.

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Dobsikova, R. Acute toxicology of carbofuran to selected species of aquatic and terrestrial organisms. *Journal of Plant Protection Science*, v. 39, n^o. 3, p. 103-108, ISSN 1212-2580, 2003.
- 2 Barbash, J. E. *The Geochemistry of Pesticides: Treatise on Geochemistry. . Environmental Geochemistry*. 2007. 9(9.15): 541–577.
- 3 Zhang, W. J.; Jiang, F. B.; Ou, J. F. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Sciences*, 2011. 1(2):125-144,
- 4 Gu, X. J.; Tian, S. F. Pesticides and cancer. *World Sci-tech R & D*. 2005. 27(2): 47-52.
- 5 Siqueira, S. L.; Kruse, M. H. L. Agrotóxicos e saúde humana: contribuição dos profissionais do campo da saúde. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*. 2008. 42(3): 584-590
- 6 Liu, L. H.; Zhong, L. Q.; Li, M. Q. An epidemiological review on pesticide poisoning in China. *China Occupational Medicine*. v. 35, n. 6, p. 518-520, 2008.
- 7 SINDAG, Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. Vendas de Defensivos Agrícolas são Recordes e vão a US\$ 8,5 Bi em 2011.2012. Disponível em: <http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2256>. Acesso em: 24 Jan. 2014.
- 8 Dorough, H. W. Metabolism of carbamate insecticides. U.S. Environ. Protection Agency Rep. 650/1-74-002. p. 244, 1973.
- 9 Palmer, J. S.; Schlinke, J. C. Toxic effects of carbofuran in cattle and sheep. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 1973. 162: 561-563
- 10 U.S. EPA. Initial scientific and minieconomic review of Carbofuran. Substitute chemical program. EPA/540/1-76/009. 187 p. Washington, DC.: Environmental Protection Agency, 1976
- 11 Finlayson, D. G.; Graham, J. R.; Greenhalgh, R.; Roberts, J. R.; Smith, E. A. H.; Whitehead, P.; Willes, R. F.; Williams, I. Carbofuran: criteria for interpreting the effects of its use on environmental quality. National Research Council. Canada, p. 191, 1979.
- 12 Flickinger, E. L.; King, K. A.; Stout, W. F.; Mohn, M. M. Wildlife hazards from Furadan 3 G applications to rice in Texas. *Journal of Wildlife Management*. 1980. 44: 190-197.

- 13 Eisler, R. Carbofuran Hazards to Fish, Wildlife, and Invertebrates: A Synoptic Review. U.S. Fish Wild Service Biological Report 85 (1.3), p. 36. Contaminant Hazard Reviews n. 3, 1985.
- 14 Mora, A.; Comejo, J.; Revilla, E.; Hermosin, M. C. Persistence and degradation of Carbofuran in Spanish soil suspensions. *Chemosphere*. 1996. 32: 1585–1598
- 15 Richards, R. P.; Kramer, J. W.; Baker, D. B.; Krieger, K. A. Pesticides in rainwater in the northeastern United States. *Nature*. 1987. 327: 129-131
- 16 Waite, D. T.; Grover, R.; Wescott, N. D.; Sommerstad, H.; Karr, L. Pesticides in ground water, surface water and spring runoff in a small Saskatchewan watershed. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1992. 11: 741–748
- 17 Fisher, S. J.; Galinat, G. F.; Brown, M. L. Acute toxicity of Carbofuran to adult and juvenile flathead chubs. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 1999. 63: 385-391.
- 18 Farm Chemicals Handbook. v. 87. Meister Publishing Company. 2001.
- 19 U.S. EPA. Carbofuran: Receipt of Application for Emergency Exemption. Solicitation of Public Comment. Docket ID #OPP-2002- 0124. Washington, DC: Environmental Protection Agency, 2002.
- 20 Mackay, D.; Sharpe, S.; Cahill, T.; Gouin, T.; Cousins, I.; Toose, L. Assessing the Environmental Persistence of a Variety of Chemical Substances Including Metals. Canadian Environmental Modelling Center. 52p., 2001.
- 21 Anton, F. A.; Laborada, E.; Laborda, P.; Ramos, E. Carbofuran acute toxicity to fresh-water algae and fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 1993. 50: 400–406.
- 22 Yen; Jui-Hung; Hsiao; Fang-Lan; Wang; Yei-Shung. Assessment of the Insecticide Carbofuran's Potential to Contaminate Groundwater through Soils in the Subtropics. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1997. 38: 260-265.
- 23 Rubin, A. L. Risk Characterization Document: Carbofuran. Department of Pesticide Regulation. California Environmental Protection Agency, 2006.
