

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE QUÍMICA E BIOLOGIA
CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS AMBIENTAIS**

CINTHIA TIEMI TAMARU

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO DECIS® 25 EC EM
*Daphnia magna***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

CURITIBA

2015

CINTHIA TIEMI TAMARU

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO DECIS[®] 25 EC EM
*Daphnia magna***

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso 2, do Curso Superior de Tecnologia em Processos Ambientais do Departamento Acadêmico de Química e Biologia - DAQBI - da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo.

Orientadora: Profa. Dra. Wanessa Algarte Ramsdorf

Coorientadora: Profa. Dra. Adriane Martins de Freitas

CURITIBA

2015

CINTHIA TIEMI TAMARU

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO DECIS® 25 EC EM
*DAPHNIA MAGNA***

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial à obtenção do grau de TECNÓLOGO EM PROCESSOS AMBIENTAIS pelo Departamento Acadêmico de Química e Biologia (DAQBI) do Câmpus Curitiba da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, pela seguinte banca examinadora:

**Membro 1 – Prof. Jefferson Nagata
Universidade Federal do Paraná (UFPR)**

**Membro 2 – Dra. Taynah Vicari
Universidade Federal do Paraná (UFPR)**

**Orientadora – Profa. Dra. Wanessa Algarte Ramsdorf Nagata
Departamento Acadêmico de Química e Biologia (UTFPR)**

Coordenador de Curso – Prof. Ms. Alessandro Feitosa Machado

Curitiba, 27 de novembro de 2015.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a minha mãe que me ensinou a buscar pelos meus sonhos e a nunca desistir e me ensinou a ser quem eu sou.

À minha família, que sempre foram a base de tudo. Sempre me apoiaram em todas as minhas decisões e me ajudaram a conquista-las.

Ao meu namorado, Eduardo, que teve a paciência de me aguentar durante os períodos mais estressantes do trabalho e ainda me levar todos os fim de semana para o laboratório para eu fazer as leituras e os experimentos.

Agradeço a Wanessa, minha orientadora, por toda a paciência que teve me orientando neste trabalho, que durante todo o período de elaboração do trabalho acompanhou todas as mudanças e reviravoltas. Assim como a Profa. Adriane agradeço pela oportunidade de trabalhar com vocês.

Às meninas do laboratório de ecotox, em especial a Eliane que partilhou comigo todos os altos e baixos, os acertos e os erros. Obrigada pelas risadas nos momentos de correria e estresse.

Às minhas chefes, do Centro de Apoio às Promotorias de Meio Ambiente do Ministério Público do Paraná, que sempre me ajudaram e entenderam que era preciso mudar meus horários para o desenvolvimento do meu TCC.

À banca, por terem aceitado ao convite e por terem colaborado com seus conhecimentos.

E a Deus, que sempre me iluminou em meu caminho.

RESUMO

TAMARU, Cinthia Tiemi. **Avaliação da toxicidade aguda do Decis[®] 25 EC em *Daphnia magna***. 2015. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Processos Ambientais) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, 2015.

O uso de produtos químicos para controle de pragas e doenças nas plantações começou na antiguidade. Com o passar do tempo, estes produtos passaram a ser chamados de agrotóxicos e se tornaram indispensáveis na agricultura intensiva para o aumento da produção. O Brasil, devido a sua intensa produção de produtos primários, é um grande consumidor de agrotóxicos. Como grande parte dos agrotóxicos aplicados no solo e nas plantas tendem a se deslocar, principalmente para as águas superficiais e subterrâneas, a avaliação da toxicidade em organismos aquáticos também deve ser considerada para a determinação de concentrações máximas dos compostos e nos cuidados de aplicação, manuseio e descarte das embalagens. Neste contexto, o presente trabalho visou avaliar a toxicidade aguda em *Daphnia magna* do inseticida Decis[®] 25 EC fabricado pela Bayer S/A, que consiste em uma mistura de Deltametrina e solvente aromático. Segundo a Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) do produto Decis[®] 25 EC, a CE₅₀ (48h) da Deltametrina em *Daphnia sp.* é 0,0035 mg/L ($3,5 \cdot 10^{-3}$ mg/L). Foram realizados testes de toxicidade aguda, empregando o microcrustáceo *D. magna*, com a CE₅₀ informada pelo fabricante e concentrações acima (1,25 mg/L; 0,025 mg/L; 0,005 mg/L) e abaixo ($3,5 \cdot 10^{-4}$ mg/L; $3,5 \cdot 10^{-5}$ mg/L; $3,5 \cdot 10^{-6}$ mg/L; $3,5 \cdot 10^{-8}$ mg/L; $3,5 \cdot 10^{-9}$ mg/L) da mesma. As concentrações acima da CE₅₀ apresentaram 100% de imobilidade após 24h, o ensaio com a CE₅₀ da Deltametrina fornecida pelo fabricante resultou em 93% de imobilidade em 24h e 100% de imobilidade em 48h. Apenas nas concentrações $3,5 \cdot 10^{-5}$ mg/L e $3,5 \cdot 10^{-6}$ mg/L foi obtido imobilidade na faixa de 60 a 40%. Os resultados demonstram que a CE₅₀ apresentada pela bula refere-se apenas a Deltametrina e que o solvente aromático, o qual representa 40 a 50% da concentração do Decis[®] 25 EC, pode estar relacionado ao aumento da CE₅₀, tendo sido encontrado uma CE₅₀ de 0,93 ng/L referente ao Decis[®] 25 EC.

Palavras-chave: Agrotóxico. Deltametrina. Bioensaio. Microcrustáceo.

ABSTRACT

TAMARU, Cinthia Tiemi. **Acute Toxicity Assessment of Decis[®] 25 EC in *Daphnia magna***. 2015. 47 f. Course Conclusion Work – Undergraduate Technology in Environmental Processes, Federal University of Technology - Paraná. Curitiba, 2015.

The use of chemicals to control pests and diseases in crops began in antiquity. Over time, these products have come to be called pesticides and have become indispensable in intensive farming to increase production. The Brazil due to its intense production of primary products, is a major consumer of these products. How much of the pesticides applied to the soil and plants tends to move, especially for surface and groundwater, assessment of toxicity to aquatic organisms should also be considered for the determination of maximum concentrations of compounds and the application of care, handling and disposal of packaging. In this context, this study aimed to evaluate the acute toxicity on *Daphnia magna* the insecticide Decis[®] 25 EC manufactured by Bayer S/A, consisting of a mixture of deltamethrin and aromatic solvent. According to the Material Safety Data Sheet - MSDS product Decis[®] EC 25, EC₅₀ (48h) of deltamethrin in *Daphnia sp.* is 0,0035 mg/L ($3,5 \cdot 10^{-3}$ mg/L). Acute toxicity testing was conducted employing the microcrustacean *D. magna*, the EC₅₀ with informed by the manufacturer and the above concentrations (1,25 mg/L; 0,025 mg/L; 0,005 mg/L) and below ($3,5 \cdot 10^{-4}$ mg/L; $3,5 \cdot 10^{-5}$ mg/L; $3,5 \cdot 10^{-6}$ mg/L; $3,5 \cdot 10^{-8}$ mg/L; $3,5 \cdot 10^{-9}$ mg/L) thereof. The above EC₅₀ concentrations showed 100% immobility after 24 hours, the test with the EC₅₀ of deltamethrin provided by the manufacturer resulted in 93% of immobility in 24 and 100% of immobility in 48 hours. Only concentrations $3,5 \cdot 10^{-5}$ mg/L and $3,5 \cdot 10^{-6}$ mg/L was obtained immobility in the range 60-40%. The results demonstrate that the EC₅₀ presented by the leaflet refers only deltamethrin the aromatic solvent, which is 40 to 50% of the concentration of Decis[®] EC 25 increases the EC₅₀, was found with an EC₅₀ of 0.93 ng / L referring to Decis[®] 25 EC.

Keywords: Pesticides. Deltamethrin. Bioassay. Microcrustacean.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Preparo de diluições de KCl.....	17
Tabela 2: Diluições para teste definitivo de toxicidade.....	21
Tabela 3: Resultados de imobilidade de <i>D. magna</i> no teste preliminar – Data: 22/10/2015.....	22
Tabela 4: Resultados de imobilidade de <i>D. magna</i> no teste preliminar – Data: 27/10/2015.....	22
Tabela 5: Resultados de imobilidade de <i>D. magna</i> no teste preliminar – Data: 13/11/2015.....	23
Tabela 6: Resultados de imobilidade de <i>D. magna</i> no teste definitivo – Data: 17/11/2015.....	24
Tabela 7: Resultados de imobilidade de <i>D. magna</i> no teste definitivo – Data: 19/11/2015.....	24
Tabela 8: Resultados de imobilidade de <i>D. magna</i> no teste definitivo – Data: 20/11/2015.....	24
Tabela 9: Resultados de imobilidade de <i>D. magna</i> no teste definitivo – Data: 03/12/2015.....	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fórmula estrutural da Deltametrina, princípio ativo do Decis [®] 25EC	7
Figura 2: Decis [®] 25 EC.....	8
Figura 3: Material para separação de <i>Daphnia magna</i> , sendo (1) rede com malha de 1 mm, para retenção das <i>D. magna</i> adultas; (2) rede com malha 0,75 mm para retenção dos filhotes e (3) rede com alça metálica, para remoção das carcaças.	15
Figura 4: Teste de sensibilidade.....	16
Figura 5: Soluções de Decis [®] 25 EC do teste preliminar.....	18
Figura 6: Teste preliminar com <i>Daphnia magna</i>	19
Figura 7: SM1 (0,5 mg/L de Deltametrina) e SM2 ($4,0 \cdot 10^{-5}$ mg/L) de Decis [®] 25 EC.	20
Figura 8: Soluções de Decis [®] 25 EC do teste definitivo.	20
Figura 9: Gráfico – Porcentagem Média de Imobilidade x Concentração da Deltametrina (Teste Preliminar).....	23
Figura 10: Gráfico – Porcentagem Média de Imobilidade x Concentração da Deltametrina (Teste Definitivo)	25

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ADAPAR	Agência de Defesa Agropecuária do Paraná
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHC	Hexaclorociclohexano
CAS	Chemical Abstracts Service
CCME	Canadian Council of Ministers of the Environment
CE ₅₀	Concentração Efetiva Mediana
CL ₅₀	Concentração Letal Mediana
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiental
CuSO ₄	Sulfato de Cobre
DAQBi	Departamento Acadêmico de Química e Biologia
DDT	Dicloro Difenil Tricloroetano
DL ₅₀	Dose Letal Mediana
EC	Concentrado Emulsionável
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FISPQ	Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos
g/L	Gramas por litro
GABA	Ácido Gama Amino Butírico
IBAMA	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente
K ₂ Cr ₂ O ₇	Dicromato de Potássio
KCl	Cloreto de Potássio
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	Miligrama
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mg/L	Miligrama por litro
µg/L	Micrograma por litro
NBR	Norma Brasileira
ng/L	Nanograma por litro
pH	Potencial Hidrogeniônico

