



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS DE ERECHIM**

CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA

LEILA CRISTINA BUGS

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CRÔNICA DO FUNGICIDA TEBUCONAZOLE
UTILIZANDO O ORGANISMO TESTE *Daphnia magna***

ERECHIM

2017

LEILA CRISTINA BUGS

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CRÔNICA DO FUNGICIDA TEBUCONAZOLE
UTILIZANDO O ORGANISMO TESTE *Daphnia magna***

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS –
Campus de Erechim, como parte das exigências para
obtenção do título de bacharel (a), na área de
Engenharia Ambiental e Sanitária.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Funghetto Fuzinato

ERECHIM

2017

PROGRAD/DBIB - Divisão de Bibliotecas

Bugs, Leila Cristina

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CRÔNICA DO FUNGICIDA
TEBUCONAZOLE UTILIZANDO O ORGANISMO TESTE *Daphnia magna*/
Leila Cristina Bugs. -- 2017.

35 f.:il.

Orientadora: Cristiane Funghetto Fuzinatto .
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Engenharia Ambiental e Sanitária , Erechim, RS , 2017.

1. Testes de toxicidade crônica. 2. *Daphnia magna*. 3.
Multigerações. 4. Tebuconazole. I. , Cristiane Funghetto
Fuzinatto, orient. II. Universidade Federal da Fronteira
Sul. III. Título.

LEILA CRISTINA BUGS

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CRÔNICA DO FUNGICIDA TEBUCONAZOLE
UTILIZANDO O ORGANISMO TESTE *Daphnia magna***

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS – Campus de Erechim, como parte das exigências para obtenção do título de Bacharela em Engenharia Ambiental e Sanitária.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Cristiane Funghetto Fuzinatto

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado em ____/____/____

Prof^ª. Dr^ª. Cristiane Funghetto Fuzinatto
UFFS - Erechim

Prof. Dr. Paulo Hartmann
UFFS – Erechim

Prof. Me. Marlon Luiz Neves da Silva
UFFS – Chapecó

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente, a Deus, pelo dom da vida, e por todas as bênçãos alcançadas.

À meus pais, Nelson Nestor Bugs, Vânia De Oliveira Bugs, a meu irmão Douglas Rafael Bugs e a meu namorado Rui Cristian Schweitzer por todo apoio, compreensão e afeto recebido nos momentos difíceis da vida.

À minha professora orientadora Cristiane Funghetto Fuzinato pela dedicação e paciência em me orientar neste trabalho, e por todo o conhecimento repassado.

À todas as meninas do grupo do laboratório: Ana Flávia, Andressa B., Andressa Z., Renata, Vanessa e em especial à minha amiga e parceira de pesquisa Patricia Mara Cupertini por todo companheirismo, ajuda e também pelos bons momentos que passamos juntas.

À Universidade Federal da Fronteira Sul, assim como todos os professores e funcionários que me auxiliaram no decorrer da graduação.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma maneira, contribuíram para realização deste trabalho.