- 24 Yu, C. C.; Booth, G. M.; Hansen, D. J.; Larsen, J. R. Fate of Carbofuran in a Model Ecosystem. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1974. 22(3): 431-434
- 25 Seiber, J. N.; Catahan, M. P.; Barril, C. R. Loss of Carbofuran from Rice Paddy Water: Chemical and Physical Factors. *Journal of Environmental Science and Health, Part, B*. 1978. 13(2): 131-148

- 26 Brahma Prakash, G. P.; Panda, S.; Sethunathan, N. Relative Persistence of Hexachlorocyclohexane, Methyl Parathion, and Carbofuran in an Alluvial Soil Under Flooded and Non-flooded conditions. *Agricultural Ecosystems and the Environment*. 1987. 19: 29-39.
- 27 Talebi, K., C.H. Walker. A Comparative Study of Carbofuran Metabolism in Treated and Untreated Soils. *Pesticide Science*. 1993. 39: 65-69
- 28 Bachman, J.; Patterson, H. H. Photodecomposition of the Carbamate Pesticide Carbofuran: Kinetics and the Influence of Dissolved Organic Matter. *Environmental Science Technology*. 1999. 33: 874-881.
- 29 Harris, C. R.; Chapman, R. A.; Harris, C.; Tu, C. M. Biodegradation of Pesticides in Soil: Rapid Induction of Carbamate Degrading Factors After Carbofuran Treatment. *Journal of Environmental Science and Health – Part B*. 1984. 19: 1-11.
- 30 Turco, R. F.; Konopka, A. Biodegradation of Carbofuran in Enhanced and Non-enhanced Soils. *Soil Biology and Biochemistry*. 1990. 22: 195-201
- 31 Scow, K. M.; Merica, R. R.; Alexander, M. Kinetic Analysis of Enhanced Biodegradation of Carbofuran. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1990. 38: 908-912
- 32 Parkin, T. B.; Shelton, D.R. Modeling Environmental Effects on Enhanced Carbofuran Degradation. *Pesticide Science*. 1994. 40: 163-168
- 33 Raha, P.; Das, A. K. Photodegradation of Carbofuran. *Chemosphere*. 1990. 21(1-2): 99-106
- 34 Deuel, L. E.; Price, J. D.; Turner, F. T.; Brown, K. W.; Persistence of Carbofuran and its metabolites, 3-keto and 3-hydroxy Carbofuran, under flooded rice culture. *Journal of Environmental Quality*. 1979. 8(1): 23-26
- 35 Santos, M. G. S. Determinação de Resíduos de Carbofuran e do Metabólito 3-Hidroxi-Carbofuran em Águas de Lavouras de Arroz Irrigado em Santa Catarina. 2007. 121 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.
- 36 Lalah, J. O.; Wandiga, S. O.; Dauterman, W. C. Mineralization, Volatilization, and Degradation of Carbofuran in Soil Samples from Kenya. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 1996. 56: 37-41.
- 37 Leão, J. C. Estudo do movimento do Carbofuran no perfil de um solo agrícola. 1997. 96 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária Ambiental) Faculdade de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, 1997.
- 38 Kumari, K.; Singh, R. P.; Saxena, S. K. Movement of Carbofuran (Nematicide) in Soil Columns. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1988. 16: 36-44.

- 39 Sharom, M. S.; Miles, J. R. W.; Harris, C. R.; McEwen, F. L. Behaviour of 12 Insecticides in Soil and Aqueous Suspensions of Soil and Sediment. *Water Research*. 1980.14: 1095-1100
- 40 Johnson, W. G.; Lavy, T. L. Organic Chemicals in the Environment. *Journal of Environmental Quality*. 1995. 24: 487-193.
- 41 U.S. EPA. Reregistration Eligibility Decision for Carboruran. Office of Pesticide Programs. Washington, DC: Environmental Protection Agency, 2007.
- 42 Trotter, D. M.; Kent, R. A.; Wong, M. P. Aquatic fate and effect of Carbofuran. *Critical Reviews in Environmental Control*. 1991. 21: 137–176
- 43 Jager, T.; Albert, C.; Preuss, T. G.; Ashauer, R. General Unified Threshold Model of Survival - a Toxicokinetic-Toxicodynamic Framework for Ecotoxicology. *Environmental Science Technology*. 2011. 45: 2529–2540
- 44 Gupta, R. C. Carbofuran toxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 1994. 43: 383–418.
- 45 Ameno, K.; Lee, S. K.; IN, S. W.; Yang, J. Y.; Yoo, Y. C.; AMENO, S.; KUBOTA, T.; KINOSHITA, H.; IJIRI, I. Blood carbofuran concentrations in suicidal ingestion cases. *Forensic Science International*. 2001. 116: 59–61.
- 46 Erwin; Nathan; Winter. Carbofuran and Bird Kills: Regulation at a Snail's Pace. *Journal of Pesticide Reform*. 1991. 11(4): 15-17.
- 47 DPR.Ecotox Database.Ground Water Database. In: Environmental Monitoring Branch. California Department of Pesticide Regulation, 2002.