SM	Solução Mãe
USEPA	United States Environmental Protection Agency
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	3
2.1.	AGROTÓXICOS	3
2.1.1.	Classificação dos agrotóxicos	5
2.1.2.	Piretróides	6
2.1.2.1.	Deltametrina	7
2.1.3.	Decis [®] 25 EC	8
2.2.	ECOTOXICOLOGIA	9
2.2.1.	Testes de toxicidade aguda	10
2.2.2.	<i>Daphnia magna</i>	12
3	OBJETIVOS	13
3.1.	OBJETIVO GERAL	13
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
4	MATERIAL E MÉTODOS	14
4.1.	CULTIVO DE <i>DAPHNIA MAGNA</i>	14
4.2.	TESTE DE SENSIBILIDADE	15
4.2.1.	Preparo das soluções para o ensaio de sensibilidade com KCl	17
4.3.	TESTE PRELIMINAR COM O DECIS [®] 25 EC	17
4.4.	TESTE DE TOXICIDADE DO DECIS [®] 25 EC	19
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	22
6	CONCLUSÃO	29
7	REFERÊNCIAS	30
8	ANEXOS	33
	ANEXO A	33
	ANEXO B	36
	ANEXO C	38
	ANEXO D	40
	ANEXO E	42

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios os agrotóxicos estão presentes no cultivo de plantas, porém, apenas após o aparecimento de doenças e da contaminação da água e do solo causados pelo uso destes produtos, foi iniciado um controle sobre sua venda e uso. Mesmo após a divulgação dos malefícios causados pelos agrotóxicos é comum a existência de agricultores que manuseiam estes produtos sem os cuidados necessários. Somado a este fato, o Brasil, um grande consumidor destes produtos, comercializa agrotóxicos, altamente tóxicos ao meio ambiente, que já foram proibidos em outros países (IBAMA, 2009).

Apesar de estas substâncias serem desenvolvidas para atuar em um conjunto de organismos, são potencialmente danosas para todos os organismos vivos expostos.

A partir de 1992, com a divulgação e ênfase do Fórum Internacional Rio-92 em relação às questões de caráter ambiental, entre elas a agroambiental, o tema sobre contaminação no meio rural ganhou nova dimensão, com a proposição e realização de estudos por diversas instituições de pesquisa. Porém, os avanços em pesquisa nesta área foram modestos, caracterizados principalmente por estudos regionalizados ou pontuais, quase sempre associados a teses acadêmicas e com objetivos específicos (EMBRAPA, 2014).

Como grande parte dos agrotóxicos aplicados no solo e nas plantas tende a se deslocar, principalmente para as águas superficiais e subterrâneas (EMBRAPA, 2014), a avaliação da toxicidade em organismos aquáticos também deve ser considerada para a determinação de concentrações máximas dos compostos e cuidados de aplicação, manuseio e descarte das embalagens.

Segundo a EMBRAPA, os inseticidas (um dos tipos de agrotóxicos) são os principais agentes de intoxicação entre os agrotóxicos de uso agrícola e empregados em ambientes domésticos e públicos. Quimicamente, esta classe de defensivos agrícolas, pode ser classificada em três grandes grupos: os organoclorados; os inibidores da colinesterase (fosforados orgânicos e carbamatos); e os piretroides naturais e sintéticos (IBAMA, 2009).

O Decis[®] 25 EC é um inseticida quimicamente classificado entre os piretroides sintéticos e seu princípio ativo é a Deltametrina (BAYER, 2011). Segundo

Fairchild et al. (2010), o componente principal deste agrotóxico também está presente no pesticida Alphamax[®], utilizado na aquicultura, contra piolhos do mar. A Deltametrina também está presente em formulação de shampoo ou loções contra piolho, tais como Scabin[®] e Deltacid[®].

Alguns estudos laboratoriais verificaram o potencial tóxico do Decis[®] EC em organismos. Anjos (2009) classificou o produto como altamente tóxico para o peixe *Danio rerio*. Marques et al. (2014) expôs enguias (*Anguilla anguilla*) a 17,5 e 35 µg/L do Decis[®], produzido em Portugal, ou respectivamente 0,05 e 0,1 µg/L de Deltametrina, e concluiu que o inseticida causa danos genéticos a esta espécie de peixe após 3 dias de exposição.

Toumi et al. (2013) realizou bioensaios com *D. magna* e concluiu que a Deltametrina é altamente tóxica a essa espécie e ainda interfere em seu desenvolvimento e reprodução.

Alguns trabalhos, tal como o de Fairchild et al. (2010), foram realizados para avaliar a toxicidade do inseticida Alphamax[®], cujo princípio ativo também é a Deltametrina e verificaram que esta é altamente tóxica em organismos de pequeno porte, como os microcrustáceos.

Neste contexto, o presente trabalho visou avaliar a toxicidade aguda do inseticida Decis[®] 25 EC fabricado pela Bayer S/A, o qual consiste em uma mistura de Deltametrina e solvente aromático, em *Daphnia magna*.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. AGROTÓXICOS

O uso de produtos químicos para o combate de pragas e doenças nas plantações começou na Antiguidade Clássica. Há escrituras de 3.000 anos atrás que mencionam o uso de arsênico para o controle de insetos. Já os chineses, há cerca de 2.000 anos atrás, usavam compostos orgânicos naturais, como a piretrina obtida das flores de crisântemos, como inseticidas. No século XIX, compostos inorgânicos a base de metais tóxicos, como cobre, enxofre e mercúrio, eram utilizados na Europa para o combate do míldio e de outros fungos (FILHO, 2002). Posteriormente estes produtos foram denominados de agrotóxicos.

Filho (2002), em sua revisão sobre o tema, separa os agrotóxicos em quatro gerações. Segundo o autor, a Primeira Geração de Agrotóxicos surgiu no final do século XIX e nas primeiras décadas do século XX, onde ocorreu um grande avanço no uso de produtos químicos para proteção de plantas contra as pragas e doenças. Os produtos desta geração são constituídos basicamente de compostos inorgânicos a base de flúor, arsênico, mercúrio, selênio, chumbo, bórax, sais de cobre e zinco e não são mais utilizados devido à elevada toxicidade ao ser humano e aos animais e persistência no ambiente.

O início da Segunda Geração de Agrotóxicos seria a partir da criação do inseticida desenvolvido pela síntese orgânica à base do tiocianato, comercializado com o nome de *Lethane 384*, em 1932. Contudo, foi a partir da Segunda Guerra Mundial que o desenvolvimento dos produtos da Segunda Geração de Agrotóxicos intensificou-se. Nesta época surgiu o DDT (Dicloro Difenil Tricloroetano) e o BHC (Hexaclorociclohexano). Nesta época, técnicos da indústria química americana focaram seus estudos no desenvolvimento de inseticidas de aplicação por vias aéreas para destruir as colheitas inimigas.

A Terceira Geração de Agrotóxicos começa na década de 60 com o surgimento de produtos menos tóxicos para o homem e o ambiente. O surgimento

de indústrias preocupadas em desenvolver este segmento ocorreu em função de três fatores: 1º) o aparecimento de doenças derivadas dos processos de intoxicações agudas e crônicas sofridos pelas populações expostas direta e indiretamente, 2º) surgimento de acidentes ambientais e 3º) problemas de eficiência agrônômica dos produtos, estes últimos desencadeados pelos mecanismos de resistência das populações de pragas aos produtos até então em uso (FILHO, 2002).

Já a quarta geração surgiu a partir do desenvolvimento de produtos que atuam no sistema endócrino, ou seja, que interferem nos hormônios que regulam o crescimento dos insetos.

A Lei Federal brasileira nº 7802, de 11 de julho de 1989 define os agrotóxicos como “a) produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; b) substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento”.

No ramo agrícola, principalmente na agricultura intensiva, os pesticidas são indispensáveis para o aumento da produção e movimentação da economia. Segundo Simoniello et al. (2008), pesticidas são definidos como substâncias ou misturas que objetivam prevenir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga, incluindo insetos, roedores e ervas daninhas. De modo geral, os pesticidas são o mesmo que agrotóxicos. Popularmente também é dada a denominação de defensivos agrícolas.

A diversidade de uso dos produtos agrotóxicos deve-se aos seus diferentes modos de ação, que podem agir contra plantas (herbicidas), insetos (inseticidas), fungos (fungicidas), microrganismos de solo (nematicidas), moluscos (moluscicidas), entre outros (IBAMA, 2009).

Cerca de 30% do mercado global consumidor de agrotóxicos corresponde aos países em desenvolvimento. Dentre estes países, o Brasil apresenta o maior

mercado consumidor individual. Seu consumo corresponde à metade de todo o consumo da região Latino-americana (PERES et al., 2007).

O aumento do uso dos agrotóxicos no Brasil nos últimos anos ocorreu devido ao aumento da área cultivada, a adoção de tecnologia e também o surgimento de pragas agrícolas de difícil controle, como a ferrugem da cultura da soja e o psílideo, vetor da doença Huanglongbing (HLB) em citros (EMBRAPA, 2014).

A Lei Federal nº 7802 (BRASIL, 1989) também determina que os agrotóxicos, seus componentes e afins só poderão ser produzidos, exportados, importados, comercializados e utilizados, se previamente registrados em órgão federal, de acordo com as diretrizes e exigências dos órgãos federais responsáveis pelos setores da saúde, do meio ambiente e da agricultura, representados respectivamente pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

O Certificado de Registro do Produto é emitido pelo MAPA apenas mediante a avaliação toxicológica da ANVISA, avaliação ambiental do IBAMA, avaliação de eficiência do MAPA e aprovação de todos os órgãos (IBAMA, 2011).

2.1.1. Classificação dos agrotóxicos

Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com a sua toxicidade de diversas formas. A ANVISA (2015), através do Manual de Procedimentos para Análise Toxicológica de Produtos Agrotóxicos, seus componentes e afins, classifica os agrotóxicos em quatro classes toxicológicas. São elas: Classe I - Extremamente Tóxico; Classe II - Altamente Tóxico; Classe III - Medianamente Tóxico e; Classe IV - Pouco Tóxico.

A classificação toxicológica realizada pela ANVISA avalia as consequências à saúde humana, pois considera apenas os parâmetros: DL₅₀ oral para ratos; DL₅₀ dérmica para ratos; CL₅₀ inalatória para ratos; a formulação não apresenta opacidade na córnea e aquelas que apresentam irritação leve, reversível dentro de um determinado período, nas mucosas oculares dos animais testados e; a

formulação provoca irritação leve ou um escore por um determinado tempo, segundo o método de Draize e Cols, na pele dos animais testados (ANVISA, 2015).

O IBAMA classifica os agrotóxicos como: Classe I - Produto Altamente Perigoso; Classe II - Produto Muito Perigoso; Classe III - Produto Perigoso (medianamente) e; Classe IV - Produto Pouco Perigoso e adota como parâmetro para o enquadramento análises físico-químicas, mobilidade e adsorção do produto no solo, biodegradabilidade, bioconcentração e toxicidade para algas, microcrustáceos e peixes (IBAMA, 2011). Ressalta-se que, na ocorrência de parâmetros que se enquadrem os compostos em classes diferentes, o agrotóxico será enquadrado na mais perigosa ou tóxica.