RESUMO

A crescente utilização de agrotóxicos nas atividades agrícolas e o uso desmedido dessas substâncias podem provocar cada vez mais danos à saúde humana e ao meio ambiente, gerando assim a necessidade de estudar e entender o comportamento e as interações das mesmas com o ecossistema em que são dispersas. Desta forma o presente estudo tem por objetivo avaliar os efeitos de toxicidade crônica do fungicida Tebuconazole através dos parâmetros sobrevivência, reprodução, crescimento e morfologia do microcrustáceo *Daphnia magna*. Os testes de toxicidade crônica foram realizados de acordo com a NBR 13.373 (ABNT, 2017), onde os organismos foram expostos, pelo período de 21 dias, a diferentes concentrações do fungicida Tebuconazole (100 µg/L – 500 µg/L e 20 µg/L – 80 µg/L). Ainda foi avaliada a primeira geração dos organismos produzidos no teste crônico de maneira a identificar os possíveis efeitos de toxicidade entre multigerações. Para avaliar de forma mais completa as interações do fungicida Tebuconazole com a *D. magna* um teste de avaliação da recuperação da reprodução dos organismos expostos foi realizado. Neste teste os organismos expostos foram dispostos em meio M4 pelo período de 10 dias. Através dos testes de toxicidade crônica realizados nesta pesquisa pôde-se observar efeitos sobre a morfologia, reprodução e principalmente sobre a longevidade dos organismos expostos. Além destes efeitos pôde-se observar que a 1^o geração de neonatos provenientes de organismos parentais expostos adquiriram maior resistência ao fungicida Tebuconazole, sendo Concentração de Efeito Observado (CEO) para a longevidade igual à 20 µg/L para os organismos parentais, e igual a 80 µg/L para os organismos da 1^o geração. Observou-se ainda, que mesmo após 10 dias de permanência em meio de cultivo (M4), não foram observadas mudanças positivas referentes ao parâmetro reprodução, indicando assim a permanência dos efeitos causados pelo fungicida Tebuconazole. Pôde-se concluir, através dos resultados encontrados neste estudo, que o fungicida Tebuconazole tem a capacidade de provocar efeitos adversos de toxicidade sobre o microcrustáceo *D. magna*, destacando a importância de estudar os efeitos de substâncias químicas a longo prazo.

Palavras chave: Testes de toxicidade crônica, *Daphnia magna*, Multigerações, Tebuconazole.

ABSTRACT

The increasing agrochemicals use in agricultural activities and the excessive use of these substances can cause more damage to the human health and to the environment, creating the need to study and understand their behavior and their interactions with the ecosystem in which they are dispersed. In this way the present study aims to evaluate the effects of chronic toxicity of the fungicide Tebuconazole through the parameters survival, reproduction, growth and morphology of the microcrustacean *Daphnia magna*. The chronic toxicity tests were performed according to NBR 13.373 (ABNT, 2017), where the organisms were exposed for 21 days at different concentrations of the fungicide Tebuconazole (100 µg / L - 500 µg / L and 20 µg / L - 80 µg / L). The first generation of the organisms produced in the chronic test was also evaluated in order to identify the possible effects of toxicity among multigenerations. In order to identify the interactions of the fungicide Tebuconazole with *D. magna*, a test to evaluate the recovery of the reproduction of exposed organisms was carried out. In this test the exposed organisms were arranged in M4 medium for the period of 10 days after finish the chronic test. Through the chronic toxicity tests carried out in this research, effects on the morphology, reproduction and mainly on the longevity of the exposed organisms could be observed. In addition to these effects, it was observed that the first generation of neonates from exposed parental organisms acquired greater resistance to the fungicide Tebuconazole, with Observed Effect Concentration (CEO) for longevity equal to 20µg/L for parental organisms, and equal to 80 µg/L for the 1st generation organisms. It was also observed that even after 10 days of permanence in culture medium (M4), no positive changes were observed regarding the reproduction parameter, thus indicating the permanence of the effects caused by the fungicide Tebuconazole. It was concluded that the Tebuconazole fungicide has the capacity to cause adverse effects of toxicity on the microcrustacean *D. magna*, emphasizing the importance of studying the effects of chemical substances in the long term.

Key words: Chronic toxicity tests, *Daphnia magna*, multigenerations, Tebuconazole.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Microcrustáceo <i>D. magna</i>	16
Figura 2 - Teste crônico utilizando o microcrustáceo <i>D. magna</i> com a substância Tebuconazole.....	18
Figura 3 – Tempo médio (em dias) de sobrevivência do microcrustáceo <i>D. magna</i> exposto ao fungicida Tebuconazole.	21
Figura 4 - Média (em dias) para a ocorrência da primeira postura durante o teste de toxicidade crônica com <i>D. magna</i> exposta ao fungicida Tebuconazole.....	23
Figura 5 - Alterações morfológicas em <i>D. magna</i> expostas ao Tebuconazole.A: <i>D.magna</i> controle negativo. B e C: <i>D. magna</i> com redução de espinho apical (em destaque).....	24
Figura 6 - Média (em dias) para a ocorrência da primeira postura do teste de toxicidade crônica com a primeira geração de neonatos das <i>D. magna</i> expostas ao fungicida Tebuconazole.....	27
Figura 7 - Comparação do número médio de filhotes entre os períodos de exposição e recuperação ao fungicida Tebuconazole.	28