- 48 Norberg-King, T.J., Durhan, E.J. Ankley, G.T; Robert, E. Application of Toxicity Identification Evaluation Procedures to the Ambient Waters of the Colusa Basin Drain, California. *Environmental Contamination and Toxicology*, 1991. 10: 891-900
- 49 Iwai, C. B.; Somparn, A.; Noller, B. Using Zooplankton, *MoinaMicruraKurz* to Evaluate the Ecotoxicology of Pesticides Used in Paddy Fields of Thailand.In MARGARITA S. M. *Pesticides in the Modern World - Risks and Benefits*.Ed. InTech. p.560. 2011.
- 50 Poirier, S. Memorandum: Memo to R Spehar, Aug.29, U.S. Environmental Protection Agency, National Water Quality Laboratory, Duluth. MN, 1990.
- 51 WHO. World Health Organization. Guidelines for drinking-water quality. 4 ed. WHO. 564p. 2011.
- 52 Golombieski, J. I.; Marchesan, E.; Camargo, E. R.; Reimche, G. B.; Zanella, R.; Storck, L. Efeitos do Carbofuran, Metsulfurom-Metílico e Azinsulfurom na Sobrevivência de Carpas e Produção de Arroz e Peixes em Rizipiscicultura. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*. Curitiba. 2007. 17: 59-66.

- 53 Barroso, M. F. S. Efeitos ecotoxicológicos de pesticidas e fatores abióticos em *Daphnia magna*. Dissertação (Mestrado). Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar – Universidade do Porto, 2009.
- 54 Altindag, A.; Ergonul, M.B.; Yigit, S.; Baykan, O. The acute toxicity of lead nitrate on *Daphnia magna* Straus. African Journal of Biotechnology, 2008. 23(7): 4298- 4300.
- 55 Palma, P.; Palma, V.L.; Matos, C.; Fernandes, R.M.; Bohn, A.; Soares, A.M.V.M.; Barbosa, I.R. Effects of atrazine and endosulfansulphate on the ecdysteroid system of *Daphnia magna*. Chemosphere. 2009. 74: 676–681
- 56 Liu, S. S.; Song, X. Q.; Liu, H. L.; Zhang, Y. H.; Zhang, J.; Combined photobacterium toxicity of herbicide mixtures containing one insecticide. Environment International. 2009. 34: 773–781
- 57 De-Lamonica-Freire, M.E. ; DORES, E.F. Contaminação do Ambiente aquático por pesticidas, estudo do caso: águas usadas para consumo humano em primavera do leste, Mato Grosso – Análise preliminar. Química Nova. 2001. 1(24): 27–36.
- 58 Nakagome, F. K.; Noldin, J. A.; Resgalla Jr., C. Toxicidade aguda e análise de herbicidas e inseticidas utilizados na lavoura do arroz irrigado sobre o cladóceros *Daphnia magna*. Pesticidas: Ecotoxicologia e Meio Ambiente. 2006. 16: 93 –100
- 59 Hodgson, E. A Textbook of Modern Toxicology. 3. ed. Cap. 1, Introduction to Toxicology. John Wiley & Sons, Inc. 2004.
- 60 Cooney, J. D. Freshwater tests. In: RAND, G.M. (ed) Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate And Risk Assessment. CRC, New York, p. 71-102, 1995.
- 61 Walker, C. H.; Hopkin, S.P.; Sibly, R.M.; Peakall, D.B. Principles of ecotoxicology. 2Ed. Taylor & Francis, New York. 309 pp. 2001.
- 62 The Society Of Toxicology. Animals in Research: The Importance of Animals in the Science of Toxicology. p. 12, 2006.
- 63 Rand, G. M. Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment. 2 ed. North Palm Beach, Florida: Taylor & Francis. 1125p, 1995.
- 64 Brentano, D. M. Desenvolvimento e Aplicação do teste de toxicidade crônica como *Daphnia Magna* Avaliação de Efluentes Tratados de um Aterro Sanitário. Dissertação (Mestrado). UFSC, 2006.
- 65 Brasil. Ministério Do Meio Ambiente. Conselho Nacional Do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 430 de 13 de maio de 2011

- 66 Brasil. Ministério Do Meio Ambiente. Conselho Nacional Do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 357 de 17 de março de 2005
- 67 Millennium Ecosystem Assessment: A Toolkit for Understanding and Action. Protecting Nature's Services. Protecting Ourselves. Island Press. 23p. 2007
- 68 Maund, S.; Barber, I.; Dulka, J.; Gonzalez-Valero, J.; Hamer, M.; Heimbach, F.; Marshall, M.; Mccahon, P.; Staudenmaier, H.; Wustner, D. Development and Evaluation of Triggers for Sediment Toxicity Testing of Pesticides With Benthic Macroinvertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1997. 16(12): 2590–2596
- 69 Bailey, H. C.; Digiorgio, C; Kroll, K.; Miller, J. L.; Hinton, D. E.; Starrett, G. Development Of Procedures For Identifying Pesticide Toxicity In Ambient Waters: Carbofuran, Diazinon, Chlorpyrifos. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1996. 15(6): 837–845.