Os agrotóxicos também podem ser classificados de acordo com o seu uso, como Herbicidas, substâncias químicas que evitam, reduzem ou eliminam plantas infestantes (mais popularmente conhecidas como ervas daninhas); Inseticidas, produtos à base de substâncias químicas ou agentes biológicos, de ação direta ou indireta, que provocam a morte dos insetos; Fungicidas, agentes físicos, químicos ou biológicos prejudiciais aos fungos, e; Acaricidas, produtos que matam uma variedade de ácaros das culturas, entre outros (IBAMA, 2009).

2.1.2. Piretróides

Conforme já mencionado, entre os tipos de inseticidas estão os piretróides. Anjos (2009) cita que, segundo Pimpão, o termo piretróide é comumente utilizado para designar pesticidas sintéticos derivados estruturalmente de piretrinas naturais, seis constituintes inseticidas do extrato do piretro, obtido das flores de *Chrysanthemum cinaerariifolium*. Os primeiros piretróides sintéticos com uso agrícola surgiram em função de sua alta atividade inseticida e fotoestabilidade (BRAGA; VALLE, 2007).

Segundo Montanha e Pimpão (2012), estes compostos apresentam amplo espectro de atividade, ação rápida, eficiência em baixa dose e baixo poder residual no ambiente. Os autores ainda advertem aos perigos da sua utilização, pois, embora sejam atóxicos aos mamíferos, podem exercer uma série de efeitos tóxicos nos vertebrados, como os peixes, susceptíveis aos efeitos neurotóxicos destes compostos químicos.

Os piretróides afetam o sistema nervoso periférico e central do inseto: estimulam as células nervosas a produzir descargas repetitivas e, eventualmente, causam paralisia (BRAGA; VALLE, 2007). Já nos peixes, são tóxicos ao fígado, rins, cérebro e músculos e afetam o sistema respiratório, pois são altamente tóxicos às brânquias, causando sérias alterações epiteliais e, conseqüentemente, danifica as trocas gasosas, podendo causar também lesões estruturais e morte das células das brânquias (MONTANHA; PIMPÃO, 2012).

Há dois tipos de piretróides: tipo I são aqueles que, entre outras respostas fisiológicas, têm um coeficiente de temperatura negativo e tipo II são os que apresentam coeficiente de temperatura positivo, ou seja, a mortalidade dos insetos a eles expostos varia diretamente com o aumento de temperatura (BRAGA; VALLE, 2007).

2.1.2.1. Deltametrina

A Deltametrina é um exemplo de piretróide do tipo II, sendo estável na luz, umidade e ar, mas instável em meio alcalino (MONTANHA; PIMPÃO, 2012). A fórmula da Deltametrina é $C_{22}H_{19}Br_2NO_3$ (Figura 1) e o número CAS é 52918-63-5 (CCME, 1999). Quimicamente é um isômero (1R, cis; α S) de oito estereoisômeros ésteres do análogo dibromo do ácido crisantêmico, ou seja, (S) - α - ciano - 3 - fenoxibenzil - (1R) - cis - 3 (2,2-dibromovinil) - 2,2 - dimetilciclopropano carboxilato (MONTANHA; PIMPÃO, 2012).

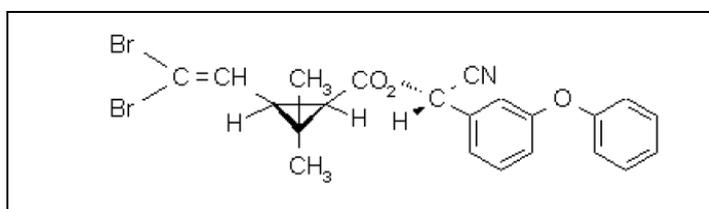


Figura 1: Fórmula estrutural da Deltametrina, princípio ativo do Decis[®] 25EC

De acordo com a revisão bibliográfica de Montanha e Pimpão (2012), a Deltametrina, assim como a Cipermetrina, são inseticidas piretróides que contêm o grupo α -ciano-fenoxibenzila e atuam no funcionamento do sistema nervoso central, pois estes compostos interagem com os receptores do Ácido Gama Amino Butírico

(GABA), principal neurotransmissor inibitório do sistema nervoso central, nos filamentos nervosos, bloqueando os canais de cloro e sua ativação, o que pode ser responsável pela hiperexcitabilidade.

2.1.3. Decis[®] 25 EC

O agrotóxico Decis[®] 25 EC (Figura 2), fabricado pela Bayer S/A, é uma mistura de Deltametrina (princípio ativo) e solvente aromático, cuja composição é segredo industrial, e a concentração de cada componente é, respectivamente, 25 g/L e 886 g/L.



Figura 2: Decis[®] 25 EC

De acordo com a classificação de uso, o Decis[®] 25 EC é um inseticida e seu grupo químico é o piretróide (Bayer, 2015). Este inseticida é indicado, principalmente, para o controle de lagartas desfolhadoras em áreas de reflorestamento. Também pode ser utilizado no cultivo de algodão, alho e cebola, brócolis, couve, couve-flor e repolho, cacau, café, feijão, maçã e trigo contra espécies de lagartas, pulgão, moscas e outros (ADAPAR, 2015).

De acordo com a bula disponibilizada pelo ADAPAR (2015), em caso de contato com a pele ou ingestão do produto é indicado procurar um médico e levar a embalagem, rótulo, bula e receituário agrônomo do produto. A bula ainda informa que para o caso de inalação do produto, a pessoa também seja levada ao médico, mas antes deve ser removida para um local arejado.

Segundo a Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) referente ao Decis[®] 25 EC, o produto pode causar depressão do sistema nervoso central e é classificado como altamente perigoso para o meio ambiente (Classe I). A bula ainda complementa informando que é altamente tóxico para organismos do solo, algas e microcrustáceos.

A FISPQ do Decis[®] 25 EC também apresenta alguns dados da ecotoxicidade da Deltametrina, tais como: toxicidade para algas - CL₅₀ (72h) > 1000 mg/L; toxicidade para microcrustáceos (*Daphnia sp.*), com a CE₅₀ (48h) de 0,0035 mg/L ($3,5 \cdot 10^{-3}$ mg/L) e toxicidade para peixes, com CL₅₀ (96h) de 0,001 a 0,01 mg/L. Em relação ao impacto ambiental, a FISPQ informa que o produto é altamente tóxico para os organismos aquáticos e altamente bioconcentrável em peixes.

2.2. ECOTOXICOLOGIA

A Ecotoxicologia é uma ciência que fornece ferramentas para monitoramento ambiental. O termo ecotoxicologia foi cunhado pelo professor e pesquisador francês René Truhaut, em 1969, reunindo a designação *eco*, que provém do grego oîkos, elementos de composição com o significado de casa, domicílio, habitat, meio ambiente, e a palavra *toxicologia*, que significa ciência que trata dos agentes tóxicos, dos venenos e da intoxicação (IBAMA, 2009).

O francês Ramade, que publicou o primeiro livro de Ecotoxicologia, definiu a ecotoxicologia como a ciência que tem por objetivo estudar as modalidades de contaminação do ambiente pelos poluentes naturais ou sintéticos, produzidos por atividades humanas, seus mecanismos de ação e seus efeitos sobre o conjunto de seres vivos que habitam a biosfera (MAGALHÃES et al., 2008).

Segundo Magalhães et al. (2008), na década de 80 as agências ambientais do mundo todo começaram a desenvolver protocolos padronizados de teste de toxicidade com organismos aquáticos. Este fato impulsionou a Agência de Proteção Ambiental Americana (USEPA – United States Environmental Protection Agency) a definir padrões de qualidade de efluentes industriais e implantar programas de controle de qualidade da água. Em 1984, a USEPA estabeleceu o uso de organismos para monitoramento da qualidade da água, o chamado biomonitoramento. Nesta mesma época, a Europa lançou uma série de protocolos de testes com organismos aquáticos, tais como algas, microcrustáceos e peixes.

Conforme apontado por Magalhães et al. (2008), a ecotoxicologia abrange todo o ecossistema, contudo, os estudos geralmente são restritos aos efeitos causados sobre um único tipo de organismo. Este fato é impulsionado pela pressão sobre as indústrias potencialmente poluidoras, para que resolvam problemas com a contaminação ambiental, e que necessitavam de testes rápidos e relativamente baratos.

A ecotoxicidade ou o potencial de afetar os ecossistemas dos agrotóxicos é variável e depende das propriedades dos ingredientes ativos e inertes que compõem o produto. Os efeitos do uso de agrotóxicos podem ser agudos (imediatos), subcrônicos (médio prazo) e crônicos (longo prazo). Esses efeitos podem interferir na fisiologia, no comportamento, na expectativa de vida, na reprodução dos organismos, entre outros fatores (IBAMA, 2009). Os testes de toxicidade aguda são os mais amplamente realizados para se avaliar o potencial tóxico de compostos, como os agrotóxicos, nos organismos vivos.

2.2.1. Testes de Toxicidade Aguda

O ensaio de toxicidade aguda pode ser definido como aquele que avalia os efeitos, em geral severos e rápidos, sofridos pelos organismos expostos a um agente químico, em um curto período de tempo, geralmente de um a quatro dias. Devido à facilidade de execução, curta duração e baixo custo, os ensaios de toxicidade aguda foram os primeiros a serem desenvolvidos e, portanto, constituem a base de dados ecotoxicológicos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Os parâmetros analisados por este tipo de ensaio é a imobilidade e mortalidade dos organismos-teste e, a partir desses dados, é possível determinar a Concentração Efetiva Mediana (CE_{50}) e Concentração Letal Mediana (CL_{50}) do composto em estudo, respectivamente.

A NBR 12713:2009 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera), da ABNT, normatiza ensaios de toxicidade aguda com *Daphnia similis* e *Daphnia magna*. Segundo esta norma, toxicidade aguda é o efeito deletério causado pela amostra na mobilidade dos organismos-teste, em um período de 48 h de exposição e a CE_{50} é a concentração real da amostra que causa efeito agudo a 50% dos organismos no tempo de exposição, nas condições de ensaio.

Para maior precisão e confiabilidade nos resultados, junto com testes de toxicidade, Zagatto e Bertolletti (2008) recomendam o controle da sensibilidade dos organismos através de ensaios realizados com substâncias de referência. Existem alguns compostos químicos que podem ser utilizadas como substância de referência.

A escolha da substância de referência, segundo Knapik e Andreatta (2013), deve considerar os seguintes critérios: disponibilidade técnica para mensurá-la; solubilidade; estabilidade em solução (não deve ser volátil ou biodegradável) e não deve oferecer riscos à segurança dos técnicos durante a sua manipulação em laboratório.

Knapik e Andreatta (2013) avaliaram a se o Dicromato de Potássio ($K_2Cr_2O_7$), o Sulfato de Cobre ($CuSO_4$) e o Cloreto de Potássio (KCl) atendem à finalidade de serem utilizadas como substância de referência e concluíram que todas atendem, podendo ser utilizadas para padronização de testes de sensibilidade. Ainda indicam a substituição do $K_2Cr_2O_7$, que oferece riscos a quem o manuseia, pelo KCl, o qual apresentou resultados satisfatórios, tendo em vista que esta é mais segura e apresenta uma disposição menos danosa ao ambiente.