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Resultados do teste de toxicidade crônica preliminar com o fungicida Tebuconazole para o microcrustáceo <i>D. magna</i>	20
Quadro 2 - Resultados do teste de toxicidade crônica com o fungicida Tebuconazole para o microcrustáceo <i>D.magna</i>	22
Quadro 3 - Resultados do teste de toxicidade crônica com a primeira geração de neonatos das <i>D. magna</i> expostas ao fungicida Tebuconazole.	25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. MATERIAS E METODOS.....	16
2.1 <i>SUBSTÂNCIA AVALIADA</i>	16
2.2 <i>ORGANISMO - TESTE</i>	16
2.3 <i>CULTIVO DA Daphnia magna</i>	16
2.4 <i>TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA COM Daphnia magna</i>	17
2.5 <i>TESTE DE SENSIBILIDADE COM Daphnia magna</i>	19
2.6 <i>TESTE DE AVALIAÇÃO DE RECUPERAÇÃO DE REPRODUÇÃO COM D. MAGNA</i>	19
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	20
3.1 <i>TESTES DE TOXICIDADE CRÔNICA COM D. magna</i>	20
3.1.1 <i>Teste preliminar de toxicidade crônica com D. magna</i>	20
3.1.2. <i>Teste de toxicidade crônica com D. magna</i>	21
3.1.3 <i>Teste de toxicidade crônica com a primeira geração de neonatos das D. magna expostas</i>	25
3.2 <i>RECUPERAÇÃO DA REPRODUÇÃO DO TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA COM D.magna</i>	27
5. RECOMENDAÇÕES.....	30
REFERÊNCIAS	31
ANEXOS	34

1. INTRODUÇÃO

O Brasil alcançou em 2009 o topo do ranking mundial no quesito consumo de agrotóxicos, mesmo não sendo o principal produtor agrícola (JUDAI & ANTUNES, 2013). O fato de o país estar localizado em uma região tropical, onde o número de pragas é maior, faz com que o uso e a produção de defensivos agrícolas se tornem uma ferramenta fundamental (RIGOTTO, VASCONCELOS E ROCHA, 2014).

Segundo Judai e Antunes (2013) o uso desmedido dessas substâncias provocam vários danos à saúde humana. Entre eles estão os problemas pulmonares, dérmicos, cânceres, alterações visuais e auditivas, entre outros. Além de causarem inúmeros danos à fauna, flora, recursos hídricos, solo e ar quando entram em contato com o ambiente. (KRÜGER, 2009).

De acordo com o artigo 2º da Lei Federal nº 7.802 (BRASIL, 1989) agrotóxico é definido como:

Os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos. (BRASIL, 1989, p.1).

Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com testes realizados em laboratório, objetivando estabelecer um limite chamado dosagem letal de 50%, (DL_{50}), sendo esta, a quantidade suficiente para matar o organismo teste. A partir da resposta dos organismos expostos, os pesticidas podem ser classificados quanto a sua toxicidade em quatro classes definidas pela Agência Nacional de vigilância sanitária (ANVISA) e o Ministério da Saúde (MS), Brasil, 1992).

- Classe I: Rótulo Vermelho - Extremamente tóxicos;
- Classe II: Rótulo Amarelo - Altamente tóxicos;
- Classe III: Rótulo Azul - Medianamente tóxicos;
- Classe IV: Rótulo Verde - Pouco tóxicos.

De acordo com Savoy (2011) os agrotóxicos utilizados na agricultura, também são classificados de acordo com seu modo de ação no organismo alvo, em relação à estrutura química, de acordo com os efeitos provocados a saúde humana, sua toxicidade, entre outros. Sendo assim separados em inseticidas, fungicidas, herbicidas, raticidas, moluscicidas, nematocidas, acaricidas, desfolhantes e fumigantes (RODRIGUES, 2012).