- 70 Matias, W. G. Etude des mecanismes moleculaire d'action de l'acide okadaïque, une toxine marine diarrheique, in vivo et in vitro. Tese (Doutorado em Toxicologia Ambiental). Universite de Bordeaux, Bordeaux, França,p.183, 1996.
- 71 Knie, J. L. W.; Lopes, E. W. B. Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA/GTZ. 289 p., 2004.
- 72 Lobo, E. A.; Callegaro, V. L. Avaliação da qualidade de águas doces continentais com base em algas diatomáceas epilíticas: Enfoque metodológico. p. 277- 300. In: TUCCI, C. E. M. & MARQUES, D. M. (Org.), Avaliação e Controle da Drenagem Urbana. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS. p. 558,2000.
- 73 Zagatto, P. A.; Goldstein, E. G; Bertoleti, E. Toxicidade de Efluentes Industriais na Bacia do Rio Piracicaba. *Revista CETESB de Tecnologia – Ambiente*. 1988. 1(2): 39-42.
- 74 Bohrer, M. B. Biomonitoramento das lagoas de tratamento terciário do sistema de tratamento dos efluentes líquidos industriais (SITEL) do pólo petroquímico do sul, Triunfo, RS, através da comunidade zooplanctônica. Tese (Doutorado em Ciências) - UFSCar, São Paulo.p.469,1995.
- 75 Goldstein, E. G. Testes de toxicidade de Efluentes Industriais. *Revista CETESB de Tecnologia – Ambiente*. 1988. 1(1): 33-37.
- 76 Guilhermino, L. Modelos e sistemas de avaliação da toxicidade de substâncias químicas. Tese (Doutorado). Universidade de Coimbra. 197 pp. 1996.
- 77 Guilhermino, L.; Lopes, M. C.; Carvalho, P. A.; Soares, A. M. V. M. Inhibition of acetylcholinesterase activity as effect criterion in acute tests with juvenile *Daphnia magna*. *Chemosphere*. 1996. 4(32): 721-738.

- 78 Diamantino, T. C.; Guilhermino, L.; Almeida, E.; Soares, A. M. V. M. Toxicity of Sodium Molybdate and Sodium Dichromate to *Daphnia magna* Straus. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2000. 45: 253-259.
- 79 Diamantino, T. C.; Almeida, E.; Soares, A. M. V. M.; Guilhermino, L. Lactatedeshydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphniamagna* Straus. *Chemosphere*. 2001. 45: 553-560.
- 80 Ferreira, A. L. G.; Loureiro, S.; Soares, A. M. V. M. Toxicity prediction of binary combinations of cadmium, carbendazim and low dissolved oxygen on *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*. 2008. 89: 28–39
- 81 Brandão, L. P. M. Efípios de *Daphnia Laevis* em Um Lago Permanente Tropical – Mecanismo de Resiliência a Alterações Ambientais. Dissertação (Mestrado) UFMG, 2009.
- 82 Peters, R. H.; De Bernardi, R. (Eds.). *Memorie Dell'Istituto Italiano dildrobiologia* Dott. Marco de Marchi, v. 45, *Daphnia*. Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto Italiano dildrobiologia, Verbania, Pallanza, 1987.
- 83 Bottrell, H. H. The relationship between temperature and duration of egg development in some epiphytic Cladocera and Copepoda from the River Thames, reading, with a discussion of temperature functions. *Oecologia* (Berlin). 1975. 18: 63-84.
- 84 Gerritsen, J. Behavioral response of *Daphnia* to rate of temperature change: possible enhancement of vertical migration. *Limnology and Oceanography*. 1982. 27(2): 254-261.
- 85 Brakke, D. F., Davis, R. B.; Kenlan, K. H. Acidification and changes over time in the chydorid Cladocera assemblages of New England lakes. In *Early Biotic Responses Advancing Lake Acidification*. Acid Precipitation Service. 1984. 6: 85–104.
- 86 Vijverberg, J.; Kalf, D. F.; Boersma, M. Decrease in *Daphnia* egg viability at elevated pH. *Limnology and Oceanography*. 1996. 41: 789-794
- 87 Gyllström M.; Hansson, L. A. Dormancy in freshwater zooplankton: Induction, termination and the importance of benthic-pelagic coupling. *Aquatic Science*. 2004. 66: 274–295.
- 88 Edmondson, W. T. Reproductive rate of planktonic rotifers as related to food and temperature in nature. *Ecological Monographs*. 1965. 35: 61-111.