Zagatto e Bertolletti (2008) citam o trabalho de Buratini, no qual foi demonstrado que o Cloreto de Potássio, em relação ao Dicromato de Potássio, é o mais adequado como substância de referência, pois não sofre a interferência da

qualidade da água na sua toxicidade, além de ser mais seguro em relação à sua disposição no meio ambiente.

2.2.2. *Daphnia magna*

Daphnia magna é um microcrustáceo planctônico de água doce, com tamanho médio de 5 a 6 mm. Atua na cadeia alimentar aquática como consumidor primário entre os metazoários, alimentando-se por filtração de material orgânico particulado, principalmente de algas unicelulares. Em condições ambientais favoráveis reproduz-se assexuadamente por partenogênese, originando apenas fêmeas. São vulgarmente conhecidas como pulgas d'água (KNIE; LOPES, 2004).

Kníe e Lopes (2004) pontuam que a escolha da *Daphnia magna* como organismos-teste fundamenta-se principalmente nos seguintes critérios:

- os descendentes são geneticamente idênticos, o que assegura uma certa uniformidade de respostas nos ensaios;
- a cultura em laboratório sob condições controladas é fácil e sem grandes dispêndios;
- o manuseio é simples, devido ao tamanho relativamente grande da espécie, em comparação com outros microcrustáceos;
- a espécie reage sensivelmente à uma ampla gama de agentes nocivos;
- a espécie é adequada para testes estáticos, semiestáticos ou de fluxo contínuo;
- o ciclo de vida e de reprodução é suficientemente curto, o que permite usar essa espécie também em testes crônicos;
- *Daphnia magna* é internacionalmente reconhecida como organismo-teste e vem sendo utilizada há décadas em laboratórios ecotoxicológicos.

3 OBJETIVOS

3.1.OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade aguda do inseticida Decis[®] 25 EC em *Daphnia magna* e definir a CE₅₀ da formulação comercial do inseticida.

3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a mobilidade de *Daphnia magna* em diferentes concentrações da Deltametrina presente como princípio ativo do Decis[®] 25 EC;
- Definir a CE₅₀ para a Deltametrina presente no Decis[®] 25 EC;
- Verificar se a CE₅₀ da Deltametrina, apresentada na bula do Decis[®] 25 EC é a mesma que a CE₅₀ do inseticida na sua formulação comercial.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O cultivo de *Daphnia magna* foi realizado no laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná UTFPR, sede Ecoville. A metodologia do cultivo e os procedimentos adotados nos testes de toxicidade aguda foram desenvolvidos de acordo com a metodologia descrita na NBR 12713:2009 (ABNT, 2009).

4.1. CULTIVO DE *Daphnia magna*

O cultivo de *Daphnia magna* foi realizado em béqueres de 2000 mL, identificados com o número do lote e a data de abertura do lote. Os béqueres eram preenchidos com aproximadamente 1500 mL de água de cultivo (Anexo A), previamente preparada e aerada por, no mínimo, 24 horas. A lavagem do material também era realizada segundo metodologia padronizada (conforme o Anexo B) para que não houvesse interferência na sensibilidade dos organismos vivos.

Duas vezes por semana (segundas e sextas-feiras) eram realizadas trocas totais da água de cultivo e do béquer. Nos demais dias da semana (terças, quartas e quintas-feiras) eram realizadas trocas parciais (1/3 da água do cultivo) e do béquer. Todas as trocas eram realizadas no mesmo horário, a fim de garantir que os organismos neonatos apresentassem de 2 a 26 h de vida.

Juntamente com a troca da água do cultivo, também era realizada a separação dos organismos neonatos, os quais eram utilizados nos bioensaios. A separação contava com o auxílio dos materiais (Figura 3): rede com malha de 1mm (1), para retenção das *D. magna* adultas e 0,75 mm (2), para retenção dos filhotes. Há uma terceira rede (3), fixada em alça de metal, para remoção das carcaças dos dafinídeos. Após a separação e a troca da água de cultivo, as *D. magna* adultas eram inseridas novamente nos béqueres de cultivo e mantidas na incubadora BOD até a próxima troca. Os filhotes eram transportados para béqueres de 100 mL, que era mantido na BOD até a realização do teste (2h após a troca, a fim de garantir que os filhotes completem o tempo mínimo de vida requerido para a realização do teste).



Figura 3: Material para separação de *Daphnia magna*, sendo (1) rede com malha de 1 mm, para retenção das *D. magna* adultas; (2) rede com malha 0,75 mm para retenção dos filhotes e (3) rede com alça metálica, para remoção das carcaças.

Os lotes eram mantidos por até 60 dias. Nos dez primeiros dias era realizada a troca da água de cultivo em dias alternativos e os filhotes eram separados e descartados. Após este período os filhotes eram utilizados para teste.

Durante todo o período de cultivo, os lotes eram mantidos em incubadora do tipo BOD, com controle de temperatura ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo (16 horas de claridade e 8 horas escuro).

As *D. magna* eram alimentadas com microalgas (*Scenedesmus subspicatus*), cultivadas no mesmo laboratório, de acordo com a metodologia descrita na NBR 12648:2011 (ABNT, 2011).

4.2. Teste de Sensibilidade

Todos os procedimentos relativos à cultura dos dafinídeos refletem na sua sensibilidade, cuja estabilidade é essencial para a confiabilidade dos resultados (KNIE; LOPES, 2004). Por este motivo, semanalmente foram realizados testes de sensibilidade. A substância de referência utilizada foi o cloreto de potássio (KCl), pois apresenta menos riscos a quem o manuseia e sua disposição é menos danosa ao ambiente (KNAPIK; ANDREATTA, 2013).

Neste teste, foram preparadas cinco diluições de KCl, descritas no subitem 4.2.1. Em seguida foram inseridos 20 mL de cada solução em béqueres de 50 mL

identificados com as letras A, B, C, D e E. As concentrações de cada um também são apresentadas no subitem 4.2.1. Em cada béquer, foram inseridos dez organismos teste (Figura 4).

Para o controle, foi adicionado 20 mL de água de diluição em um béquer de 50 mL e inserido 10 organismos neonatos.



Figura 4: Teste de sensibilidade.

Todos os béqueres foram armazenados em bandejas brancas, cobertas com alumínio e mantidos em incubadora do tipo BOD, com controle de temperatura ($20 \pm 2^{\circ}\text{C}$), durante 48h. Após o período na BOD era realizada a leitura da imobilidade dos organismos e, a partir dos resultados, era verificada a CE_{50} do KCl para *D. magna*.

Os testes foram realizados em duplicatas ou triplicadas. A lavagem dos materiais utilizados no teste de sensibilidade, bem como a dos testes apresentados posteriormente, estão descritas no Anexo B.

Para apresentação dos resultados dos testes de sensibilidade, foram elaborados: carta-controle do cultivo (elaborada através do método de Probitos com auxílio de software BioStat[®]), média, desvio padrão e o coeficiente de variação dos resultados da sensibilidade dos organismos obtidas a partir de 10 testes (ANEXO C).

4.2.1. Preparo das soluções para o ensaio de sensibilidade com KCl

Foi pesado 0,5 g de KCl e diluído em 100 mL de água de diluição no balão volumétrico de 100 mL (solução mãe, SM). Em seguida, foram realizadas cinco diluições em balões de 100 mL, conforme apresentado na Tabela 1. O volume foi completado com água deionizada.

Tabela 1: Preparo de diluições de KCl.

Balão	Quantidade da SM inserida	Concentração Final
A	11,4 mL	570 mg/L
B	13,2 mL	660 mg/L
C	14 mL	700 mg/L
D	15 mL	750 mg/L
E	16,8 mL	870 mg/L

4.3. Teste Preliminar com o Decis[®] 25 EC

Conforme previsto pela NBR 12713:2009 (ABNT, 2009), foram realizados testes preliminares para determinar um intervalo de solução-teste a ser utilizado no ensaio definitivo.

Knie e Lopes (2004) recomendam a realização de testes preliminares para amostras com potencial tóxico para conhecer a maior diluição que causa imobilidade a 100% dos dafinídeos e a solução com menor diluição na qual se observa efeito menor do que 10%. Os autores também destacam que, para estes testes, não são necessárias réplicas e o tempo de exposição pode ser de 24h.

Considerando que a concentração da Deltametrina no Decis[®] 25 EC é 25 g/L, foi preparada uma solução-mãe (SM), na qual foram inseridos 40 mL de Decis[®] 25 EC e completado com 60 mL de água deionizada e a concentração obtida foi 10 g/L de Deltametrina. Desta SM (10 g/L) foram pipetados, respectivamente, 35 µL, 25 µL, 12,5 µL, 2,5 µL, 1,25 µL e 0,25 µL e inserido em balões volumétricos de 100 mL, os quais foram preenchidos e aferidos com água de diluição, fazendo com que a

concentração da Deltametrina nos balões fosse de (1) 3,5 mg/L, (2) 2,5 mg/L, (3) 1,25 mg/L, (4) 0,25 mg/L, (5) 0,125 mg/L e (6) 0,025 mg/L (Figura 5).



Figura 5: Soluções de Decis[®] 25 EC do teste preliminar.

Para a contaminação de *Daphnia magna*, foram adicionados 20 mL de cada balão em béqueres de 50 mL e inseridos 10 organismos neonatos de *D. magna* em cada béquer (Figura 6). Para o controle, foram adicionados 20 mL de água de diluição em um béquer de 50 mL e inseridos 10 organismos neonatos.

Todos os béqueres foram armazenados em bandejas brancas, cobertas com alumínio e mantidos em incubadora do tipo BOD, com controle de temperatura ($20 \pm 2^\circ\text{C}$), durante 48h. Ressalta-se que os béqueres contendo os organismos de controle foram armazenados em bandeja separada dos demais e todo o procedimento foi realizado em triplicada.



Figura 6: Teste preliminar com *Daphnia magna*.

Posteriormente, foram testadas novas concentrações, sendo elas: 0,15; 0,05; 0,025; 0,005; 0,001; $5,0 \cdot 10^{-4}$; $3,5 \cdot 10^{-4}$; $1,0 \cdot 10^{-4}$; $5,0 \cdot 10^{-5}$; $3,5 \cdot 10^{-5}$; $5,0 \cdot 10^{-6}$; $3,5 \cdot 10^{-6}$; $3,5 \cdot 10^{-7}$; $3,5 \cdot 10^{-8}$ e $4,0 \cdot 10^{-8}$ mg/L. Todas as diluições foram preparadas a partir de uma solução mãe, conforme descrito anteriormente.