Dentre os agrotóxicos destaca-se o Tebuconazole, o qual foi avaliado no presente trabalho. O Tebuconazole é um fungicida amplamente utilizado na agricultura em diversas culturas tais como de batata, cevada, feijão, cebola, maçã, uva e em lavouras de soja (SEHNEM, 2009). Os fungicidas são utilizados para o controle de fungos patogênicos, porém, podem erradicar ou afetar grande número de microrganismos que não eram vistos como alvo daquela substância (DA SILVEIRA et al., 2012).

O Tebuconazole é um fungicida sistêmico do grupo químico triazol, que apresenta fórmula molecular $C_{16}H_{22}N_3O$, possui o nome químico de ((RS)-1-p-chlorophenyl-4,4-dimethyl-1H-1,2,4-triazol-5-ylmethyl) pentan-3-ol), sendo registrado no Ministério da Agricultura e Pecuária sob nº 06203, portador do nome comercial RIVAL 200 EC. Enquadra-se na classe toxicológica I (Pesticidas extremamente tóxicos), em relação ao meio ambiente é classificado como classe II, considerado muito perigoso ao meio ambiente de acordo com informações provenientes da ficha de informação de segurança do produto químico (FISPQ, 2001). Já segundo a ANVISA (2005) o fungicida Tebuconazole é enquadrado na classe toxicológica IV, como pouco tóxico.

A toxicologia segundo Chasin e Lima (2010) é a ciência que examina e relata os efeitos nocivos aos organismos vivos, resultantes das interações destes com substâncias químicas. A toxicologia abrange uma vasta área do conhecimento e entre essas áreas destaca-se a ecotoxicologia, que segundo Filho e Magalhaes (2008) é definida como a ciência que avalia os efeitos nocivos de substâncias químicas ou naturais sobre os organismos vivos e as interações dos organismos com o ecossistema.

A ecotoxicologia busca estudar as mais diferentes formas de contaminação através do monitoramento de organismos submetidos a ensaios com a substância teste. Segundo Martins (2008) a toxicidade dos agentes químicos no meio aquático é avaliada por meio de testes de toxicidade, utilizando-se de organismos representativos presentes nesses ambientes.

A ecotoxicologia, por meio de testes, tem a capacidade de identificar efeitos ocasionados em organismos pelo contato ou ingestão de substâncias específicas, avaliando seu potencial tóxico quando disposta no meio ambiente. Desta maneira, estuda as ações tóxicas de substâncias químicas no ecossistema e a propensão de afetar morfologicamente os organismos vivos (BRILHANTE & CALDAS, 1999).

Os testes toxicológicos têm como objetivo descobrir se, e em qual grandeza, as substâncias químicas, são nocivas, e como e onde seus efeitos se manifestam. Revelam também, através de análises com matéria viva, efeitos agudos ou crônicos, produzidos por substâncias químicas (KNIE & LOPES, 2004).

Os testes agudos são realizados com o intuito de estipular o nível de toxicidade que uma amostra ambiental ou substância química apresenta sobre um determinado organismo, este é exposto a diferentes concentrações do poluente por um curto período de tempo. Os efeitos analisados variam de acordo com o organismo testado: mortalidade quando se trabalha com peixes; mobilidade e letalidade quando se trabalha com invertebrados; e crescimento quando se trabalha com algas. A duração do teste varia e pode ser de 24 – 96 horas. (BRENTANO, 2006).

Já os testes crônicos expõe o organismo-teste ao agente potencialmente tóxico a concentrações subletais durante parte de seu ciclo de vida, incluindo estágios sensíveis como juventude, crescimento, maturidade sexual e reprodução com o intuito de avaliar os possíveis efeitos adversos gerados sob o organismo teste após um longo tempo de exposição ao contaminante avaliado (BRENTANO, 2006).