- 89 Rocha O.; Matsumura-Tundisi, T. Growth rate, longevity and reproductive performance of *Daphnia laevis* Birge, *D. gessneri* Herbst and *D. ambigua* Scourfield in laboratory cultures. *Revista Brasileirade Biologia*. 1990. 50: 915–921

- 90 Maia-Barbosa, P. M. Ecologia de cinco espécies de cladóceros de um Lago Amazônico impactado por rejeito de bauxita (Lago Batata, Para-Brasil). Universidade Federal do Rio de Janeiro. Tese (doutorado). , 2000.
- 91 Bunioto, T. C.; Arcifa, M. S. Effects of food limitation and temperature on cladocerans from a tropical Brazilian lake. *Aquatic Ecology*. 2007. 41: 569–578.
- 92 Campbell, N. A.; Reece, J. B. *Biology*. 6. ed. San Francisco: Benjamin Cummings. 2002.
- 93 Khan, M. A. Q.; Khan, M. A. Effect of temperature on waterflea *Daphnia magna* (Crustacean: Cladocera). *Nature Precedings*. 2008.
- 94 Richard, J. Cladoceres recueillis par le Dr. Theod. Barrois en Pelestine, en Syrie et en Égypte. *Revue biologique du nord de la France, Lille*. 1894. 6: 360–378.
- 95 Brasil. ABNT. Associação brasileira de normas tecnicas – NBR – 13373, Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Crônica – Método de Ensaio com *Ceriodaphnia spp.* (Crustacea, Cladocera). 3 ed. de 03 de Dezembro de 2010.
- 96 Gilbert, J. J.; Williamson, C. E. Sexual dimorphism in zooplankton (Copepoda, Cladocera and Rotifera). *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 1983. 14: 1–33.
- 97 Alekseev, V.R.; Starobogatov, Y. I. Types of diapause in Crustacea: definitions, distribution, evolution. *Hydrobiologia*. 1996 320: 15-26.
- 98 Fryer, G., Diapause, a force in the evolution of freshwater crustaceans. *Hydrobiologia*. 1996. 320: 1-14.
- 99 Crispim, M. C.; Watanabe, T. Ovos de resistência de rotíferos presentes em sedimentos secos de um açude no semi-árido paraibano. *ActaLimnologica*. 2000. 12: 89-94.
- 100 Kleiven, Ole T.; Larsson P.; Hobæk, A. Sexual reproduction in *Daphnia magna* requires three stimuli. *Oikos*.1992. 65: 197-206.
- 101 Fairchild, G. W. Movement and micro distribution of *Sidia crystallina* and other littoral micro Crustacea. *Ecology*. 1981. 62(5): 1341-1352.
- 102 Pal, G. Characterization of water quality regions of the Lake of Velence, Hungary with planktonic crustaceans. *Allattani Kozl*. 1980. 67(1-4): 49-58
- 103 Vigerstad, T. J.; Tilly. L. J. Hyper-thermal effluent effects on heleo planktonic Cladocera and the influence of submerged macrophytes. *Hydrobiologia*. 1977. 55(1): 81-86.

- 104 Kititsyna, L. A.; Sergeeva, O. A. Effect of temperature increase on the size and weight of some invertebrate populations in the cooling reservoir of the Kinakhovsk State Regional Electric Power Plant. *Ekologiya*. 1976. 5: 99-102.
- 105 Smagowicz, K. On the zooplankton of Lake Zeribar, Western Iran. *Acta Hydrobiologia*. 1976. 18(1): 89-100
- 106 Katznelson, R. A simplified acute toxicity testing protocol with *Ceriodaphnia dubia*. Alameda Countywide Clean Water Program – Contra Costa Clean Water Program. 25p. 1997.
- 107 Versteeg, D. J.; Sralmans, M.; Duer, S. D.; Janssen, C. *Ceriodaphnia* and *Daphnia*: A comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. *Chemosphere*. 1997. 34(4): 869–892.
- 108 Orr, C.; Foster, S. Methods of culturing and performing toxicity tests with the Australian cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. CSIRO Land and Water. T.R. 20/97. 22p. 1997.
- 109 Hall, J. A.; Golding, L. A. Freshwater Cladoceran (*Ceriodaphnia dubia*): Acute toxicity test protocol. In: Standart methods for whole effluent toxicity testing: development and application. Report no. MFE80205. NIWA report for the ministry for the environment, Wellington, New Zealand. 38p. 1998.
- 110 Stewart, A.; Konetsku, K. Logevity and reproduction of *Ceriodaphnia dubia* in receiving waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1998. 17(6): 1165–1171.
- 111 Norberg-King, T. J.; Durhan, E.; Ankley, G.; Robert, E. Application of toxicity identification evaluation procedures to the ambient waters of the Colusa Basin Drain, California. US EPA – Environmental Protection Agency. 40p. 1988.
- 112 Dyer, S. D.; Stanton, D. T.; Lauth, J. R.; Cherry, D. S. Structure-Activity relationships for acute and chronic toxicity of alcohol ether sulfates. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2000. 19(3): 608–616.