4.4. Teste de Toxicidade do Decis[®] 25 EC

Para os testes definitivos foram preparadas duas soluções-mãe, SM1 e SM2 (Figura 7). A SM1 foi preparada em balão volumétrico de 50 mL, no qual foi inserido 1 μ L do agrotóxico comercial Decis[®] 25 EC e completado com água deionizada, de modo que a concentração obtida foi 0,5 mg/L de Deltametrina. A SM2 foi preparada a partir da SM1, ou seja, foi inserido 2 μ L da SM1 em balão volumétrico de 25 mL, completado com água deionizada, e a concentração obtida foi $4,0 \cdot 10^{-5}$ mg/L.



Figura 7: SM1 (0,5 mg/L de Deltametrina) e SM2 ($4,0 \cdot 10^{-5}$ mg/L) de Decis[®] 25 EC.

Em seguida foram preparadas seis diluições em balões volumétricos de 100 mL, numerados de um a seis (Figura 8). A concentração do balão 1 refere-se a concentração da CE_{50} referente a Deltametrina apresentada pela bula do produto e as concentrações seguintes são 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 menores que a CE_{50} (Figura 8 e Tabela 2).



Figura 8: Soluções de Decis[®] 25 EC do teste definitivo.

Tabela 2: Diluições para teste definitivo de toxicidade.

Béquer	Volume inserido	Concentração Final (mg/L)
1	700 µL da SM1	$3,5 \cdot 10^{-3}$
2	7 µL da SM1	$3,5 \cdot 10^{-5}$
3	0,7 µL da SM1	$3,5 \cdot 10^{-6}$
4	437,5 µL da SM2	$3,5 \cdot 10^{-7}$
5	43,75 µL da SM2	$3,5 \cdot 10^{-8}$
6	4,375 µL da SM2	$3,5 \cdot 10^{-9}$

Para o cálculo da CE_{50} do Decis[®] 25 EC, foi utilizado o método de Probitos, com auxílio de software BioStat[®].

Tabela 5: Resultados de imobilidade de *D. magna* no teste preliminar – Data: 13/11/2015.

Cód.	Concentração (mg/L)	Quantidade de neonatos imóveis em cada béquer nas 48h			% imobilidade
1	$3,5 \cdot 10^{-5}$	6	6	6	60
2	$3,5 \cdot 10^{-6}$	3	5	6	47
3	$3,5 \cdot 10^{-7}$	4	7	7	60
4	$3,5 \cdot 10^{-8}$	3	0	3	20
5	$4,0 \cdot 10^{-9}$	0	2	5	23
CT	-	0	0	0	0

As médias da porcentagem de imobilidade obtidas no teste de preliminares de toxicidade, reforçam que as concentrações acima de $1,0 \cdot 10^{-4}$ mg/L são altamente tóxicas a *D. magna*, tendo causado imobilidade em 100% dos organismos testados, havendo sobrevivência apenas nas concentrações mais baixas (Figura 9).

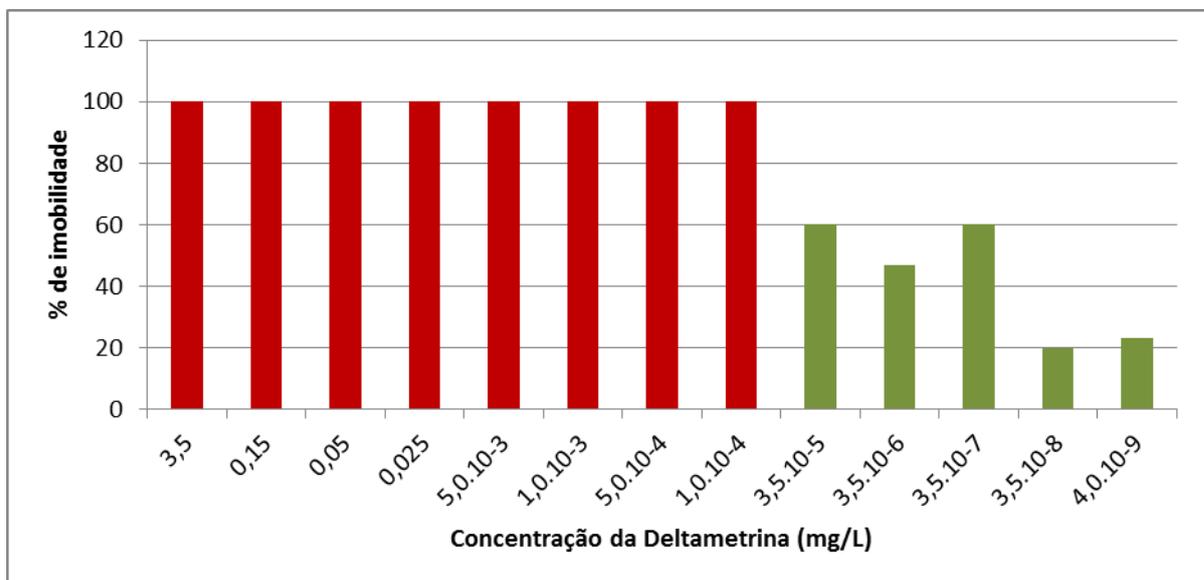


Figura 9: Gráfico – Porcentagem Média de Imobilidade x Concentração da Deltametrina (Teste Preliminar)

Destaca-se que os resultados dos ensaios cujos controles apresentaram imobilidade superior a 10% não foram considerados como válidos.

Tendo em vista que um dos objetivos do presente trabalho era avaliar a CE_{50} da Deltametrina informada pela bula do Decis[®] 25 EC, nos testes definitivos foi testada esta concentração e diluições desta (Tabela 6, 7, 8 e 9).

Tabela 6: Resultados de imobilidade de *D. magna* no teste definitivo – Data: 17/11/2015.

Cód.	Concentração (mg/L)	Quantidade de neonatos imóveis em cada béquer nas 24h			% imobilidade	Quantidade de neonatos imóveis em cada béquer nas 48h			% imobilidade
1	$3,5 \cdot 10^{-3}$	9	9	7	83	10	10	10	100
2	$3,5 \cdot 10^{-5}$	2	1	4	23	10	9	7	87
3	$3,5 \cdot 10^{-6}$	4	3	0	23	4	5	4	43
4	$3,5 \cdot 10^{-7}$	0	6	0	20	0	5	4	30
5	$3,5 \cdot 10^{-8}$	0	0	0	0	0	1	0	3
6	$3,5 \cdot 10^{-9}$	0	0	0	0	0	1	2	10
CT	-	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 7: Resultados de imobilidade de *D. magna* no teste definitivo – Data: 19/11/2015.

Cód.	Concentração (mg/L)	Quantidade de neonatos imóveis em cada béquer nas 24h			% imobilidade	Quantidade de neonatos imóveis em cada béquer nas 48h			% imobilidade
1	$3,5 \cdot 10^{-3}$	9	9	7	83	10	10	10	100
2	$3,5 \cdot 10^{-5}$	2	1	4	23	8	6	6	67
3	$3,5 \cdot 10^{-6}$	4	3	0	23	3	2	4	30
4	$3,5 \cdot 10^{-7}$	0	6	0	20	4	3	2	30
5	$3,5 \cdot 10^{-8}$	0	0	0	0	3	3	3	30
6	$3,5 \cdot 10^{-9}$	0	0	0	0	2	6	5	43
CT	-	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabela 8: Resultados de imobilidade de *D. magna* no teste definitivo – Data: 20/11/2015.

Cód.	Concentração (mg/L)	Quantidade de neonatos imóveis em cada béquer nas 48h		% imobilidade
1	$3,5 \cdot 10^{-3}$	10	10	100
2	$3,5 \cdot 10^{-5}$	7	8	77
3	$3,5 \cdot 10^{-6}$	6	7	70
4	$3,5 \cdot 10^{-7}$	4	7	47

5	$3,5 \cdot 10^{-8}$	3	3	5	37
6	$3,5 \cdot 10^{-9}$	1	2	3	20
CT	-	0	0	0	0

Tabela 9: Resultados de imobilidade de *D. magna* no teste definitivo – Data: 03/12/2015.

Cód.	Concentração (mg/L)	Quantidade de neonatos imóveis em cada béquer nas 48h			% imobilidade
1	$3,5 \cdot 10^{-3}$	10	10	10	100
2	$3,5 \cdot 10^{-5}$	7	8	7	73
3	$3,5 \cdot 10^{-6}$	4	5	6	50
4	$3,5 \cdot 10^{-7}$	4	3	3	33
5	$3,5 \cdot 10^{-8}$	3	4	2	30
6	$3,5 \cdot 10^{-9}$	3	2	3	27
CT	-	0	0	0	0

As médias da porcentagem de imobilidade dos testes definitivos de toxicidade (Figura 10) confirmam que a concentração $3,5 \cdot 10^{-3}$ mg/L causa imobilidade de todos os organismos testados e que as diluições são menos nocivas, conforme já demonstrado nos testes preliminares.

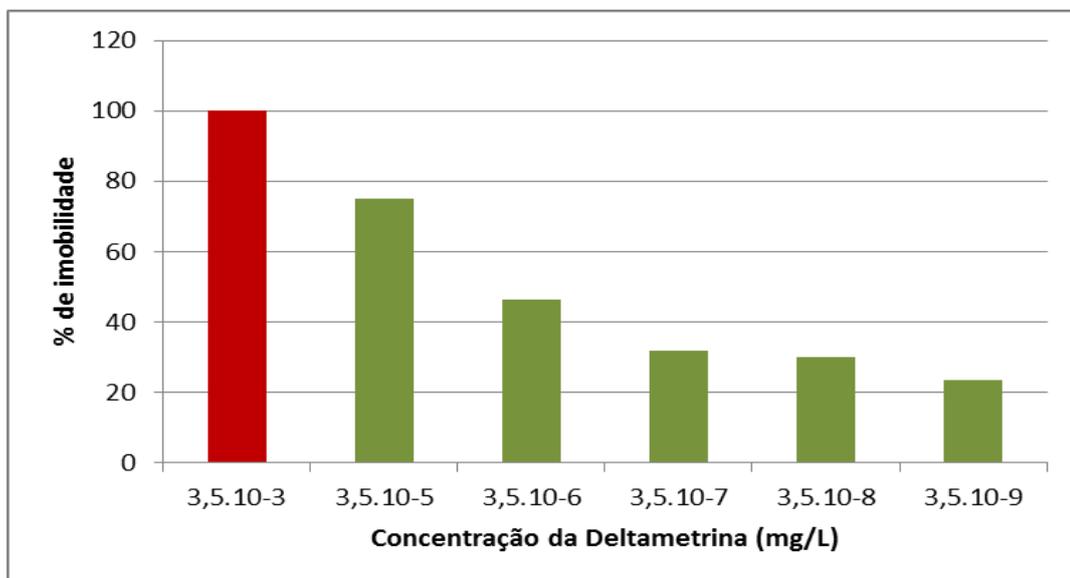


Figura 10: Gráfico – Porcentagem Média de Imobilidade x Concentração da Deltametrina (Teste Definitivo)

A CE_{50-48h} , calculada a partir do método de Probitos com auxílio de software BioStat[®], foi 1,84 ng/L, 1,33 ng/L, 0,41 ng/L e 0,92 ng/L. Assim, a CE_{50-48h} mediana obtida foi de 0,93 ng/L ou $9,3 \cdot 10^{-10}$ mg/L. Comparando com a CE_{50-48h} da Deltametrina, informada pela bula do fabricante do produto comercial ($3,5 \cdot 10^{-3}$ mg/L), nota-se que a CE_{50-48h} da Deltametrina no Decis[®] 25 EC é, aproximadamente, 10^6 vezes menor que a CE_{50} do princípio ativo do inseticida.

