

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



Júlia Vianna da Anunciação de Pinho

Avaliação ecotoxicológica de sistema unitário e combinado de um pesticida neonicotinoide (acetamiprida) e de uma cianobactéria produtora de saxitoxinas (*Raphidiopsis raciborskii*) em cladóceros

Rio de Janeiro

2021

Júlia Vianna da Anunciação de Pinho

Avaliação ecotoxicológica de sistema unitário e combinado de um pesticida neonicotinoide (acetamiprida) e de uma cianobactéria produtora de saxitoxinas (*Raphidiopsis raciborskii*) em cladóceros

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Toxicologia Ambiental.

Orientador: Fábio Veríssimo Correia.

Coorientador: Aloysio S. Ferrão-Filho.

Rio de Janeiro

2021

Título do trabalho em inglês: Ecotoxicological evaluation of a unitary and combined system of a neonicotinoid pesticide (acetamiprid) and a saxitoxin-producing cyanobacterium (*Raphidiopsis raciborskii*) in cladocerans.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Catálogo na fonte
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde
Biblioteca de Saúde Pública

P654a Pinho, Júlia Vianna da Anunciação de.
Avaliação ecotoxicológica de sistema unitário e combinado de um pesticida neonicotinoide (acetamiprida) e de uma cianobactéria produtora de saxitoxinas (*Raphidiopsis raciborskii*) em cladóceros / Júlia Vianna da Anunciação de Pinho. -- 2021.
87 f. : il. color. ; graf. ; tab.

Orientador: Fábio Veríssimo Correia.
Coorientador: Aloysio S. Ferrão-Filho.
Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2021.

1. Limnologia. 2. Neurotoxinas. 3. Praguicidas. 4. Zooplâncton.
5. Cianobactérias. 6. Agricultura. 7. Ecotoxicologia. I. Título.

CDD – 23.ed. – 632.9517

Júlia Vianna da Anunciação de Pinho

Avaliação ecotoxicológica de sistema unitário e combinado de um pesticida neonicotinoide (acetamiprida) e de uma cianobactéria produtora de saxitoxinas (*Raphidiopsis raciborskii*) em cladóceros

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Toxicologia Ambiental.

Aprovada em: 15 de julho de 2021.

Banca Examinadora

Profa. Dr^a Silvia Mattos Nascimento
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Profa. Dr^a Rachel Ann Hauser-Davis
Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Oswaldo Cruz

Prof. Dr Enrico Mendes Saggioro
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca

Prof. Dr. André Luís De Sá Salomão
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Aloysio da Silva Ferrão-Filho (Coorientador)
Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Oswaldo Cruz

Prof. Dr. Fábio Veríssimo Correia (Orientador)
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca

Rio de Janeiro

2021

À minha irmã-alma-gêmea Giovanna.

Você é absolutamente tudo.

AGRADECIMENTOS

Obrigada Família Vianna: mãe, pai, irmãos, avó, bisá e biso por todo esforço, amparo e incentivo, não apenas nessa etapa, mas em todas as anteriores e nas futuras também.

Aos meus orientadores Dr. Fábio e Dr. Aloysio que não apenas me conduziram nessa fase da jornada, mas que sempre tiveram paciência, respeito e compreensão e se dispuseram a ouvir minhas dúvidas e desesperos cotidianos. Sou imensamente grata por tantas coisas: puxões de orelha, conversas, ensinamentos. Vocês são pessoas tão diferentes, mas que de certa forma me ensinaram as mesmas coisas: calma, precisão e esperança.

A minha grande incentivadora Dr^a Ludmila Bergsten-Torralba que jamais desistiu de mim. Eu tenho certeza que Deus te colocou na minha trajetória esperando que você passasse por um teste de paciência e no final eu ganhei a maior das bênçãos. Te amo infinitamente.

Ao Dr. Mauro Vilar e a Dr^a Rachel Ann Hauser-Davis que me apoiaram, ficaram ao meu lado sempre que precisei e me ensinaram tanto. Se a pessoa que entrega essa dissertação é mais decidida e forte que a menina que ingressou no mestrado em 2019 isso é graças à suas palavras.

Aos meus colegas de turma que compartilharam os mais inusitados momentos comigo, as amigas que fiz nessa trajetória: Daphne, Louise e Julia, além dos meus amigos de vida Raphael, Juliana, Maísa e Wolfgang que são a maior fonte de pureza da minha vida. Sem vocês eu não teria nem mesmo atravessado a rua.

Aos alunos de IC que compartilharam bons e maus dias comigo e com quem eu tenho crescido junto a cada dia: Gustavo, Jéssica, Michele e Larissa e, principalmente, minha amiga Julia Rodrigues, com quem dividi de piadas à faxinas, por ser minha parceira e “maria fiã” todos os dias e ao Michael Ribas que foi muito mais que meu pupilo e parceiro de laboratório. Obrigada por ser minha “dupla de tudo”, pelas implicâncias diárias, pelos mimos e pela sua companhia e apoio.

Aos trabalhadores terceirizados da Fundação Oswaldo Cruz e da Universidade Federal do Rio de Janeiro responsáveis pela segurança e manutenção dos *campi*.

A Dona Creuza, por todos os conselhos e conversas e por sempre estar disposta a ajudar todo mundo.

A toda equipe do CESTEJ, do LAPSA e do LETC pelo apoio na manutenção e realização dos ensaios.

A CAPES e a ENSP pela concessão da bolsa para realização desse trabalho.

RESUMO

A agricultura é uma das principais fontes de degradação dos recursos hídricos devido a aplicação e transporte de compostos químicos como fertilizantes e pesticidas. Além de promoverem o enriquecimento nutricional e a contaminação química da água, pesticidas como neonicotinoides vêm sendo cada vez mais detectados em ambientes aquáticos, que sofrem, ainda com a intensificação na ocorrência de florações de cianobactérias. Considerando a complexidade das interações entre tais materiais na biosfera, o presente trabalho teve como objetivo determinar os efeitos de um pesticida neonicotinóide e uma cianobactéria filamentosa produtora de saxitoxina, de forma unitária e combinada, sobre três espécies de cladóceros, sendo duas espécies isoladas de corpos hídricos tropicais (*Daphnia laevis* e *Moina micrura*) e uma de região temperada (*D. similis*). Os três clones foram submetidos a exposições individuais e de mistura em diferentes proporções da cepa de *Raphidiopsis raciborskii* LETC-CY-05 e de acetamiprida. Os ensaios tiveram duração de 96 horas – toxicidade aguda – e de 15 dias – toxicidade crônica – e foram observados efeitos sobre a sobrevivência, crescimento somático, reprodução e crescimento populacional. O clone de *D. similis* foi ainda submetido a ensaios comportamentais com 24 horas de exposição. *D. similis* foi a espécie mais sensível a todas as exposições agudas individuais ($CL_{50} = 284 \mu\text{g L}^{-1}$ e $449 \mu\text{g L}^{-1}$ para a cianobactéria e o pesticida respectivamente), e se mostrou mais sensível à mistura em função da presença da cianobactéria, além de exibir aumento nos parâmetros de comportamento em função da exposição à mistura. Já *D. laevis* – pouco afetada nos ensaios agudos com LETC-CY-05 ($CL_{50} = 3270 \mu\text{g L}^{-1}$) e acetamiprida ($CL_{50} = 2620 \mu\text{g L}^{-1}$) – apresentou efeitos adversos à mistura conforme o tempo de exposição, sendo verificado antagonismo em até 96 horas e de sinergismo a potencialização nas exposições crônicas ($CL_{50} = 8340 \mu\text{g L}^{-1}$). Da mesma forma, *Moina micrura* foi resistente nos ensaios agudos individuais, porém a mistura se mostrou mais tóxica ($CL_{50} = 10100 \mu\text{g L}^{-1}$), enquanto, em ensaios crônicos foi observado tamponamento do efeito dos agentes. Com isso foram observados diferentes padrões de resposta em função do clone e proporção dos agentes e, ainda, uma forte relação entre o tempo de exposição e o grau de efeito observado, reforçando a necessidade de avaliação de diferentes *endpoints* fisiológicos para avaliação de efeitos combinados.

Palavras-chave: limnologia, neurotoxinas, pesticidas, zooplâncton, ecotoxicologia de misturas.

ABSTRACT

Agriculture is one of the primary sources of degradation of water resources due to the application and loading of chemical compounds such as fertilizers and pesticides. In addition to promoting nutritional enrichment and chemical contamination of water, pesticides such as neonicotinoids have been increasingly detected in aquatic environments, which suffer, even with the intensification of the occurrence of cyanobacterial blooms. Considering the complexity of interactions between such materials in the biosphere, this study aimed to determine the effects of a neonicotinoid pesticide and a saxitoxin-producing filamentous cyanobacterium, in a unitary and combined form, on three species of cladocerans, two species isolated from bodies tropical waters (*Daphnia laevis* and *Moina micrura*) and one from the temperate region (*D. similis*). The three clones were subjected to single and mixed exposures in different proportions of the *Raphidiopsis raciborskii* strain LETC-CY-05 and acetamiprid. The trials lasted 96 hours – acute toxicity – and 15 days – chronic toxicity – and effects on survival, somatic growth, reproduction, and population growth were observed. *D. similis* was also submitted to behavioral tests with 24 hours of exposure. *D. similis* was the most sensitive species to all individual acute exposures (LC50 = 284 µg L⁻¹ and 449 µg L⁻¹ for the cyanobacteria and pesticide respectively) and was more sensitive to the mixture due to the presence of the cyanobacteria, in addition to exhibiting an increase in behavioral parameters as a function of exposure to the mixture. On the other hand, *D. laevis* – little affected in acute assays with LETC-CY-05 (LC50 = 3270 µg L⁻¹) and acetamiprid (LC50 = 2620 µg L⁻¹) – presented adverse effects to the mixture according to the exposure time, being verified antagonism in up to 96 hours and synergism to potentiation in chronic exposures (LC50 = 8340 µg L⁻¹). Likewise, *Moina micrura* was resistant in individual acute tests, but the mixture was more toxic (LC50 = 10100 µg L⁻¹), while in chronic tests, buffering of the agents' effect was observed. Thus, different response patterns were observed depending on the clone and proportion of agents and a strong relationship between exposure time and the degree of effect observed, reinforcing the need to evaluate different endpoints to assess combined impacts.

Keywords: limnology, neurotoxins, pesticides, zooplankton, mixture ecotoxicology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema de fontes poluidoras que afetam os ecossistemas aquáticos e as suas principais pressões sobre os seres vivos	19
Figura 2: Histórico de consumo de ingredientes ativos por área cultivada (kg. Ha ⁻¹) no Brasil entre os anos de 2010 e 2014.....	19
Figura 3: Número de registros de agrotóxicos liberados no Brasil entre os anos de 2010 e 2020	20
Figura 4: Estrutura química do neonicotinoide Acetamiprida	21
Figura 5: Mecanismo de ação da acetamiprida (a), indicando a atividade a substância no neurônio pós sináptico (b) como agonista de acetilcolina (c)	22
Figura 6: Estruturas químicas gerais de a. Hepatotoxinas e b. neurotoxinas	24
Figura 7: Mecanismo de ação da saxitoxina, indicando a atividade a substância no neurônio pré-sináptico (b) como bloqueador dos canais de sódio (c)	27
Figura 8: Etapas de respostas dos organismos às exposições de agentes intoxicantes com escala crescente de gravidade e irreversibilidade de dano oriundo de impactos sobre o comportamento, alcançando níveis ecossistêmicos.	28
Figura 9: Clones de cládoceros utilizados nos ensaios ecotoxicológicos: a. <i>D. laevis</i> ; b. <i>M. micrura</i> ; c. <i>D. similis</i>	32
Figura 10: Esquema de cultivo de LETC-CY-05 (a) e preparo de filtros (b) para determinação de biomassa (c) e extração de toxinas (d) e utilização em ensaios de toxicidade (e).....	34
Figura 11: Desenho esquemático de preparo e execução dos testes de exposição aguda de 96 horas onde (a) representa a separação de neonatos, (b) a medição do comprimento inicial, (c) o preparo dos tratamentos e (d) a contabilização de indivíduos mortos após 96 horas seguida de (e) medição do comprimento final dos sobreviventes	35
Figura 12: Modelo de exposição aplicado em ensaios de toxicidade crônica com duração de 14 dias.....	38
Figura 13: Esquema de execução de teste aplicado para avaliação de efeito comportamental onde (a) é a separação de neonatos para (b) manutenção por 4-6 dias e (c) aplicação nos ensaios, nos quais (d) é a colocação dos organismos em câmara de acrílico para (e) gravação de vídeos e (f) análise.	40
Figura 14: Taxa de crescimento média para três espécies de microcrustáceos expostos a cianobactéria <i>R. raciborskii</i> com seus respectivos tratamentos e desvio padrão para cada tratamento com 3 replicatas	43

Figura 15: Taxa de crescimento médio para três espécies de microcrustáceos expostos a acetamiprida (ACE) com seus respectivos tratamentos e desvio padrão para cada tratamento	45
Figura 16: Taxa de crescimento somático para 4 dias de exposição a mistura com seus respectivos tratamentos e desvio padrão para cada tratamento composto por 3 replicatas.....	47
Figura 17: Curva de sobrevivência de a. <i>D. similis</i> , b. <i>D. laevis</i> e c. <i>M. micrura</i> expostas a cepa LETC-CY-05 durante 48 horas e 96 horas com desvios padrões para cada tratamento compostos por 3 replicatas.....	49
Figura 18: Curva de sobrevivência de a. <i>D. similis</i> , b. <i>D. laevis</i> e c. <i>M. micrura</i> expostas ao neonicotinoide acetamiprida durante 48 horas e 96 horas com desvios padrões para cada tratamento.....	52
Figura 19: Curva de sobrevivência de a. <i>D. similis</i> , b. <i>D. laevis</i> e c. <i>M. micrura</i> expostas a mistura contendo <i>R. raciborskii</i> e o neonicotinoide acetamiprida durante 48 horas e 96 horas com desvios padrões para cada tratamento.....	54
Figura 20: Indivíduos de <i>D. laevis</i> submetidos a tratamentos: a. Controle; b. 3000 µg PS L-1 de LETC-CY-05; c. 7500 µg L-1 de Mistura (1:2); d. 5000 µg L-1 de Mistura (1:1); e. 4500 µg L-1 de Mistura (2:1).	56
Figura 21: Taxa de sobrevivência por dia para os cladóceros a. <i>D. similis</i> , b. <i>D. laevis</i> e c. <i>M. micrura</i> expostos a tratamentos da cepa LETC-CY-05 durante 15 dias.....	59
Figura 22: Taxa de sobrevivência por dia para os cladóceros a. <i>D. similis</i> , b. <i>D. laevis</i> e c. <i>M. micrura</i> expostos a tratamentos de acetamiprida durante 15 dias.....	60
Figura 23: Taxa de sobrevivência por dia para os cladóceros a. <i>D. similis</i> , b. <i>D. laevis</i> e c. <i>M. micrura</i> expostos a tratamentos da cepa LETC-CY-05 durante 15 dias.....	62
Figura 24: Parâmetros reprodutivos para <i>D. similis</i> , <i>D. laevis</i> e <i>M. micrura</i> em exposição a LETC-CY-05, onde A. Idade de Primeira reprodução; B. Fecundidade média; C. Total de neonatos e D. Taxa intrínseca de crescimento populacional.....	64
Figura 25: Parâmetros reprodutivos para <i>D. similis</i> , <i>D. laevis</i> e <i>M. micrura</i> em exposição a LETC-CY-05, onde A. Idade de Primeira reprodução; B. Fecundidade média; C. Total de neonatos e D. Taxa intrínseca de crescimento populacional.....	66
Figura 26: Parâmetros reprodutivos para <i>D. similis</i> , <i>D. laevis</i> e <i>M. micrura</i> em exposição a mistura de LETC-CY-5 e acetamiprida em diferentes proporções, onde A. Idade de Primeira reprodução; B. Fecundidade média; C. Total de neonatos e D. Taxa intrínseca de crescimento populacional.....	69
Figura 28: Efeitos apresentados por <i>D. similis</i> sobre velocidade média e distância percorrida para exposições unitárias e combinadas e LETC-CY-05 e acetamiprida.....	71

Figura 29: Efeitos provocados por tratamentos unitários e combinados de LETC-CY-05 e acetamiprida sobre o comportamento natatório de *D. similis*73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados de detecção e quantificação de acetamiprida em matrizes ambientais	23
Tabela 2: Dados de detecção e quantificação de cianobactérias e cianotoxinas em corpos hídricos	26
Tabela 3: Comparação entre vantagens e desvantagens de bioensaios ecotoxicológicos agudo e crônico	29
Tabela 4: Diluições efetuadas para ensaios de toxicidade aguda – 96h para <i>D. similis</i> , <i>D. laevis</i> e <i>M. micrura</i> submetida aos 4 variantes	36
Tabela 5: Diluições efetuadas para ensaios de toxicidade crônica – 15 dias para <i>D. similis</i> , <i>D. laevis</i> e <i>M. micrura</i> submetida aos 3 variantes testados	38
Tabela 6: Diluições estabelecidas para utilização nos ensaios comportamentais de 24h	40
Tabela 7: Concentrações das culturas de LETC-CY-05 aplicadas a cada ensaio de toxicidade em valores de Peso seco ($\mu\text{g PS L}^{-1}$)	42
Tabela 8: Dados de relação entre as concentrações da cepa LETC-CY-05 ($\mu\text{g PS L}^{-1}$) e ACE ($\mu\text{g L}^{-1}$) quanto a proporção de cada agente nos ensaios da mistura	43
Tabela 8: Concentrações de Efeito (CE_{50}) estimadas para o crescimento somático de micro crustáceos expostos por 96 horas	44
Tabela 9: Concentração Letal (CL_{50}) estimada para exposições de 48 e 96 horas de exposição em ensaios agudos	51
Tabela 10: Estimativas de efeito observado para a sobrevivência de microcrustáceos expostos a mistura de ACE e LETC-CY-05, segundo modelo de Jonker et. al (2005)	55
Tabela 11: Concentrações de Efeito sobre a fecundidade média (CE_{50}) e Concentrações Letais para 50% (CL_{50}) para indivíduos expostos a LETC-CY-05, acetamiprida (ACE) e a mistura entre eles (MIX) em ensaio de toxicidade crônica.	58
Tabela 12: Estimativa de efeito e efeito observado para sobrevivência de três microcrustáceos expostos a mistura de LETC-CY-05 e ACE	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg – Micrograma

μL – Microlitro

^a – Tratamentos de mistura contendo a mesma proporção e com concentração total superior

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ACE – Acetamiprida

ACh – Acetilcolina

AChe – Acetilcolinesterase

AgNPs – Nanopartículas de prata

BBP – Ftalato de butil benzílico

BMMA – β -Methylamino-L-alanine

CE₅₀ - Concentração de Efeito 50%

CL₁₅ – Concentração Letal 15%

CL₅₀ – Concentração Letal 50 %

CLP – Clorpirifós

DL₅₀ – Dose Letal 15%

EPA – Agência de Proteção Ambiental (do inglês *Environmental Protection Agency*)

HAB – Floração de algas nocivas (do inglês Harmful algal blooms)

ISO – Organização Internacional para Padronização (do inglês *International Organization for Standardization*)

L⁻¹ – Litro

mg – Miligrama

MIX – Mistura

mL – Mililitro

nAChR – receptores nicotínicos de acetilcolina

OECD – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (do inglês *Organization for Economic Cooperation and Development*)

pH – Potencial de Hidrogênio

PS – Peso seco

STXs – saxitoxinas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	155
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 CONTAMINAÇÃO HÍDRICA.....	18
2.1.1 Agricultura	19
2.1.1.1 <i>Acetamiprida</i>	21
2.1.2 Cianobactérias	23
2.1.2.1 <i>Raphidiopsis raciborskii</i>	26
2.2 ECOTOXICOLOGIA.....	28
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL.....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4 METODOLOGIA.....	32
4.1 CULTIVO DE ORGANISMOS	32
4.1.1 Manutenção de produtores primários	32
4.1.2 Manutenção de cladóceros	32
4.2 ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA	33
4.2.1 Preparo de LETC-CY-05.....	33
4.2.2 Preparo de acetamiprida	34
4.2.3 Exposições	34
4.3 ENSAIOS DE TOXICIDADE CRÔNICA	36
4.3.1 Preparo de LETC-CY-05.....	37
4.3.2 Preparo de Acetamiprida.....	37
4.3.3 Exposições.....	37
4.4 ENSAIOS COMPORTAMENTAIS	39
4.5 ANÁLISE DE DADOS	41
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
5.1 ENSAIOS AGUDOS.....	43
5.1.1 Crescimento somático.....	43
5.1.1.1 <i>LETC-CY-05</i>	43
5.1.1.2 <i>Acetamiprida</i>	45
5.1.1.3 <i>Mistura</i>	46
5.1.2 Sobrevivência	48
5.1.2.1 <i>LETC-CY-5</i>	48
5.1.2.2 <i>Acetamiprida</i>	51

5.1.2.3 <i>Mistura</i>	53
5.2 ENSAIOS CRÔNICOS	57
5.2.1 Sobrevivência.....	58
5.2.1.1 <i>LETC-CY-5</i>	58
5.2.1.2 <i>Acetamiprida</i>	60
5.2.1.3 <i>Mistura</i>	61
5.2.2 Reprodução	63
5.2.2.1 <i>LETC-CY-05</i>	63
5.2.2.2 <i>Acetamiprida</i>	65
5.2.2.3 <i>Mistura</i>	67
5.2.3 Crescimento populacional	70
5.3 ENSAIOS COMPORTAMENTAIS	71
6 CONCLUSÕES	75
7 RECOMENDAÇÕES FUTURAS.....	76
REFERÊNCIAS	77

1. INTRODUÇÃO

A “crise ambiental”, definida por Miller e Spoolman, (2009) está associada a uma redução na qualidade de vida no planeta e depende de três principais pilares: população, recursos naturais e poluição. O primeiro trata do crescimento exponencial e desordenado da população, que conseqüentemente necessita de recursos naturais renováveis e não renováveis para se manter (MARTINE, 2007). Estes recursos são explorados às custas do desmatamento, utilização de substâncias tóxicas e, na maioria das vezes, com uma taxa de utilização que supera a máxima capacidade de sustentação do sistema.

A poluição pode ser definida como uma alteração ecológica oriunda da introdução antrópica de substâncias, materiais ou energia no ambiente com potencial de ocasionar desequilíbrio nos ecossistemas, danos à saúde humana e ambiental (PEIRY, 2017). As alterações indesejáveis provocadas pelas atividades e intervenções humanas tem causado pressões negativas, indesejáveis e muitas vezes irreversíveis sobre o ambiente, em especial sobre os ambientes aquáticos (FUNARI *et al.*, 2017; ROCHA *et al.*, 2018). Dentre os principais fenômenos de poluição ligados a concentração ou quantidade de resíduos presentes na água está a eutrofização.

A eutrofização, a princípio, é um processo natural, bastante demorado, associado ao tempo de evolução dos ecossistemas, que se manifesta por meio do aumento de produtividade biológica, onde ocorre a proliferação de algas e outros vegetais aquáticos em decorrência do aumento da disponibilidade de nutrientes, tais como o nitrogênio e o fósforo (CALLISTO; MOLOZZI; BARBOSA, 2013). No entanto, a eutrofização associada à intervenção humana é chamada de eutrofização cultural ou acelerada, fruto da ocupação de atividades industriais, agrícolas ou zonas urbanas (HUANG *et al.*, 2018).

A eutrofização artificial possui como principais fontes ou origens, esgotos domésticos, esgotos industriais, e produtos agrícolas (O'SULLIVAN; 1995). Destas três fontes, a agricultura requer devida atenção, pois consiste em uma atividade elementar das comunidades humanas. Com os avanços tecno-científicos, a aplicação de maquinário e de aditivos químicos, a produtividade dos cultivos tem prosperado e, com isso, vêm superando o colapso populacional previsto pelo economista britânico Thomas Malthus em 1798 em sua obra “*An Essay on the Principle of Population*”.

No entanto, a atividade agrícola, além de promover o aumento da concentração de compostos nitrogenados e fosfatados na biosfera através da aplicação de fertilizantes em diversas culturas, traz, associado à produtividade das lavouras, o uso dependente e indiscriminado de pesticidas no controle de pragas, como insetos e ervas daninhas

(LAMMOGLIA *et al.*, 2017). Assim como os fertilizantes, os pesticidas também atingem os corpos hídricos por escoamento superficial, lixiviação ou via aérea após aplicação (LEFRANCQ *et al.*, 2017).

Os pesticidas vêm, cada vez mais, sendo detectados em ambientes aquáticos (FURIHATA *et al.*, 2019) e tem demonstrado efeitos sobre a produção de pigmentos em algas (GAO *et al.*, 2019), a inibição de processos filtratórios em moluscos (EWERE *et al.*, 2019) e mesmo na sobrevivência e desenvolvimento de amphipodas (BARTLETT *et al.*, 2019), além de outros. Em geral, muitas classes desses pesticidas, como os neonicotinoides, não apresentam padrões de emissão estabelecidos, sendo caracterizados como contaminantes emergentes. Um exemplo dessa situação é a acetamiprida, amplamente aplicada em culturas agrícolas no Brasil (PEREIRA *et al.*, 2011; SILVA; CANTERI; LEITE JÚNIOR, 2012) e tem sido encontrada em recursos hídricos em diversos países (MAHAI *et al.*, 2019; SJERPS *et al.*, 2019; YI *et al.*, 2019).

Além da contaminação por tais substâncias, o aporte de aditivos agroquímicos promove um crescimento anormal da biomassa de produtores primários, como as cianobactérias (TUCCI; SANT'ANNA, 2003). Essa situação pode ser intensificada em regiões tropicais, e também em regiões temperadas em tempos de mudanças climáticas, pois os processos de eutrofização são diretamente influenciados pela radiação solar e a temperatura (JONIAK *et al.*, 2018). Nessas condições, grupos de cianobactérias produtoras de toxinas, como *Raphidiopsis* sp., *Anabaena* sp, *Planktothrix* sp e *Microcystis* sp., comuns em corpos hídricos brasileiros tendem a formar florações.

Com o objetivo avaliar o efeito de substâncias tóxicas sobre organismos representativos do ecossistema aquático, diversos métodos de ensaios de toxicidade aguda e crônica têm sido desenvolvidos e adaptados. Estes ensaios utilizam alguns grupos/espécies de organismos, tais como os cladóceros do gênero *Daphnia*, amplamente difundidos e normatizados por órgãos como a Agência Nacional de Normas Técnicas (ABNT) pela norma NBR12713. Os cladóceros são consumidores primários, um nível trófico diretamente afetado tanto pela ingestão de cianobactérias tóxicas quanto pela exposição à poluentes orgânicos. Por essa razão, estudos ecotoxicológicos com estes organismos vêm se mostrando excelentes modelos no estudo dos efeitos de cianotoxinas (FERRÃO-FILHO *et al.*, 2014) e compostos orgânicos. (BOWNIK; PAWŁOCIK; SOKOŁOWSKA, 2017).

Apesar de serem bons métodos de avaliação, em estudos de toxicidade aguda com organismos aquáticos o principal efeito medido é a letalidade ou alguma outra manifestação do organismo que a antecede como, por exemplo, a imobilidade (COSTA *et al.*, 2008). Por outro lado, os testes de toxicidade crônica permitem avaliar possíveis efeitos tóxicos de substâncias

químicas em funções biológicas, tais como reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação, dentre outras (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006).

Como há uma série de substâncias que são continuamente despejadas em recursos hídricos, a complexidade de suas interações pode resultar nos mais distintos efeitos. Segundo Martín-Díaz; Gagné; Blaise (2009) diferentes respostas subletais podem ser determinadas como indicadores de toxicidade com relação exposições de misturas de contaminantes em águas residuais. Assim, é necessária a avaliação de parâmetros que precedam o efeito letal, uma vez que substâncias tóxicas podem gerar diferentes respostas nas variadas espécies (CROMMENTUIJN *et al.*, 1995).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 CONTAMINAÇÃO HÍDRICA

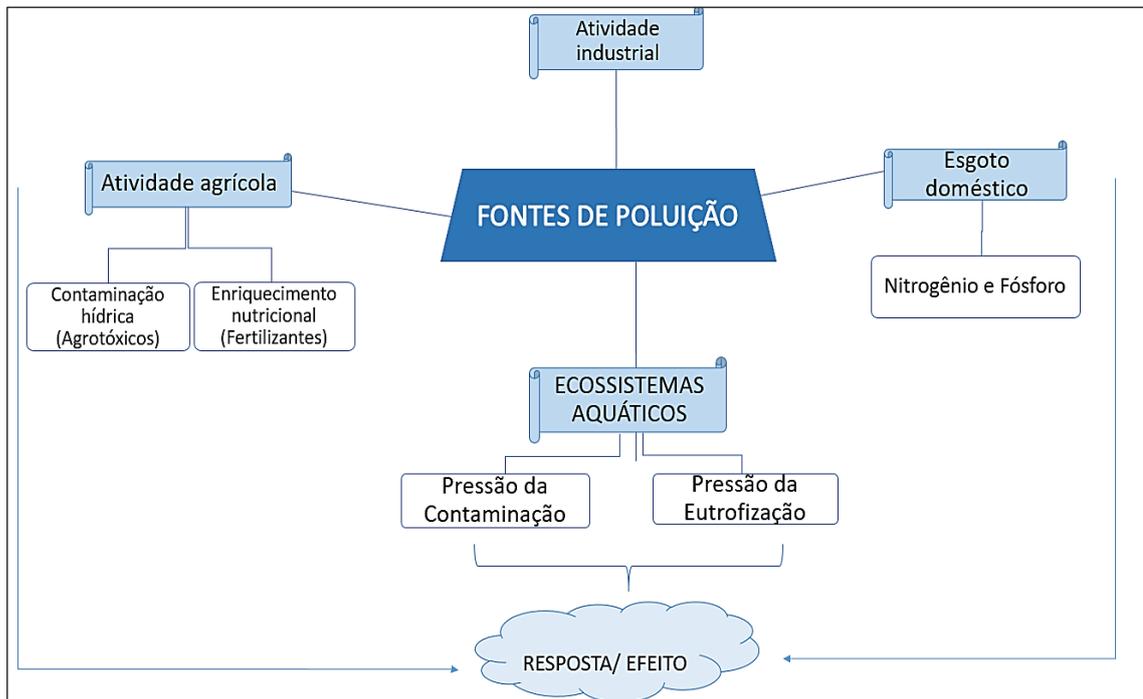
A eutrofização – contaminação hídrica por excesso de nutrientes – é um dos problemas mais comuns associados a perda de qualidade da água (ANA, 2011). Esse aumento é fortemente associado ao aporte de nitrogênio e fósforo oriundos de lançamentos agrícolas e também associados ao esgoto doméstico, processo denominado como eutrofização artificial.