- 113 Scott, G.; Crunkilton, R. L. Acute and chronic toxicity of nitrate to fathead minnows (*Pimephales promelas*), *Ceriodaphnia dubia*, and *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2000. 19(12): 2918–2922.
- 114 Wernwe, I.; Deanovic, L. A.; Connor, V.; Vlaming, V.; Bailey, H. C.; Hinton, D. E. Insecticide-caused toxicity to *Ceriodaphnia dubia* (cladocera) in the sacramento-San Joaquin river delta, California, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2000. 19(1): 215–227.
- 115 Rose, R. M.; Warne, M. S. T. J.; Lim, R. P. The presence of chemicals exuded by fish affects the life-history response of *Ceriodaphnia cf. Dubia* to chemicals with different mechanisms of action. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2001. 20(12): 2892–2898

- 116 Bielmyer, G. K.; Bell, R. A.; Klaine, S. J. Effects of ligand-bound silver on *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2002. 21(10): 2204–2208.
- 117 Sherrard, R. M.; Murray-Gulde, C. L.; Rodgers Jr., J. H.; Shah, Y. T. Comparative toxicity of Chlorothalonil: *Ceriodaphnia dubia* and *Pimephales promelas*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2003. 56: 327–333.
- 118 Henry, T. B.; Kwon, J. W.; Armbrust, K. L.; Black, M. C. Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2004. 23(9): 2229–2233.
- 119 Keithly, J.; Brooker, J. A.; DeForest, D. K.; Wu, B. K.; Brix, K. V. Acute and chronic toxicity of nickel to a cladoceran (*Ceriodaphnia dubia*) and an amphipod (*Hyalella Azteca*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2004. 23(3): 691–696.
- 120 Biological test method: test of reproduction and survival using the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. Environmental Science and Technology Center, Environment Canada – 2 ed. 100p. 2007
- 121 Manar, R.; Vasseur, P.; Bessl, H. Chronic toxicity of Chlordane to *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia*: A comparative study. *Environmental Toxicology*. 2010. 90–97.
- 122 Sherrard, R. M. *Ceriodaphnia dubia*: whole sediment survival and reproduction toxicity teste results. Environmental enterprises USA, INC. Pearl Acres Road, Suite D. 38p. 2011
- 123 Flores, J. L. G.; Salas, M. E, H.; Sarma, S. S. S.; Nandini, S. Somatic and population growth responses of *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia pulex* (Cladocera) to changes in food (*Chlorella vulgaris*) level and temperature. *Journal of Environmental Biology*. 2011. 32: 489 – 495.
- 124 Fisher, S. W.; Wadleigh, R. W. Effects of temperature on the acute toxicity and uptake of lindane by *Chironomus riparius* (Meigen) (Diptera: Chironomidae). *Journal of Economic Entomology*. 1985. 78: 1222-1226.
- 125 Heugens, E. H. W.; Hendriks, A. A. J.; Dekker, T.; Van Straalen, N. M.; Admiraal, W. A Review of the Effects of Multiple Stressors on Aquatic Organisms and Analysis of Uncertainty Factors for Use in Risk Assessment. *Critical Reviews in Toxicology*. 2001. 31(3): 247–284.
- 126 Song, M. Y.; Stark, J. D.; Brown, J. J. Comparative toxicity of four insecticides, including imidacloprid and tebufenozide, to four aquatic arthropods. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 1997. 16: 2494–2500
- 127 Maslin, M. *Global Warming: A Very Short Introduction*. Oxford: Oxford University Press, 2004.

- 128 Oetken, M.; Jagodzinski, L. S.; Vogt, C.; Jochum, A.; Oehlmann, J. Combined effects of chemical and temperature stress on *Chironomus riparius* populations with differing genetic variability. *Journal of Environmental Science and Health. Part A.* 2009. 44: 955–962
- 129 Vogt, C.; Belz, D.; Galluba, S.; Nowak, C.; Oetken, M.; Oehlmann, J. Effects of cadmium and tributyltin on development and reproduction of the non-biting midge *Chironomus riparius* (Diptera)—baseline experiments for future multi-generation studies. *Journal of Environmental Science and Health Part, A.* 2007. 42: 1–9
- 130 IPCC, Intergovernmental Panel On Climate Change. FIELD, C. B.; BARROS, V.; STOCKER, T. F.; QIN, D.; DOKKEN, D. J.; EBI, K. L.; MASTRANDREA, M. D.; MACH, K. J.; PLATTNER, G. K.; ALLEN, S. K.; TIGNOR, M.; MIDGLEY, P. M. (eds.). *Managing the Risks of Extreme Events and Disasters to Advance Climate Change Adaptation. A Special Report of Working Groups I and II of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Cambridge University Press, Cambridge, UK, and New York, NY, USA, 582 pp., 2012.