Fairchild et al. (2010) testou a toxicidade aguda (96h) da Deltametrina presente em produtos utilizados na agricultura (Decis, 50 g/L) e na aquicultura (AlphaMax, 10 g/L), ambos comercializados no Canadá, na lagosta-americana (*Homarus americanus*), no camarão (*Crangon septemspinosa*) e no anfípoda, (*Eohaustorius estuarius*). Para todos os organismos foram realizados testes de toxicidade aguda e crônica com concentrações na escala de ng/L. Os autores priorizaram avaliar a toxicidade do Alphamax[®], sendo assim foram realizados mais testes com este pesticida. Todavia, foi possível notar que o Decis apresentou-se menos tóxico em relação ao Alphamax[®], provavelmente pelo fato de ser um pesticida para combater o piolho-do-mar, um organismo aquático. Com relação aos organismos testados, a CL_{50} do Decis para a lagosta-americana (4,92 ng/L) foi menor que a CL_{50} do camarão (27,4 ng/L). Já a CE_{50} do anfípoda foi $< 0,32$ ng/L (FAIRCHILD et al., 2010).

Dentre os organismos testados por Fairchild et al. (2010), apenas um deles pertence a classe dos microcrustáceos como a *Daphnia magna*, que é o anfípoda *Eohaustorius estuarius*. A CE_{50} encontrada pelo autor para esta espécie também esta na escala de ng/L, sendo apenas 0,55 ng/L, ainda inferior a CE_{50} mediana encontrada para *D. magna* no presente trabalho.

O trabalho realizado por Fairchild et al. (2010), ainda aponta que, segundo CCME (1999), a legislação canadense prevê um limite de 0,0004 μ L de Deltametrina na água. No Brasil, a legislação que determina a classificação dos corpos d'água, bem como padrões de limites máximos permissíveis é a Resolução CONAMA n^o 357/2005 (Brasil, 2005), e não determina nenhum padrão para Deltametrina. A Resolução CONAMA n^o 430/2011, que determina padrões de lançamento de qualidade da água, também não contempla esta substância.

Neto e Sarcinelli (2009) compararam a Portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde com diferentes normatizações internacionais e destacaram que a portaria define valores máximos permitidos a compostos que são considerados pela Organização Mundial da Saúde como inadequados para permitir a definição de valores guias para os metabólitos. Ainda enfatizam que a legislação brasileira contempla importantes agrotóxicos, porém sua amplitude ainda é muito deficiente.

Conforme previsto pela Lei Federal no 7.802/1989, para o registro do produto é necessário o fornecimento de informações toxicológicas do mesmo. Contudo, esta lei poderia ir mais adiante e determinar que o próprio fabricante determine valores máximos permissíveis do composto em solos e corpos hídricos, os quais seriam incorporados pelas respectivas normas.

A CE₅₀ do Decis[®] 25 EC, comercializado pela Bayer da Alemanha, obtida por Toumi et al. (2013) foi 0,32 µg/L (Lote 1, oriundo do laboratório da França) e 0,63 µg/L (do lote 2, oriundo do laboratório do Japão), concentrações superiores a obtida no presente trabalho, com as *D. magna* cultivadas no laboratório de Ecotoxicologia da UTFPR e expostas ao inseticida produzido no Brasil.

Toumi et al. (2013) também realizaram testes crônicos de toxicidade com duração de 21 dias, nos quais foram testadas concentrações na escala de ng/L (9, 20, 40, 80 e 160 ng /L para o lote 1 e 16, 37, 75, 150 e 310 ng/L para o lote 2). Os resultados mostraram a Deltametrina interfere no desenvolvimento e na reprodução da *Daphnia magna*, pois reduz o comprimento, o número de ninhadas e o número de neonatos por sobreviventes adultos e aumenta a quantidade de dias para a primeira ninhada.

Diferenças nas concentrações efetivas medianas encontradas em diferentes estudos podem ser justificadas por fatores ambientais, tais como alimentação e condições culturais. Genótipos diferentes apresentam respostas diferentes frente a mesma substância (TOUMI et al., 2013).

Possíveis diferenças nas composições misturadas com a Deltametrina, as quais são segredo industrial, entre os inseticidas produzidos no Brasil e na Alemanha também pode causar alteração nas CE.

A bula brasileira do inseticida Decis[®] 25 EC apresenta apenas que o produto é formado pelo princípio ativo e solvente aromático. Já em outros países

mais rigorosos, como os europeus, a composição do inseticida é mais detalhada, conforme demonstrado por Marques et al. (2014), que testou a toxicidade do Decis[®] comercializado pela Bayer CropScience Portugal, e a apresentou que o composto é formado pela Deltametrina, princípio ativo, (2,85%) cálcio 4-(4 6 8-trimetil nonano- 3-yl)benzeno sulfonato (1-5 %), 2-metil-1-propanol (1-5 %), nafta (petróleo) como solvente (>25%) e outros componentes produzidos pela Sigma–Aldrich Chemical Company (Madrid, Espanha).

A divulgação mais detalhada da composição do composto ainda não é uma exigência da legislação brasileira, porém estas informações são fundamentais para o desenvolvimento de técnicas de remoção destes compostos no ambiente, além de fornecerem mais informações a respeito da toxicidade de uma mistura.

Zagatto e Bertolletti (2008) afirmam que a *Daphnia spp* é aproximadamente 1.000 vezes mais sensível que os peixes. O trabalho realizado por Anjos (2009), avaliou a toxicidade aguda do Decis[®] 25 EC em *Danio rerio* e obteve uma CL_{50-48h} mediana de 0,0004156 mg/L ou $4,156 \cdot 10^{-6}$ mg/L, aproximadamente 10.000 vezes maior que a CE_{50-48h} mediana obtida para os dafinídeos.

Anjos (2009) também testou a toxicidade aguda do inseticida Decis[®] 25 EC e do acaricida Tamaron BR[®] e concluiu que o inseticida é altamente tóxico a esta espécie de peixe e mais tóxico que o acaricida.

6 CONCLUSÃO

O inseticida Decis[®] 25 EC apresentou-se como altamente tóxico a *Daphnia magna*, cuja CE₅₀ mediana foi 0,93 ng/L.

Considerando também os resultados obtidos por Fairchild et al. (2010), o inseticida analisado é altamente tóxico a microcrustáceos, cuja CE₅₀ para este grupo está na faixa de ng/L.

Os resultados demonstram que a CE₅₀ apresentada pela bula refere-se apenas a Deltametrina e o solvente aromático, o qual representa 40 a 50% da concentração do Decis[®] 25 EC, aumenta a CE_{50-48h} em aproximadamente 1.000.000 vezes, demonstrando assim a necessidade da divulgação das informações ecotoxicológicas referentes ao produto e não ao princípio ativo do produto.

Considerando os produtos que possuem a Deltametrina como princípio ativo e os resultados obtidos neste e em outros estudos, conclui-se que esta substância é tóxica a pequenos organismos, cuja área superficial de contato é maior.

Alguns órgãos ambientais, tais como o IBAMA, desenvolvem trabalhos para formar um panorama da poluição ambiental causada pelos agrotóxicos, porém, devido a grande variedade de defensivos agrícolas comercializados no Brasil, a legislação brasileira não é capaz de padronizar limites permissíveis destes produtos em corpos hídricos. Apenas alguns agrotóxicos mais comuns são englobados por essas resoluções, como é o caso do glifosato e DDT.

A legislação brasileira é falha por não exigir o detalhamento da composição dos agrotóxicos e por não exigir a determinação dos valores máximos permissíveis do composto em solos e corpos hídricos.

Para próximos trabalhos, recomenda-se que seja realizado um estudo *in situ* que avalie os efeitos do Decis[®] 25 EC no ambiente aquático. Após este estudo será possível determinar uma concentração máxima permissível em corpos hídricos.

7 REFERÊNCIAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713:** Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2009.

ADAPAR – AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ. **DECIS 25 EC.** Arquivo Eletrônico. Disponível em: <http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/DECIS_25_EC.pdf>. Acesso em: 02 out. 2015.

ANJOS, K. M. G. D. **Investigação e avaliação da toxicidade aguda dos agrotóxicos mais utilizados no cinturão verde da Grande Natal (RN, Brasil) para o peixe-zebra (*Danio rerio* Hamilton Buchanan, 1822, Teleostei, Cyprinidae).** Mestrado em Bioecologia, Aquática, UFRN. Natal, 2009.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Critérios para a classificação Toxicológica.** 2015.

BRAGA, I. A; VALLE, D. *Aedes aegypti*: insecticides: mechanisms of action and resistance. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília , v. 16, n. 4, dez. 2007 .

BRASIL. **Lei Federal Nº 7.802, de 11 de julho de 1989.** Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 11 jul. 1989.

CCME - Canadian Council of Ministers of the Environment. **Deltamethrin.** Canadian Environmental Quality Guidelines N^o.1299: 3 p. 1999.

CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente. **Resolução N^o 357, de 17 de março de 2005.** Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 17 mar. 2005.

CONAMA – Conselho Nacional de Meio Ambiente. **Resolução N^o 430, de 13 de maio de 2011.** Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes,

complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente, CONAMA. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 13 maio. 2011.

BAYER SA. **Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos – Decis® 25 EC.** 2011. Disponível em: <http://www.bayercropscience.com.br/produtos/downloads/Decis%2025%20EC%20FISPQ_Atualizada.pdf>. Acesso em 08 out. 2015.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Panorama da Contaminação Ambiental por Agrotóxicos e Nitrato de Origem Agrícola no Brasil: cenário 1992/2011.** Documentos 98, ISSN 1517-5111. Maio, 2014.

FAIRCHILD, W. L.; DOE, K. G; JACKMAN, P. M; ARSENAULT, J. T; AUBÉ, J. G; LOSIER, M; COOK A. M. Acute and Chronic Toxicity of Two Formulations of the Pyrethroid Pesticide Deltamethrin to an Amphipod, Sand Shrimp and Lobster Larvae. **Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences.** 2876: vi + 34 p. 2010.

FILHO, J. P. A. Uso de Agrotóxicos no Brasil: Controle social e interesses corporativos. São Paulo. **Annablume; FAPESP.** 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. **Avaliação ambiental e a atuação do IBAMA no registro de agrotóxicos.** 2011. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/camaras_tematicas/Insumos_agropecu_arios/52RO/App_ibama.pdf>. Acesso em: 15 out. 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil - Uma abordagem ambiental.** 2009. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/produtos_agrotoxicos_comercializados_brasil_2009.pdf>. Acesso em: 15 out. 2015.

KNAPIK, L. F. O; ANDREATTA, M. **Avaliação de toxicidade de três substâncias de referência ao microcrustáceo *Daphnia magna*.** Trabalho de Conclusão de curso, UTFPR, 2013.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações.** Florianópolis, SC; FATMA, 288 p., 2004.