De acordo com Wiegand e Araújo (2016) o aporte nutricional beneficia um aumento do crescimento de produtores primários dos quais destacam-se as algas e as cianobactérias. Como consequência, é verificado um aumento na concentração de substâncias tóxicas – potencialmente produzidas por esses organismos – e a redução do oxigênio através do processo de decomposição da biomassa na água (MORAES, 2009; NYENJE *et al.*, 2010)

Além de nutriente, tem sido verificado o aumento no aporte de contaminantes – Pesticidas, plastificantes, surfactantes, produtos de higiene pessoal, fármacos (JESUS GAFFNEY, DE *et al.*, 2015) – e em contrapartida muitos desses não apresentam toxicidade delineada e padrões de emissão/concentrações definidas.

Dessa forma, existe uma dinâmica multifatorial na qual os ambientes aquáticos são submetidos à diversas fontes de poluição e/ou contaminação, que interagem entre si, pressionando os compartimentos ambientais bem como os seres vivos aquáticos, conforme exemplo ilustrado na Figura 1.

Figura 1: Esquema de fontes poluidoras que afetam os ecossistemas aquáticos e as suas principais pressões sobre os seres vivos



Fonte: Autoria própria

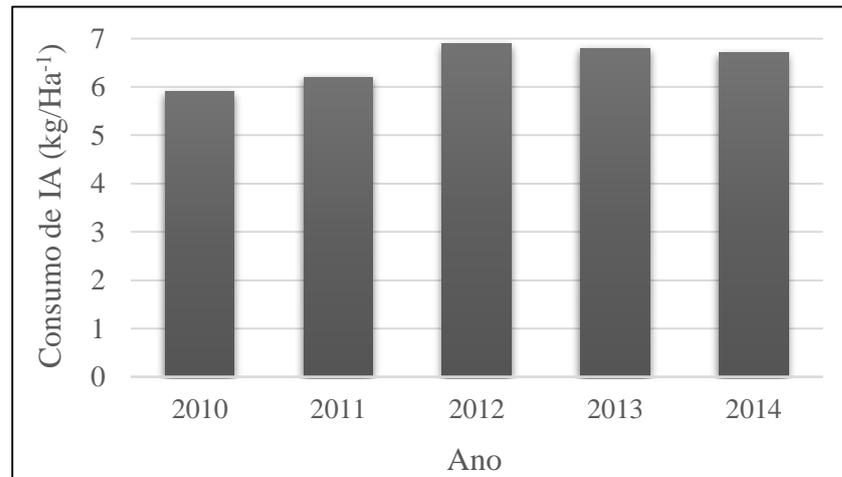
2.1.1 Agricultura

A agricultura, devido a aplicação de pesticidas, é a segunda maior causa de contaminação dos rios no Brasil, já que os pesticidas se dispersam principalmente através dos corpos hídricos (CHIARELLO *et al.*, 2017). A produção agrícola brasileira vem se destacando no contexto mundial, podendo ser diretamente associada ao impacto do uso de agrotóxicos sobre o aumento na produtividade (Chrisman *et al.*, 2009).

De acordo com o censo agropecuário de 2017, no Brasil 1681740 estabelecimentos aplicaram agrotóxicos em suas lavouras e o gasto total foi de R\$ 32.470.451.000,00 na comercialização destes produtos, valor 1,3 vezes maior que o gasto em 2006. Até 2014 o gasto em quilos de Ingredientes ativos (IAs) era quase 7 kg/Hectare (Figura 2).

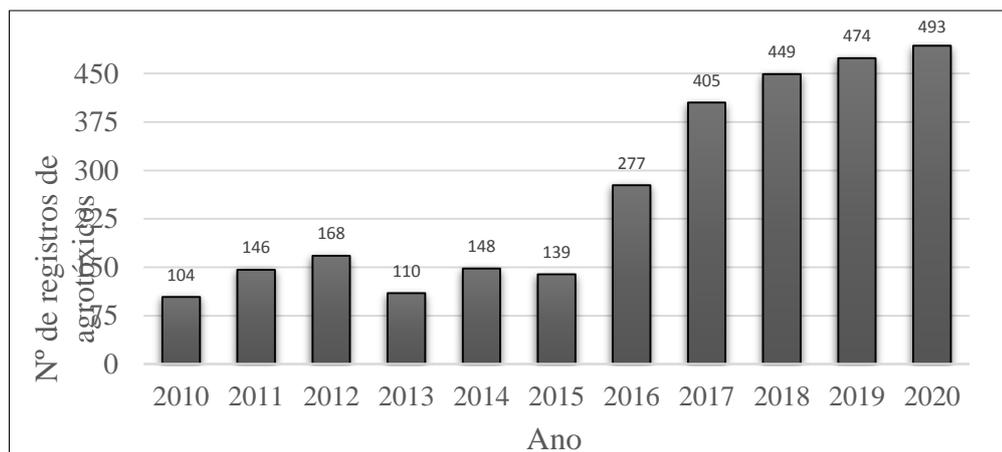
Figura 2: Histórico de consumo de ingredientes ativos por área cultivada (kg. Ha⁻¹) no Brasil entre os anos de 2010 e 2014.

Fonte: IBGE (2015)



O Ministério da Agricultura, nos últimos cinco anos, tem superado sucessivamente o número de registros de pesticidas liberados (Figura 3) demonstrando uma política de facilitação para a liberação de novas marcas e patente para os IAs. No entanto, a aplicação desses insumos necessita de um controle mais efetivo visto que o uso excessivo de agrotóxicos pode impactar negativamente o meio ambiente, principalmente os ambientes aquáticos (CHIARELLO *et al.*, 2017).

Figura 3: Número de registros de agrotóxicos liberados no Brasil entre os anos de 2010 e 2020



Fonte: Ministério da Agricultura (2021).

Esses impactos são definidos também pela toxicidade pré-estabelecida das substâncias aplicadas, porém a disseminação no uso de agentes como os neonicotinóides ocorreu mesmo

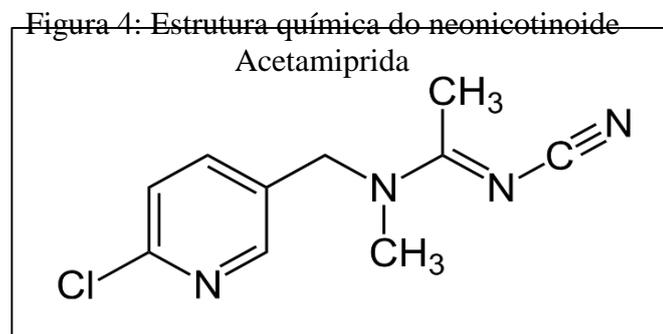
sem uma avaliação profunda de toxicidade para exposições crônicas (TOMIZAWA; LEE; CASIDA, 2000).

Os inseticidas pertencentes ao grupo dos neonicotinóides apresentam os grupos nitrometileno, nitroimina ou cianoimina (MATSUDA *et al.*, 2001) e agem nos receptores nicotínicos de acetilcolina do sistema nervoso central, bloqueando os impulsos nervosos (KAGABU, 1999). Estes inseticidas são considerados contaminantes emergentes, devido à ausência de regulamentação, fato preocupante, considerando que são desreguladores endócrinos associados a redução nas populações de abelhas, por exemplo (IWASA *et al.*, 2004).

Destes, substâncias como a acetamiprida, tem sido amplamente aplicada em lavouras e, por consequência, cada vez mais têm sido detectadas em rios. Além disso, destaca-se que já foi relatada a ocorrência de casos de intoxicação aguda por essa substância em humanos (IMAMURA *et al.*, 2010).

2.1.1.1 Acetamiprida

Entre os inseticidas neonicotinóides, a acetamiprida ((E)-N-(6-cloro-3-piridil) metil)-N-ciano-N-metilacetamidina) (Figura 4) é a mais comumente aplicada para o combate de insetos como hemípteras (SANYAL; CHAKMA; ALAM, 2008) devido sua ação sistêmica. Porém seu uso indiscriminado tem demonstrado efeitos sobre as relações tróficas e pode ainda atingir a saúde humana (BAGRI; JAIN, 2019).

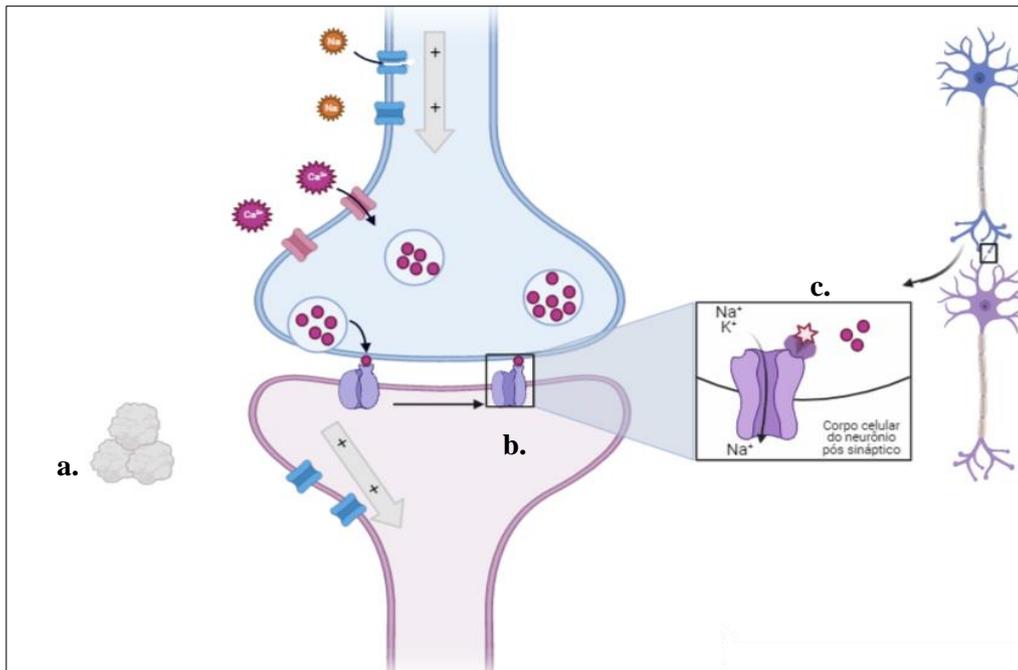


Fonte: PubChem (2021)

Por sua ação sistêmica sobre os receptores nicotínicos de insetos, são poucos os estudos de efeito deste composto sobre mamíferos (PIRES, 2013), porém Tomizawa e Casida (2005) evidenciam que os neonicotinóides apresentam sintomas semelhantes à intoxicação por nicotina

(Figura 5). Assim, alguns autores alertam para os potenciais efeitos neurotóxicos e a possibilidade de substâncias como a acetamiprida afetarem funções cerebrais (BLACQUIÈRE *et al.*, 2012). Além disso, a sua ação pode afetar o sucesso ecológico de uma série de espécies, caso ocorram seus efeitos deletérios sobre a reprodução (CIMINO *et al.*, 2017).

Figura 5: Mecanismo de ação da acetamiprida (a), indicando a atividade da substância no neurônio pós sináptico (b) como agonista de acetilcolina (c)



Fonte: Autoria própria

A preocupação quanto aos efeitos da acetamiprida e demais neonicotinóides é ainda maior considerando a mobilidade e persistência desses contaminantes no ambiente. Têm crescido o número de estudos que identificaram concentrações de neonicotinóides em ambientes aquáticos (HLADIK; KOLPIN, 2016; MAIN *et al.*, 2014; MILES *et al.*, 2018) (Tabela 1). Alguns autores detectaram concentrações de acetamiprida em amostras de água, por exemplo como Zheng *et al.* (2016), que constataram acetamiprida em mais de 55% de 35 pontos amostrais do rio Jiulong (China). Nos Estados Unidos, Anderson *et al.* (2013) encontraram até 44,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ em águas superficiais.

No cenário brasileiro, Ribeiro *et al.* (2013) determinaram aproximadamente 30 $\mu\text{g L}^{-1}$ de acetamiprida em águas superficiais em uma área de nascente do Rio São Lourenço no estado do Mato Grosso em outubro de 2010, além de outros sete neonicotinóides, evidenciando a necessidade de avaliação para os efeitos tóxicos de agentes em condição de mistura.

Tabela 1: Dados de detecção e quantificação de acetamiprida em matrizes ambientais ao redor do mundo.

Concentração	Ano	Citação	País	Matriz/Local
2,50 ng L⁻¹	2019	MAHAI <i>et al.</i> (2019)	China	Rio Yangtze
51,2 ng L⁻¹ (18,8- 15,7)	2019	YI <i>et al.</i> (2019)	China	Canais urbanos
1,3 ng L⁻¹ (0,84-12,7)	2019	IANCU <i>et al.</i> (2019)	Romênia	Rio Danúbio
0,98 - 75 ng L⁻¹	2019	SOUSA <i>et al.</i> (2019)	Portugal	Rios Ave Sousa
Até 44,1 µg L⁻¹	2013	ANDERSON <i>et al.</i> (2013)	EUA	Lagoas praianas
23,61 µg L⁻¹	2013	RIBEIRO <i>et al.</i> (2013)	Brasil	Nascente do Rio São Lourenço do Rio São Lourenço, MT

Apesar da necessidade de delineamento de efeitos dessa substância em organismos aquáticos, estudos que avaliem o efeito de neonicotinoides sobre a mobilidade de cladóceros, por exemplo, são raros (BOWNIK; PAWŁOCIK; SOKOŁOWSKA, 2017). Anderson; Dubetz; Palace (2015) identificaram *Daphnia magna* como uma espécie pouco sensível à tratamentos de até 106 mg L⁻¹, porém Tackács *et al.* (2017) sugerem que a tolerância pode variar em função da diversidade das espécies de cladóceros.

2.1.2 Cianobactérias

Ao longo de sua história evolutiva, as cianobactérias desenvolveram alguns mecanismos que permitiram a esses organismos, colonizar diversos ecossistemas ao redor do planeta (MOLICA; AZEVEDO, 2009). Segundo Whitton e Potts (2012), sua alta representação em ambientes aquáticos é hoje garantida pelo desenvolvimento de estruturas que promovem

tolerância à radiação solar, a capacidade de suportarem altas concentrações de metais e mesmo sobreviver a temperaturas elevadas.

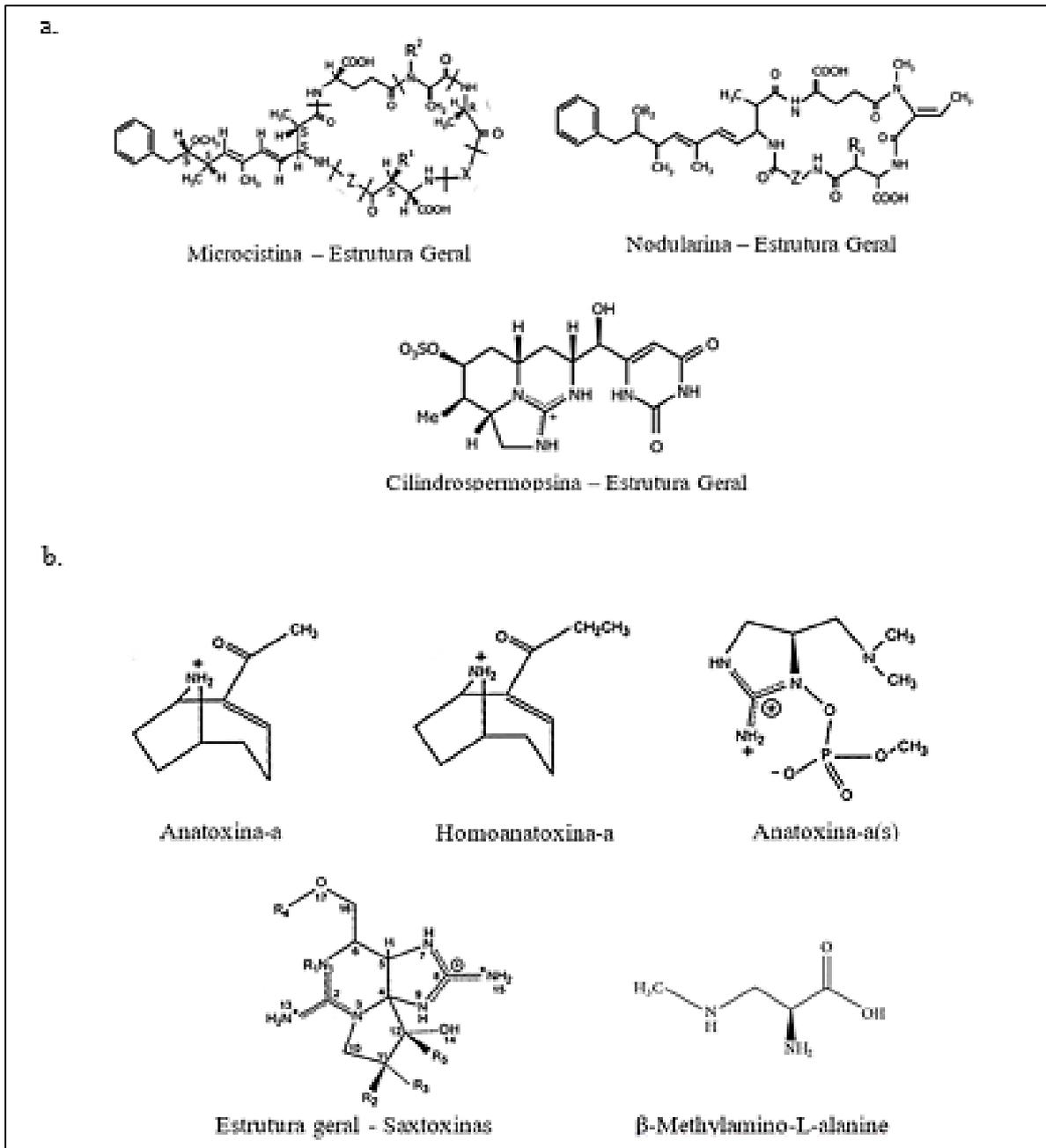
Dentre os mecanismos desenvolvidos, os aerótopos apresentam vantagem por proporcionarem maior fluabilidade. Células especializadas como os heterócitos permitem a fixação de nitrogênio enquanto os acinetos atuam como células de resistência sob condições desfavoráveis (RAVEN, 1978), Já a produção de metabólitos secundários denominados de cianotoxinas, podem ocasionar uma série de efeitos em outros organismos.

Westrick *et al.*, (2010) cita que cianotoxinas foram desenvolvidas a fim de promover a sobrevivência das cianobactérias sob altas concentrações de metais, porém Ferrão-Filho *et al.* (2002; 2009; 2014), tal como Holland e Kinnear (2013), destacam a importância dessas substâncias como defesa química contra predadores.

Esses metabólitos podem ser classificados em três classes principais: as dermatotoxinas, as hepatotoxinas e as neurotoxinas (Figura 6), apresentando diferentes toxicidades e mecanismos de ação (FERRÃO-FILHO *et al.*, 2009), sendo a ação crônica da β -Methylamino-L-alanine (BMAA) em exposição ambiental relacionada à doenças degenerativas do sistema nervoso como a Esclerose Lateral Amiotrófica, Alzheimer e Parkinson (COX *et al.*, 2005; COX; BANACK; MURCH, 2003; PROCTOR; MOWREY; DOKHOLYAN, 2019).

Já para saxitoxinas, Zagatto *et al.* (2012) observou a intoxicação aguda e a mortalidade de mamíferos, *Daphnia* sp. e peixes ocasionada por exposição à duas cepas de *Raphidiopsis raciborskii*. Trabalhos como de (ABELL *et al.*, 2008) Abell *et al.* (2008) e Briand *et al.* (2003), verificaram a intoxicação não apenas em animais silvestres como também em domésticos, alertando para eventos de contaminação em águas associadas ao abastecimento. Além disso, casos em humanos, levando inclusive a óbitos, já foram relatados na literatura (SVIRČEV *et al.*, 2017; CARMICHAEL *et al.*, 2001), confirmando a necessidade de verificação de qualidade de águas para consumo, visto que os efeitos negativos à saúde foram ocasionados por florações de cianobactérias em reservatórios.

Figura 6: Estruturas químicas gerais de a. Hepatotoxinas e b. neurotoxinas



Fonte: Adaptado de Chorus & Bartram (1999).

No Brasil ocorreram casos de intoxicação humana por cianobactérias, como a “Tragédia de Caruaru” em 1996, que levou a morte de dezenas de pessoas em virtude da contaminação de água destinada ao tratamento de pacientes renais por microcistina. Além do grau de impacto inferido por esse evento, a “Tragédia de Caruaru” foi o único caso de intoxicação humana por cianotoxina comprovado cientificamente no mundo (CARMICHAEL *et al.*, 2001; AZEVEDO *et al.*, 2002).

Segundo León-Silva; Fernández-Luqueño e López-Valdez (2016) a Organização Mundial de Saúde (OMS) estabelece a relação entre o aumento de doenças em humanos associadas a águas contaminadas. As detecções de cianobactérias e cianotoxinas em reservatórios (Tabela 2) constituem uma problemática sócio ambiental e alguns trabalhos, como Panosso *et al.* (2007) e Ferrão-Filho *et al.* (2009), avaliaram amostras isoladas de reservatórios.

Tabela 2: Dados de detecção e quantificação de cianobactérias e cianotoxinas em corpos hídricos.

Biomassa	Ano	Citação	País	Local analisado
0,2 - 1,9 mg L⁻¹ de peso fresco	2020	BALLOT <i>et al.</i> (2020)	Myanmar	Lago Meiktila
0,16 µg. Kg⁻¹ de STXs	2020	AI; LEE; LEE (2020)	Estados Unidos	Resíduos de tratamento de água em Ohio
1,9 - 4 mm³ L⁻¹	2003	FASTNER <i>et al.</i> (2003)	Alemanha	Mar de Langer
150000 células mL	2002	MOLICA <i>et al.</i> (2002)	Brasil	Reservatório Tapacurá
152 - 736 µm³	1999	BOUVY <i>et al.</i> (1999)	Brasil	Reservatório Ingazeira
5 – 7 µg de STXs L	2005 - 2008	LEDREUX <i>et al.</i> (2010)	França	Reservatório Champs-sur-Marne

2.1.2.1

Raphidiopsis raciborskii

A espécie *Raphidiopsis raciborskii* (anteriormente *Cylindrospermopsis raciborskii*) (AGUILERA *et al.*, 2018) é uma cianobactéria planctônica e filamentosa encontrada em ambientes de água doce que foi descrita, a princípio, em ambiente de clima tropical. No entanto, segundo Sant'Anna e Azevedo (2000) essa espécie vem formando florações também em ambientes temperados, demonstrando sua capacidade de dispersão (HAANDE *et al.*, 2008) e facilidade de adaptação a condições adversas (BONILLA *et al.*, 2012).

O aumento na biomassa de cianobactérias é favorecido pelo contínuo aporte de materiais antropogênicos e o aquecimento global podendo ocasionar riscos aos ecossistemas aquáticos (METCALF *et al.*, 2012) e à saúde humana devido sua presença em reservatórios de abastecimento e água de recreação (CODD *et al.*, 1999). Assim, há de se considerar a associação entre eventos de intoxicação coletiva por *R. raciborskii* (SVIRČEV *et al.*, 2017) e a produção de toxinas por algumas cepas (COSTA; FERRÃO-FILHO; AZEVEDO, 2013).

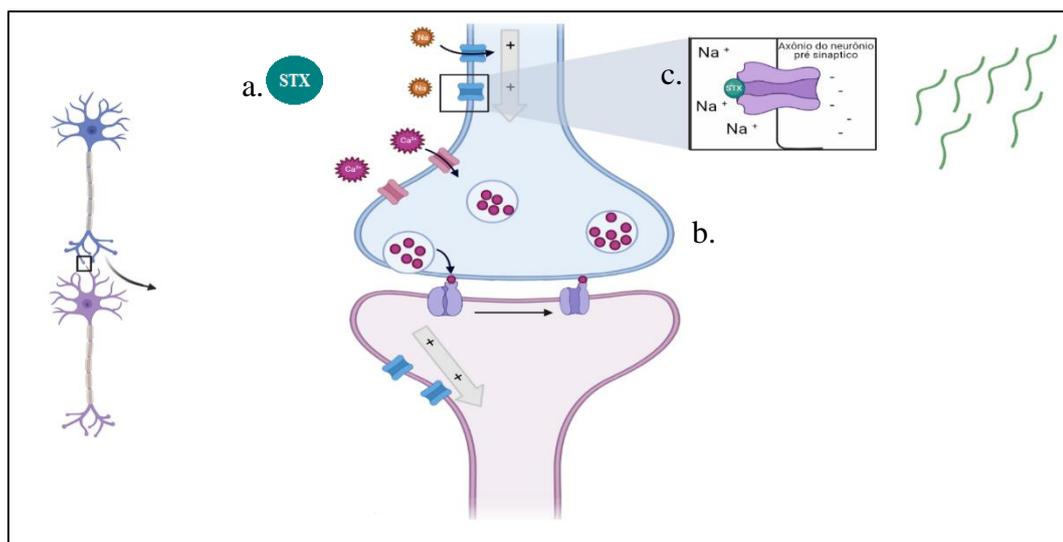
As linhagens isoladas de *Raphidiopsis raciborskii* são conhecidamente produtoras de cilindrospermopsinas (CYN) e saxitoxinas (STXs) (MOLICA *et al.*, 2002), porém cepas isoladas na América do Sul, vêm demonstrado capacidade de produzir apenas STXs e, evolutivamente, aparentam ter suprimido a capacidade de produzir CYN (VICO *et al.*, 2020).

As saxitoxinas são alcalóides que atuam como neurotoxinas capazes de bloquear os canais de sódio da membrana do axônio impedindo a propagação do impulso nervoso (CHORUS e BARTRAM, 1999). Esse grupo conta com cerca de 57 análogos – podendo ser não-sulfatadas (saxitoxina e neosaxitoxina), com um grupamento sulfato (goniautoxinas) e dois grupamentos sulfato (C-toxinas) (PEARSON *et al.*, 2010) – de toxicidade variada.

A molécula não-sulfatada saxitoxina é umas das mais tóxicas conhecidas, com uma dose letal ($DL_{50\%}$) de 10 mg kg^{-1} em bioensaios com camundongos (MOLICA; AZEVEDO, 2009). Em ambientes aquáticos, apesar de serem altamente hidrossolúveis, as STXs são persistentes em águas de ambiente tropicais (CASTRO *et al.*, 2004), e tendem a ser contidas nas células de cianobactérias, sendo liberadas na lise resultante de estresse ou da morte do organismo (MELEGARI, 2010).

As saxitoxinas e seu mecanismo de ação (Figura 8) têm sido, dentre as cianotoxinas, as mais estudadas farmacologicamente. Essas moléculas possuem ação rápida, bloqueando os canais iônicos voltagem-dependentes e levando à inibição da passagem dos íons Na^+ necessários para a despolarização da membrana plasmática do neurônio pré-sináptico (LLEWELLYN, 2006).

Figura 7: Mecanismo de ação da saxitoxina, indicando a atividade a substância no neurônio pré-sináptico (b) como bloqueador dos canais de sódio (c)



Fonte: Autoria própria

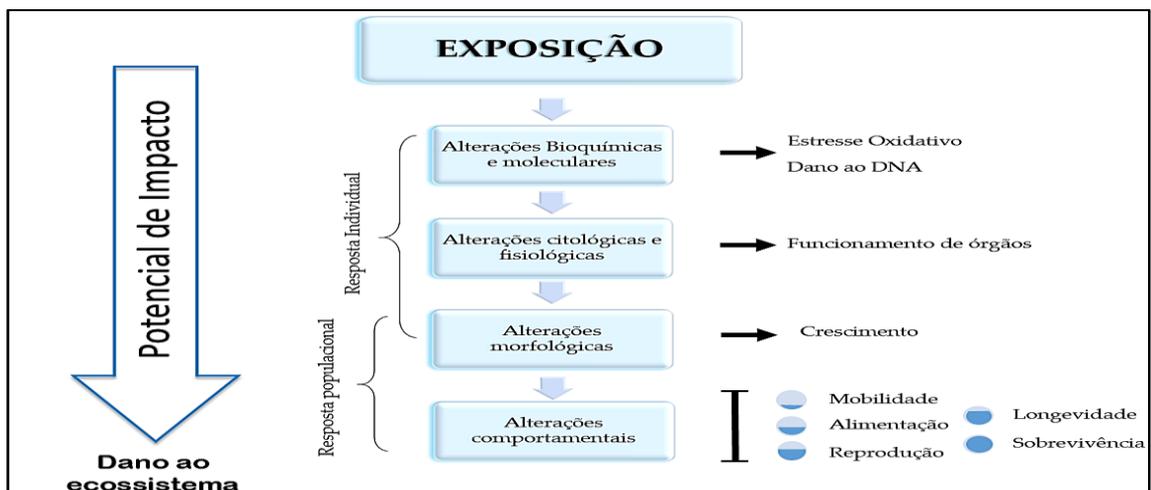
O Brasil é uma das poucas nações que determinam monitoramento de cianobactérias e cianotoxinas em águas destinadas ao abastecimento, através da portaria n.º 2914 de 2011 do Ministério da saúde (BRASIL, 2011) que determina os padrões de potabilidade para água destinada ao consumo humano.

2.2 ECOTOXICOLOGIA

Os estudos ecotoxicológicos são aplicados de forma a prevenir os impactos a partir da investigação dos efeitos de substâncias químicas manufaturadas e de outros materiais antropogênicos ou naturais (AZEVEDO; CHASIN, 2003). Esse tipo de estudo possibilita a caracterização e análise de resposta utilizando organismos padronizados por normas e protocolos de órgãos como a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), International Organization for Standardization (ISO) e Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008).

De acordo com Magalhães e Ferrão-Filho (2008) o conceito de ecotoxicologia é amplo e pode abordar uma série de possíveis efeitos finais – *endpoints* – (Figura 9), enquanto para Lombardi (2004) os bioensaios não só viabilizam a identificação de fontes de contaminação como também os efeitos resultantes de suas interações (como sinérgicos ou antagônicos).