- 131 Thomas, C. D.; Cameron, A.; Green, R. E.; Bakkenes, M.; Beaumont, L. J.; Collingham, Y. C.; Erasmus, B. F.; Siqueira, M. F.; Grainger, A.; Hannah, L.; Hughes, L.; Huntley, B.; Van Jaarsveld, A. S.; Midgley, G. F.; Miles, L.; Ortega-Huerta, M. A.; Peterson, A. T.; Phillips, O. L.; Williams, S. E. Extinction risk from climate change. *Nature.* 2004. 427(6970): 145-8.
- 132 IPCC. *Climate Change 2007. The physical science basis: Summary for policymakers* Intergovernmental Panel on Climate Change. 2007
- 133 Benoit, D. A.; Sibley, P. K.; Juenemann, J. L.; Ankley, G. T. *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 1997. 16(6): 1165 – 1176.
- 134 Airas, S.; Leppänen, M.; Kukkonen, J. V. K. Effects of temperature and oxygen concentration in sediment toxicity testing. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 2008. 70: 475–482.
- 135 Forbes, V. E.; Cold, A. Effects of the pyrethroid esfenvalerate on life cycle traits and population dynamics of *Chironomus riparius* — importance of exposure scenario. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 2005. 24: 78–86.
- 136 Sibley, P. K.; Benoit, D. A.; Ankley, G. T. The significance of growth in *Chironomus tentans* sediment toxicity tests: Relationship to reproduction and demographic endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 1997. 16: 336–345
- 137 Wetzel, R.G.: *Limnology: Lake and river ecosystems*, 3. ed. Academic Press, London. 2001.

- 138 Dodson, S. I.; Frey D. G, Cladocera and other branchiopoda. In: (Eds.: J.H. Thorp and A.P. Covich). Ecology and classification of North American Freshwater Invertebrates. Academic Press, London. p. 850 – 914. 2001.
- 139 Gillooly, J. F. Effect of body size and temperature on generation time in zooplankton. *Journal of Plankton Research*. 2000. 22: 241–251.
- 140 Sarma, S. S. S.; Nandini, S.; Gulati, R. D. Life history strategies of cladocerans : Comparisons of tropical and temperate taxa. *Hydrobiologia*. 2005. 542: 315 – 333.
- 141 Gophen, M. Temperature dependence of food intake, ammonia excretion, and respiration in *Ceriodaphnia reticulata*, Lake Kinneret, Israel. *Freshwater Biology*. 1976. 6(5): 451-455.
- 142 Lynch, M. Fitness and Optimal Body Size in Zooplankton Population. *Ecology*, 58(4): 763-774.
- 143 Brambilla, D. J. Seasonal variation of egg size and number in a *Daphnia pulex* population. *Hydrobiologia*. 1982. 97: 233–248,
- 144 Goss, L. B.; Bunting, D. L. Daphnia development and reproduction: responses to temperature. *Journal of Thermal Biology*. 1983 8: 375–380.
- 145 Moore, M.; FOLT, C. Zooplankton Body Size and Community Structure: Effects of Thermal and Toxicant Stress. *Trends in Ecology & Evolution*. 1993.8 (5): 178–183.
- 146 Atkinson, D. Temperature and organism size: a biological law for ectotherms?. *Advances in Ecological Research*. 1994. 25: 1–58.
- 147 Mckee, D. M.; Ebert, D. (a)The effect of temperature on maturation threshold body-length in *Daphnia magna*. *Oecologia*.1996. 108: 627-630.
- 148 McKee, D.; Ebert, D. (b). The interactive effects of temperature, food level and maternal phenotype on offspring size in *Daphnia magna*. *Oecologia*, 1996. 107: 189–196
- 149 Xie, P.; Iwakuma, T.; Fujii, K. Effect of Available Food and Temperature on the Growth and Reproduction of *Daphnia rosea*. *Journal of freshwater ecology*. 2000. 15(3):379-388.
- 150 Atkinson, D., Morley, S. A., Weetman, D.; Hughes, R. N. Offspring size responses to maternal temperature in ectotherms. In ATKINSON, D.; THORNDYKE, M. (eds), *Environment and Animal Development: Genes, Life Histories and Plasticity*. Bios Scientific Publishers, Oxford, pp. 269–285, 2001.

- 151 Weetman, D.; Atkinson, D. Evaluation of alternative hypotheses to explain temperature-induced life history shifts in *Daphnia*. *Journal of Plankton Research*. 2004. 26(2):107–116
- 152 Savage, V. M.; Gillooly, J. F.; Brown, J. H.; West, G. B.; Charnov, E. L. Effects of body size and temperature on population growth. *The American Naturalist*. 2004. 163: 429-441.
- 153 Pery, A.R.R.; Garric, J. Modelling effects of temperature and feeding level on the life cycle of the midge *Chironomus riparius*: an energy based modelling approach. *Hydrobiologia*. 2006. 553: 59–66.