MAGALHÃES, D. DE P; FILHO, A. DA S. F. A ecologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia brasiliensis**, vol 12(3), pag. 355-381. 2008

MARQUES, A; CUSTODIO, M; GUILHERME, S; GAIVAO, I; SANTOS, M. A; PACHECO, M. Assessment of chromosomal damage induced by a Deltamethrin-based insecticide in fish (*Anguilla anguilla* L.) - A follow-up study upon exposure and post-exposure periods. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, vol. 113, pag. 40-46. 2014.

MONTANHA, F. P; PIMPÃO, C. T. Efeitos toxicológicos de piretróides (Cipermetrina e Deltametrina) em peixes – Revisão. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária** – ISSN: 1679-7353. Ano IX – Número 18. 2012.

NETO, M. D. L. F; SARCINELLI, P.D.N. Agrotóxicos em água para consumo humano: uma abordagem de avaliação de risco e contribuição ao processo de atualização da legislação brasileira. **Eng Sanit Ambient**. v.14 n.1, p. 69-78. 2009.

PERES, J; MOREIRA, J.C; LUZ, C. Os impactos dos agrotóxicos sobre a saúde e o ambiente. **Ciência & Saúde Coletiva - SciELO Public Health**. 2007.

SIMONIELLO, M. F; KLEINSORGE, E. C; SCAGNETTI, J. A; GRIGOLATO, R. A; POLETTA, G. L; CARBALLO, M. A. DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures. **Journal of Applied Toxicology**, vol. 28: 957–965. 2008.

TOUMI, H; BOUMAIZA, M; MILLET, M; RADETSKI, C.M; FELTEN, V; FOUQUE, C; FÉRARD, J.F. Effects of Deltamethrin (pyrethroid insecticide) on growth, reproduction, embryonic development and sex differentiation in two strains of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). **Science of the Total Environment**, vol. 458–460, pag. 47–53. 2013.

TOUMI, H; BOUMAIZA, M; IMMEL, F; SOHM, B; FELTEN, V; FÉRARD, J-F. Effect of deltamethrin (pyrethroid insecticide) on two clones of *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera): A proteomic investigation. **Elsevier – Aquatic Toxicology**, vol. 148, pag 40-47. 2014.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática – Princípios e Aplicações**. Editora Rima, São Carlos. 472 p., 2008.

8 ANEXOS

ANEXO A

- **Soluções utilizadas no meio de cultivo da *Daphnia magna***

A Tabela 1 apresenta as soluções utilizadas para o preparo do meio de cultivo e a Tabela 2 apresenta as quantidades de cada solução inseridas para o preparo de 20 L do meio de cultivo. Destaca-se que as concentrações foram ajustadas para o volume de 20L, as quais foram baseadas nas normas da ABNT, NBR 12713:2009 e obedecem aos parâmetros de pH, dureza, condutividade e oxigenação estabelecidos pela norma.

A água de meio é aerada por 12 a 24h, tempo suficiente para que o pH se estabilize e o oxigênio dissolvido atinja a saturação, e armazenada em barrilete de PVC com torneira (KNIE; LOPES, 2004).

Tabela 1-A: Soluções para o cultivo da *Daphnia magna*.

Solução	Reagente	Quantidade (mg)	Preparo
1	CaCl ₂ .2H ₂ O	73500	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
2	MgSO ₄ .7H ₂ O	123300	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
3	KCl	5800	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
4	NaHCO ₃	64800	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
5	MnCl ₂ .4H ₂ O	7210	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
	LiCl	6120	
	RbCl	1420	
	SrCl ₂ .6H ₂ O	3040	
	CuCl ₂ .2H ₂ O	335	
	ZnCl ₂	260	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	200	
6	NaNO ₃	548	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
	H ₃ BO ₃	5719	
	NaBr	32	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	126	
	NH ₄ VO ₃	1,15	
	KI	6,5	
	Na ₂ SeO ₃	4,38	
7	NaSiO ₃	21465	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada, deixando em agitação até o

Solução	Reagente	Quantidade (mg)	Preparo
			clareamento da solução
8	Na ₂ EDTA.7H ₂ O	500 mg	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada. Preparar as soluções separadamente, cada uma em 500 mL de água processada. Misturar as duas soluções e autoclavar imediatamente a 121 °C por 15 min
	FeSO ₄ .7H ₂ O	199,1 mg	
9	KH ₂ PO ₄	286 mg	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada
	K ₂ HPO ₄	368 mg	
	Hidrocloreto de tiamina	750 mg	
10	Cianocobalamina (vitamina B12)	10 mg	Dissolver e diluir a 1000 mL com água processada. Congelar em volume adequado para uso
	D (+) Biotina	7,5 mg	

Fonte: Adaptado de ABNT NBR 12713:2009.

Tabela 2-A: Volume de soluções para preparo de 20L do meio de cultivo da *Daphnia magna*.

Solução	Quantidade
1	64 mL
2	16 mL
3	16 mL
4	16 mL
5	02 mL
6	10 mL
7	04 mL
8	100 mL
9	10 mL
10	02 mL

Conforme recomendações de Knie e Lopes (2004), as soluções preparadas tinham validade de seis meses e as soluções 1 a 9, eram armazenadas na geladeira, a 5°C e a solução 10 era armazenada no congelador.

• Água de Diluição

A água de diluição é composta pela solução 1, 2, 3 e 4, cujas quantidades são apresentadas na tabela abaixo, e completada com água deionizada. Antes de serem utilizadas, as águas de diluição eram aeradas durante 24h.

Tabela 3-A: Quantidades das soluções inseridas na água de diluição.

Solução	Quantidade
1	3,2 mL para 1000 mL
2	0,8 mL para 1000 mL
3	0,8 mL para 1000 mL
4	0,8 mL para 1000 mL

ANEXO B

Lavagem das vidrarias

- Materiais de cultivo

Com a troca da água de cultivo de *Daphnia magna* também era realizada a troca dos béqueres. Estes eram lavados em 5 etapas:

1. Lavagem com água da torneira;
2. Limpeza com álcool;
3. Enxágue com água da torneira, mínimo cinco vezes;
4. Enxágue com água deionizada, mínimo três vezes, e;
5. Secagem na estufa (50° C).

As bacias e peneiras utilizadas são lavadas, no mínimo três vezes, com água da torneira e enxaguadas com água deionizada.

- Materiais de teste

Os béqueres contaminados com Decis[®] 25 EC eram lavados em cinco etapas:

1. Lavagem com Extran 2,5%;
2. Enxágue com água da torneira até não ocorrer a formação de espuma;
3. Banho ácido, 12 a 24h;
4. Enxágue com água da torneira, mínimo cinco vezes;
5. Enxágue com água deionizada, mínimo três vezes, e;
6. Secagem na estufa (50° C).

Os béqueres utilizados nos testes de sensibilidade (com KCl) eram lavados como os béqueres contaminados com o Decis[®] 25 EC, contudo não era realizada a etapa de lavagem com o Extran, esta etapa era substituída lavagem com água da torneira.

A peneira e as pipetas de plástico utilizadas para a separação dos filhotes e inserção dos mesmos nos béqueres com solução teste eram esterilizadas em cinco etapas:

1. Enxágue com água da torneira, água corrente por 5 segundos;
2. Banho ultrassônico por 4 min, no qual o béquer é inserido no banho, contendo a peneira e a pipeta em solução com água da torneira e Extran 2,5%;
3. Enxágue com água da torneira, mínimo cinco vezes;
4. Enxágue com água deionizada e;
5. Banho ultrason por 4 min, no qual o béquer é inserido no banho, contendo a peneira e a pipeta com água deionizada.

ANEXO C

Resultados Teste de Sensibilidade com KCl

- Carta Controle

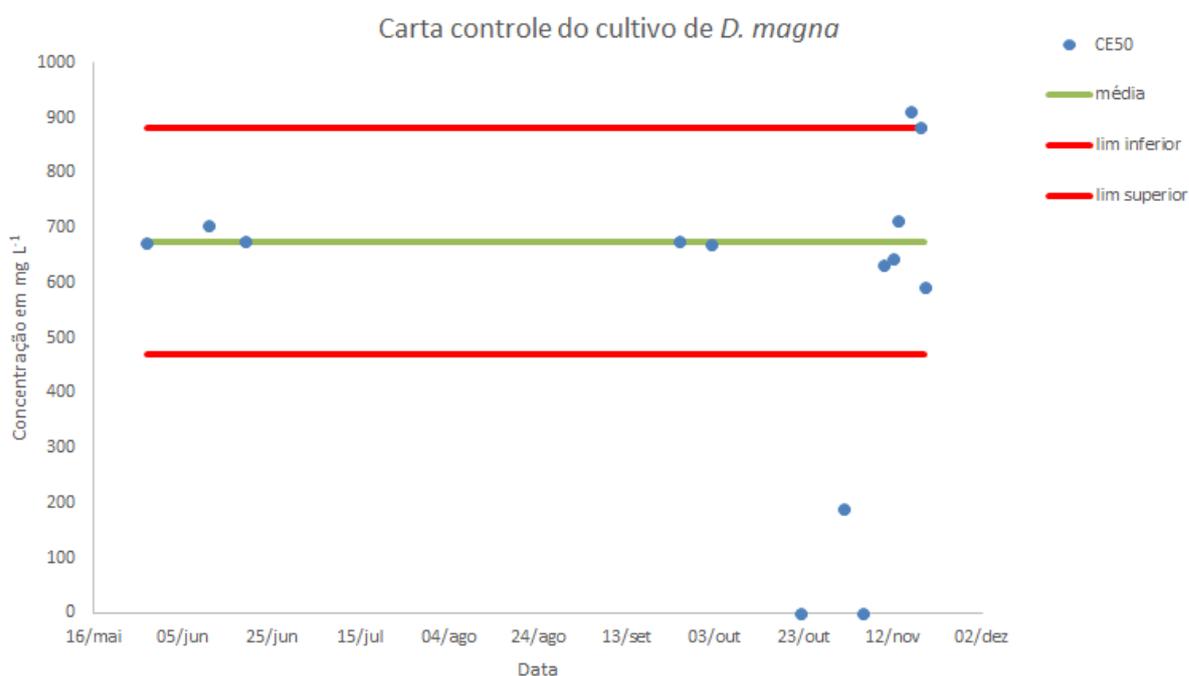


Figura 1-C: Carta-controle.

- Resultados analíticos

Para a elaboração dos resultados analíticos dos testes de sensibilidade, foram considerados os testes realizados no período de 28/05/2015 à 19/11/2015 e que apresentaram porcentagem de imobilidade do controle < 10% (Tabela 1-C). Destaca-se que o teste de sensibilidade referente ao dia 22/10/2015 foi desconsiderado, pois ocorreu a imobilidade de todos os organismos teste e desta forma o software Biostat[®] não pode calcular a CE₅₀.

Tabela 1-C: CE₅₀ do teste de sensibilidade.