Figura 8: Etapas de respostas dos organismos às exposições de agentes intoxicantes com escala crescente de gravidade e irreversibilidade de dano oriundo de impactos



Fonte: Autoria própria

Esses ensaios podem ser classificados quanto ao tipo de exposição a qual os organismos serão submetidos. Em testes agudos (Tabela 3), a duração da exposição é curta (até 96h), mimetizando um evento pontual de contaminação. No geral, são utilizadas concentrações elevadas e o *endpoint* avaliado é a letalidade, calculando-se a Concentração Letal 50% (CL₅₀) que determina a concentração necessária para provocar a mortalidade de 50% dos indivíduos expostos.

Já os ensaios crônicos (Tabela 3) são mais extensos, podendo durar semanas. Chasin e Azevedo (2003) alertam que a intoxicação crônica de organismos pode ocorrer tanto pela acumulação de xenobióticos nos organismos quanto pela ação de efeitos por exposições repetidas/pulsadas. Nessa modalidade é observada a Concentração Efetiva 50% (CE₅₀) que reflete a quantidade necessária para ocasionar a morte de metade dos indivíduos expostos (RAND; PETROCELLI, 1985).

Tabela 3: Comparação entre pontos vantagens e desvantagens de bioensaios ecotoxicológicos agudo e crônico:

Ensaio	Vantagens	Desvantagens
Agudo	<ul style="list-style-type: none"> • Curta duração; • Possibilita determinação de limites para emissão; • Avaliação das espécies a nível de indivíduo; • Monitoramento ambiental; 	<ul style="list-style-type: none"> • Tem como <i>endpoint</i> a mortalidade; • Pouco sensível a relações ecológicas; • Não considera os diferentes estágios de vida; • Não avalia período de latência;
Crônico	<ul style="list-style-type: none"> • Avalia efeitos da acumulação; • Observa parâmetros individuais e populacionais; • Verifica mortalidade e concentração de efeito sobre parâmetros populacionais; • Sensível ao período de latência; 	<ul style="list-style-type: none"> • Durabilidade maior que os ensaios agudos; • Não detecta as respostas citológicas/bioquímicas. • São necessários ensaios complementares para quantificar os <i>endpoints</i> supracitados;

Com a necessidade de verificação de efeitos precoces e que antecedam a morte dos organismos, metodologias alternativas vem sendo cada vez mais testadas. Ensaio comportamentais podem ser caracterizados por diversos parâmetros como, por exemplo, movimentos natatórios, que pode ser avaliada tanto pelo tempo em que o organismo permanece nadando, quanto pela velocidade ou o tipo de natação (BOWNIK, 2017).

Para a ecotoxicologia aquática, normas estabelecidas pela ISO, Environmental Protection Agency (EPA), OECD e ABNT aplicam como modelos para avaliação de toxicidade em ambientes dulcícolas, os cladóceros (PIMENTEL *et al.*, 2010). Gêneros como *Daphnia* destacam-se por apresentam reprodução por partenogênese em condições adequadas, mantém uma população de baixa variabilidade genética, ideal para cultivo e ensaios de toxicidade, além de serem filtradores generalistas com capacidade de recolherem material particulado (BROOKS; DODSON, 1965).

Daphnia similis é a espécie sugerida para ensaios pelos órgãos citados anteriormente. Essa espécie foi originalmente descrita por Claus (1876) em Jerusalém, porém sua distribuição se dá também pela Europa (Hrbacek *et al.*, 1978) com representantes de até 3,9 mm de comprimento. No Brasil, Matsumura-Tundisi (1984) cita a ocorrência de três espécies, *D. gessneri*, *D. ambigua* e *D. laevis*, além de gêneros como *Moina*.

D. laevis, inicialmente descrita na Lagoa Amarela (MG – Brasil) já foi identificada no Lago Jacaré (MG – Brasil), na Colômbia e Argentina. Suas fêmeas adultas podem alcançar de 1,8 a 2 mm de comprimento, metade do tamanho registrado para *D. similis*. Por sua vez *M. micrura*, cujas fêmeas partenogênicas chegam a 0,76 mm de comprimento, tem ampla distribuição pela Europa, Ásia e Américas (ELÍAS-GUTIÉRREZ *et al.*, 2019) e vem sendo associada à ambientes eutrofizados (ALMEIDA *et al.*, 2009).

Como os limites de emissão para contaminantes utilizados em regulamentações brasileiras são baseados em ensaios com organismos nativos de outros países os resultados muitas vezes não exprimem relevância ecológica em ambientes tropicais (KRULL *et al.*, 2011) e não refletem as diferentes sensibilidades entre os animais testados (CARRIQUIRIBORDE *et al.*, 2014). Assim, a utilização de organismos modelos nativos bem como a avaliação de exposições pulsadas e à misturas de agentes químicos podem melhor caracterizar a complexidade do cenário ambiental atual (DENNIS; TIEDE; THOMPSON, 2017).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos ecotoxicológicos de uma cepa de cianobactéria produtora de neurotoxina e de um inseticida neonicotinoide de forma unitária e combinada sobre três cladóceros: *Moina micrura* (nativa), *Daphnia laevis* (nativa) e *D. similis* (exótica).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos de toxicidade aguda de uma cepa de cianobactéria neurotóxica e do inseticida acetamiprida de forma individual e em condição de mistura em três cladóceros;
- Determinar os efeitos de uma cepa de cianobactéria neurotóxica e do inseticida acetamiprida de forma individual e em condição de mistura sobre os parâmetros reprodutivos e populacionais de duas espécies de *Daphnia* e uma espécie de *Moina*;
- Caracterizar os efeitos toxicológicos impostos por misturas de diferentes proporções nas três espécies de cladóceros;
- Avaliar efeitos subletais dos dois agentes individualmente e em mistura por meio de análise comportamental em *D. similis*.

4 METODOLOGIA

4.1 CULTIVO DE ORGANISMOS

Todas as culturas foram mantidas no Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA) localizado no Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ).

4.1.1 Manutenção de produtores primários

As clorofíceas *Pseudokichneriella subcapitata* e *Ankistrodesmus falcatus* foram cultivadas em meio LC oligo com pH ajustado para 7,0 e aeração constante conforme a norma NBR 12648/2018. Ambas as culturas foram mantidas à temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, com intensidade luminosa de $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ e fotoperíodo claro/escuro de 12/12 h.

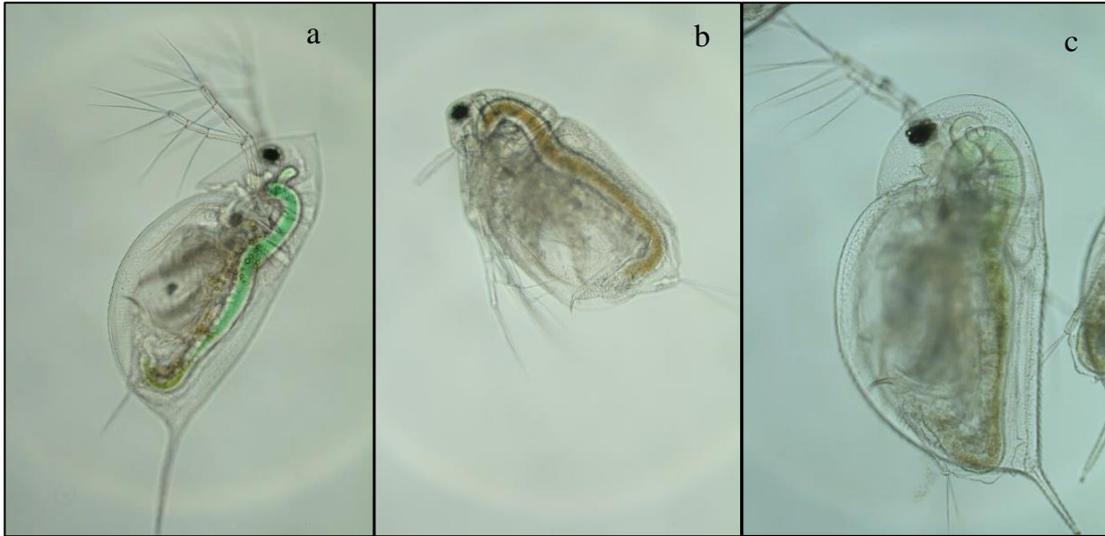
A cepa LETC-CY-05 da cianobactéria *Raphidiopsis raciborski* foi isolada do Reservatório do Funil em Itatiaia – RJ. A cultura foi mantida em meio WC conforme o método de Guillard (1975), com pH ajustado a $7,5 \pm 0,5$ e temperatura a $23 \pm 1^\circ\text{C}$, com intensidade luminosa de $20 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e fotoperíodo claro/escuro de 12/12 h.

A manutenção da cepa foi efetuada em volume de 100 mL de meio WC e aumentada para 400 mL do meio para a realização de testes, utilizando a fase de crescimento exponencial da cultura (7 a 10 dias).

4.1.2 Manutenção de cladóceros

O clone de *Daphnia laevis* (Figura 10a), escolhido como representante de ambiente aquático tropical, foi isolado do Lago Jacaré, situado no Parque Estadual do Rio Doce (MG), enquanto o clone de *Moina micrura* (Figura 10b) foi isolado do Rio Iguaçu, na região da Baixada fluminense (RJ). *D. similis* (Figura 10c), cedida pelo LABTOX/UFRJ, é uma espécie representante de ambientes temperados e considerada padrão para testes ecotoxicológicos no Brasil, segundo a ABNT NBR 12713/2004.

Figura 9: Clones de cladóceros utilizados nos ensaios ecotoxicológicos: **a.** *D. laevis*; **b.** *M. micrura*; **c.** *D. similis*



Fonte: Autorial própria

Todas as culturas foram mantidas em meio artificial RT (TOLLRIAN, 1993) adaptado com 30% de água oriunda de fonte natural – Parque Estadual da Pedra Branca - Rio de Janeiro/RJ. Também foi adicionado um extrato de ácidos húmicos (Microbe-lift® Amazon Black & Soft Water Conditioner, USA) na proporção de 0,5 mL para cada litro de meio RT. Para alimentação, foi mantida uma dieta de clorofíceas com suspensão alimentar de clorofíceas fixada em 0,5 mg C L⁻¹ *Pseudokirchneriela subcapitata* e 0,5 mg C L⁻¹ de *Ankistrodesmus falcatus*.

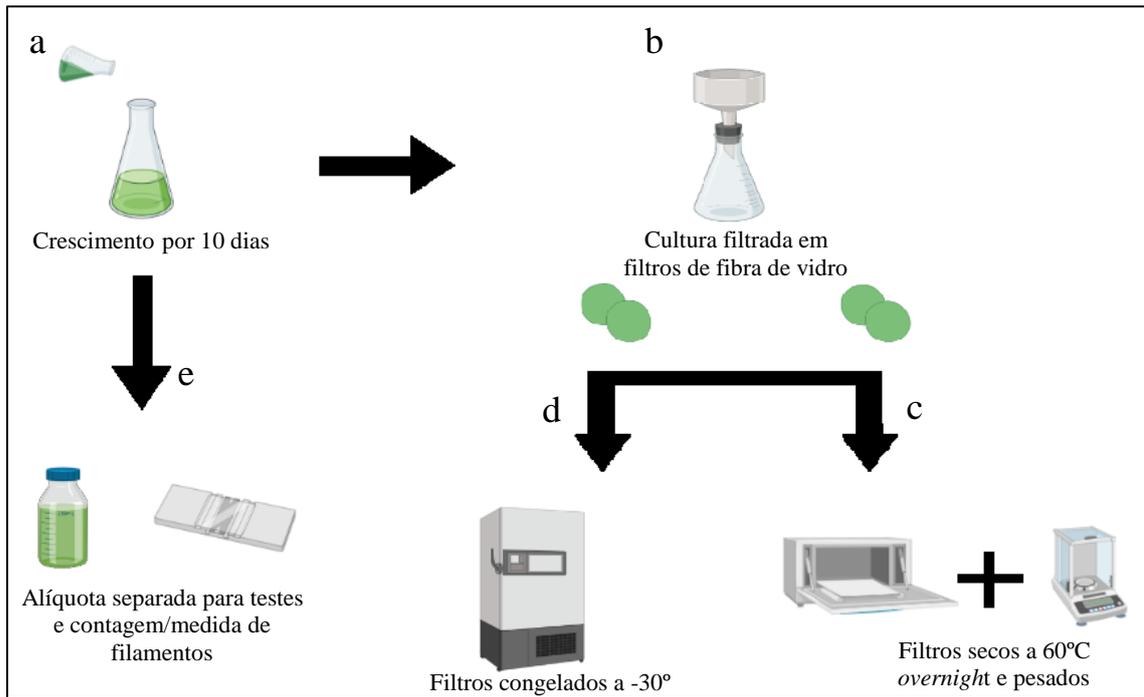
4.2 ENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA

4.2.1 Preparo de LETC-CY-05

A cultura de LETC-CY-05 foi mantida em 400 mL de meio WC por \pm 10 dias (Figura 11a) e, com 24h de antecedência ao início da exposição, duas amostras de 40 mL foram retiradas, filtradas em filtros de fibra de vidro, secas por 24 h em estufa a 60 °C e, por fim, pesada, para a determinação da biomassa em peso seco (mg PS) (Figura 11c).

Também foram filtradas duas amostras de 20 mL cada para posterior extração e quantificação de STXs, sendo armazenadas a seguir a -30 °C (Figura 11b). A cultura foi mantida a 4 °C e ao abrigo de luz para utilização nos ensaios e uma alíquota foi retirada para determinação da densidade celular em câmara de contagem Fuchs Rosental (Figura 11e) conforme Hillebrand *et al.* (2002).

Figura 10: Esquema de cultivo de LETC-CY-05 (a) e preparo de filtros (b) para determinação de biomassa (c) e extração de toxinas (d) e utilização em ensaios de toxicidade (e)



Fonte: Autoria própria

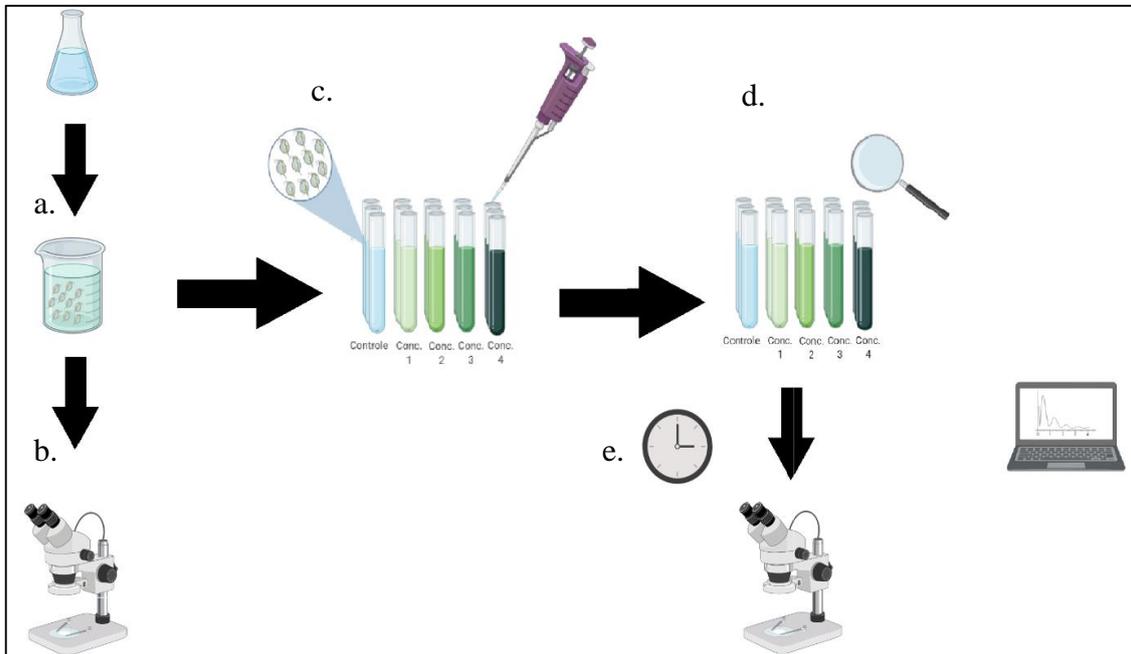
4.2.2 Preparo de acetamiprida

A Acetamiprida ($C_{10}H_{11}ClN_4$), disponível em pó cristalizado, foi obtida da Sigma-Aldrich (Brasil) a 99 % de pureza e, a partir dela foi preparada uma solução estoque de 50 mg.L⁻¹. A solução foi mantida ao abrigo de luz com temperatura de 4 °C para ser utilizada posteriormente nos tratamentos.

4.2.3 Exposições

Os ensaios agudos foram realizados a partir da separação de neonatos com até 24 h de nascimento (Figura 12a), sendo 10 indivíduos de cada clone separados para medição (Figura 12b). Posteriormente, foram efetuados tratamentos em sistema de triplicadas com 30 mL de suspensão contendo 10 organismos cada (Figura 12c) e com alimentação fixada em 1 mg C L⁻¹, mesma concentração utilizada para manutenção, a fim de reduzir efeitos associados a deficiência nutricional.

Figura 11: Desenho esquemático de preparo e execução dos testes de exposição aguda de 96 horas onde (a) representa a separação de neonatos, (b) a medição do comprimento inicial, (c) o preparo dos tratamentos e (d) a contabilização de indivíduos mortos após 96 horas seguida de (e) medição do comprimento final dos sobreviventes



Fonte: Autoria própria

Os experimentos tiveram duração de 96 h em modelo semi estático – com renovação do meio e contabilização de mortes a cada 24 horas – e, ao término das exposições os sobreviventes foram encaminhados para medição em lupa estereoscópica Olympus SZ6145STR com magnificação de 10-20x a fim de calcular a taxa de crescimento somático, conforme indicado na equação 1 abaixo:

$$\frac{(\ln Cf) - (\ln Ci)}{\Delta t}$$

Onde Ci é o comprimento inicial, Cf o comprimento final e Δt o tempo do experimento em dias.

Para todos os ensaios agudos foram efetuados testes preliminares e, a partir desses resultados, foram definidos os tratamentos com intervalos polinomiais (2 x) para a determinação da CL_{50} de acordo com o exposto na Tabela 4.

Tabela 4: Diluições efetuadas para ensaios de toxicidade aguda – 96 h – para *D. similis*, *D. laevis* e *M. micrura* submetida aos toxicantes – individuais e em mistura –:

Toxicante	Organismos	Concentrações utilizadas ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
LETC-CY-05	<i>D. similis</i>	0, 250, 500, 1000, 2000
	<i>D. laevis</i>	0, 250, 500, 1000, 2000
	<i>M. micrura</i>	0, 250, 500, 1000, 2000
Acetamiprida	<i>D. similis</i>	0, 100, 200, 400, 800
	<i>D. laevis</i>	0, 200, 400, 800, 1600
	<i>M. micrura</i>	0, 500, 1000, 2000, 4000
Mistura - <i>R. raciborskii</i> fixa em função da CL ₅₀	<i>D. similis</i>	0, 0+RR, 250, 500, 1000
	<i>D. laevis</i>	0, 0+RR, 1500, 3000, 6000
	<i>M. micrura</i>	0, 0+RR, 1500, 3000, 6000
Mistura - Acetamiprida fixa em função da CL ₅₀	<i>D. similis</i>	0, 0+ACE, 200, 400, 800
	<i>D. laevis</i>	0, 0+ACE, 1250, 2500, 5000
	<i>M. micrura</i>	0, 0+ACE, 1250, 2500, 5000

OBS.: Os ensaios das misturas ocorreram simultaneamente e as concentrações 0 + RR e 0 + ACE foram tratadas como um controle de validação.

Após os resultados dos ensaios individuais foram estabelecidos os critérios para a determinação da concentração de cada agente nos ensaios com misturas, sendo utilizado um tratamento contendo apenas a concentração referente à CL₅₀ do toxicante fixado a fim de validar o efeito com base na exposição unitária. Em todos os tratamentos foi fixada a concentração de um dos agentes – *R. raciborskii* ou acetamiprida – com base na sua CL₅₀ individual para cada clone e a concentração do outro toxicante variou de forma a contemplar proporções 2:1, 1:1 e 1:2 entre a cianobactéria e o pesticida de forma que, em ao menos um tratamento, sua concentração na mistura fosse equivalente a sua CL₅₀ unitária.

4.3 ENSAIOS DE TOXICIDADE CRÔNICA

4.3.1 Preparo de LETC-CY-05

A cepa foi preparada conforme descrito no item 4.2.1 e o procedimento de preparo foi efetuado no início e no meio das exposições

4.3.2 Preparo de Acetamiprida

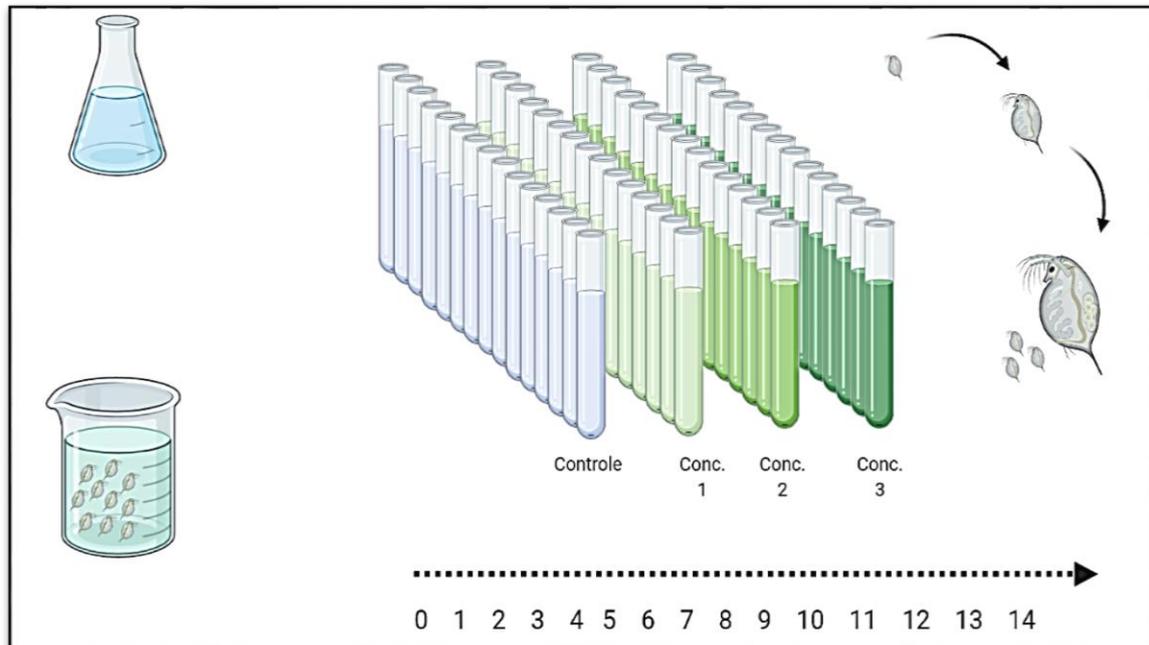
Foi preparada uma solução conforme descrita no item 4.2.2.

4.3.3 Exposições

Foram utilizadas quatro concentrações para todos os agentes conforme indicado na Tabela 5. Os valores foram definidos a partir da CL_{10} – *D. similis* – e CL_{15} – *M. micrura* e *D. laevis* – estimadas nos ensaios agudos, a fim de reduzir a interferência de danos na sobrevivência sobre parâmetros reprodutivos.

Os ensaios foram conduzidos em sistema de 15 réplicas contendo um indivíduo de até 24 h de nascimento cada (Figura 13). Da mesma forma que as exposições agudas, foi fixada a concentração de $0,5 \text{ m.C L}^{-1}$ de clorofíceas para a garantia de fonte nutritiva. Cada réplica foi preparada com suspensão de 30 mL e os meios de cultura foram renovados diariamente. Foram observados como parâmetros: a sobrevivência, a idade da primeira reprodução (primípara), o número de neonatos produzidos por fêmea e mobilidade.

Figura 12: Modelo de exposição aplicado em ensaios de toxicidade crônica com duração de 14 dias



Fonte: Autoria própria

Tabela 5: Diluições efetuadas para ensaios de toxicidade crônica – 15 dias para *D. similis*, *D. laevis* e *M. micrura* submetida às 3 variantes testadas:

Agente Tóxico	Organismos	Concentrações utilizadas ($\mu\text{g L}^{-1}$)
LETC-CY-05	<i>D. similis</i>	0, 12,5, 25, 50
	<i>D. laevis</i>	0, 100, 200, 400
	<i>Moina micrura</i>	0, 100, 200, 400
Acetamiprida	<i>D. similis</i>	0, 50, 100, 200
	<i>D. laevis</i>	0, 100, 200, 400
	<i>Moina micrura</i>	0, 100, 200, 400
Mistura	<i>D. similis</i>	0, 25, 50, 75
	<i>D. laevis</i>	0, 75, 150, 300
	<i>Moina micrura</i>	0, 75, 150, 300

Assim como nos ensaios agudos, foram postuladas condições para a definição das concentrações utilizadas nos ensaios da mistura. Como nos ensaios agudos o efeito de letalidade

foi validado com a exposição dos organismos as suas respectivas CL_{50} para *R. raciboskii* e esta CL_{50} também foi estabelecida como a concentração para o agente fixado. Da mesma forma, foram utilizadas proporções correspondentes ao ensaio agudo estabelecida conforme os critérios descritos, porém em concentrações que contemplassem os efeitos observados em 15 dias de exposição

4.4 ENSAIOS COMPORTAMENTAIS

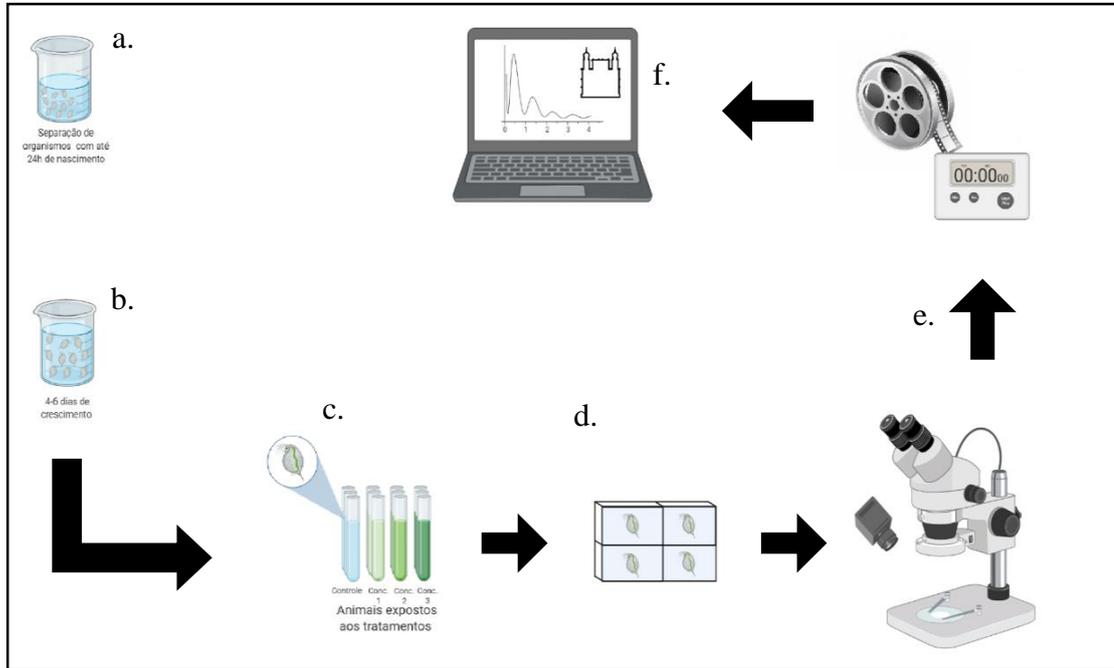
Os ensaios comportamentais foram efetuados com juvenis de *Daphnia* (4-6 dias), em função de seu tamanho corporal já estabelecido. Os juvenis foram transferidos para suspensões contendo de 30 mL dos tratamentos em meio RT e alimentação fixada em 0,5 mg C.L⁻¹ de clorofíceas. Para cada tratamento, incluindo o controle, foram dispostas 10 réplicas contendo um indivíduo cada (Figura 14).

Os indivíduos foram colocados em uma câmara de exposição de acrílico de 2 × 2 cm dividida em quatro compartimentos. Os animais ficaram expostos em água de cultivo contendo alimento (clorofíceas - Controle) ou tratamento e filmados durante 1 min em lupa Olympus SZ6145STR (objetiva 2X) por 1 min com uma webcam Microsoft de alta resolução, com uma taxa de 15 frames seg⁻¹.

Cada indivíduo foi submetido ao tratamento correspondente a CL_{50} estimada nos ensaios agudos (Tabela 6) e aclimatado por 10 minutos e submetido a exposições de 0, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h e 24 h sucessivamente e, ao término do experimento, a velocidade, a distância percorrida, e os tempos de movimento de natação, de repouso e estereotipado foram analisados no software FioTracker (IOC/Fiocruz).

O tempo em repouso foi determinado pela soma do número de segundos em que *D. similis* ficou imóvel ou apresentou apenas rotações corporais; o tempo ambulatorial foi estimado pelo tempo, em segundos, em que os animais percorreram distâncias maiores que o dobro de seu tamanho, caracterizando “saltos”; já o tempo estereotipado foi calculado pela soma de segundos em que os animais se deslocaram por distâncias inferiores a seu tamanho corporal (FEIJOÓ et al., 2019).

Figura 13: Esquema de execução de teste aplicado para avaliação de efeito comportamental onde (a) é a separação de neonatos para (b) manutenção por 4-6 dias e (c) aplicação nos ensaios, nos quais (d) é a colocação dos organismos em câmara de acrílico para (e) gravação de vídeos e (f) análise.