Na atualidade, inúmeros países elaboraram e padronizaram testes toxicológicos utilizando organismos aquáticos (FUZINATTO, 2009). Exemplos de órgãos normativos internacionais são a OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) e a ISO (International Organization for Standardization) (KNIE & LOPES, 2004). No Brasil, os testes toxicológicos são normatizados pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e também pela Companhia Ambiental Do Estado De São Paulo (CETESB) (ARAGÃO & ARAÚJO, 2006).

A avaliação da toxicidade gera a necessidade da seleção de organismos-teste. Segundo Knie e Lopes (2004) alguns pontos devem ser levados em consideração no momento da escolha da espécie:

- Facilidade de reprodução;
- Facilidade de cultivo;
- Velocidade de crescimento e desenvolvimento;
- Disponibilidade no mercado;
- Facilidade de manipulação dos animais;
- Conhecimento da biologia da espécie.

Dentre os organismos utilizados, destaca-se a *Daphnia magna*, um microcrustáceo planctônico de água doce, com tamanho médio na fase adulta de 5 a 6 mm. A escolha por este organismo-teste se baseia basicamente nos seguintes critérios (KNIE & LOPES, 2004):

- Os descendentes são geneticamente idênticos, o que traz segurança quanto a uniformidade de respostas nos ensaios;

- O cultivo em laboratório sob condições controladas é fácil e sem grandes gastos financeiros.
- O manejo é simples, por conta do tamanho consideravelmente grande da espécie, em comparação com outros microcrustáceos;
- O organismo apresenta sensibilidade a uma ampla gama de agentes nocivos;
- A espécie se adequa testes estáticos, semi-estáticos ou de fluxo contínuo;
- O ciclo de vida e de reprodução é suficientemente curto, permitindo usar a espécie também em testes crônicos;

Segundo a NBR 12.713 (ABNT, 2016), *Daphnia magna*, 1820 (Cladocera, Crustacea), também conhecida comumente como “pulga d’água”. Atua como consumidor primário na cadeia alimentar aquática, alimentando-se por mecanismo de filtração de material orgânico particulado em suspensão, principalmente algas unicelulares. Organismos deste gênero se encontram em grande escala no hemisfério norte.

Em condições ambientais favoráveis, a *Daphnia magna* se reproduz por partenogênese, gerando populações quase inteiramente compostas por fêmeas. Quando existe alguma variação no ambiente como baixas temperaturas, alta densidade de indivíduos, escassez de alimento ou ainda interferências antrópicas, esses fatores podem estimular a produção de machos induzindo o aparecimento de ovos sexuais, chamados efípios. O surgimento de efípios se deve quando a espécie precisa se adaptar às condições extremas (FLOHR, 2007).

De acordo com Barnes (1977) *apud* Flohr (2007), na natureza os efípios podem resistir a condições extremas e dispersar-se a certas distâncias com o auxílio do vento ou de outros animais. Assim que as condições naturais forem apropriadas, estes ovos eclodem em poucos dias.

As condições ideais de trabalho destes organismos abrangem temperaturas variando em $20 \pm 2^\circ\text{C}$, pH entre 6,5 e 9,5 encontrando-se o pH ótimo entre 7,2 e 8,5, e os alimentos ideais para cultura são algas, leveduras e bactérias (CLARE, 2007).

O período médio de vida da *Daphnia magna* é de 40 dias para uma temperatura de 25°C , e de 56 dias para uma temperatura de 20°C . Normalmente, de 6 a 10 ovos são gerados por cada indivíduo. As adultas têm normalmente de 6 a 22 gestações. A gestação dura aproximadamente dois dias em condições ideais, mas em condições adversas ela pode durar mais de uma semana, a duração da gestação também aumenta com a idade do organismo (EPA, 2002).

Desta maneira, o presente estudo visa à avaliação da toxicidade do fungicida Tebuconazole e as possíveis adversidades que o mesmo pode causar no ecossistema afetando os organismos aquáticos, este estudo está focado nas interações do fungicida com o organismo teste *D. magna* e os possíveis efeitos causados nas gerações posteriores do organismo.