- 154 Krajcik, D. Thermal tolerance of *daphnia pulex* in relation to their original location and body size. 2010
- 155 Alberta Research Council. Effects of water temperature and treated pulp mill effluent on survival and growth of *Daphnia magna* (Cladocera: Daphnidae) and *Taenionema* (Plecoptera: Taeniopterygidae). Alberta Environment Sustainable Forest Management Research Program, 2000.
- 156 Jiliberto, R.; Acuña, A. Between-species differences in demographic responses to temperature of coexisting cladocerans. *Austral Ecology*. 2007. 32: 766–774.
- 157 Takahashi, I. T.; Cowgill, U. M. P.; Murphy, G. Comparison of Ethanol Toxicity to *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* Tested at Two Different Temperatures: Static Acute Toxicity Test Results. *Bulletin of environmental Contamination and Toxicology*. 1987. 39: 229 – 236.
- 158 Cairns, J. JR. ; Heath, A. G. ; Parker, B. C. The effects of temperature upon the toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Hydrobiologia*. 1975. 47(1): 135–171.
- 159 Cavalcanti, V. A. Avaliação da ecotoxicidade de azo corantes têxteis utilizando *Chironomus xanthus* e *Daphnia similis*. Dissertação (Mestrado) - Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, FIOCRUZ, p. 66, 2010
- 160 Burton G. A. Jr. Assessing the toxicity of freshwater sediments. *Environmental Toxicology Chemistry*. 1991. 10: 1585-1627.
- 161 Brasil. ANVISA. Agência Nacional De Vigilância Sanitária Resolução - RDC No- 10, de 22 de fevereiro de 2008
- 162 Pringle, B. H.; Hissong, D. E. ; Katz, E. L. ; Mulawka, S. T. Trace Metal Accumulation by Estuarine Mollusks. *ASCE Journal of Sanitary Engineering Division*. 1968. 94(3): 455 – 476.
- 163 Edgren, M.; Notter, M. Cadmium uptake by fingerlings of perch (*Perca fluviatilis*) studied by Cd-115m at two different temperatures. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 1980. 24(1): 647–651

- 164 Lampert, W.; Sommer, U. The ecology of lakes and streams. Limnoecology. Oxford University Press, New York 1997.
- 165 Crane, M.; Newman, M. C. What level of effect is a no observed effect? Environmental Toxicology and Chemistry, 2000. 19: 516–519.
- 166 Lürling, M.; Roozen, F.; Van Donk, E.; Goser, B. Response of Daphnia to substances released from crowded congeners and conspecifics. Journal Of Plankton Research. 2003. 25(8): 967 – 978.
- 167 Lee, C. E.; Strathmann, R. R. Scaling of gelatinous clutches: effects of siblings' competition for oxygen on clutch size and parental investment per offspring. American Naturalist., 1998. 151: 293–301.
- 168 Dick, J. T. A.; Falcon, S. E.; Elwood, R. W. Active brood care in an amphipod: influences of embryonic development, temperature and oxygen. Animal Behaviour, 1998. 56: 663–672.
- 169 Sibly, R. M.; Calow, P. Direct and absorption costing in the evolution of life cycles. Journal of Theoretical Biology. 1984. 111: 463–473
- 170 Jonsson, K. I.; Tuomi, J.; Jaremo, J. Pre- and postbreeding costs of parental investment. Oikos. 1998. 83: 424–431.
- 171 U.S. EPA. Environmental Protection Agency Registration of Pesticides Containing Carbaryl, Carbofuran, and Methomyl. Endangered Species Act Section 7 Consultation. EPA R-20-04.591 p. Arlington, Virginia. Environmental Protection Agency, 2009.
- 172 Gliwicz, M. Z.; Sieniawska, A. Filtering activity of Daphnia in low concentrations of a pesticide. Limnology and Oceanography. 1986. 31(1): 1132- 1138.
- 173 Sullivan, B. K., Buskey, E., Miller, D. C. and Ritacco, P.I. Effects of copper and cadmium on growth, swimming and predator avoidance in *Eurytemora affinis* (Copepoda). Marine Biology. 1983. 77(3): 299-306.
- 174 McNaught, D.C. Functional bioassays utilizing zooplankton: a comparison. Hydrobiologia. 1989. 188-189(1): 117-121.
- 175 NHMRC, NRMCC. Australian Drinking Water Guidelines Paper 6 National Water Quality Management Strategy. National Health and Medical Research Council, National Resource Management Ministerial Council, Commonwealth of Australia, Canberra. 1244p. 2011.
- 176 U.S. EPA. Environmental Protection Agency. Basic Information about Carbofuran in Drinking Water. Disponível em: <<http://water.epa.gov/drink/contaminants/basicinformation/carbofuran.cfm#four>>. Acesso em: 24 Jan. 2014.
- 177 Federal Provincial Territorial Committee on Drinking Water. Guidelines for Canadian Drinking Water Quality Summary Table. Health Canada. 2010