Fonte: Autoria própria

Tabela 6: Diluições estabelecidas para utilização nos ensaios comportamentais de 24h

Agente Tóxico	Organismo teste	Concentrações utilizadas ($\mu\text{g L}^{-1}$)	OBS: “*” indica as
LETC-CY-05	<i>D. similis</i>	250	
Acetamiprida	<i>D. similis</i>	450	
MIX	<i>D. similis</i>	400:400*	

concentrações utilizadas para a proporção 1:1 entre *R. raciborskii* e ACE na mistura

4.5 ANÁLISE DE DADOS

Os cálculos de efeitos para mistura de n elementos foram realizados conforme Jonker *et al.* (2005), utilizando os valores de CL_{50} e CE_{50} estimados para os agentes individualmente para a determinação de efeito nos tratamentos aplicados conforme a fórmula descrita na equação 2:

$$\sum_{i=1}^n \frac{ci}{Cx_{i50}} = UT$$

Onde ci é a concentração da substância utilizada na mistura, Cx_{50} é a concentração de efeito (CE) ou letal (CL) da substância quando aplicada individualmente e UT é a unidade tóxica que representa o efeito estimado para o tratamento. As estimativas de efeito obtidas foram categorizadas como efeito antagônico – $CE_{50mix} > UT$ –, efeito sinérgico – $CE_{50mix} < UT$ –, efeito aditivo – $CE_{50mix} = UT$ – e Potencialização – $CE_{50mix} < 2UT$ –.

Para os cálculos de CL_{50} e CE_{50} dos ensaios agudo e crônicos foi utilizada a plataforma online MOSAIC (CHARLES *et al.*, 2018). Os parâmetros populacionais do ensaio crônico (idade da primeira reprodução, fecundidade e o número de neonatos produzidos por fêmea) foram analisados por ANOVA unidirecional e as diferenças entre tratamentos foram analisadas por Teste de Tukey ($p < 0,05$) e parâmetros natatórios foram submetidos ao teste Shapiro-Wilk para avaliação da normalidade dos dados e, posteriormente, foram comparados com o controle de cada exposição pelo teste análise de variância (ANOVA). A determinação de efeitos dose-resposta foi efetuada por meio de correlação de Pearson.

As análises de sobrevivência para os ensaios agudos e crônicos foram realizadas utilizando o software R versão 3.4.2, enquanto os parâmetros reprodutivos e de crescimento foram avaliados programa GraphPad Prism versão 9.00. Para todas as análises foi utilizando limite de confiança igual ou superior a 95 % ($p \leq 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

No presente trabalho, foi verificada diferença na tolerância à cada toxicante pelos clones, refletindo em diferentes concentrações de cada agente na mistura para as três espécies. Ainda, nas análises de sobrevivência foi avaliada uma possível relação entre as respostas e as proporções de LETC-CY-05 e acetamiprida na mistura (Tabela 7).

Tabela 7: Dados para a relação entre as concentrações da cepa LETC-CY-05 ($\mu\text{g PS L}^{-1}$) e ACE ($\mu\text{g L}^{-1}$) quanto a proporção de cada agente nos ensaios da mistura

Tipo de Ensaio	Espécie	LETC-CY-05 ($\mu\text{g PS L}^{-1}$)	Acetamiprida ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Mistura Total ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Proporção
Agudo	<i>D. similis</i>	250	125	375	2:1
		250	250	500	1:1
		250	500	750	1:2 ^a
		200	400	600	1:2
		400	400	800	1:1 ^a
		800	400	1200	2:1 ^a
	<i>D. laevis</i> e <i>M. micrura</i>	3000	1500	4500	2:1
		3000	3000	6000	1:1 ^a
		3000	6000	9000	1:2 ^a
		1250	2500	3750	1:2
		2500	2500	5000	1:1
		5000	2500	7500	2:1 ^a
Crônicos	<i>D. similis</i>	25	25	50	1:1
		25	50	75	1:2
		25	100	125	1:3
	<i>D. laevis</i> e <i>M. micrura</i>	150	75	225	2:1
		150	150	300	1:1
		150	300	450	1:2

^a indicam tratamento em que os dois agentes foram aplicados na mesma proporção que o tratamento anterior porém em concentrações superiores, por exemplo: 2:1 apresenta uma concentração total dos toxicantes inferior a 2:1^a apesar de ambas seguirem a mesma ordem de proporção entre eles.

5. 1 ENSAIOS AGUDOS

5.1.1 Crescimento somático

5.1.1.1 LETC-CY-05

As taxas de crescimento média das três espécies de microcrustáceos expostas a cianobactéria *R. raciborskii* (LETC-CY-05) com seus respectivos tratamentos estão apresentados na Figura 15. Os resultados para *M. micrura* (p valor = 0,3358) e *D. laevis* (p valor = 0,4626) não apresentaram efeitos significativos sobre o crescimento, com valores de CE_{50} de 10895 $\mu\text{g PS L}^{-1}$ e 9604 $\mu\text{g PS L}^{-1}$ respectivamente, sendo estes superiores as concentrações máximas testadas (Tabela 8). Na concentração de 2000 $\mu\text{g PS L}^{-1}$ foi observada redução de 9,71% no crescimento somático médio *M. micrura* e de 12,05% em *D. laevis*. Em contrapartida, *D. similis* (p valor <0,0001) apresentou diferença significativa para os quatro tratamentos em relação ao controle (CE_{50} = 988,7 $\mu\text{g PS L}^{-1}$) sofrendo redução de 29,88% no crescimento a partir de 250 $\mu\text{g PS L}$ com efeito dose-reposta ($R = -0,9747$).

Figura 14: Taxa de crescimento média para três espécies de microcrustáceos expostos a cianobactéria *R. raciborskii* com seus respectivos tratamentos e desvio padrão para cada tratamento composto por 3 replicatas

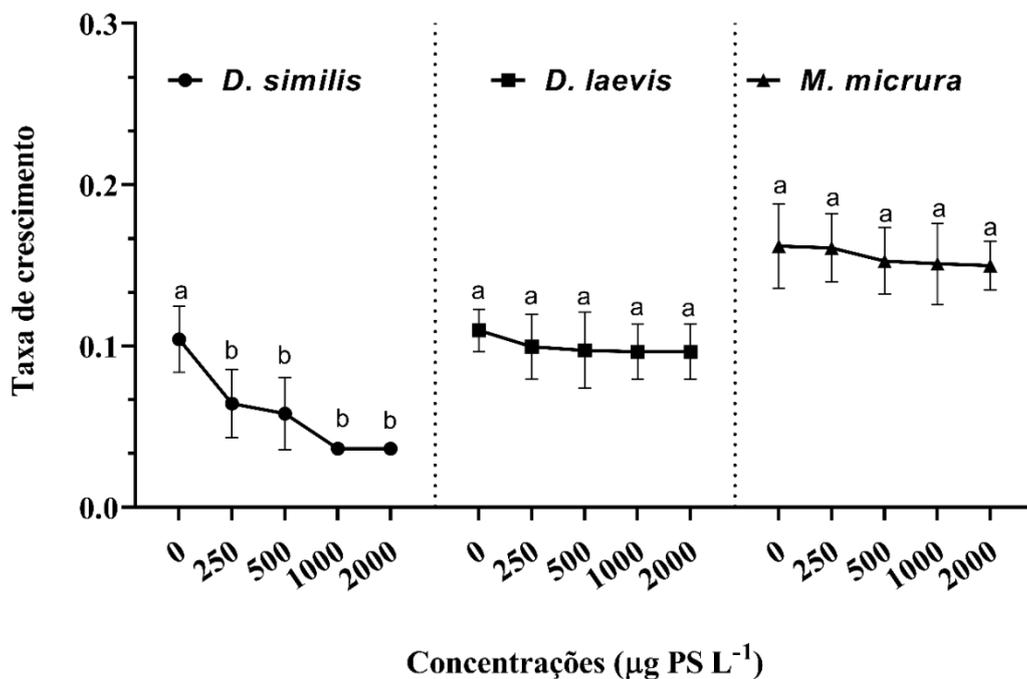


Tabela 8: Concentrações de Efeito (CE₅₀) estimadas para o crescimento somático de microcrustáceos expostos aos toxicantes – cianobactéria e pesticida – de forma unitária e em mistura durante 96 horas

Agente tóxico	Organismo teste	CE ₅₀ para taxa de crescimento (µg L ⁻¹)	IC 95%
LETC-CY-05	<i>D. similis</i>	988,70	742,9 - 1357
	<i>D. laevis</i>	9604*	4678 - 14530
	<i>Moina micrura</i>	10895*	5108 – 16682*
Acetamiprida	<i>D. similis</i>	367,80	284 – 499,7
	<i>D. laevis</i>	733,2	551,60 – 945,20
	<i>Moina micrura</i>	3811	2463 – 5319*
Mistura	<i>D. similis</i>	-	-
	<i>D. laevis</i>	-	-
	<i>Moina micrura</i>	-	-

Obs.: “*” indica valores acima da concentração máxima testada;
“-” indica exposições para as quais a estimativa de CE₅₀ não foi possível

Em um trabalho de exposição aguda a 50 ng L⁻¹ ao fármaco diltiazem (bloqueador de canais de cálcio) sobre *Daphnia magna*, Steinkey *et al.* (2019) também não observaram danos ao crescimento, mas houve aumento na taxa metabólica. Os autores atribuem esse efeito a alimentação dos animais, ou seja, por manterem uma dieta considerada nutritiva, mesmo com a exposição, o desenvolvimento dos animais não é afetado devido a uma compensação na demanda energética através da alimentação.

Em ensaios com compostos perfluorados, Seyoum *et al.*, (2020) verificaram para a mesma espécie 25% de redução no tamanho corporal na concentração de 10 µmol L⁻¹ após 7 dias de exposição e posteriormente não foi observado efeito, sugerindo uma compensação tardia. Apesar de Araújo *et al.* (2019) descreverem padrões de resposta similares entre espécies monofiléticas, *D. magna* pode ser mais tolerante a poluentes neurotóxicos que como *D. similis*, o que reforça a aplicabilidade de espécies nativas para análise de risco.

Reis (2018) constatou que cladóceros tropicais, como *D. laevis*, apresentam redução no crescimento somático quando expostas a uma dieta contendo 90% da cianobactéria *R. raciborskii*. Segundo a autora, a dieta é, efetivamente, um fator que contribui para a expressão de alterações no crescimento somático. Cabe ressaltar que nos ensaios conduzidos foi estabelecida a concentração de alimento palatável (clorofíceas), o que pode não ocorrer em

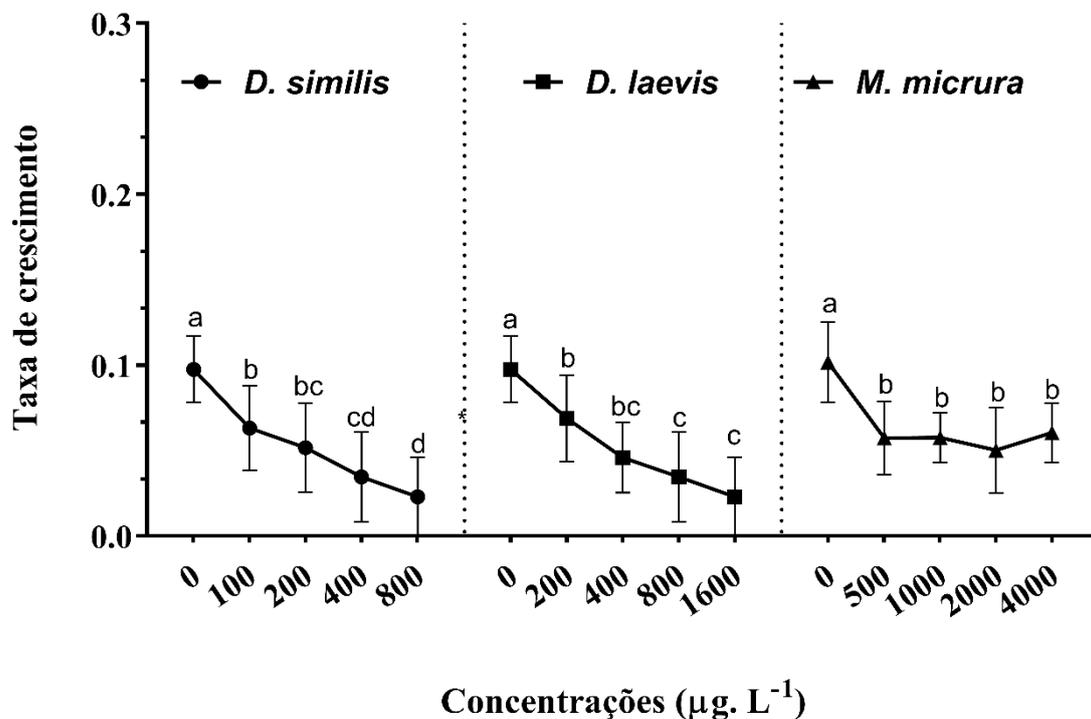
ambiente natural, e assim a compensação energética pode não ser viável devido a diminuição na disponibilidade ou ausência de alimento (STEINKEY *et al.*, 2019).

5.1.1.2 Acetamiprida

Em relação a taxa de crescimento somático para os três microcrustáceos expostos a acetamiprida (ACE) conforme seus respectivos tratamentos (Figura 16), *D. similis* ($CE_{50} = 367,8 \mu\text{g L}^{-1}$) se mostrou tão sensível quanto constatado na exposição à LETC-CY-05 exibindo um padrão dose-dependente. Da mesma forma, *D. laevis* ($CE_{50} = 322,2 \mu\text{g L}^{-1}$) (Tabela 8) demonstrou uma tendência à redução no crescimento somático com o aumento de concentração, sendo afetada a partir da menor concentração ($200 \mu\text{g L}^{-1}$).

Moina micrura (Figura 16), assim como *D. laevis*, diferentemente do que foi observado na exposição a cianobactéria, sofreu redução na taxa de crescimento para todos os tratamentos em relação ao controle, sendo 2,86 vezes mais sensível ao pesticida que à cianobactéria ($CE_{50} = 3811 \mu\text{g L}^{-1}$) (Tabela 8).

Figura 15: Taxa de crescimento médio para três espécies de microcrustáceos expostos a acetamiprida (ACE) com seus respectivos tratamentos e desvio padrão para cada tratamento



Em ensaios de 21 dias, Li *et al.* (2021), verificaram que exposição a 1,2 mg L⁻¹ do plastificante ftalato de butil benzílico (BBP) provocou um aumento na ocorrência de deformidades nos espinhos caudais de *D. magna* e, ainda, que o crescimento do cladóceros foi afetado em seus sete primeiros dias de vida. Para cladóceros o crescimento normalmente está atrelado a maturação, logo indivíduos tendem a crescer à medida que se tornam aptos para a reprodução (FLAHERTY; DODSON, 2005). Além disso Tessier *et al.* (1983) demonstrou que há uma correlação entre as reservas energéticas e o crescimento com a reprodução e, até mesmo o tamanho da prole.

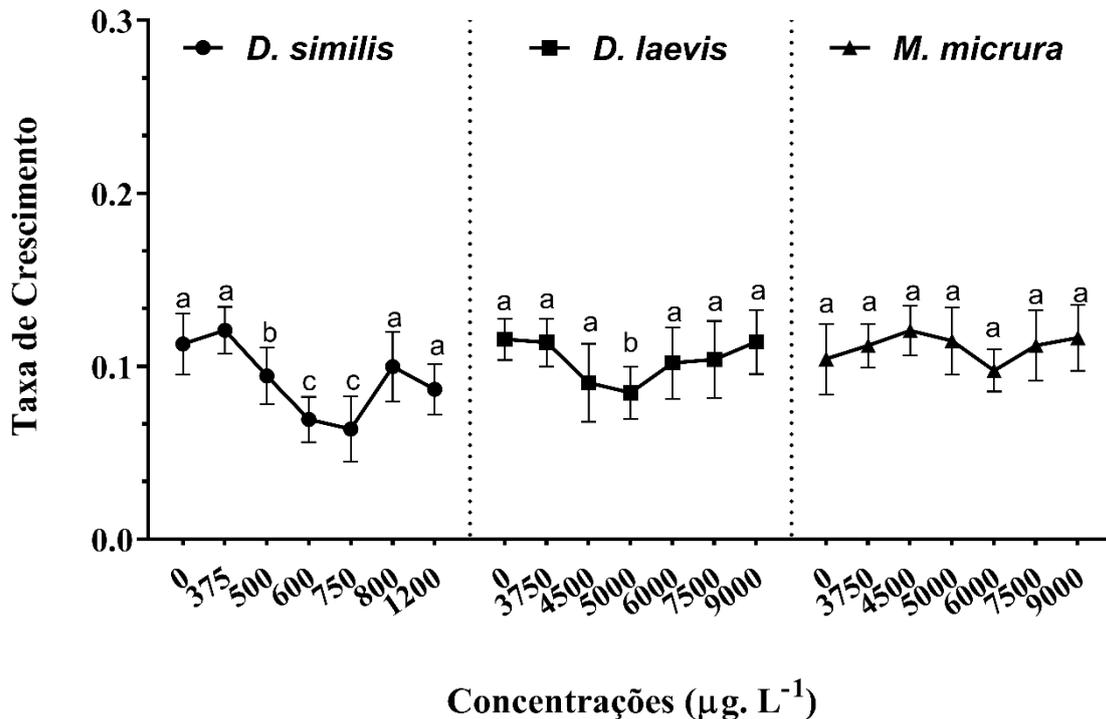
Devido a sua ação sobre os receptores nicotínicos de acetilcolina, os neonicotinóides podem afetar o processo de muda em insetos (KOBASHIA *et al.*, 2017), demonstrando efeitos sobre o peso, crescimento e desenvolvimento de larvas (SHI *et al.*, 2020). Esse tipo de dano em estágios de vida tão iniciais pode comprometer toda estrutura populacional e anteceder impactos significativos sobre a rede trófica.

5.1.1.3 Mistura

Quanto a taxa de crescimento somático para 96 h de exposição à mistura s de proporções variadas dos dois agentes, as três espécies demonstraram um padrão irregular e alta variabilidade entre as réplicas analisadas para cada tratamento (Figura 17), o que impossibilitou a estimativa de uma concentração de efeito para os três clones dentro do intervalo de concentrações testado (Tabela 8).

D. similis apresentou uma tendência de redução em seu crescimento corporal conforme o aumento na porção de acetamiprida dentro da mistura, mas só foi observado efeito significativo entre 500 (proporção 1:2^a) e 750 µg L⁻¹ (proporção 2:1, tabela 7). Enquanto isso, para *D. laevis*, foi verificada uma tendência na redução de seu crescimento na concentração 1:1 (5000 µg L⁻¹) e o mesmo foi observado para *M. micrura* na mesma proporção, porém a uma concentração superior à de *D. laevis* (6000 µg L⁻¹) (Figura 17).

Figura 16: Taxa de crescimento somático para 4 dias de exposição a mistura com seus respectivos tratamentos e desvio padrão para cada tratamento composto por 3 replicatas.



Em ensaio crônico com nanopartículas de prata (AgNPs), *D. similis* teve um aumento de 8% em seu comprimento corporal e de 33,6% em sua massa seca quando exposta a 1,0 µg kg⁻¹ de AgNPs (WANG *et al.*, 2018), sendo os efeitos associados, também, a baixa concentração ou ausência de alimento nutritivo. O autor postulou que o cladóceros podem ter alterado sua resposta toxicofisiológica em função de baixas concentrações. Respostas opostas ao esperado, como aumento no crescimento corporal e na duração do ciclo de vida em função de exposições vêm sendo relatadas outros estudos (STEVENSON *et al.*, 2013, 2017; JIAO *et al.* 2014b).

Alterações no ciclo de vida podem impor danos substanciais a espécies com ciclo de vida mais rápido, tais como *Moina micrura*, cujo desenvolvimento embrionário é de até 24 h (MURUGAN, 1975). Assim, um prolongamento associado à utilização de inseticidas neurotóxicos pode, ainda, aumentar o risco desses organismos serem afetados por fatores e pressões ambientais tais como mudanças sazonais e susceptibilidade a inimigos naturais.

Sabe-se que inúmeras fontes de estresse podem afetar microcrustáceos, desde a radiação ultra violeta (UV) (LUO *et al.*, 2018) até contaminantes emergentes e o crescimento em *Daphnia* tem uma relação direta com a biossíntese de aminoacil-tRNA (YEBRA;

HERNÁNDEZ-LEÓN, 2004). Wang *et al.* (2018) ressaltam que o estímulo desse processo por fontes externas e internas pode, até mesmo, favorecer o rápido crescimento de *D. similis*.

Assim, a variabilidade no crescimento de *D. similis* e *D. laevis* na mistura pode estar associada a efeitos secundários ocasionados pela influência da exposição ao inseticida sobre o comportamento alimentar. Dessa forma, o efeito de inseticidas sobre o zooplâncton ainda poderia ocasionar um crescimento de microalgas e cianobactérias devido a inibição da atividade predatória. Muturi *et al.* (2017) observam que essas substâncias reduzem a diversidade e alteram a estrutura das comunidades de macroinvertebrados.

5.1.2 Sobrevivência

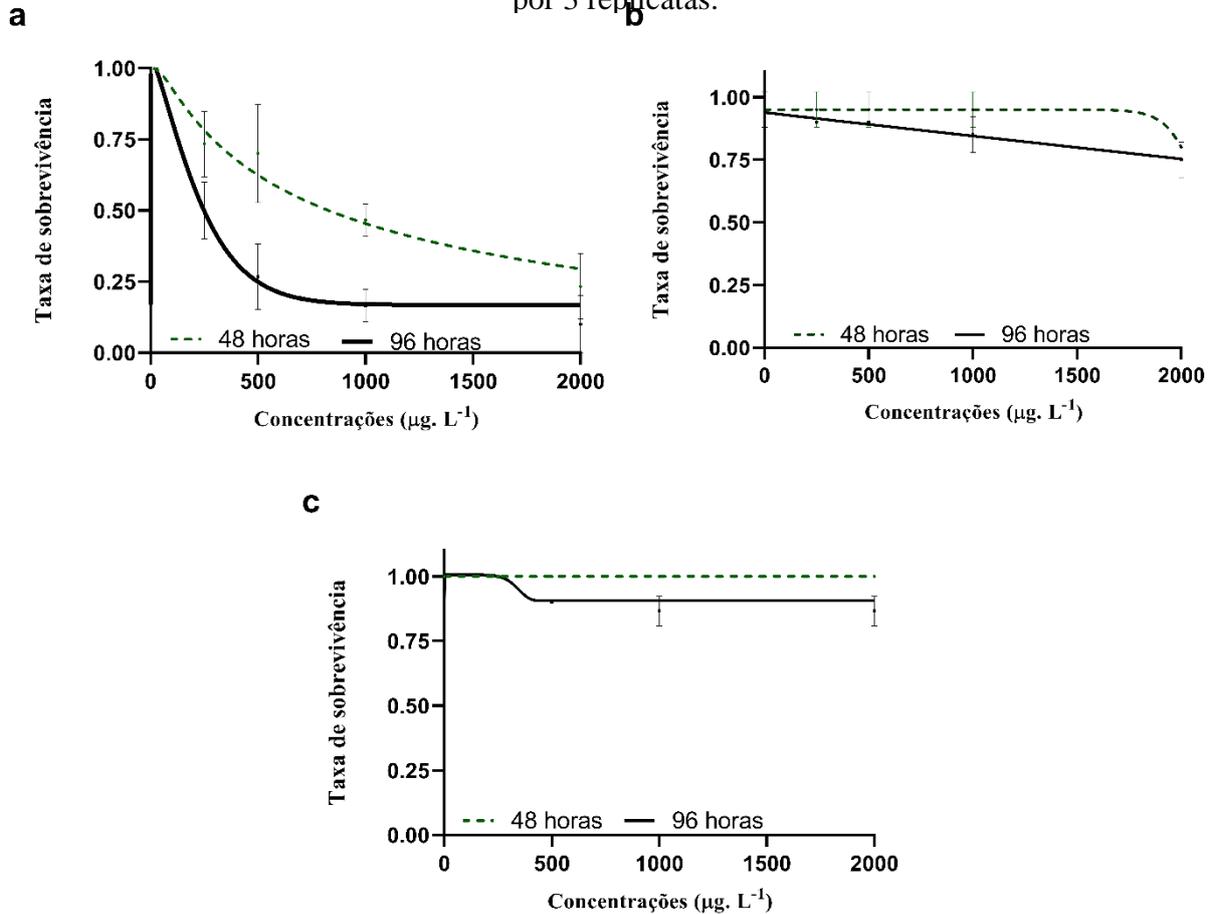
5.1.2.1 LETC-CY-5

A sobrevivência de *D. similis*, *D. laevis* e *M. micrura* expostas a cepa LETC-CY-05 durante 48 h e 96 h também foi avaliada conforme apresentado na Figura 18. Quando exposta a cianobactéria *R. raciborskii*, *D. similis* se mostrou a espécie mais sensível, com sobrevivência reduzida à 66,67% após 48 horas e à 46,77% após 96 horas de exposição logo na menor concentração testada ($250 \mu\text{g PS L}^{-1}$) (Figura 18a). Na maior concentração ($2000 \mu\text{g PS L}^{-1}$) apenas 23% dos indivíduos sobreviveram após 96 horas de exposição, refletindo em uma CL_{50} estimada em $284 \mu\text{g PS L}^{-1}$ para LETC-CY-05 (Tabela 9).

Daphnia laevis apresentou uma redução de 10% na taxa de sobrevivência em $250 \mu\text{g PS L}^{-1}$, porém na concentração $2000 \mu\text{g L}^{-1}$ – 8 vezes superior a menor testada – a redução foi de 25% conforme indicado na Figura 18b. Com isso, os danos à sobrevivência não foram significativos a ponto de possibilitar uma estimativa de uma concentração de letal (CL_{50}) dentro das concentrações utilizadas (Tabela 9).

Em exposição a cepa LETC-CY-05, a sobrevivência de *M. micrura* não foi afetada em nenhum tratamento nas primeiras 48h de exposição e mesmo em 96 horas, na maior concentração ($2000 \mu\text{g PS L}^{-1}$), a sobrevivência não foi significativamente reduzida, alcançando a taxa de 0,8 (Figura 18c) e impossibilitando uma estimativa de concentração letal.

Figura 17: Curva de sobrevivência de *a. D. similis*, *b. D. laevis* e *c. M. micrura* expostas a cepa LETC-CY-05 durante 48 horas e 96 horas com desvios padrões para cada tratamento compostos por 3 replicatas.



R. raciborskii tem o potencial de produzir uma gama de variantes de toxina (STX, GTX2, GTX3, dcSTX dentre outras) sendo as dcSTX detectadas em culturas mantidas a partir de 25° C (CASTRO *et al.*, 2004), temperatura média de ambientes tropicais. As STXs estão fortemente associadas a redução de sobrevivência e imobilidade em cladóceros (COSTA, 2013; FERRÃO-FILHO *et al.*, 2014).

Segundo Costa *et al.* (2013) no ambiente, as cianobactérias produtoras de toxinas podem desencadear efeitos no zooplâncton que corroboram a exclusão de espécies mais sensíveis e também a redução da pressão de predação desses organismos sobre o fitoplâncton. Em um ensaio de mobilidade com *D. laevis*, Restani e Fonseca (2014) observaram uma baixa taxa de mortalidade em 24 horas de ensaio e tratamento de até 10^6 células/mL⁻¹. *D. laevis* também foi pouco afetada em ensaios agudos com as cepas MYRF e LETC-CY-05-01 individualmente, apresentando efeitos marginais na sobrevivência a 125 $\mu\text{g L}^{-1}$ de LETC-CY-05-01, enquanto o clone de *Moina micrura* isolado do Lago Parú-Calado – Amazonas foi sensível a todos os tratamentos (FERRÃO-FILHO *et al.*, 2017)

Em ensaio com *D. magna*, dietas contendo *R. raciborskii* afetaram o tamanho corporal e, à uma dieta de 100% da cianobactéria, a sobrevivência foi reduzida a uma taxa de 0,21 após 7 dias de exposição em ensaio de 11 dias de duração (SOARES *et al.*, 2009). Entretanto, a mesma cepa provocou a redução da atividade natatória em *D. pulex*, o que pode estar relacionado ao mecanismo de ação das STXs, que atuam com o bloqueio de canais de sódio em células nervosas, acarretando na interrupção dos impulsos nervosos (Ferrão-Filho *et al.*, 2007).

Em uma análise crônica comparativa, uma cepa de *Cinlindrospermopsis. curvispora* – não-produtora de MCs – se mostrou mais letal à *Daphnia lumholtzi* que tratamentos contendo microcistina-LR pura e células vivas de *Microcystis aeruginosa* – produtora de MCs – (VO *et al.*, 2020). Dessa forma, apesar de efeitos observados sugerirem uma ação das toxinas produzidas por LETC-CY-05 sobre os clones testados, como foram utilizadas suspensões com células vivas e, assim como em descrito por Ferrão-Filho *et al.* (2017), os efeitos de outros compostos produzidos pela cianobactéria não devem ser excluídos.

Daphnia spp. em outros estudos demonstrou potencial para quebrar filamentos de cianobactérias como *R. raciborskii*, fragmentando-os em porções menores e comestíveis (COSTA, 2013; OBERHAUS *et al.*, 2007). Assim, devido ao maior tamanho corporal de *D. similis* é possível que uma alta ingestão de LETC-CY-05 tenha favorecido sua intoxicação.

Kâ *et al.* (2012) observaram que cladóceros pequenos como *Moina micrura* podem até mesmo consumir filamentos de *R. raciborskii*, utilizando a cianobactéria como recurso alimentar. Considerando que o clone utilizado nesse trabalho foi isolado de um ambiente com alto grau de eutrofização, existe a possibilidade de o clone apresentar resistência associada ao histórico de sua dieta em ambiente natural.

Tabela 9: Concentração Letal (CL₅₀) em µg L⁻¹ estimada para exposições de 48 e 96 horas de exposição em ensaios agudos.