Este estudo de toxicidade visa atingir seu objetivo através do desenvolvimento das seguintes etapas:

- Identificar efeitos da exposição crônica a substância teste observando a longevidade;
- Observar os possíveis efeitos causados quanto à reprodução após a exposição crônica a substância teste;
- Identificar efeitos causados pela exposição crônica a substância teste observando o crescimento.
- Verificação da ocorrência de possíveis alterações morfológicas nos organismos após a exposição crônica a substância teste.
- Avaliação dos efeitos sobre a 1^o geração dos organismos expostos.
- Observar a reprodução dos organismos após finalização do teste crônico por um período de recuperação de 10 dias.

2. MATERIAS E METODOS

2.1 SUBSTÂNCIA AVALIADA

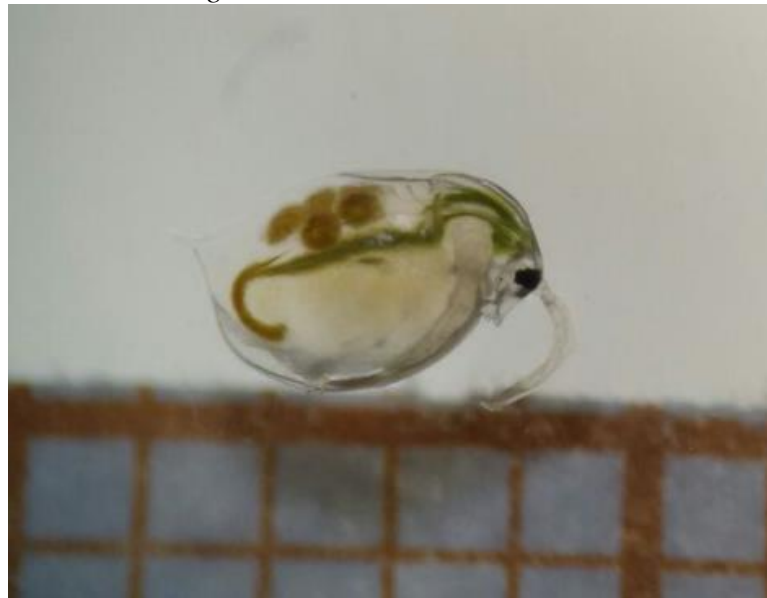
A substância química que foi avaliada neste estudo é um fungicida que possui como nome técnico Tebuconazole. A sua concentração de ingrediente inerte é de 800 g.L^{-1} , e a de ingrediente ativo 200 g.L^{-1} de acordo com informações obtidas em ficha técnica, o tempo de meia vida em dias para o solo é de 365 e para a água 28.

Neste trabalho foram realizados testes de toxicidade crônica utilizando como organismo teste o microcrustáceo *Daphnia magna*. Com base na bibliografia e a partir de testes preliminares foram definidas as concentrações que foram utilizadas nos testes de toxicidade.

2.2 ORGANISMO - TESTE

O microcrustáceo *D. magna* apresentado na Figura 1 foi utilizado como organismo teste, para o desenvolvimento dos testes toxicológicos com a substância teste fungicida Tebuconazole.

Figura 1 - Microcrustáceo *D. magna*.



Fonte: A autora, 2017.

2.3 CULTIVO DA *Daphnia magna*

O cultivo do microcrustáceo *D. magna* foi realizado no Laboratório de Ecologia e Conservação da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Erechim, seguindo as determinações da NBR 12.713 (ABNT, 2016). Os organismos foram mantidos em béqueres

de vidro de 2 L cada e em ambiente com temperatura controlada a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz.

Cada béquer foi preenchido com volume aproximado de 1250 mL de meio de cultura M4 (anexo A), conforme estabelecido pela NBR 12.713 (ABNT, 2016), onde foram mantidos até 30 indivíduos. O meio M4, foi renovado três vezes por semana, sendo os organismos transferidos para o novo meio e alimentados, o meio antigo restante foi descartado. A alimentação foi feita no mesmo dia da troca do meio e o alimento utilizado foi a microalga *Scenedesmus subspicatus*, inoculada em meio nutriente preparado no laboratório de acordo com a norma NBR 12.713 (ABNT, 2016).