Data de realização do teste	% imobilidade do Controle	CE ₅₀
28/05/2015	0%	673,15
11/06/2015	0%	704,5
19/06/2015	0%	674,96
25/09/2015	0%	674,85
02/10/2015	0%	668,49
22/10/2015	10%	-
01/11/2015	50%	188,08
05/11/2015	17%	0,00
10/11/2015	0%	632,03
12/11/2015	23%	643,97
13/11/2015	0%	713,61
16/11/2015	0%	910,65
18/11/2015	0%	883,42
19/11/2015	0%	593,27

O coeficiente de variação - CV, segundo Zagatto e Bertoletti (2008), é considerado bom quando $\leq 30\%$. Deste modo, o CV obtido em nossos lotes, com os resultados do teste de sensibilidade, é considerado bom (Tabela 2-C).

Quadro 1-C: Resultados analíticos do teste de sensibilidade.

Média (X)	674,91
Desvio Padrão (S)	103,03
Coeficiente de Variação (CV)	15,27

ANEXO D

Gráficos Análise Probit – Biostat®

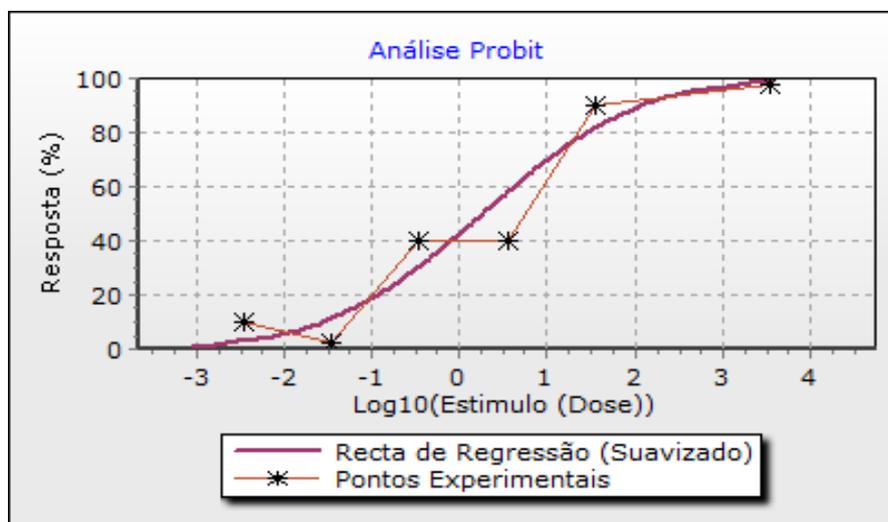


Figura 1-D: Análise Probit – Teste definitivo 17/11/2015

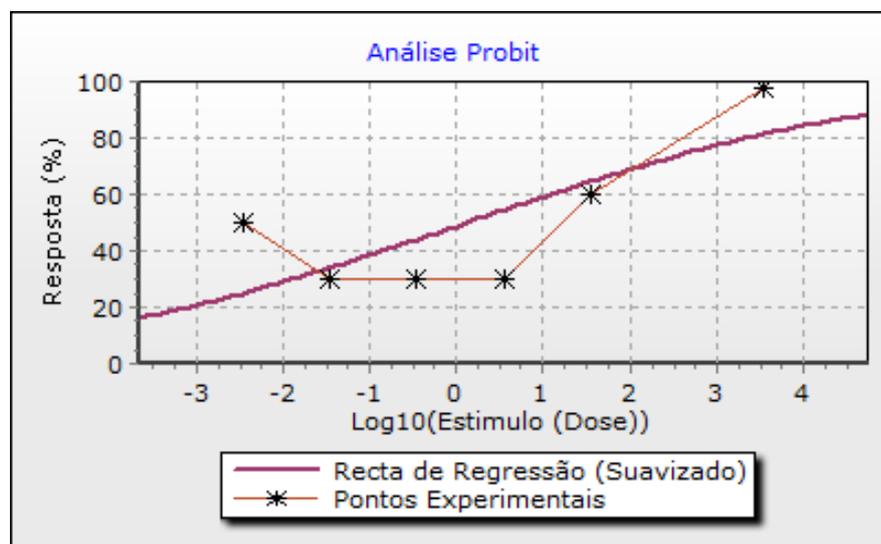


Figura 2-D: Análise Probit – Teste definitivo 19/11/2015

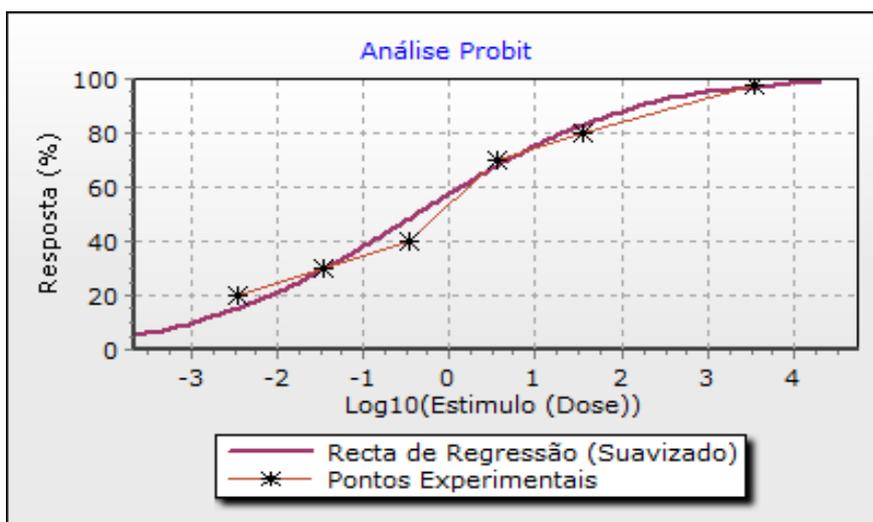


Figura 3-D: Análise Probit – Teste definitivo 20/11/2015

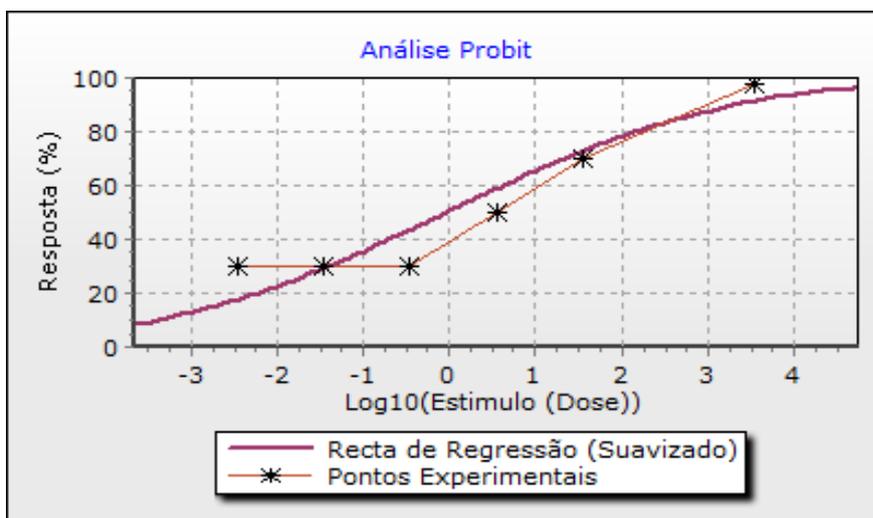


Figura 4-D: Análise Probit – Teste definitivo 03/12/2015

ANEXO E

Memorial de Cálculo

- Cálculo da Solução mãe para o teste definitivo

No teste definitivo foram preparadas duas Soluções-mãe, SM1 e SM2. A solução SM1 foi preparada em balão volumétrico de 50 mL, no qual foi inserido 1 µL do Decis[®] 25 EC e completado com água deionizada. Deste modo, a concentração da Deltametrina (C₂) obtida na SM1 foi 0,5 mg/L (Fórmula 1).

Fórmula 1 : Cálculo da concentração da SM1.

$$25000 \text{ mg/L} \cdot 1 \mu\text{L} = C_2 \cdot 50000 \mu\text{L}$$

$$C_2 = 0,5 \text{ mg/L}$$

A SM2 foi preparada em balão volumétrico de 25 mL, no qual foi inserido 2µL da SM1 e completado com água deionizada. Deste modo, a concentração da Deltametrina (C₂) obtida na SM2 foi 4.10⁻⁵ mg/L (Fórmula 2).

Fórmula 2 : Cálculo da concentração da SM2.

$$0,5 \text{ mg/L} \cdot 2 \mu\text{L} = C_2 \cdot 25000 \mu\text{L}$$

$$C_2 = 4 \cdot 10^{-5} \text{ mg/L}$$

- Cálculo das concentrações para o teste definitivo

As concentrações das soluções para contaminação das *D. magna* foram preparadas de acordo com os seguintes cálculos:

Tabela 1-E: Soluções 1 a 3 de teste de toxicidade definitivo

Sol.	Concentração da Deltametrina da SM1 (C ₁)	Volume da SM1 inserido na solução (V ₁)	Concentração da Deltametrina obtida (C ₂)	Cálculo do V ₁
1	0,50	700,0	3,50.10 ⁻³	$0,5 \text{ mg/L} \cdot V_1 \mu\text{L} = 3,5 \cdot 10^{-3} \cdot 100000 \mu\text{L}$ $V_1 = 700 \mu\text{L}$
2	0,50	7,0	3,50.10 ⁻⁵	$0,5 \text{ mg/L} \cdot V_1 \mu\text{L} = 3,5 \cdot 10^{-5} \cdot 100000 \mu\text{L}$ $V_1 = 7,0 \mu\text{L}$
3	0,50	0,7	3,50.10 ⁻⁶	$0,5 \text{ mg/L} \cdot V_1 \mu\text{L} = 3,5 \cdot 10^{-6} \cdot 100000 \mu\text{L}$ $V_1 = 0,7 \mu\text{L}$

Tabela 2-E: Soluções 4 a 6 de teste de toxicidade definitivo

Sol.	Concentração da Deltametrina da SM2 (C ₁)	Volume da SM2 inserido na solução (V ₁)	Concentração da Deltametrina obtida (C ₂)	Cálculo do V ₁
4	$4,0 \cdot 10^{-5}$	875,0	$3,50 \cdot 10^{-7}$	$4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mg/L} \cdot V_1 \mu\text{L} = 3,5 \cdot 10^{-7} \cdot 100000 \mu\text{L}$ $V_1 = 875,0 \mu\text{L}$
5	$4,0 \cdot 10^{-5}$	87,5	$3,50 \cdot 10^{-8}$	$4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mg/L} \cdot V_1 \mu\text{L} = 3,5 \cdot 10^{-8} \cdot 100000 \mu\text{L}$ $V_1 = 87,5 \mu\text{L}$
6	$4,0 \cdot 10^{-5}$	8,8	$3,50 \cdot 10^{-9}$	$4,0 \cdot 10^{-5} \text{ mg/L} \cdot V_1 \mu\text{L} = 3,5 \cdot 10^{-9} \cdot 100000 \mu\text{L}$ $V_1 = 8,8 \mu\text{L}$