Agente Tóxico	Organismos	CL ₅₀ 48h	IC 95%	CL ₅₀ 96h	IC 95%
LETC-CY-05	<i>D. similis</i>	860	[532; 1570]	284	[185; 434]
	<i>D. laevis</i>	-	-	3270*	[1780; 7230]
	<i>M. micrura</i>	-	-	3220*	[2240; 5390]
Acetamiprida	<i>D. similis</i>	1260*	[786; 2260]	449	[165; 958]
	<i>D. laevis</i>	3180*	[2080; 5600]	2620*	[1640; 4760]
	<i>M. micrura</i>	-	-	6460*	[4430; 10800]
Mistura	<i>D. similis</i>	931	[808 ; 1130]	684	[588 ; 805]
	<i>D. laevis</i>	11400*	[9380; 14900]	8340	[5970; 11200]
	<i>M. micrura</i>	11800*	[9770 ; 4900]	10100*	[7930; 13300]

Obs.: "*" indica valores acima da concentração máxima testada; "-" indica exposições para as quais a estimativa de CL₅₀ não foi possível

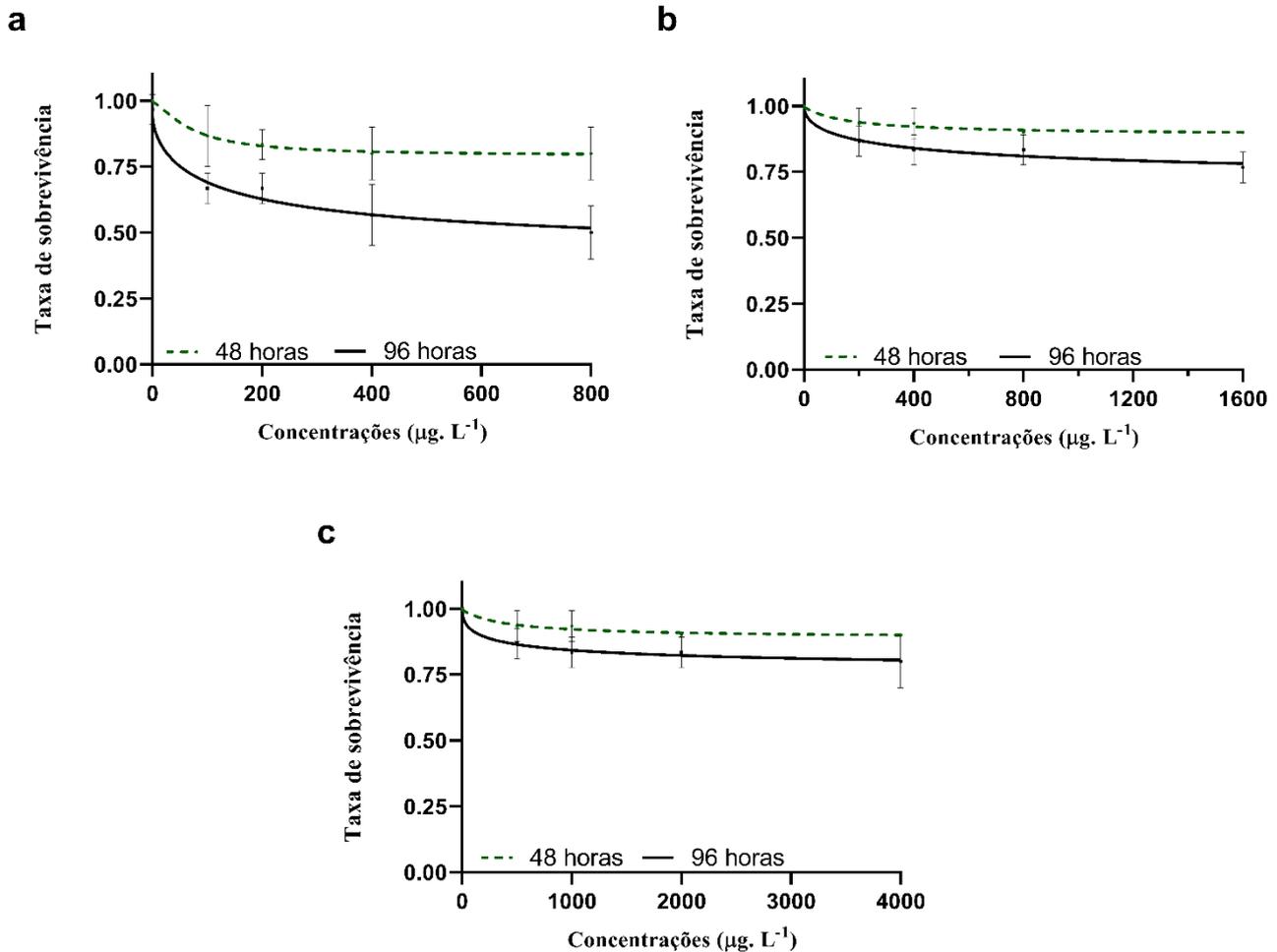
5.1.2.2 Acetamiprida

Quando comparamos os efeitos da cianobactéria sobre as três espécies de microcrustáceos, com os efeitos apresentados pelo inseticida, verificamos que o inseticida acetamiprida demonstrou ser menos efetivo à *D. similis* (CL₅₀ = 449 µg L⁻¹) e mais letal a *D. laevis* (CL₅₀ = 2620 µg L⁻¹) quando comparado a cianobactéria (Figura 19). Apesar disso, assim como observado com LETC-CY-05, os cladóceros tropicais se mostraram mais tolerantes que a espécie de ambiente temperado (Tabela 9).

A sobrevivência de *D. similis* foi reduzida à 90% já nas primeiras 24 horas de exposição em 400 µg L⁻¹ do neonicotinoide. Houve uma redução na sobrevivência em função do tempo de exposição e a cada intervalo de 24 horas foi verificada uma redução média de 2 vezes para 400 µg L⁻¹ e de 1,8 vezes em 800 µg L⁻¹.

A taxa de sobrevivência de *D. laevis* em 200 µg L⁻¹ foi 1,33 vezes superior à observada no cladóceros de região temperada após 96 horas de exposição. Apesar disso, *D. laevis* foi pouco afetada pelo inseticida, com mortalidade máxima de 20% em 1600 µg L⁻¹ (Figura 19b). Por sua vez, *M. micrura* não apresentou efeitos significativos quanto a sobrevivência em 48 horas e, em 96 horas, a maior concentração (4000 µg L⁻¹) alcançou 15% de mortalidade levando a uma estimativa de CL₅₀ superior a concentração máxima testada.

Figura 18: Curva de sobrevivência de **a.** *D. similis*, **b.** *D. laevis* e **c.** *M. micura* expostas ao neonicotinoide acetamiprida durante 48 horas e 96 horas com desvios padrões para cada tratamento.



D. similis e *D. laevis* demonstraram, respectivamente, taxa de sobrevivência 11,5 e 11,1 vezes menor que o determinado por Raby *et al.* (2018) para *Ceriodaphnia dubia*. Os autores concluíram que em exposição a 2,71 mg L^{-1} de acetamiprida, a sobrevivência de *C. dubia* sofreu diminuição de 10% em ensaios crônicos e a produção de neonatos foi 9,36% menor que em indivíduos não expostos.

Vehovxzy *et al.* (2015) usaram o caracol *Lymnaea stagnalis* para estudar os efeitos neurofisiológicos inibitórios de diferentes neonicotinóides e observaram que em 0,1 mg.L^{-1} a acetamiprida foi capaz de inibir em 58% as sinapses excitatórias colinérgicas entre neurônios do sistema nervoso central.

Na classificação de risco de pesticidas agrícola com método preditivo, a acetamiprida foi o segundo neonicotinoide com maior risco toxicológico a espécies aquáticas. Nesta análise, foram considerados dados secundários de efeitos de pesticidas sobre peixes, crustáceos, algas e

macrófitas e o nenicotinoide destacou-se por sua capacidade de inibição do sistema nervoso (WHITESIDE *et al.*, 2008).

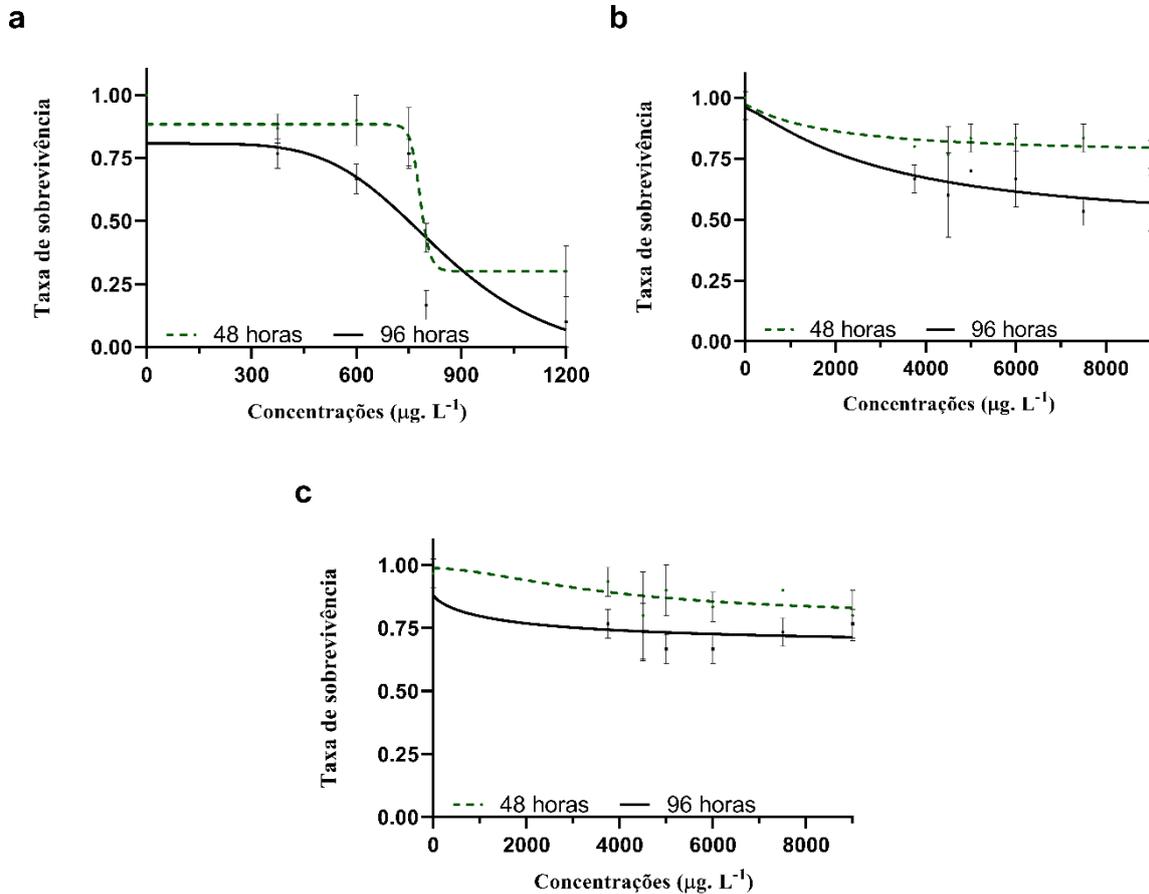
Em uma análise ecológica, (GUTIERREZ *et al.*, 2020) avaliaram os efeitos do inseticida organofosforado clorpirifós (CLP) em uma assembleia zooplanctônica composta por rotíferos, copépodes e cladóceros (i.e. *Ceriodaphnia* sp. e *Moina* sp.) submetida a pressão predatória. Os autores observaram uma redução na riqueza de cladóceros correlacionada com a predação imposta por peixes. A hipótese, baseada em Havens *et al.* (2009) é que a contaminação e a predação são eventos com efeitos diferentes caso ocorram individualmente ou combinados e os efeitos dessa interação podem alterar toda a composição da assembleia desencadeando efeitos adversos.

5.1.2.3 Mistura

Assim como nos dois ensaios individuais, *Daphnia similis* foi a espécie mais sensível (Figura 20a, Tabela 9). Quando submetida ao tratamento de $750 \mu\text{g L}^{-1}$ da mistura, ($250 \mu\text{g PS.L}^{-1}$ de cianobactéria e $500 \mu\text{g L}^{-1}$ inseticida) (Tabela 8), a taxa de sobrevivência foi de 0,73. Contudo, em $375 \mu\text{g L}^{-1}$ de mistura ($250 \mu\text{g PS.L}^{-1}$ de cianobactéria e $125 \mu\text{g L}^{-1}$ de acetamiprida) a sobrevivência foi 1,25 vezes menor, evidenciando uma associação entre o efeito e a proporção de LETC-CY-05, ou seja, uma porção superior de cianobactéria na mistura gera um impacto maior que o somatório das concentrações dos dois agentes.

A maior mortalidade em *D. similis* ocorreu no tratamento contendo $1200 \mu\text{g L}^{-1}$ de mistura (2:1^a) (Tabela 8), no qual a concentração de cianobactéria utilizada foi 2,82 vezes maior do que a sua CL_{50} (Tabela 9). A taxa de sobrevivência estimada para a caracterização de efeito sinérgico entre os dois agentes seria, no máximo, 0,18, contudo, experimentalmente, a sobrevivência foi 2,87 vezes menor do que o esperado (Tabela 10).

Figura 19: Curva de sobrevivência de *a. D similis*, *b. D. laveis* e *c. M.micura* expostas a mistura contendo *R. raciborskii* e o neonicotinoide acetamiprida durante 48 horas e 96 horas com desvios padrões para cada tratamento



Como dito anteriormente, foi observada uma forte correlação entre a proporção dos agentes e sobrevivência nas exposições agudas. Em *D similis*, as taxas de sobrevivência para as proporções 1:2 e 1:2^a (0,73 e 0,40) (Tabela 10) corroboram à hipótese de que o aumento na concentração de acetamiprida na mistura promove uma diminuição no efeito de letalidade. Inversamente, nos tratamentos 2.1 e 2.1^a as taxas de sobrevivência observadas foram de 0,67 e 0,07, respectivamente demonstrando maior sensibilidade em função da concentração de cianobactéria ($R^2 = -0,5846$).

Tabela 10: Estimativas de efeito observado para a sobrevivência de microcrustáceos expostos a mistura de ACE e LETC-CY-05, segundo modelo de Jonker et. al (2005)

	Proporção de MIX	Taxa de sobrevivência estimada para ACE	Taxa de sobrevivência estimada para LETC-CY-05	Taxa de sobrevivência observada	Tipo de efeito observado
<i>D. similis</i>	1:2	0,561	0,710	0,400	Aditivo
	1:2 ^a	0,449	0,568	0,733	Antagônico
	1:1	0,898	0,568	0,767	Antagônico
	1:1 ^a	0,561	0,355	0,167	Aditivo
	2:1	1,796	0,568	0,667	Sinérgico
	2:1 ^a	0,561	0,178	0,067	Sinérgico
<i>D. laevis</i>	1:2	0,524	1,308	0,667	Aditivo
	1:2 ^a	0,218	0,545	0,567	Antagônico
	1:1	0,524	0,654	0,700	Antagônico
	1:1 ^a	0,437	0,545	0,667	Antagônico
	2:1	0,873	0,545	0,600	Aditivo
	2:1 ^a	0,524	0,327	0,533	Antagônico
<i>M. micrura</i>	1:2	1,292	1,288	0,767	Aditivo
	1:2 ^a	0,538	0,537	0,767	Antagônico
	1:1	1,292	0,644	0,667	Aditivo
	1:1 ^a	1,077	0,537	0,667	Aditivo
	2:1	2,153	0,537	0,733	Sinérgico
	2:1 ^a	1,292	0,322	0,733	Aditivo

OBS.: ^a indicam tratamento em que os dois agentes foram postos em proporções já testadas podem em concentrações superiores, por exemplo: 2:1 apresenta uma concentração total inferior a 2:1 ^a

Embora a correlação entre a sobrevivência e as concentrações de cianobactéria e pesticida ($R^2 = -0,8324$ e $-0,6600$, respectivamente) nas exposições individuais tenha sido de regular a forte nos ensaios com mistura, *D. laevis* apresentou uma baixa correlação com a porção de acetamiprida ($R^2 = -0,0873$) e regular tanto para *R. raciborskii* ($R^2 = -0,5527$) quanto para concentração total da mistura ($R^2 = -0,4703$).

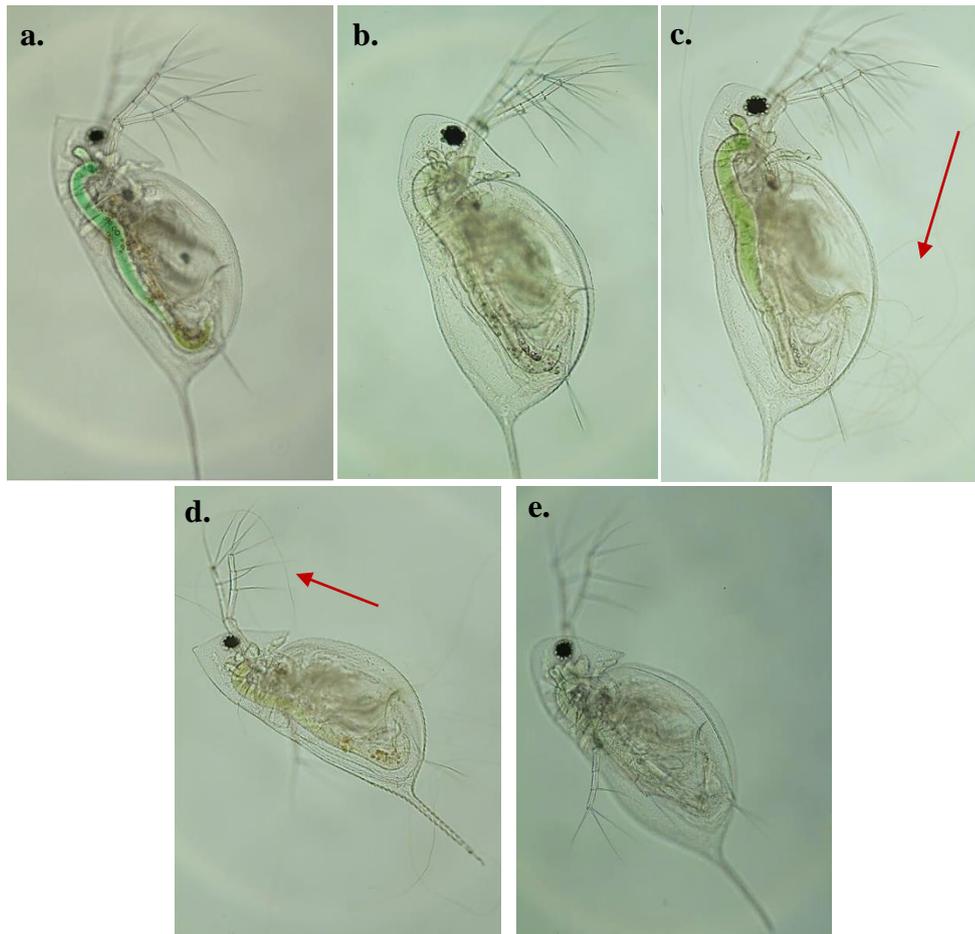
Nesse clone a maior taxa de sobrevivência foi constatada na proporção 1:1 (5000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de mistura) e a menor na proporção 2:1^a (7500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de mistura) (Figura 20b), sendo o efeito geral da mistura caracterizado como antagônico (Tabela 10). Vale ressaltar que 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de mistura foi o mesmo tratamento no qual verificou-se tendência de redução ao crescimento somático, o que sugere que uma possível alocação de energia para garantia da sobrevivência tenha sido resultado de menor investimento em crescimento.

Percebeu-se também, ao analisar os sobreviventes da proporção 1:2 (3750 $\mu\text{g L}^{-1}$ de mistura) no microscópio (Figura 21), que os indivíduos continham material no sistema

digestivo, indicando atividade de filtração (Figura 21c) Diferente disso, nos tratamentos com maior porção de *R. raciborskii* o trato digestivo dos animais estava vazio (Figura 21e).

Com isso, salienta-se que a toxicidade ao zooplâncton pode ter sido definida por uma interação dos dois agentes entre si, considerando que de acordo com a classe de pesticida (Inseticida, herbicida ou fungicida) as respostas de cianobactérias podem oscilar desde a inibição até estímulo de crescimento (SINGH *et al.*, 2018).

Figura 20: Indivíduos de *D. laevis* submetidos a tratamentos: a. Controle; b. 3000 μg PS L-1 de LETC-CY-05; c. 7500 μg L-1 de Mistura (1:2); d. 5000 μg L-1 de Mistura (1:1); e. 4500 μg L-1 de Mistura (2:1).



OBS.: As setas indicam o registro de emaranhados de filamentos de *R. raciborskii*

Apesar de *Daphnia* ser um gênero com comportamento alimentar generalista, é possível que *D. laevis* possa limitar sua filtração a fim de reduzir a ingestão de filamentos de *R. raciborskii* e evitar a intoxicação. Contudo, na presença de acetamiprida (1:2) (Figura 21c) essa capacidade foi inibida e a espécie se tornou susceptível a intoxicação por STX devido ao consumo da cianobactéria.

Em estudo de tabela de vida com o cladóceros tropical *D. gessneri*, Costa *et al* (2013) viram que o clone apresentava uma resistência a cepa produtora de STXs T3 devido a um possível comportamento de rejeição dos filamentos em exposições com suspensões alimentares de 0.5 mg C L^{-1} e que em dieta com 100% da cepa foi verificada presença de conteúdo esverdeado no intestino dos animais.

Moina micrura foi a espécie menos afetada nos ensaios individuais, mas quando os dois materiais foram aplicados em mistura a relação entre a concentração e a taxa de sobrevivência forneceu um coeficiente de determinação (r^2) igual a -0,7972. A menor sobrevivência observada foi de 67,67% nos tratamentos 1.1 e 1.1^a, e diferente dos outros clones, isso sugere que não há efeitos indiretos da interação entre os agentes sobre a mortalidade.

Acetamiprida foi, dentre os neonicotinoides, o que apresentou menor efeito em exposição *in vitro* aguda à abelhas *Apis mellifera* (BRUNET; BADIOU; BELZUNCES, 2005) porém não se pode descartar a relação entre os baixos efeitos de exposição aguda e a menor afinidade lipídica dessa substância, já que a estabilidade de ligações de “Wander-Walls” como os receptores é baixa. Sendo assim, através da interação com uma matriz lipídica – como os produtores primários – em porções correlatas é possível que a biodisponibilidade dessa substância aumente e, assim, seja observado um aumento do efeito.

O padrão de respostas e expressões associadas aos canais iônicos pode variar conforme as funções fenotípicas da célula afetada e também pelas condições ambientais. De acordo com Wessler e Kirkpatrick (2008) os neurônios colinérgicos liberam ACh, que via receptores nicotínicos e muscarínicos (n- e mAChRs) viabilizam a neurotransmissão química e, dessa forma, o organismo responde aos estímulos externos e internos, porém o bloqueio da neurotransmissão colinérgica é normalmente seguido pela morte imediata.

5.2 ENSAIOS CRÔNICOS

Nos ensaios de toxicidade crônica foram utilizadas concentrações que compreendessem até a CL_{15} verificada para cada clone. Tendo em vista que nas exposições agudas para a mistura os clones exibiram efeito antagônico com uma forte correlação entre a presença de *R. raciborskii* e a taxa de sobrevivência, foram definidas concentrações que contemplassem as proporções com danos mais drásticos observados. Também foi considerada a concentração de LETC-CY-05 aplicada nos ensaios individuais na qual os indivíduos apresentaram redução de outro parâmetro, seja número de neonatos, fecundidade ou crescimento populacional.

5.2.1 Sobrevivência

5.2.1.1 LETC-CY-05

Assim como no ensaio agudo, LETC-CY-05 foi mais letal à *D. similis*, reduzindo sua sobrevivência em todos os tratamentos desde o terceiro dia de exposição ($CL_{50} = 13,5 \mu\text{g PS L}^{-1}$ – Tabela 11). A partir do sexto dia todos os tratamentos apresentaram uma queda de, ao menos, 25% na sobrevivência e, ao término do ensaio, em 25 e 50 $\mu\text{g PS L}^{-1}$ não restaram sobreviventes (Figura 22a).

Nos ensaios conduzidos, a diminuição de parâmetros reprodutivos de *D. similis* (Figura 22a) foi diretamente influenciada pela baixa taxa de sobrevivência, uma vez que com a morte precoce dos indivíduos levou à uma redução na contribuição de prole.

O mesmo não pode ser atribuído para *D. laevis* que teve, no máximo, 12,5% de redução em sua sobrevivência após 15 dias de exposição (Figura 22b). Mesmo em 400 $\mu\text{g PS L}^{-1}$, a taxa de sobrevivência se manteve estável a partir do terceiro dia. Com isso a CL_{50} para esse clone (477 $\mu\text{g PS L}^{-1}$ – Tabela 11) superou a concentração máxima testada.

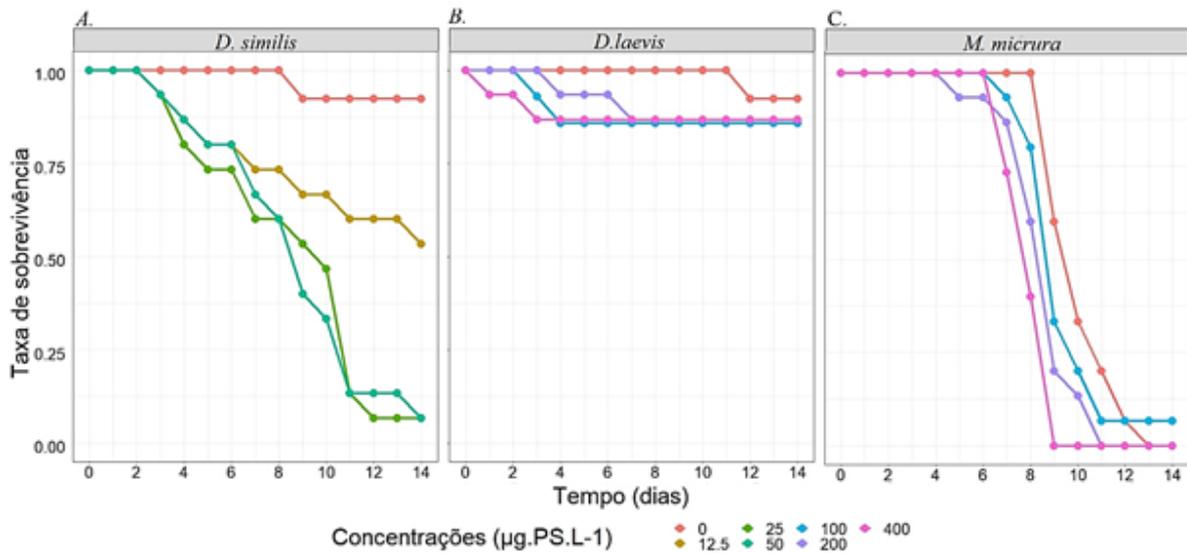
Em média, 15 % dos indivíduos de *M. micrura* (CL_{50} de 158,7 $\mu\text{g L}^{-1}$, Tabela 11) foram mortos entre a segunda e terceira ninhada (dia 6-8), mas em todos os tratamentos, incluindo o controle, houve uma queda na taxa de sobrevivência após o nono dia.

Tabela 11: Concentrações de Efeito sobre a fecundidade média (CE_{50}) e Concentrações Letais para 50% (CL_{50}) para indivíduos expostos a LETC-CY-05, acetamiprida (ACE) e a mistura entre eles (MIX) em ensaio de toxicidade crônica.

Espécie	Tratamento	CE_{50}	$IC_{95\%}$	CL_{50}	$IC_{95\%}$
<i>D. similis</i>	LETC-CY-05	12,32	11,29; 13,09	13,5	11,4 ; 15,5
	ACE	-	-	45,44	24,11 89,86
	MIX	49,55	48,86; 50,24	77,96	49,96 121
<i>D. laevis</i>	LETC-CY-05	-	-	477	417 ; 680
	ACE	-	-	935,30*	655,1; 1420*
	MIX	257,8	243,7; 371,9	308,80	219,1; 435
<i>M. micrura</i>	LETC-CY-05	-	-	158,7	110,0 266,2
	ACE	-	-	98,18	49,98; 300
	MIX	-	-	488,5*	457,6; 582,2*

Obs.: “*” indica valores acima da concentração máxima testada; “-” indica exposições para as quais a estimativa de CE não foi possível

Figura 21: Taxa de sobrevivência por dia para os cladóceros *a. D. similis*, *b. D. laevis* e *c. M. micrura* expostos a tratamentos da cepa LETC-CY-05 durante 15 dias



Alguns trabalhos levantam a hipótese que, devido a fatores climáticos o zooplâncton de regiões temperadas é submetido a florações de cianobactérias com menor frequência que o zooplâncton tropical e, por isso, organismos tropicais tenderiam a ser mais tolerantes a intoxicação por cianotoxinas (FERRÃO-FILHO; KOZLOWSKY-SUZUKI, 2011; HOOVER *et al.*, 2006), o que explica a maior sensibilidade de *D. similis* a *R. raciborskii* quando comparada com os dois cladóceros isolados no Brasil.

Características da história de vida ligadas a concentração e qualidade do alimento podem influenciar na resistência de cladóceros à cianobactérias. *Daphnias* de ambientes tropicais normalmente têm ciclo de vida mais curto, o que implica em menores intervalos entre gerações, favorecendo a expressão de tolerância em curtos períodos (MCLAREN, 1963; PETRUSEK, 2002). Além disso, em ambientes tropicais as florações são mais frequentes e perenes, podendo favorecer a exposição e aumento da resistência em cladóceros (Ferrão-Filho e Kozlowsky-Suzuki, 2011).

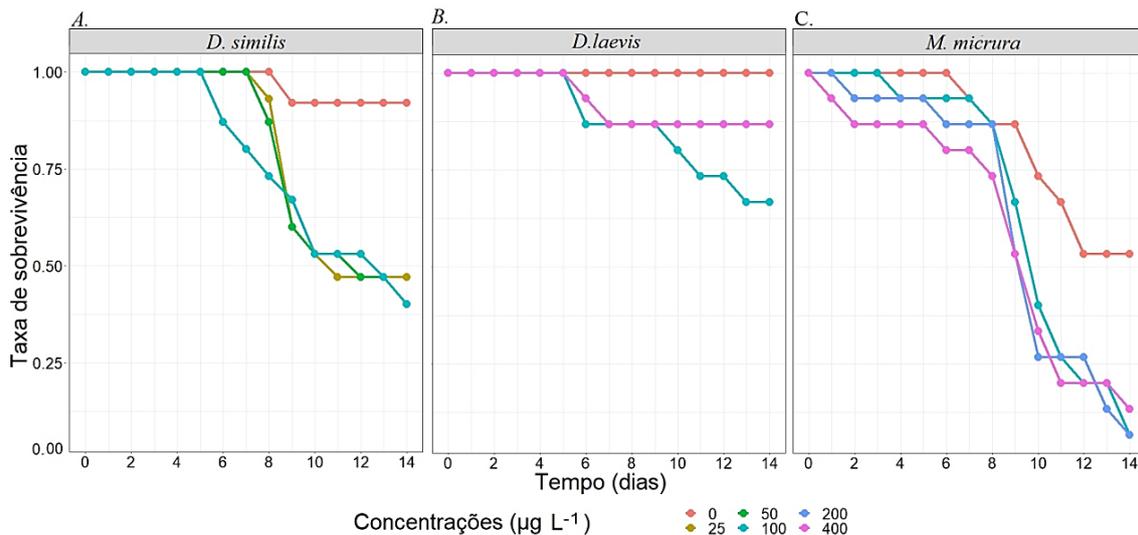
Espécies pequenas como *D. laevis* vêm demonstrando capacidade de reduzir a biomassa de cianobactérias como *R. raciborskii* (FERRÃO-FILHO, A. S. *et al.*, 2020). No entanto, a exposição à cianobactérias pode afetar a filtração e inibir proteases digestivas em espécies exóticas como *D. magna*, implicando na geração de descendentes com maior tolerância às toxinas (DAO; DO-HONG; WIEGAND, 2010).

5.2.1.2 Acetamiprida

Com 6 dias de exposição à acetamiprida, o número de indivíduos de *D similis* ($CL_{50} = 45,44 \mu\text{g L}^{-1}$, Tabela 11) no tratamento de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ foi reduzido em 20%, mas nas concentrações inferiores só foi notada mortalidade a partir do oitavo dia, alcançando 50% de diminuição na sobrevivência em todos os tratamentos após 14 dias (Figura 23a). A acetamiprida se mostrou letal a *D. similis* nas concentrações testadas principalmente a partir do décimo dia, quanto todas as concentrações alcançaram 50% de redução na taxa de sobrevivência.

Tal como ocorrido em exposição a *R. raciborskii*, quando submetida a acetamiprida *M. micrura* (Figura 23c) teve mortalidade expressiva a partir do dia 9 ($CL_{50} = 98,18 \mu\text{g L}^{-1}$, Tabela 11) e se mostrou mais sensível ao inseticida que *D. laevis* ($CL_{50} = 935,3 \mu\text{g L}^{-1}$, Tabela 11) (Figura 23b).

Figura 22: Taxa de sobrevivência por dia para os cladóceros **a.** *D. similis*, **b.** *D. laevis* e **c.** *M. micrura* expostos a tratamentos de acetamiprida durante 15 dias



Diferente do observado com *R. raciborskii*, os danos do neonicotinoide ao ciclo de vida dos três cladóceros foram expressivos, com potencial de ocasionar diminuição no tempo de permanência desses organismos no ambiente e, ainda, retardar e/ou inibir a reprodução. Esses resultados sugerem que, assim como observado para larvas de abelhas, a exposição a acetamiprida tende a suprimir o desenvolvimento dos juvenis e expressa um risco a longo prazo (SHI *et al.*, 2020).

Apesar de não ter a sobrevivência afetada nos ensaios de 96 horas, *Moina micrura* demonstrou sensibilidade a exposição crônica de acetamiprida. Efeitos similares foram observados para essa espécie quando submetida a doses subletais dos inseticidas neurotóxicos

endosulfan e carbaril, nas quais a produção de ovos foi reduzida em, até 31,8% afetando também a taxa intrínseca de crescimento populacional (r) (KRISHNAN; CHOCKALINGAM, 1989).

Exposições crônicas a neonicotinóides vêm demonstrado efeitos sobre a interação entre abelhas e flores campestres (STANLEY; RAINE, 2016) e a nicotina, substância para qual o mecanismo de ação dos neonicotinóides foi originalmente descrito, já foi definida também como altamente tóxica para *Daphnia* spp. e outros invertebrados, como insetos. Tal toxicidade é atribuída à ação dessa substância sobre a neurotransmissão na junção neuromuscular (CHEN *et al.*, 2018).

Em tratamentos com acetamiprida, Guedegba *et al.* (2019) constataram morte em peixes Tilápia do Nilo após 5 horas de exposição e, ainda, observaram uma série de alterações comportamentais como letargia e natação errática, também associadas a ação do neonicotinoide como agonista dos receptores nicotínicos de acetilcolina.

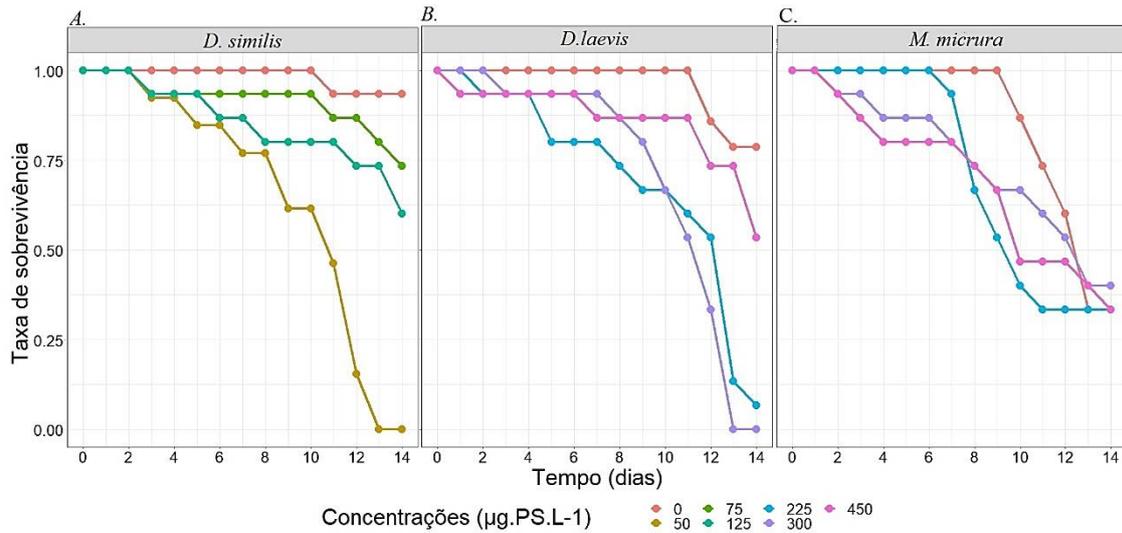
5.2.1.3 Mistura

A taxa de sobrevivência de *D. similis* foi expressivamente afetada em $50 \mu\text{g L}^{-1}$ – na qual a proporção entre a biomassa de cianobactéria e a concentração de acetamiprida era 1:1 – sendo totalmente inibida no décimo terceiro dia. Nos demais tratamentos o percentual de indivíduos vivos após 14 dias foi, em média, 68% coincidindo com o observado no ensaio agudo, em que a sobrevivência se mostrou mais influenciada pela proporção entre os contaminantes do que pela concentração total.

O clone de *Daphnia* tropical demonstrou maior resistência que *D. similis* à mistura ($\text{CL}_{50} = 308,8 \mu\text{g L}^{-1}$, Tabela 11), não havendo mortalidade expressiva nos 4 primeiros dias. Em $225 \mu\text{g L}^{-1}$ (proporção 2:1) foi o primeiro tratamento no qual verificou-se redução de sobrevivência (Figura 24b). Apesar disso, entre os dias 10 e 14, o número de indivíduos em $300 \mu\text{g L}^{-1}$ (proporção 1:1) sofreu uma diminuição brusca, chegando a zero.

Apesar de $450 \mu\text{L}^{-1}$ ser a maior concentração utilizada para esse clone, contou com uma proporção de cianobactéria e inseticida na ordem de 1:2. Nos ensaios individuais foi observado que, apesar de ambos os agentes contarem com CL_{50} superiores aos tratamentos máximos usados, LETC-CY-05 foi 1,96 vezes menos letal a *D. laevis* que acetamiprida. Portanto, é possível que por representar uma porção menor na mistura, o efeito da quantidade de cianobactéria tenha influenciado na redução da letalidade.

Figura 23: Taxa de sobrevivência por dia para os cladóceros *a. D. similis*, *b. D. laevis* e *c. M. micrura* expostos a tratamentos da cepa LETC-CY-05 durante 15 dias



Quando analisados os modelos de mistura *D. similis* sofreu antagonismo entre os dois materiais, indicando uma anulação de efeito de *R. raciborskii* pela presença de acetamiprida na mistura (Tabela 12). Já na proporção 1:1, bem como em 1:2, foi constatado efeito de aumento da toxicidade para a mistura. A maior interferência na sobrevivência desses clones foi constatada a partir do 9º dia de exposição o que sugere uma ausência de resposta imediata e alerta para uma intensificação de efeito com exposição cumulativa.

Tabela 12: Estimativa de efeito e efeito observado para sobrevivência de três microcrustáceos expostos a mistura de LETC-CY-05 e Acetamiprida (ACE)

	Proporção de MIX	Taxa de sobrevivência estimada para ACE	Taxa de sobrevivência estimada para LETC-CY-05	Taxa de sobrevivência observada	Tipo de efeito observado
<i>D. similis</i>	1:1	0,909	0,27	0,000	Sinérgico
	1:2	0,454	0,27	0,733	Antagônico
	1:3	0,303	0,27	0,600	Antagônico
<i>D. laevis</i>	2:1	6,235	1,59	0,067	Antagônico
	1:1	3,118	1,59	0,000	Sinérgico
	1:2	1,559	1,59	0,533	Potencialização
<i>M. micrura</i>	2:1	0,655	0,529	0,333	Antagônico
	1:1	0,327	0,529	0,400	Antagônico
	1:2	0,164	0,529	0,333	Antagônico

Microalgas como *Chlorella vulgaris* vivendo individualmente e também quando associada ao fungo aquático filamentosso *Aspergillus niger* vêm demonstrando potencial para a remoção de pesticidas de águas residuais, incluindo acetamiprida e outros neonicotinóides (HULTBERG *et al.*, 2016;HULTBERG; BODIN, 2018), porém IronMenta (1999) ressalta que pesticidas de diferentes modos de ação podem provocar alterações morfológicas nas células, inibição de crescimento e afetando o teor de clorofila.

Em avaliação com estruturas químicas micelares de acetamiprida, Tang *et al.* (2018) relataram um aumento nas forças de atração em função da diminuição do pH e aumento na concentração de Na⁺ favorecendo a ligação por pontes de hidrogênio. Considerando que a ligação à seus receptores não demonstra competitividade com outros toxicantes, em condições específicas a acetamiprida demonstraria maior estabilidade com meios/matrizes lipídicos (BARBARA *et al.*, 2008;KNOWN; DFP, 1985;PARK *et al.*, 2001; 2003). Nesse cenário hipotetiza-se que, a longo prazo, com a ação das STXs sobre os canais voltagem-dependentes de sódio e aumento da afinidade e estabilidade da ação do neonicotinoide, ocorra uma mudança no padrão de toxicidade à longas exposições como observado em *D. similis* e *D. laevis*.

5.2.2 Reprodução

5.2.2.1 LETC-CY-05

Nos ensaios com LETC-CY-05, houve atraso significativo na maturação de *D. similis* para todos os tratamentos em relação ao controle (média de 9 dias), enquanto *D. laevis* e *M. micrura* não sofreram danos expressivos na maturação (Figura 25a). O cladóceros de região temperada foi o mais sensível à exposição crônica da cepa LETC-CY-05

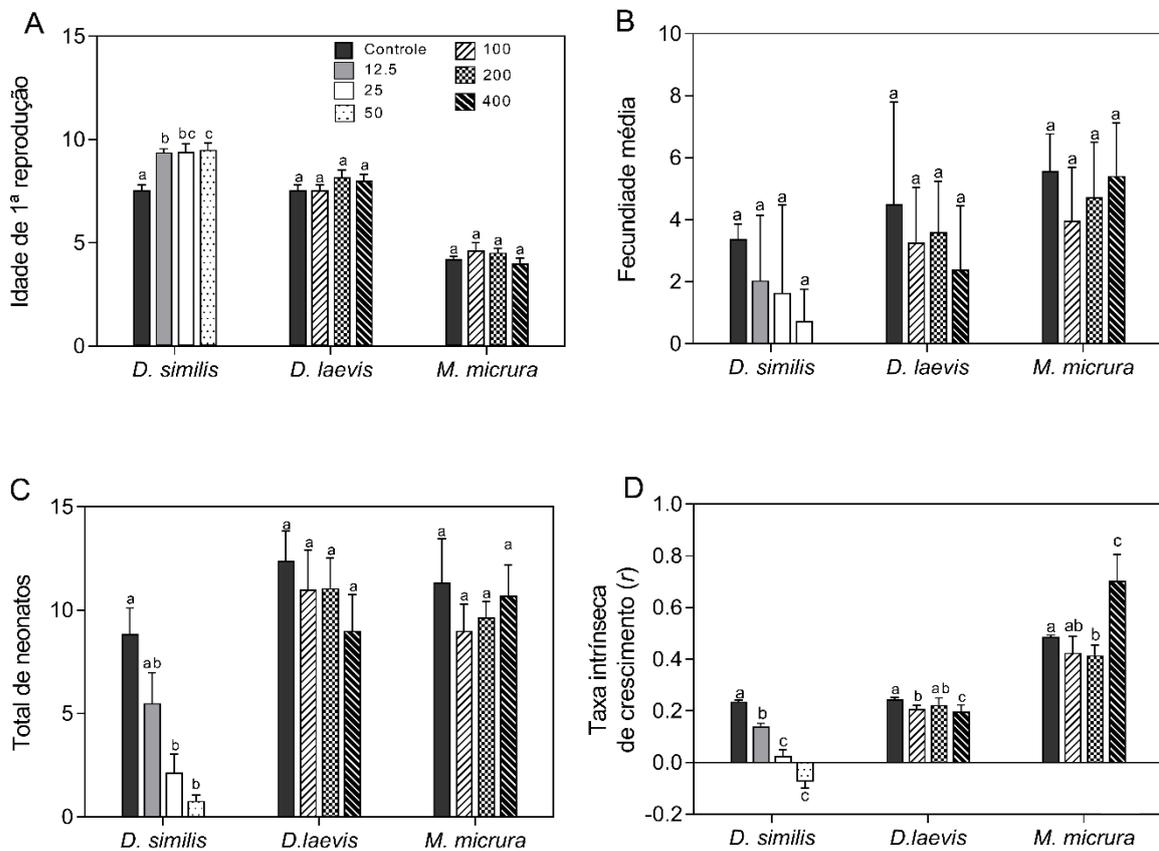
D. similis exibiu um total de neonatos significativamente menor que o controle em todos os tratamentos utilizados (Figura 25c) com CE₅₀ = 12,32 µg PS L⁻¹ (Tabela 11). Apesar disso, a fecundidade média desse clone não foi significativamente reduzida (Figura 25b) uma vez que tanto as proles quanto o número de ninhadas também foram igualmente baixos, indicando que a cada reprodução a média de neonatos liberados por fêmea se manteve. Tal desempenho na reprodução pode ter acontecido como uma alternativa a manutenção energética (SARNELLE; GUSTAFSSON; HANSSON, 2010).

A reprodução de *D. laevis* não foi afetada (CE₅₀ não estimada, Tabela 11) com relação à primípara (Figura 25a), enquanto o número de neonatos (Figura 25c) e fecundidade média (Figura 25b) foram, respectivamente, 1,37 e 1,88 vezes inferiores em 400 µg PS L⁻¹ em relação ao controle (Figura 25c). Apesar disso, em todas as exposições houve uma média de 4 ninhadas

por fêmea, o que sugere ainda que, diferente de *D. similis*, *D. laevis* não utilizou de estratégias para alocação energética.

Dentre os três cladóceros, *Moina micrura* foi o que apresentou as maiores taxas de reprodução (CE₅₀ não estimada, Tabela 11). Além de a idade de primeira reprodução (Figura 25a) e a fecundidade média (Figura 25b) não terem sido alteradas em nenhum tratamento, o total de neonatos produzidos foi somente 1,05 vezes inferior ao controle em 400 µg PS L⁻¹ (Figura 25c).

Figura 24: Parâmetros reprodutivos para *D. similis*, *D. laevis* e *M. micrura* em exposição a LETC-CY-05, onde **A.** Idade de Primeira reprodução; **B.** Fecundidade média; **C.** Total de neonatos e **D.** Taxa intrínseca de crescimento populacional



É possível que os efeitos na reprodução dos organismos tenham ocorrido devido à presença de toxinas (FERRÃO-FILHO, *et al.*, 2009), mas também ressalta-se que há influência de características morfológicas e do baixo valor nutritivo das cianobactérias (SOARES *et al.*, 2009). Por isso, nesse trabalho foi fornecida uma concentração de 0,5 mg C L⁻¹ de cada clorofícea a fim de minimizar os efeitos da falta de alimento.

Em ensaios com clone de *D. laevis* isolado da Lagoa da Pampulha-MG, tanto a cepa produtora de STXs CYRF-01 (atual LETC-CY-05) quanto a cepa NPC-1 (não produtora) levaram à diminuição na fecundidade do microcrustáceo (RESTANI, 2011). Segundo a autora, apesar de NPC-1 não produzir toxina, provavelmente produz outro metabólito com potencial de afetar a sobrevivência e reprodução de *D. laevis*.

Ainda, há de ser considerada a possibilidade de interferência mecânica dos filamentos que pode afetar a demanda energética e sobrevivência de microcrustáceos. Segundo Porter e Orcutt (1980) ao realizar movimentação excessiva do pós-abdômen para a rejeitar/expulsar partículas, os cladóceros tem um alto gasto energético e, mesmo assim, essas partículas podem obstruir a câmara de filtração impedindo a entrada de outras.

Segundo Hart e Bycheck (2011) o zooplâncton com maior tamanho corporal pode ser mais afetado do que organismos menores e, por isso, como já citado, o comportamento alimentar de *D. similis* pode explicar a sensibilidade desse clone já que conseguiria ingerir filamentos de cianobactérias com maior facilidade, sendo assim mais afetado por metabólitos potencialmente tóxicos e ainda, ter a redução do seu “fitness”, desencadeando efeitos negativos na sua sobrevivência e fecundidade (Ferrão-Filho *et al.*, 2009).

5.2.2.2 Acetamiprida

O inseticida neonicotinoide não provocou atraso na maturação (Figura 26a), porem reduziu a reprodução de *D. similis* principalmente em $50 \mu\text{g L}^{-1}$ e em $200 \mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 26b) (CE_{50} não estimada, Tabela 11). O número médio de neonatos produzidos por fêmeas no primeiro tratamento – $50 \mu\text{g L}^{-1}$ – foi 2,63 vezes menor do que o controle, enquanto em $100 \mu\text{g L}^{-1}$ a diminuição foi de 1,45 vezes, indicando uma ausência de resposta concentração-dependente (Figura 26c).

Efeitos no tamanho da prole em *D. similis* refletiram diretamente sobre a taxa de fecundidade média (Figura 26b), já que enquanto o controle apresentou uma média de 3,37 neonatos por ninhada para cada fêmea, em $100 \mu\text{g L}^{-1}$ houve uma queda de 2,4 vezes, chegando a produzir 1,39 neonatos por ninhada (Figura 26b).

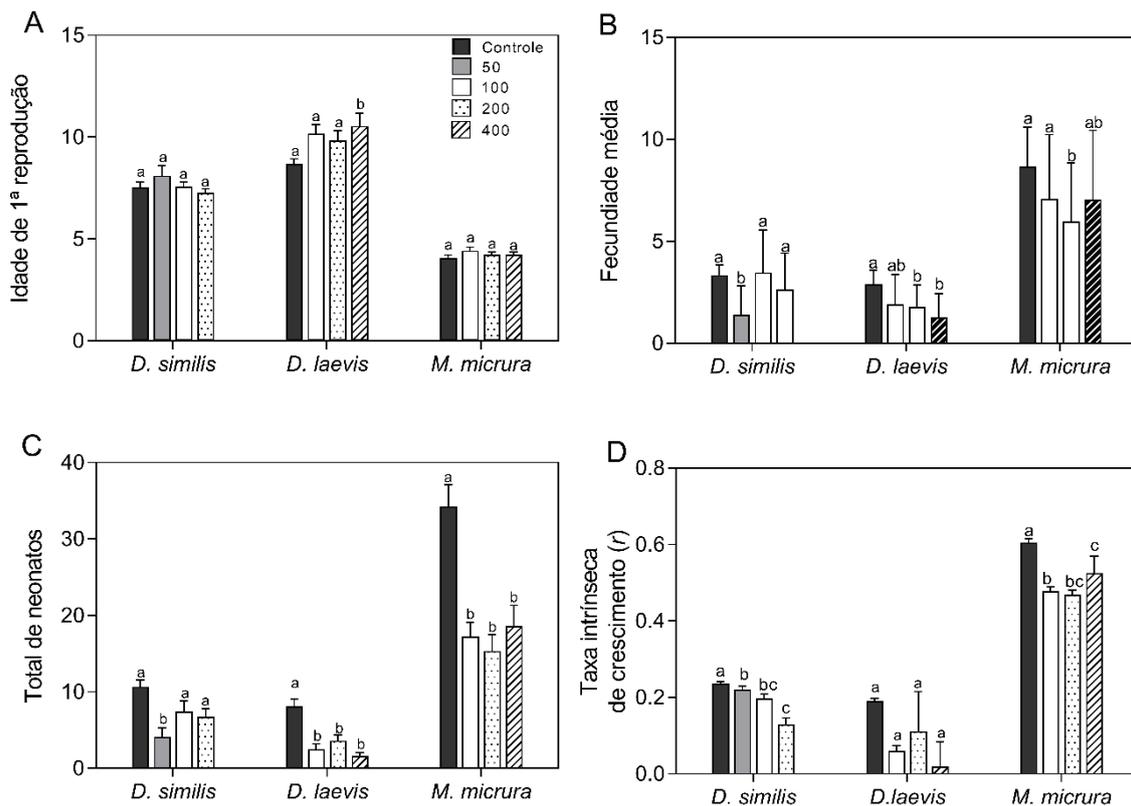
Em *D. laevis* foi constatado um retardo na liberação da primeira prole de 8 para 11 dias entre o controle e a maior concentração (Figura 26a). Com isso, *D. laevis* foi mais afetada pelo pesticida que pela cianobactéria, chegando a 80,38% de redução no número de total de neonatos por fêmea em $400 \mu\text{g L}^{-1}$ de acetamiprida (Figura 26c). Enquanto os organismos controle

produziram, em média, 8,2 neonatos ao longo do ensaio, em $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e $400 \mu\text{g L}^{-1}$ esse total foi de 2,5 e 1,6 neonatos para cada fêmea, respectivamente (Figura 26c).

Com isso e considerando a baixa quantidade de ninhadas liberada foi observada baixa fecundidade em *D. laevis* em todos os tratamentos. Enquanto indivíduos do controle tiveram 3-4 reproduções, os organismos submetidos aos tratamentos a partir de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de acetamiprida liberaram, no máximo, 2 ninhadas (Figura 26b).

Embora não tenham sido observadas diferenças significativas na idade de primeira reprodução de *Moina micrura* (Figura 26a), a fecundidade média desse clone foi reduzida em 31,23 % em $200 \mu\text{g L}^{-1}$ comparada ao controle (Figura 26b). Apesar disso, o total de neonatos para esse tratamento foi até 2,23 vezes menor (Figura 26c), o que indica uma diminuição também no número de ninhadas para, em média, 3 enquanto no controle foram contabilizadas de 4-5 ninhadas.

Figura 25: Parâmetros reprodutivos para *D. similis*, *D. laevis* e *M. micrura* em exposição a LETC-CY-05, onde **A.** Idade de Primeira reprodução; **B.** Fecundidade média; **C.** Total de neonatos e **D.** Taxa intrínseca de crescimento populacional



Já foi relatado que inseticidas como neonicotinóides e diamidas podem afetar significativamente o metabolismo de invertebrados não-alvos provocando danos ao sistema de desintoxicação, com efeito sobre as vias energéticas e reduzindo o ganho de biomassa (PISA *et*

al., 2014). Em estudos anteriores, Hasan e Ansari (2017) relataram que os estágios imaturos tiveram uma maior duração em *Zygogramma bicolorata* quando exposto a inseticidas de vários modos de ação, incluindo o neonicotinoide imidacloprida.

A acetamiprida é um dos neonicotinóides que pertence ao grupo químico N-cyanoamidine, ou seja, é uma molécula com um menor número de porções cíclicas, o que a torna menos lipofílica que outros neonicotinóides, porém tem, cada vez mais, demonstrado efeitos adversos sobre invertebrados aquáticos, principalmente predadores (MILES *et al.*, 2018).

Em um estudo de coorte Hasan *et al.* (2020) quantificaram a redução no crescimento populacional do coleóptera *Z. bicolorata* e definiram a acetamiprida como a quarta substância com maior dano a tabela de vida do besouro. Os autores atribuem esse evento ao fato de os neonicotinóides atuarem sobre os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) e apresentarem o potencial de acumulação no receptor podendo, a longo prazo, alterar o intervalo de mudas.

Além disso, por ser um inseticida sistêmico, muitos insetos alvo têm demonstrado déficit nutricional e sabe-se que uma alimentação inadequada devido à aplicação do inseticida pode causar um prolongamento no tempo de desenvolvimento, redução da viabilidade da prole e morte (AQUEEL *et al.*, 2014)

Em exposição crônica à tratamentos com o inseticida clorpirifós (CLP) e/ou peixes, o CLP mostrou potencial de afetar a estrutura aquática devido a mudança nos padrões de predação de peixes que, na presença do inseticida, exibiram uma tendência de seleção pelo zooplâncton de maior tamanho, como os cladóceros (GUTIERREZ *et al.*, 2020).

Assim como com a cianobactéria, é possível que em ambiente natural o inseticida possa provocar um maior dano ecológico a cladóceros maiores como *D. similis* tanto pela toxicidade quanto por fatores indiretos. Contudo, como já abordado, *R. raciborskii* oferece um risco “bottom-up” associado a herbivoria já que indivíduos com maior tamanho corporal são mais susceptíveis a ingestão de filamentos, enquanto a acetamiprida pode provocar um risco “top-down” devido ao aumento da pressão predatória.

5.2.2.3 Mistura

Diferente dos ensaios individuais, *D. similis* foi apenas a segunda espécie mais afetada pela mistura, que continha uma concentração fixa de 25 µg OS L⁻¹ de *R. raciborskii* (Tabela 8). Dito isso, nos ensaios de exposição crônica não foram utilizadas proporções 2:1 em *D. similis*,

pois as concentrações de cada agente que a contemplariam não possibilitariam a estimativa de efeito para os parâmetros avaliados conforme sua letalidade individual.

Seguindo o modelo estabelecido por Jonker *et al.* (2005), aumentar a concentração de *R. raciborskii* nessa mistura inviabilizaria uma análise de reprodução devido a uma alta mortalidade ocasionada por esse agente nos primeiros dias de exposição. Por outro lado, uma menor concentração do inseticida não provocaria danos em relação ao controle, como observado pela impossibilidade de estimativa de CE_{50} (Tabela 11). Nesse caso, optou-se e pela proporção 1:3 (25 $\mu\text{g PS L}^{-1}$ de LETC-CY-05 e 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ do inseticida).

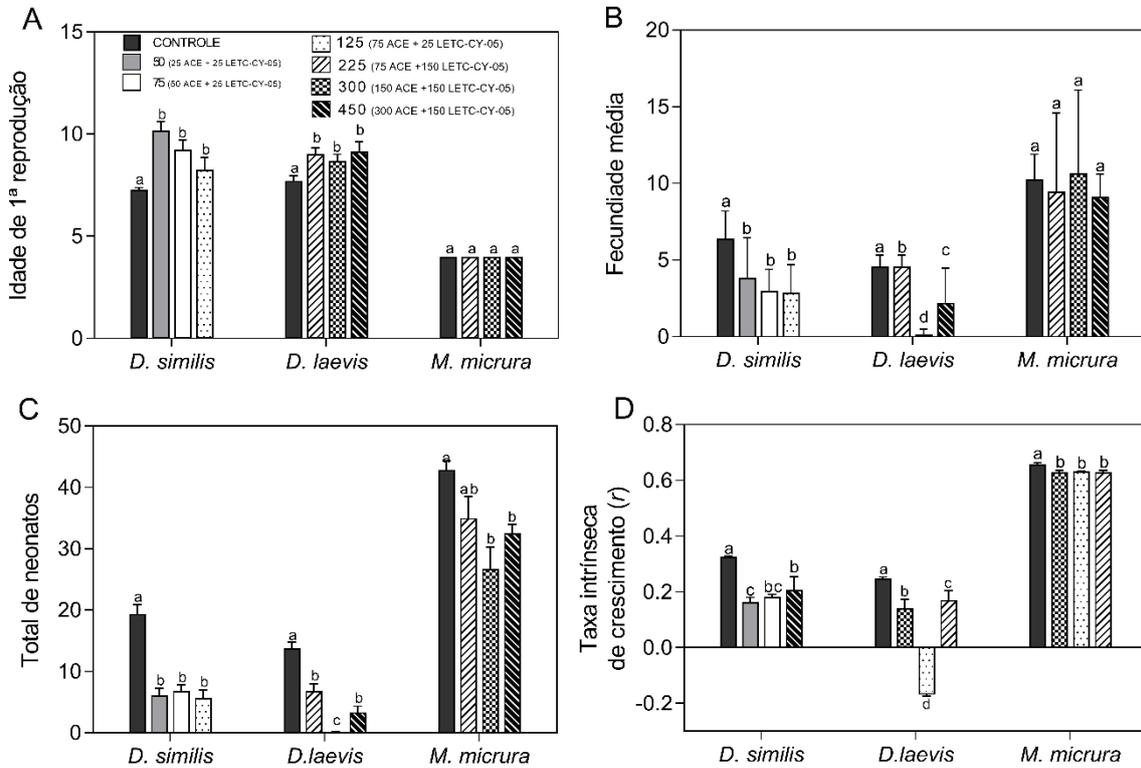
Para essa espécie, o total de neonatos em 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ (25 $\mu\text{g PS L}^{-1}$ de LETC-CY-05 e 75 $\mu\text{g L}^{-1}$ de acetamiprida) (Figura 27c) sofreu uma redução de 70,46% em relação ao controle (Figura 27c). Já para a fecundidade média, os três tratamentos apresentaram diminuição igualmente significativa ($\sim 50\%$) (Figura 27b), sofrendo potencialização do efeito de acetamiprida devido a interação com LETC-CY-05 (Tabela 12).

Tanto *D. similis* quanto *D. laevis* sofreram um atraso médio de 2 dias na idade de primeira reprodução em todas as concentrações da mistura porém para *M. micrura* não foi observada diferença em nenhum indivíduo exposto e, independente do tratamento, as fêmeas liberaram a primeira ninhada no 4 dia de exposição (Figura 27a).

D. laevis além de ser a espécie mais sensível à mistura em exposição crônica, sofreu sinergismo com CE_{50} de 257,8 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Tabela 11), tendo sua reprodução reduzida a 0,3 neonatos por fêmea a cada ninhada quando submetida a 300 $\mu\text{g L}^{-1}$ (150 $\mu\text{g PS L}^{-1}$ de LETC-CY-05 e 150 $\mu\text{g L}^{-1}$ de acetamiprida) (Tabela 8), 15 vezes menos que o controle (Figura 27b).

Apesar de ter demonstrado efeitos similares a *D. laevis* nas exposições individuais, *Moina micrura* (CE_{50} não estimada, Tabela 11) não teve sua fecundidade média afetada por nenhum tratamento da mistura (Figura 27b) e o total de neonatos foi apenas marginalmente afetado nas concentrações (Figura 27c) ainda que tenha sofrido potencialização decorrente da ausência de efeito de LETC-CY-05 (CE_{50} não estimada) sobre os parâmetros reprodutivos (Tabela 10).

Figura 26: Parâmetros reprodutivos para *D. similis*, *D. laevis* e *M. micrura* em exposição a mistura de LETC-CY-5 e acetamiprida em diferentes proporções, onde **A.** Idade de Primeira reprodução; **B.** Fecundidade média; **C.** Total de neonatos e **D.** Taxa intrínseca de crescimento populacional



Em estudo com nicotina – cujo mecanismo de ação se assemelha aos neonicotinóides – em ratos machos, doses de 0,25 e 4 mg Kg⁻¹ apresentaram diminuição significativa na imunorreatividade. Contudo, em concentração intermediária (2 mg Kg⁻¹) não foi verificado efeito, o que denota que a nicotina em doses distintas pode tanto melhorar quanto retardar a maturação de neurônios nascidos em adultos (IJOMONE; NWOHA, 2015).

Em trabalho com fotobiorretadores, Rueda *et al.* (2020) demonstraram que o produto do escoamento agrícola pode beneficiar a seleção de cianobactérias à algas verdes. Entretanto, os efeitos de contaminantes emergentes contidos nesse efluente não são definidos, o que reforça a hipótese que a proporção entre pesticidas como acetamiprida e cianobactérias como *R. raciborskii* é fundamental para a determinação do efeito aos ecossistemas aquáticos.

Em exposição a herbicida, *R. raciborskii* teve aumento de até 27% na produção de STX (BRÊDA-ALVES *et al.*, 2020) o que sugere que além da toxicidade direta ao zooplâncton, a bioconcentração da substância bem como o favorecimento e/ou o prejuízo ao crescimento da

biomassa fitoplanctônica, a seletividade de espécies afetadas e as alterações impostas ao rede trófica devem ser bem delineados.

É importante ressaltar que apesar de curvas dose-resposta monotômicas – sejam elas lineares ou sigmóides – serem um padrão a ser alcançado em estudos de toxicologia, os valores normalmente aplicados nos ensaios pouco representam o real efeito das variadas concentrações que os organismos são continuamente expostos em condições ambientais (VANDENBERG *et al.*, 2012).

5.2.3 Crescimento populacional

D. similis teve seu crescimento populacional significativamente reduzido em todos os tratamentos de LETC-CY-05 (Figura 25d), chegando a exibir taxa negativa em 400 $\mu\text{g PS L}^{-1}$. Em relação ao inseticida, só houve redução deste parâmetro em 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 26d), mas na mistura todas as concentrações apresentaram r inferior ao controle (Figura 27d). Para tal espécie já vem sendo registrada uma alta sensibilidade à cepas produtoras de microcistinas (MCs) e saxitoxinas (STXs) (HERRERA; ECHEVERRI; FERRÃO-FILHO, 2015; FERRÃO-FILHO *et al.*, 2017).

Em contrapartida, tanto *D. laevis* quanto *M. micrura* foram pouco afetadas por LETC-CY-05 (Figura 25d). Contudo, ambas sofreram reduções significativas nos tratamentos com acetamiprida (Figura 26d) sendo as menores taxas (r) verificadas em 400 $\mu\text{g L}^{-1}$ para *D. laevis* e em 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ para *M. micrura* (10,05 e 1,26 vezes menor que o controle, respectivamente).

Na mistura, a *Daphnia* tropical teve uma taxa de crescimento populacional aproximadamente nula na proporção 1:1 (300 $\mu\text{g L}^{-1}$ - Tabela 8) (Figura 24d), indicando uma tendência à exclusão dessa espécie em ambientes contaminados. Por sua vez, *M. micrura* foi marginalmente afetada em todas as proporções da mistura (Figura 24d)

A tolerância dessas espécies à exposição crônica pode ser explicada pela dinâmica entre herbívoros e o fitoplâncton de ambientes tropicais (SARNELLE; GUSTAFSSON; HANSSON, 2010; SARNELLE; WILSON, 2005), na qual a ocorrência de *D. laevis* já foi associada, inclusive, à diminuição na biomassa de cianobactérias (SARMA; NANDINI; GULATI, 2005). Em contrapartida clones isolados de reservatórios mesotróficos como *M. micrura* (Reservatório de Lajes), tendem a ser altamente sensíveis apresentando inclusive taxas de crescimento populacional negativas em dietas contendo 100% da cianobactéria (FERRÃO-FILHO *et al.*, 2019).

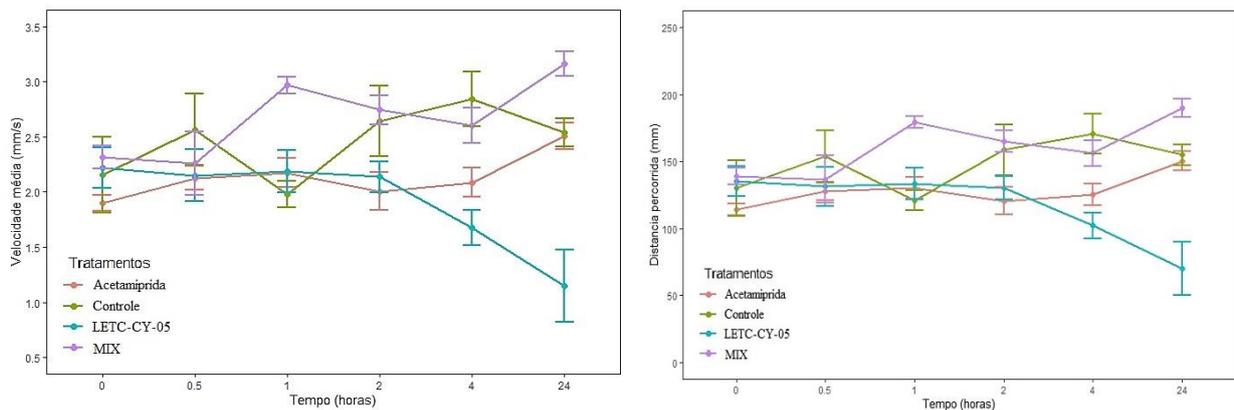
O crescimento populacional de cladóceros também pode ser afetado por pressões múltiplas. Inúmeros pesticidas demonstraram efeitos sobre a sobrevivência de *Daphnia spp.* e *M. micrura* (BOONTHAI; SOMPARN; NOLLER, 2011; KRISHNAN; CHOCKALINGAM, 1989; MALAGNOUX; CAPOWIEZ; RAULT, 2015; MORRISSEY *et al.*, 2015; PISA *et al.*, 2014; RASHID *et al.*, 2018). Com fertilizantes agrícolas, foi observada redução na população de *M. micrura* em até 6 dias de exposição seguida de uma recuperação promovida tanto pelo consumo de fitoplâncton quanto pelo aumento na reprodução sexuada, sugerindo a expressão de resistência dessa espécie em função das condições.(BONOU; SAINT-JEAN, 1998)

5.3 ENSAIOS COMPORTAMENTAIS

Ao longo das 24 horas de exposição, a velocidade média e a distância percorrida por indivíduos do controle aumentaram significativamente em 30 min, 2 e 4 horas quando comparadas ao tempo inicial (Figura 28). Já quando exposta a LETC-CY-05 foi observada redução nos parâmetros natatórios após 4 e 24 horas em relação ao controle, quando houve paralisia total de três indivíduos e diminuição de 41,04% e 54,84% na distância percorrida e velocidade em relação ao tempo inicial.

A velocidade e distância percorrida por *D. similis* em acetamiprida não apresentou diferença significativa para nenhum tempo em relação ao controle e foi superior à cianobactéria apenas em 4 e 24 horas. Porém quando a avaliada a mistura entre os dois agentes, houve um tamponamento do efeito da cianobactéria pelo pesticida, mas em 1 hora, a velocidade média aumentou 49,97% em relação ao tempo inicial.

Figura 28: Efeitos ocasionados por exposições unitárias e combinadas e LETC-CY-05 sobre velocidade média e distância percorrida de *D. similis*



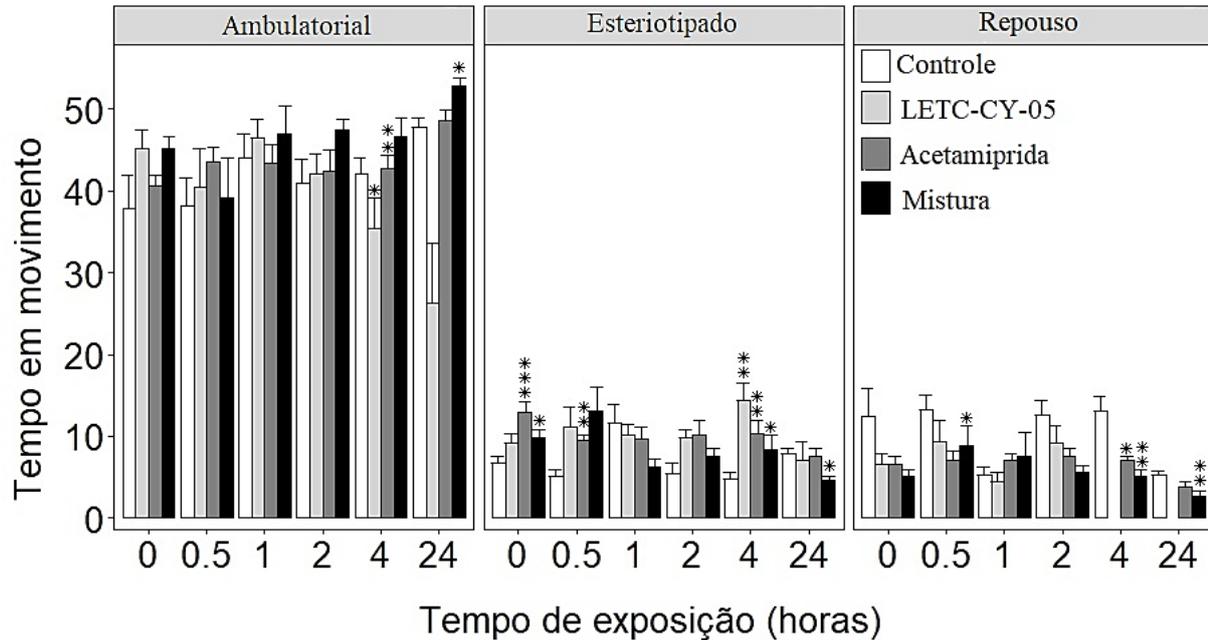
Nos primeiros 30 minutos de ensaio, todos os tratamentos aumentaram significativamente o tempo ambulatorial em relação ao controle, porém nos demais tempos não foram registradas alterações. Apenas em 24 horas, na mistura, foi registrado um aumento de 14,58% no tempo ambulatorial em relação ao tempo inicial (Figura 29).

Não foram observadas diferenças significativas no tempo de repouso entre o controle e os tratamentos nas primeiras duas horas de exposição (Figura 29). Em 4 horas, organismos expostos à acetamiprida e mistura apresentaram uma diminuição desse parâmetro em relação ao controle, mas esse padrão só foi mantido pela mistura em 24 horas. Já para LETC-CY-05, em 4 e 24 horas, 40% dos indivíduos apresentaram imobilidade total, provocando um acréscimo de 30,7 segundos no tempo médio de repouso.

Leves alterações no foco das imagens foram registradas na análise o que sugere uma tendência à natação vertical, movimento que, na natureza, ocorre fortemente associado às migrações diárias e à captura de alimento (DODSON *et al.*, 1997). Contudo, Ferrão-Filho *et al.* (2014), destacam que o maior tempo de repouso para microcrustáceos submetidos a CYRF-01 pode refletir a paralisia dos cladóceros devido a ação das STXs, que, devido ao bloqueio dos canais voltagem-dependentes de sódio, é capaz de levar à imobilização de cladóceros entre 0,5 e 3 horas de exposição (FERRÃO-FILHO, A. da S. *et al.*, 2010)

A natação estereotipada de *D. similis* demonstrou aumento em 4 horas de exposição tanto para a cianobactéria quanto para o pesticida e, em 24 horas sofreu redução associada ao aumento no tempo ambulatorial para organismos da mistura. Dodson *et al* (1995) associa que daphnídeos podem apresentar esse movimento associado à fuga em exposição a substâncias como carbaril. Ferrão-Filho e Silva (2020) salientam que *D. similis* pode, inicialmente, exibir um aumento de movimentação do pós-abdômen como tentativa de expulsar filamentos de cianobactérias, porém danos à natação seriam mais atrelados a ação de STXs sobre a movimentação das antenas.

Figura 29: Efeitos provocados por tratamentos unitários e combinados de LETC-CY-05 e acetamiprida sobre o comportamento natatório de *D. similis*.



Em ensaio agudo utilizando tratamentos com cepa de *Microcystis aeruginosa* (MIRF-1) e *C. raciborskii* (LETC-CY-05) isoladamente, houve baixa letalidade para *D. laevis* (Ibirité) e não registraram paralisia, enquanto *D. similis* e *Moina micrura* mostraram-se mais afetadas nesses tratamentos (Ferrão-Filho *et al.*, 2017). A mesma cepa com variações nos níveis de produção de STXs e NeoSTX foi utilizada por Restani e Fonseca (2014), que poderia ter influenciado nos efeitos sobre a mobilidade de *D. laevis*.

Também já foram definidos efeitos da nicotina, que pode induzir a malformações na segunda antena, carapaça e espinha da cauda de *D. magna* em exposições de até 1000 mg.L⁻¹ (CE₅₀ = 250.8 mg L⁻¹)(CHEN *et al.*, 2018), afetando na capacidade de natação dessa espécie. Sabe-se que o inseticida neonicotinóide acetamiprida pode diminuir os níveis de pigmentos – clorofila-a, ficocianinas e carotenóides – em cianobactérias como *Anabaena aequalis* (YASODHA; UMARAJAN; MALATHY, 2019) mas pouco se sabe sobre a interação desses materiais e dos efeitos que podem ser desencadeados em herbívoros.

Assim como ocorrido para a mistura no presente estudo, Zein *et al.* (2014) observaram que a nicotina a 256 mmol L⁻¹ provoca redução na atividade natatória de *D. pulex* após 20 minutos e que, posteriormente, os indivíduos tendem a se recuperar e percorrer distâncias maiores que o controle. Assim, apesar de exposição crônica e aguda a pesticidas como os organofosforados ocasionar efeitos neurológicos e neurocomportamentais persistentes, estes

não podem ser explicados apenas pela inibição da acetilcolinesterase (AChE), já que antagonistas dos receptores nicotínicos podem, inclusive, desempenhar algum papel protetor (MEHRANI; GOLMANESH, 2008).

6 CONCLUSÕES

Esse estudo, além de pioneiro, expressa que mesmo com as diferentes tolerâncias, espécies distintas podem expressar respostas tanto às exposições individuais quanto à misturas em níveis diversos. Os clones mostraram uma forte relação entre tolerância e as proporções dos agentes, o que alerta para uma complexidade de fatores e condições que podem promover a quebra de homeostase e o desencadeamento de uma série de alterações desde níveis fisiológicos até ecossistêmicos.

D. similis, cujo uso em bioensaios já é normatizado, teve a maior sensibilidade. Contudo, os resultados de *M. micrura* e *D. laevis* evidenciam a aplicabilidade de clones com ocorrência registrada em corpos hídricos tropicais como uma alternativa eficiente para a avaliação de impactos e possibilita a definição de valores máximos de emissão para o contaminante emergente, correspondentes às características tropicais.

Também fica evidente que a origem dos clones pode afetar sua tolerância e que interações entre os materiais de natureza distinta (um sendo um organismo vivo com potencial produção de metabólitos tóxicos e o outro um pesticida) podem infligir danos indiretos sobre a sobrevivência e ciclo de vida dos cladóceros.

Sobretudo, destaca-se a necessidade de mais estudos que avaliem as interações entre materiais de diferentes origens e matrizes – química, física e biológica – e o efeito combinado de agentes toxicantes, já que além de afetar organismos variados, a interação pode favorecer a intoxicação de espécies não alvo, afetando os ecossistemas e implicando em alterações das condições ideais para o bem-estar das populações animais e humanas.

7 RECOMENDAÇÕES FUTURAS

Com objetivo de aprofundar o conhecimento sobre a combinação de materiais e substâncias e seus efeitos a saúde ambiental e humana, recomendam-se mais investigações sobre efeitos subletais, incluindo análises moleculares e bioquímicas que antecedem a letalidade, bem como o estudo de interações sobre uma perspectiva de efeitos indiretos associados a transferência trófica. Além disso, são necessários, cada vez mais, estudos que tenham por objetivo determinar os efeitos da durabilidade das exposições sobre organismos para que seja possível avaliar os danos por exposições prolongada, através de outros biomarcadores –fisiológicos e moleculares, por exemplos.

REFERÊNCIAS

- ABELL, R. et al. **Freshwater Ecoregions of the World: A New Map of Biogeographic Units for Freshwater Biodiversity Conservation.** *BioScience*, [s.l.], v. 58, n° 5, p. 403–414, 2008. ISSN: 0006-3568, DOI: 10.1641/b580507.
- AGUILERA, A. et al. **The polyphasic analysis of two native Raphidiopsis isolates supports the unification of the genera Raphidiopsis and Cylindrospermopsis (Nostocales, Cyanobacteria).** *Phycologia*, [s.l.], v. 57, n° 2, p. 130–146, 2018. ISSN: 23302968, DOI: 10.2216/17-2.1.
- AI, Y.; LEE, S.; LEE, J. **Drinking water treatment residuals from cyanobacteria bloom-affected areas: Investigation of potential impact on agricultural land application.** *Science of the Total Environment*, [s.l.], v. 706, n° xxxx, p. 135756, 2020. ISSN: 18791026, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.135756.
- ALMEIDA, V. L. S. et al. **Zooplanktonic community of six reservoirs in northeast Brazil.** *Brazilian Journal of Biology*, [s.l.], v. 69, n° 1, p. 57–65, 2009. ISSN: 16784375, DOI: 10.1590/s1519-69842009000100007.
- ANDERSON, J. C.; DUBETZ, C.; PALACE, V. P. **Neonicotinoids in the Canadian aquatic environment: A literature review on current use products with a focus on fate, exposure, and biological effects.** *Science of the Total Environment*, [s.l.], v. 505, p. 409–422, 2015. ISSN: 18791026, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2014.09.090.
- ANDERSON, T. A. et al. **Effects of landuse and precipitation on pesticides and water quality in playa lakes of the southern high plains.** *Chemosphere*, [s.l.], v. 92, n° 1, p. 84–90, 2013. ISSN: 00456535, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2013.02.054.
- AQUEEL, M. A. et al. **Effect of plant nutrition on aphid size, prey consumption, and life history characteristics of green lacewing.** *Insect Science*, [s.l.], v. 21, n° 1, p. 74–82, 2014. ISSN: 16729609, DOI: 10.1111/1744-7917.12019.
- ARAUJO, G. S. et al. **Toxicity of lead and mancozeb differs in two monophyletic Daphnia species.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [s.l.], v. 178, n° February, p. 230–238, 2019. ISSN: 10902414, DOI: 10.1016/j.ecoenv.2019.03.095.
- AZEVEDO, S. M. F. O. et al. **Human intoxication by microcystins during renal dialysis treatment in Caruaru - Brazil.** *Toxicology*, [s.l.], v. 181–182, p. 441–446, 2002. ISSN: 0300483X, DOI: 10.1016/S0300-483X(02)00491-2.
- BAGRI, P.; JAIN, S. K. **Assessment of acetamiprid-induced genotoxic effects in bone marrow cells of Swiss albino male mice.** *Drug and Chemical Toxicology*, [s.l.], v. 42, n° 4, p. 357–363, 2019. ISSN: 15256014, DOI: 10.1080/01480545.2018.1429461.
- BALLOT, A. et al. **Cylindrospermopsin- And Deoxycylindrospermopsin-Producing Raphidiopsis raciborskii and Microcystin-Producing Microcystis spp- And Meiktila Lake, Myanmar.** *Toxins*, [s.l.], v. 12, n° 4, 2020. ISSN: 20726651, DOI: 10.3390/toxins12040232.
- BARBARA, G. S. et al. **Study of nicotinic acetylcholine receptors on cultured antennal lobe neurones from adult honeybee brains.** *Invertebrate Neuroscience*, [s.l.], v. 8, n° 1, p. 19–29, 2008. ISBN: 1015800700622, ISSN: 13542516, DOI: 10.1007/s10158-007-0062-2.
- BARTLETT, A. J. et al. **Acute and chronic toxicity of neonicotinoid and butenolide insecticides to the freshwater amphipod, Hyalella azteca.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [s.l.], v. 175, n° January, p. 215–223, 2019. ISSN: 10902414, DOI:

10.1016/j.ecoenv.2019.03.038.

BLACQUIÈRE, T. et al. **Neonicotinoids in bees: A review on concentrations, side-effects and risk assessment.** *Ecotoxicology*, [s.l.], v. 21, n° 4, p. 973–992, 2012. ISSN: 15733017, DOI: 10.1007/s10646-012-0863-x.

BONILLA, S. et al. **What drives the distribution of the bloom-forming cyanobacteria *Planktothrix agardhii* and *Cylindrospermopsis raciborskii*?** *FEMS Microbiology Ecology*, [s.l.], v. 79, n° 3, p. 594–607, 2012. ISSN: 01686496, DOI: 10.1111/j.1574-6941.2011.01242.x.

BONOU, C. A.; SAINT-JEAN, L. **The regulation mechanisms and yield of brackish water populations of *Moina micrura* reared in tanks.** *Aquaculture*, [s.l.], v. 160, n° 1–2, p. 69–79, 1998. ISSN: 00448486, DOI: 10.1016/S0044-8486(97)00224-X.

BOONTHAI, C.; SOMPARN, A.; NOLLER, B. **Using Zooplankton, *Moina Micrura Kurz* to Evaluate the Ecotoxicology of Pesticides Used in Paddy Fields of Thailand.** *Pesticides in the Modern World - Risks and Benefits*, [s.l.], 2011. DOI: 10.5772/18275.

BOUVY, M. et al. **Dynamics of a toxic cyanobacterial bloom (*Cylindrospermopsis raciborskii*) in a shallow reservoir in the semi-arid region of northeast Brazil.** *Aquatic Microbial Ecology*, [s.l.], v. 20, n° 3, p. 285–297, 1999. ISSN: 09483055, DOI: 10.3354/ame020285.

BOWNIK, A. ***Daphnia* swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: A review.** *Science of the Total Environment*, [s.l.], v. 601–602, p. 194–205, 2017. ISSN: 18791026, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.05.199.

BOWNIK, A.; PAWŁOCIK, M.; SOKOŁOWSKA, N. **Effects of neonicotinoid insecticide acetamiprid on swimming velocity, heart rate and thoracic limb movement of *Daphnia Magna*.** *Polish Journal of Natural Sciences*, [s.l.], v. 32, n° 3, p. 481–493, 2017. ISSN: 16439953.

BRÊDA-ALVES, F. et al. **Clethodim (herbicide) alters the growth and toxins content of *Microcystis aeruginosa* and *Raphidiopsis raciborskii*.** *Chemosphere*, [s.l.], v. 243, 2020. ISSN: 18791298, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.125318.

BROOKS, J. L.; DODSON, S. I. **Predation , Body Size , and Composition of Plankton The effect of a marine planktivore on lake plankton.** *Science*, [s.l.], v. 150, n° 3692, p. 28–35, 1965. ISBN: 0036-8075, ISSN: 0036-8075, 1095-9203, DOI: 10.1126/science.150.3692.28.

BRUNET, J. L.; BADIOU, A.; BELZUNCES, L. P. **In vivo metabolic fate of [14C]-acetamiprid in six biological compartments of the honeybee, *Apis mellifera* L.** *Pest Management Science*, [s.l.], v. 61, n° 8, p. 742–748, 2005. ISSN: 1526498X, DOI: 10.1002/ps.1046.

CARMICHAEL, W. W. et al. **Human fatalities form cyanobacteria: Chemical and biological evidence for cyanotoxins.** *Environmental Health Perspectives*, [s.l.], v. 109, n° 7, p. 663–668, 2001. ISSN: 00916765, DOI: 10.1289/ehp.01109663.

CARRIQUIRIBORDE, P. et al. **Aquatic risk assessment of pesticides in Latin America.** *Integrated Environmental Assessment and Management*, [s.l.], v. 10, n° 4, p. 539–542, 2014. ISSN: 15513793, DOI: 10.1002/ieam.1561.

CASTRO, D. et al. **The effect of temperature on growth and production of paralytic shellfish poisoning toxins by the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* C10.** *Toxicon*, [s.l.], v. 44, n° 5, p. 483–489, 2004. ISSN: 00410101, DOI: 10.1016/j.toxicon.2004.06.005.

CHEN, K. F. et al. **Detoxification of nicotine solution using Fe0-based processes: Toxicity evaluation by *Daphnia magna* neonate and embryo assays.** *Chemical Engineering Journal*,

[s.l.], v. 331, n° September 2017, p. 636–643, 2018. ISSN: 13858947, DOI: 10.1016/j.cej.2017.09.029.

CHIARELLO, M. et al. **Determinação de agrotóxicos na água e sedimentos por HPLC-HRMS e sua relação com o uso e ocupação do solo.** *Química Nova*, [s.l.], v. 40, n° 2, p. 158–165, 2017. ISSN: 16787064, DOI: 10.21577/0100-4042.20160180.

CHRISMAN, J. de R. et al. **Pesticide sales and adult male cancer mortality in Brazil.** *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, [s.l.], v. 212, n° 3, p. 310–321, 2009. ISSN: 14384639, DOI: 10.1016/j.ijheh.2008.07.006.

CIMINO, A. M. et al. **Effects of neonicotinoid pesticide exposure on human health: A systematic review.** *Environmental Health Perspectives*, [s.l.], v. 125, n° 2, p. 155–162, 2017. ISSN: 15529924, DOI: 10.1289/EHP515.

COSTA, C. R. et al. **A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação.** *Química Nova*, [s.l.], v. 31, n° 7, p. 1820–1830, 2008. ISSN: 01004042, DOI: 10.1590/S0100-40422008000700038.

COSTA, S. M. DA; S. FERRÃO-FILHO, A. DA; AZEVEDO, S. M. F. O. **Effects of saxitoxin- and non-saxitoxin-producing strains of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* on the fitness of temperate and tropical cladocerans.** *Harmful Algae*, [s.l.], v. 28, p. 55–63, 2013. ISSN: 15689883, DOI: 10.1016/j.hal.2013.05.017.

COX, P. A. et al. **Diverse taxa of cyanobacteria produce β -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [s.l.], v. 102, n° 14, p. 5074–5078, 2005. ISBN: 0501526102, ISSN: 00278424, DOI: 10.1073/pnas.0501526102.

COX, P. A.; BANACK, S. A.; MURCH, S. J. **Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, [s.l.], v. 100, n° 23, p. 13380–13383, 2003. ISSN: 00278424, DOI: 10.1073/pnas.2235808100.

DAO, T. S.; DO-HONG, L. C.; WIEGAND, C. **Chronic effects of cyanobacterial toxins on *Daphnia magna* and their offspring.** *Toxicon*, [s.l.], v. 55, n° 7, p. 1244–1254, 2010. ISSN: 00410101, DOI: 10.1016/j.toxicon.2010.01.014.

DENNIS, N.; TIEDE, K.; THOMPSON, H. **Repeated and multiple stress (exposure to pesticides) on aquatic organisms.** *EFSA Supporting Publications*, [s.l.], v. 9, n° 10, 2017. ISSN: 23978325, DOI: 10.2903/sp.efsa.2012.en-347.

DODSON, S. I. et al. **Individual swimming behavior of *Daphnia*: Effects of food, light and container size in four clones.** *Journal of Plankton Research*, [s.l.], v. 19, n° 10, p. 1537–1552, 1997. ISSN: 01427873, DOI: 10.1093/plankt/19.10.1537.

ELÍAS-GUTIÉRREZ, M. et al. **Who is *Moina micrura*? Redescription of one of the most confusing cladocerans from terra typica, based on integrative taxonomy.** *Limnetica*, [s.l.], v. 38, n° 1, p. 227–252, 2019. ISSN: 19891806, DOI: 10.23818/limn.38.18.

EWERE, E. E. et al. **Uptake, depuration and sublethal effects of the neonicotinoid, imidacloprid, exposure in Sydney rock oysters.** *Chemosphere*, [s.l.], v. 230, p. 1–13, 2019. ISSN: 18791298, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.05.045.

FASTNER, J. et al. ***Cylindrospermopsis* occurrence in two German lakes and preliminary assessment of toxicity and toxin production of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanobacteria) isolates.** *Toxicon*, [s.l.], v. 42, n° 3, p. 313–321, 2003. ISSN: 00410101, DOI: 10.1016/S0041-0101(03)00150-8.

FEIJOÓ, M. P. P. et al. **Análise Comportamental Apoiada em Vídeo Rastreamento.** [s.l.],

2019.

FERRÃO-FILHO, A. da S. et al. **A rapid bioassay for detecting saxitoxins using a *Daphnia* acute toxicity test.** *Environmental Pollution*, [s.l.], v. 158, n° 6, p. 2084–2093, 2010. ISSN: 02697491, DOI: 10.1016/j.envpol.2010.03.007.

_____. **Nutritional and toxicity constraints of phytoplankton from a Brazilian reservoir to the fitness of cladoceran species.** *Environmental Science and Pollution Research*, [s.l.], v. 26, n° 13, p. 12881–12893, 2019. ISSN: 16147499, DOI: 10.1007/s11356-019-04851-6.

FERRÃO-FILHO, A. da S.; SILVA, D. A. C. DA. **Saxitoxin-producing *Raphidiopsis raciborskii* (cyanobacteria) inhibits swimming and physiological parameters in *Daphnia similis*.** *Science of the Total Environment*, [s.l.], v. 706, n° xxxx, p. 135751, 2020. ISSN: 18791026, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.135751.

FERRÃO-FILHO, A. S. et al. **Biomonitoring of cyanotoxins in two tropical reservoirs by cladoceran toxicity bioassays.** [s.l.], v. 72, p. 479–489, 2009. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2008.02.002.

FERRÃO-FILHO, A. S. et al. **Effects of *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) on the swimming behavior of *Daphnia* (cladocera).** *Environmental Toxicology and Chemistry*, [s.l.], v. 33, n° 1, p. 223–229, 2014. ISSN: 07307268, DOI: 10.1002/etc.2420.

_____. **Can small-bodied *Daphnia* control *Raphidiopsis raciborskii* in eutrophic tropical lakes? A mesocosm experiment.** *Environmental Science and Pollution Research*, [s.l.], v. 27, n° 28, p. 35459–35473, 2020. ISBN: 1135602009737, ISSN: 16147499, DOI: 10.1007/s11356-020-09737-6.

FERRÃO-FILHO, Aloysio Da S.; KOZLOWSKY-SUZUKI, B. **Cyanotoxins: Bioaccumulation and effects on aquatic animals.** *Marine Drugs*, [s.l.], v. 9, n° 12, p. 2729–2772, 2011. ISSN: 16603397, DOI: 10.3390/md9122729.

FERRÃO-FILHO, Aloysio Da Silva. **Bioacumulação De Cianotoxinas E Seus Efeitos Em Organismos Aquáticos.** *Oecologia brasiliensis*, [s.l.], v. 13, n° 2, p. 272–312, 2009.

FLAHERTY, C. M.; DODSON, S. I. **Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth, and reproduction.** *Chemosphere*, [s.l.], v. 61, n° 2, p. 200–207, 2005. ISSN: 00456535, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.02.016.

FUNARI, E. et al. **Cyanobacteria blooms in water: Italian guidelines to assess and manage the risk associated to bathing and recreational activities.** *Science of the Total Environment*, [s.l.], v. 598, p. 867–880, 2017. ISSN: 18791026, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.03.232.

FURIHATA, S. et al. **Ecological risks of insecticide contamination in water and sediment around off-farm irrigated rice paddy fields.** *Environmental Pollution*, [s.l.], p. 628–638, 2019. ISSN: 18736424, DOI: 10.1016/j.envpol.2019.05.009.

GAO, J. et al. **Enantioselective toxic effects and environmental behavior of ethiprole and its metabolites against *Chlorella pyrenoidosa*.** *Environmental Pollution*, [s.l.], p. 757–765, 2019. ISSN: 18736424, DOI: 10.1016/j.envpol.2018.10.056.

GUEDEGBA, N. L. et al. **Comparative acute toxicity of two phytosanitary molecules, lambda-cyhalothrin and acetamiprid, on Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) juveniles.** *Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, [s.l.], v. 54, n° 7, p. 580–589, 2019. ISSN: 15324109, DOI: 10.1080/03601234.2019.1616986.

GUTIERREZ, M. F. et al. **Interactive effects of fish predation and sublethal insecticide concentrations on freshwater zooplankton communities.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [s.l.], v. 196, n° December 2019, p. 110497, 2020. ISSN: 10902414, DOI:

10.1016/j.ecoenv.2020.110497.

HAANDE, S. et al. **Genetic characterisation of *Cylindrospermopsis raciborskii* (Nostocales, Cyanobacteria) isolates from Africa and Europe.** *Harmful Algae*, [s.l.], v. 7, n° 5, p. 692–701, 2008. ISSN: 15689883, DOI: 10.1016/j.hal.2008.02.010.

HASAN, F. et al. **Ecotoxicity of neonicotinoids and diamides on population growth performance of *Zygogramma bicolorata* (Coleoptera: Chrysomelidae).** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [s.l.], v. 203, n° July, p. 110998, 2020. ISSN: 10902414, DOI: 10.1016/j.ecoenv.2020.110998.

HAVENS, K. E. et al. **Zooplankton-phytoplankton relationships in shallow subtropical versus temperate lakes Apopka (Florida, USA) and Trasimeno (Umbria, Italy).** *Hydrobiologia*, [s.l.], v. 628, n° 1, p. 165–175, 2009. ISSN: 15735117, DOI: 10.1007/s10750-009-9754-4.

HERRERA, N. A.; ECHEVERRI, L. F.; FERRÃO-FILHO, A. S. **Effects of phytoplankton extracts containing the toxin microcystin-LR on the survival and reproduction of cladocerans.** *Toxicon*, [s.l.], v. 95, p. 38–45, 2015. ISSN: 18793150, DOI: 10.1016/j.toxicon.2014.12.016.

HLADIK, M. L.; KOLPIN, D. W. **First national-scale reconnaissance of neonicotinoid insecticides in streams across the USA.** *Environmental Chemistry*, [s.l.], v. 13, n° 1, p. 12–20, 2016. ISSN: 14482517, DOI: 10.1071/EN15061.

HOOVER, R. S. et al. **Hoover2006.** [s.l.], v. 318, n° Wassmann 1998, p. 187–201, 2006.

HUANG, C. et al. **Carbon and nitrogen burial in a plateau lake during eutrophication and phytoplankton blooms.** *Science of the Total Environment*, [s.l.], v. 616–617, p. 296–304, 2018. ISSN: 18791026, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.320.

HULTBERG, M. et al. **Effect of microalgal treatments on pesticides in water.** *Environmental Technology (United Kingdom)*, [s.l.], v. 37, n° 7, p. 893–898, 2016. ISSN: 1479487X, DOI: 10.1080/09593330.2015.1089944.

HULTBERG, M.; BODIN, H. **Effects of fungal-assisted algal harvesting through biopellet formation on pesticides in water.** *Biodegradation*, [s.l.], v. 29, n° 6, p. 557–565, 2018. ISBN: 0123456789, ISSN: 15729729, DOI: 10.1007/s10532-018-9852-y.

IANCU, V. I. et al. **Occurrence of neonicotinoid residues in danube river and tributaries.** *Revista de Chimie*, [s.l.], v. 70, n° 1, p. 313–318, 2019. ISSN: 00347752, DOI: 10.37358/rc.19.1.6907.

IJOMONE, O. M.; NWOHA, P. U. **Nicotine inhibits hippocampal and striatal acetylcholinesterase activities, and demonstrates dual action on adult neuronal proliferation and maturation.** *Pathophysiology*, [s.l.], v. 22, n° 4, p. 231–239, 2015. ISSN: 1873149X, DOI: 10.1016/j.pathophys.2015.09.002.

IMAMURA, T. et al. **Two cases of acute poisoning with acetamiprid in humans.** *Clinical Toxicology*, [s.l.], v. 48, n° 8, p. 851–853, 2010. ISSN: 15569519, DOI: 10.3109/15563650.2010.517207.

IRONMENTA, E. N. V. **ADVANCES IN ENVIRONMENTAL SCIENCE 引言 湿地甲烷排放研究方法 Yavit t.** [s.l.], 1999.

IWASA, T. et al. **Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*.** *Crop Protection*, [s.l.], v. 23, n° 5, p. 371–378, 2004. ISSN: 02612194, DOI: 10.1016/j.cropro.2003.08.018.

JESUS GAFFNEY, V. DE et al. **Occurrence of pharmaceuticals in a water supply system**

and related human health risk assessment. *Water Research*, [s.l.], v. 72, p. 199–208, 2015. ISSN: 18792448, DOI: 10.1016/j.watres.2014.10.027.

JONIAK, T. et al. **Effects of eutrophication: Spatial limitation of photosynthetic active radiation in lakes with deep-water anoxia.** *International Multidisciplinary Scientific GeoConference Surveying Geology and Mining Ecology Management, SGEM*, [s.l.], v. 18, n° 3.1, p. 227–234, 2018. ISSN: 13142704, DOI: 10.5593/sgem2018/3.1/S12.030.

KÂ, S. et al. **Can tropical freshwater zooplankton graze efficiently on cyanobacteria?** *Hydrobiologia*, [s.l.], v. 679, n° 1, p. 119–138, 2012. ISSN: 00188158, DOI: 10.1007/s10750-011-0860-8.

KAGABU, S. **Discovery of Chloronicotinyl Insecticides.** *Nicotinoid Insecticides and the Nicotinic Acetylcholine Receptor*, [s.l.], p. 91–106, 1999. DOI: 10.1007/978-4-431-67933-2_4.

KNOWN, O. F.; DFP, I. N. (**DFP ; morphine ; prednisolone ; sodium channel blockers) lithium ; ketamine ; phenobarbital : lidocaine ; Pharmacologic ~ research on counteracting the toxicity of organophosphates has conventionally been directed toward blocking the action of acetylch.** [s.l.], v. 25, p. 307–312, 1985.

KRISHNAN, M.; CHOCKALINGAM, S. **Toxic and sublethal effects of endosulfan and carbaryl on growth and egg production of *Moina micrura kurz* (Cladocera: Moinidae).** *Environmental Pollution*, [s.l.], v. 56, n° 4, p. 319–326, 1989. ISSN: 02697491, DOI: 10.1016/0269-7491(89)90077-8.

KRULL, M. et al. **State of the art of Brazilian ecotoxicology.** *Integrated Environmental Assessment and Management*, [s.l.], v. 7, n° 4, p. 690–691, 2011. ISSN: 15513793, DOI: 10.1002/ieam.267.

LAMMOGLIA, S. K. et al. **Assessing human health risks from pesticide use in conventional and innovative cropping systems with the BROWSE model.** *Environment International*, [s.l.], v. 105, n° January, p. 66–78, 2017. ISSN: 18736750, DOI: 10.1016/j.envint.2017.04.012.

LEDREUX, A. et al. **Evidence for saxitoxins production by the cyanobacterium *Aphanizomenon gracile* in a French recreational water body.** *Harmful Algae*, [s.l.], v. 10, n° 1, p. 88–97, 2010. ISSN: 15689883, DOI: 10.1016/j.hal.2010.07.004.

LEFRANCQ, M. et al. **High frequency monitoring of pesticides in runoff water to improve understanding of their transport and environmental impacts.** *Science of the Total Environment*, [s.l.], v. 587–588, p. 75–86, 2017. ISSN: 18791026, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.02.022.

LEÓN-SILVA, S.; FERNÁNDEZ-LUQUEÑO, F.; LÓPEZ-VALDEZ, F. **Silver Nanoparticles (AgNP) in the Environment: a Review of Potential Risks on Human and Environmental Health.** *Water, Air, and Soil Pollution*, [s.l.], v. 227, n° 9, 2016. ISSN: 15732932, DOI: 10.1007/s11270-016-3022-9.

LI, J. et al. **Effects of butyl benzyl phthalate exposure on *Daphnia magna* growth, reproduction, embryonic development and transcriptomic responses.** *Journal of Hazardous Materials*, [s.l.], v. 404, n° PB, p. 124030, 2021. ISSN: 18733336, DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.124030.

LLEWELLYN, L. E. **Saxitoxin, a toxic marine natural product that targets a multitude of receptors.** *Natural Product Reports*, [s.l.], v. 23, n° 2, p. 200–222, 2006. ISSN: 02650568, DOI: 10.1039/b501296c.

LUO, T. et al. **Effects of lomefloxacin on survival, growth and reproduction of *Daphnia magna* under simulated sunlight radiation.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [s.l.],

- v. 166, n° September, p. 63–70, 2018. ISSN: 10902414, DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.09.067.
- MAHAI, G. et al. **Neonicotinoid insecticides in surface water from the central Yangtze River, China.** *Chemosphere*, [s.l.], v. 229, p. 452–460, 2019. ISSN: 18791298, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.05.040.
- MAIN, A. R. et al. **Correction: Widespread use and frequent detection of neonicotinoid insecticides in wetlands of Canada’s Prairie Pothole Region (PLoS ONE (2014) 9, 3 (e92821) DOI: 10.1371/journal.pone.0092821).** *PLoS ONE*, [s.l.], v. 9, n° 6, p. 101400, 2014. ISSN: 19326203, DOI: 10.1371/journal.pone.0101400.
- MALAGNOUX, L.; CAPOWIEZ, Y.; RAULT, M. **Impact of insecticide exposure on the predation activity of the European earwig *Forficula auricularia*.** [s.l.], p. 14116–14126, 2015. DOI: 10.1007/s11356-015-4520-9.
- MARTÍN-DÍAZ, M. L.; GAGNÉ, F.; BLAISE, C. **The use of biochemical responses to assess ecotoxicological effects of Pharmaceutical and Personal Care Products (PPCPs) after injection in the mussel *Elliptio complanata*.** *Environmental Toxicology and Pharmacology*, [s.l.], v. 28, n° 2, p. 237–242, 2009. ISSN: 13826689, DOI: 10.1016/j.etap.2009.04.009.
- MARTINE, G. **O lugar do espaço na equação.** [s.l.], n° 2006, p. 181–190, 2007.
- MATSUDA, K. et al. **NEON - TMX - Structures.** [s.l.], v. 22, n° 11, p. 573–580, 2001.
- MATSUMURA-TUNDISI, T. **Occurrence of species of the genus *Daphnia* in Brazil.** *Hydrobiologia*, [s.l.], v. 112, n° 3, p. 161–165, 1984. ISSN: 00188158, DOI: 10.1007/BF00008082.
- MCLAREN, I. A. **Effects of Temperature on Growth of Zooplankton, and the Adaptive Value of Vertical Migration.** *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, [s.l.], v. 20, n° 3, p. 685–727, 1963. ISSN: 0015-296X, DOI: 10.1139/f63-046.
- MEHRANI, H.; GOLMANESH, L. **Evaluation of nicotinic receptors agonists and antagonists against paraoxon exposed PC12 cells.** *Environmental Toxicology and Pharmacology*, [s.l.], v. 26, n° 1, p. 22–29, 2008. ISSN: 13826689, DOI: 10.1016/j.etap.2008.01.003.
- MILES, J. C. et al. **Correction: Effects of clothianidin on aquatic communities: Evaluating the impacts of lethal and sublethal exposure to neonicotinoids (PLoS ONE (2017) 12:3 (e0174171) DOI: 10.1371/journal.pone.0174171).** *PLoS ONE*, [s.l.], v. 13, n° 3, p. 1–24, 2018. ISBN: 1111111111, ISSN: 19326203, DOI: 10.1371/journal.pone.0194634.
- MILLER, G.; SPOOLMAN, S. **LIVING IN THE ENVIRONMENT: Concepts, Connections, and Solutions, 16e.** *Cengage learning*, [s.l.], 2009. ISBN: 9780324376005.
- MOLICA, R. et al. **Toxins in the freshwater cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* (Cyanophyceae) isolated from Tabocas reservoir in Caruaru, Brazil, including demonstration of a new saxitoxin analogue.** *Phycologia*, [s.l.], v. 41, n° 6, p. 606–611, 2002. ISSN: 00318884, DOI: 10.2216/i0031-8884-41-6-606.1.
- MOLICA, R.; AZEVEDO, S. **Ecofisiologia de cianobactérias produtoras de cianotoxinas.** *Oecologia Brasiliensis*, [s.l.], v. 13, n° 2, p. 229–246, 2009. ISSN: 19806442, DOI: 10.4257/oeco.2009.1302.02.
- MORRISSEY, C. A. et al. **Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates : A review.** *Environment International*, [s.l.], v. 74, p. 291–303, 2015. ISSN: 0160-4120, DOI: 10.1016/j.envint.2014.10.024.
- MURUGAN, N. **Egg production, development and growth in *Moina micrura* Kurz (1874) (Cladocera: Moinidae).** *Freshwater Biology*, [s.l.], v. 5, n° 3, p. 245–250, 1975. ISSN:

13652427, DOI: 10.1111/j.1365-2427.1975.tb00137.x.

MUTURI, E. J. et al. **Effect of pesticides on microbial communities in container aquatic habitats.** *Scientific Reports*, [s.l.], v. 7, n° February, p. 1–10, 2017. ISSN: 20452322, DOI: 10.1038/srep44565.

NYENJE, P. M. et al. **Eutrophication and nutrient release in urban areas of sub-Saharan Africa - A review.** *Science of the Total Environment*, [s.l.], v. 408, n° 3, p. 447–455, 2010. ISSN: 00489697, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2009.10.020.

OBERHAUS, L. et al. **Grazing of two toxic Planktothrix species by Daphnia pulicaria: Potential for bloom control and transfer of microcystins.** *Journal of Plankton Research*, [s.l.], v. 29, n° 10, p. 827–838, 2007. ISSN: 01427873, DOI: 10.1093/plankt/fbm062.

PANOSSO, R. et al. **CIANOBACTÉRIAS E CIANOTOXINAS EM RESERVATÓRIOS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE E O POTENCIAL CONTROLE DAS FLORAÇÕES PELA TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*).** *Oecologia Brasiliensis*, [s.l.], v. 11, n° 03, p. 433–449, 2007. ISSN: 19806442, DOI: 10.4257/oeco.2007.1103.12.

PARK, T. J. et al. **Noncompetitive inhibition by camphor of nicotinic acetylcholine receptors.** *Biochemical Pharmacology*, [s.l.], v. 61, n° 7, p. 787–793, 2001. ISSN: 00062952, DOI: 10.1016/S0006-2952(01)00547-0.

_____. **Inhibition of acetylcholine-mediated effects by borneol.** *Biochemical Pharmacology*, [s.l.], v. 65, n° 1, p. 83–90, 2003. ISSN: 00062952, DOI: 10.1016/S0006-2952(02)01444-2.

PEARSON, L. et al. **On the chemistry, toxicology and genetics of the cyanobacterial toxins, microcystin, nodularin, saxitoxin and cylindrospermopsin.** *Marine Drugs*. [s.l.]: [s.n.], 2010. v. 8, 1650–1680 p. ISBN: 6129385323, ISSN: 16603397, DOI: 10.3390/md8051650.

PEIRY, K. K. **Transboundary movement of hazardous waste and chemicals.** *The Practice of Shared Responsibility in International Law*, [s.l.], n° 249499, p. 936–961, 2017. ISBN: 9781316227480, DOI: 10.1017/9781316227480.036.

PEREIRA, M. F. A. et al. **Eficácia da mistura Acetamiprid + Fipronil, aplicados em tratamento de sementes de algodão, no controle de *Aphis gossypii* Glover (Hemiptera: Aphididae).** *BioAssay*, [s.l.], v. 6, n° 0, p. 1–4, 2011. DOI: 10.14295/ba.v6.0.27.

PETRUSEK, A. **Moina (Crustacea : Anomopoda , Moinidae) in the Czech Republic : a review.** [s.l.], n° May 1921, p. 213–220, 2002.

PISA, L. W. et al. **Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates.** *Environmental Science and Pollution Research*, [s.l.], v. 22, n° 1, p. 68–102, 2014. ISSN: 16147499, DOI: 10.1007/s11356-014-3471-x.

PROCTOR, E. A.; MOWREY, D. D.; DOKHOLYAN, N. V. **β -Methylamino-L-alanine substitution of serine in SOD1 suggests a direct role in ALS etiology.** *PLOS Computational Biology*, [s.l.], v. 15, n° 7, p. e1007225, 2019. ISBN: 1111111111, ISSN: 1553-7358, DOI: 10.1371/journal.pcbi.1007225.

RABY, M. et al. **Ecotoxicology and Environmental Safety Relative chronic sensitivity of neonicotinoid insecticides to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna*.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [s.l.], v. 163, n° March, p. 238–244, 2018. ISSN: 0147-6513, DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.07.086.

RASHID, H. et al. **Effects of imidacloprid on the ecology of sub-tropical freshwater.** [s.l.], v. 236, p. 432–441, 2018. DOI: 10.1016/j.envpol.2018.01.102.

- RESTANI, G.; FONSECA, A. **Effects of *Cylindrospermopsis raciborskii* strains (*Woloszynska* , 1912) Senayya & Subba Raju on the mobility of *Daphnia laevis* (*Cladocera* , *Daphniidae*).** [s.l.], v. 74, n° 1, p. 23–31, 2014.
- RIBEIRO, A. C. A. et al. **Resíduos de pesticidas em águas superficiais de área de nascente do rio São Lourenço-MT: Validação de método por extração em fase sólida e cromatografia líquida.** *Química Nova*, [s.l.], v. 36, n° 2, p. 284–290, 2013. ISSN: 01004042, DOI: 10.1590/S0100-40422013000200015.
- ROCHA, M. P. DA et al. **Tools for monitoring aquatic environments to identify anthropic effects.** *Environmental Monitoring and Assessment*, [s.l.], v. 190, n° 2, 2018. ISSN: 15732959, DOI: 10.1007/s10661-017-6440-2.
- RUEDA, E. et al. **Bioremediation of agricultural runoff and biopolymers production from cyanobacteria cultured in demonstrative full-scale photobioreactors.** *Process Safety and Environmental Protection*, [s.l.], v. 139, p. 241–250, 2020. ISSN: 09575820, DOI: 10.1016/j.psep.2020.03.035.
- S. FERRÃO-FILHO, A. DA et al. **Single and combined effects of microcystin- and saxitoxin-producing cyanobacteria on the fitness and antioxidant defenses of cladocerans.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, [s.l.], v. 36, n° 10, p. 2689–2697, 2017. ISSN: 15528618, DOI: 10.1002/etc.3819.
- SANYAL, D.; CHAKMA, D.; ALAM, S. **Persistence of a neonicotinoid insecticide, acetamiprid on chili (*Capsicum annum* L.).** *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, [s.l.], v. 81, n° 4, p. 365–368, 2008. ISSN: 00074861, DOI: 10.1007/s00128-008-9479-5.
- SARMA, S. S. S.; NANDINI, S.; GULATI, R. D. **Life history strategies of cladocerans: Comparisons of tropical and temperate taxa.** *Hydrobiologia*, [s.l.], v. 542, n° 1, p. 315–333, 2005. ISBN: 1075000432, ISSN: 00188158, DOI: 10.1007/s10750-004-3247-2.
- SARNELLE, O.; GUSTAFSSON, S.; HANSSON, L. A. **Effects of cyanobacteria on fitness components of the herbivore *Daphnia*.** *Journal of Plankton Research*, [s.l.], v. 32, n° 4, p. 471–477, 2010. ISSN: 01427873, DOI: 10.1093/plankt/fbp151.
- SARNELLE, O.; WILSON, A. E. **Local adaptation of *Daphnia pulex* to toxic cyanobacteria.** *Limnology and Oceanography*, [s.l.], v. 50, n° 5, p. 1565–1570, 2005. ISSN: 00243590, DOI: 10.4319/lo.2005.50.5.1565.
- SEYOUM, A. et al. **Perfluorinated alkyl substances impede growth, reproduction, lipid metabolism and lifespan in *Daphnia magna*.** *Science of the Total Environment*, [s.l.], v. 737, p. 139682, 2020. ISSN: 18791026, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.139682.
- SHI, J. et al. **Exposure to acetamiprid influences the development and survival ability of worker bees (*Apis mellifera* L.) from larvae to adults.** *Environmental Pollution*, [s.l.], v. 266, p. 115345, 2020. ISSN: 18736424, DOI: 10.1016/j.envpol.2020.115345.
- SILVA, M. R. L.; CANTERI, M. G.; LEITE JÚNIOR, R. P. **Inseticida neonicotinóide induz resistência ao cancro cítrico em laranja doce.** *Tropical Plant Pathology*, [s.l.], v. 37, n° 1, p. 65–75, 2012. ISSN: 19825676.
- SINGH, A. K. et al. **Distribution of cyanobacteria and their interactions with pesticides in paddy field: A comprehensive review.** *Journal of Environmental Management*, [s.l.], v. 224, n° May, p. 361–375, 2018. ISSN: 10958630, DOI: 10.1016/j.jenvman.2018.07.039.
- SJERPS, R. M. A. et al. **Occurrence of pesticides in Dutch drinking water sources.** *Chemosphere*, [s.l.], v. 235, p. 510–518, 2019. ISSN: 18791298, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.06.207.

- SOARES, M. C. S. et al. **Effects of the cyanobacterium *Cylindrospermopsis raciborskii* on feeding and life-history characteristics of the grazer *Daphnia magna*.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [s.l.], v. 72, n° 4, p. 1183–1189, 2009. ISSN: 01476513, DOI: 10.1016/j.ecoenv.2008.09.004.
- SOUSA, J. C. G. et al. **Monitoring of the 17 EU Watch List contaminants of emerging concern in the Ave and the Sousa Rivers.** *Science of the Total Environment*, [s.l.], v. 649, p. 1083–1095, 2019. ISSN: 18791026, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.08.309.
- STANLEY, D. A.; RAINE, N. E. **Chronic exposure to a neonicotinoid pesticide alters the interactions between bumblebees and wild plants.** *Functional Ecology*, [s.l.], v. 30, n° 7, p. 1132–1139, 2016. ISSN: 13652435, DOI: 10.1111/1365-2435.12644.
- STEINKEY, D. et al. **The effects of diltiazem on growth, reproduction, energy reserves, and calcium-dependent physiology in *Daphnia magna*.** *Chemosphere*, [s.l.], v. 232, p. 424–429, 2019. ISSN: 18791298, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.05.176.
- SVIRČEV, Z. et al. **Toxicology of microcystins with reference to cases of human intoxications and epidemiological investigations of exposures to cyanobacteria and cyanotoxins.** *Archives of Toxicology*, [s.l.], v. 91, n° 2, p. 621–650, 2017. ISSN: 14320738, DOI: 10.1007/s00204-016-1921-6.
- TANG, Y. et al. **Electrolyte and pH-sensitive amphiphilic alginate: Synthesis, self-assembly and controlled release of acetamiprid.** *RSC Advances*, [s.l.], v. 8, n° 56, p. 32193–32199, 2018. ISSN: 20462069, DOI: 10.1039/c8ra05503c.
- TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. **NEONICOTINOID INSECTICIDE TOXICOLOGY: Mechanisms of Selective Action.** *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, [s.l.], v. 45, n° 1, p. 247–268, 2005. ISSN: 0362-1642, DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930.
- TOMIZAWA, M.; LEE, D. L.; CASIDA, J. E. **Neonicotinoid insecticides: Molecular features conferring selectivity for insect versus mammalian nicotinic receptors.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, [s.l.], v. 48, n° 12, p. 6016–6024, 2000. ISSN: 00218561, DOI: 10.1021/jf000873c.
- TUCCI, A.; SANT’ANNA, C. L. ***Cylindrospermopsis raciborskii* (Woloszynska) Seenayya & Subba Raju (Cyanobacteria): variação semanal e relações com fatores ambientais em um reservatório eutrófico, São Paulo, SP, Brasil.** *Revista Brasileira de Botânica*, [s.l.], v. 26, n° 1, p. 97–112, 2003. DOI: 10.1590/s0100-84042003000100011.
- VANDENBERG, L. N. et al. **Hormones and endocrine-disrupting chemicals: Low-dose effects and nonmonotonic dose responses.** *Endocrine Reviews*, [s.l.], v. 33, n° 3, p. 378–455, 2012. ISSN: 0163769X, DOI: 10.1210/er.2011-1050.
- VEHOVSZKY et al. **Neonicotinoid insecticides inhibit cholinergic neurotransmission in a molluscan (*Lymnaea stagnalis*) nervous system.** *Aquatic Toxicology*, [s.l.], v. 167, p. 172–179, 2015. ISSN: 18791514, DOI: 10.1016/j.aquatox.2015.08.009.
- VICO, P. et al. **Biogeography of the cyanobacterium *Raphidiopsis* (*Cylindrospermopsis*) *raciborskii*: Integrating genomics, phylogenetic and toxicity data.** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, [s.l.], v. 148, n° September 2019, p. 106824, 2020. ISSN: 10959513, DOI: 10.1016/j.ympev.2020.106824.
- VO, T. M. C. et al. **Responses of a tropical micro-crustacean, *Daphnia lumholtzi*, upon exposures to dissolved toxins and living cells of cyanobacteria.** *Environmental Technology and Innovation*, [s.l.], v. 19, p. 100973, 2020. ISSN: 23521864, DOI: 10.1016/j.eti.2020.100973.

- WANG, P. et al. **Metabolite changes behind faster growth and less reproduction of *Daphnia similis* exposed to low-dose silver nanoparticles.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, [s.l.], v. 163, n° April, p. 266–273, 2018. ISSN: 10902414, DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.07.080.
- WESSLER, I.; KIRKPATRICK, C. J. **Acetylcholine beyond neurons: The non-neuronal cholinergic system in humans.** *British Journal of Pharmacology*, [s.l.], v. 154, n° 8, p. 1558–1571, 2008. ISSN: 00071188, DOI: 10.1038/bjp.2008.185.
- WESTRICK, J. A. et al. **A review of cyanobacteria and cyanotoxins removal/inactivation in drinking water treatment.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, [s.l.], v. 397, n° 5, p. 1705–1714, 2010. ISSN: 16182642, DOI: 10.1007/s00216-010-3709-5.
- WHITESIDE, M. et al. **Comparison of a score-based approach with risk-based ranking of in-use agricultural pesticides in Canada to aquatic receptors.** *Integrated environmental assessment and management*, [s.l.], v. 4, n° 2, p. 215–236, 2008. ISSN: 15513777, DOI: 10.1897/IEAM_2007-056.1.
- YASODHA, D. S.; UMARAJAN, K. M.; MALATHY, S. **Effect of acetamiprid on *Anabaena aequalis* Borge and *Oscillatoria salina* Biswas : A biochemical study.** [s.l.], v. 8, n° 6, p. 877–883, 2019.
- YEBRA, L.; HERNÁNDEZ-LEÓN, S. **Aminoacyl-tRNA synthetases activity as a growth index in zooplankton.** *Journal of Plankton Research*, [s.l.], v. 26, n° 3, p. 351–356, 2004. ISSN: 01427873, DOI: 10.1093/plankt/fbh028.
- YI, X. et al. **Occurrence and distribution of neonicotinoid insecticides in surface water and sediment of the Guangzhou section of the Pearl River, South China.** *Environmental Pollution*, [s.l.], v. 251, p. 892–900, 2019. ISSN: 18736424, DOI: 10.1016/j.envpol.2019.05.062.
- ZEIN, M. A. et al. **Optical bioassay for measuring sublethal toxicity of insecticides in *Daphnia pulex*.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, [s.l.], v. 33, n° 1, p. 144–151, 2014. ISSN: 07307268, DOI: 10.1002/etc.2404.
- ZHENG, S. et al. **Distribution and risk assessment of 82 pesticides in Jiulong River and estuary in South China.** *Chemosphere*, [s.l.], v. 144, p. 1177–1192, 2016. ISSN: 18791298, DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.09.050.