Na troca, somente os indivíduos adultos foram transferidos para o novo recipiente, enquanto que os filhotes ou foram descartados em um recipiente com hipoclorito de sódio (NaClO) ou reservados para a utilização em testes do laboratório.

2.4 TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA COM *Daphnia magna*

A avaliação dos efeitos subletais de uma amostra foi realizada a partir de ensaios em que o período de exposição compreendeu parte significativa do ciclo de vida do organismo. No caso de testes crônicos com *Daphnia magna*, o período de tempo em que os organismos são submetidos à amostra foi de 21 dias. Para a execução do teste de toxicidade crônica além de expor os organismos ao fungicida Tebuconazole foi realizado também um controle negativo, somente com o meio M4, o meio de cultivo da *D. magna*, para validar os resultados (KNIE & LOPES, 2004).

A concentração efetiva, que causou a imobilidade em 50% dos organismos expostos, foi definida a partir do teste agudo. Estes testes têm duração de 48 horas, foram colocados em cada recipiente de teste 10 indivíduos jovens de *D. magna* e, ao final do teste, foi verificado quantos organismos se encontravam imóveis em cada diluição, o teste de toxicidade foi realizado de acordo com a NBR 12.713 (ABNT, 2016). As diluições utilizadas para o teste crônico foram selecionadas partir da $CE_{50,48h}$, uma vez que estas apresentariam efeitos não letais.

Os parâmetros analisados no ensaio crônico com *D. magna* foram: longevidade, reprodução e crescimento. Foi possível também observar alterações morfológicas. O parâmetro de reprodução constituiu em contar o número de filhotes por *D. magna* ao longo dos 21 dias, os filhotes produzidos pelos organismos que apresentaram mortalidade a partir do 18º de exposição ainda foram contabilizados neste parâmetro. O parâmetro de crescimento se dá a partir da medição do comprimento das *D. magna* sobreviventes após 21 dias de ensaio

através de lupa de 40x de aumento e régua milimetrada. Já o parâmetro de longevidade baseou-se na contagem de indivíduos adultos sobreviventes após 21 dias.

O teste com *D. magna* é uma adaptação da ISO 10.706 (2000) e da NBR 13.373 (ABNT, 2017). A disposição do teste crônico foi realizada em 10 béqueres por diluição, bem como no teste referente ao controle negativo. Houve a troca do meio e alimentação 3 vezes por semana, assim como o fotoperíodo de 16 horas de luz e a temperatura controlada a $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Em testes agudos previamente realizados a $CE_{50,48h}$ média encontrada foi de 631,4 $\mu\text{g/L}$. Com base nesses dados as concentrações investigadas no teste preliminar foram 100 $\mu\text{g/L}$, 200 $\mu\text{g/L}$, 300 $\mu\text{g/L}$, 400 $\mu\text{g/L}$ e 500 $\mu\text{g/L}$. O controle negativo foi realizado somente com meio M4, o meio de cultivo da *D. magna*. A Figura 2 apresenta a montagem do teste.

Figura 2 - Teste crônico utilizando o microcrustáceo *D. magna* com a substância Tebuconazole.



Fonte: A autora, 2017.

Posteriormente, com base na alta letalidade observada no teste de toxicidade preliminar, um novo teste de toxicidade foi realizado, utilizando as concentrações de 20 $\mu\text{g/L}$, 40 $\mu\text{g/L}$, 60 $\mu\text{g/L}$ e 80 $\mu\text{g/L}$.

A análise estatística dos dados foi realizada com o auxílio software GraphPad Prism versão 6.01. Utilizou-se o teste de Dunnett como ferramenta estatística. Este teste consiste na comparação múltipla entre os resultados obtidos no controle com as concentrações avaliadas, determinando assim a diferença significativa existente entre o controle e as diluições testadas com um nível de significância de 95% ($p < 0,05$), 99% ($p < 0,01$) e 99,9% ($p < 0,001$).

Os resultados para longevidade, reprodução e crescimento obtidos nas diferentes diluições foram comparados com os resultados obtidos no controle e desta forma foi possível a determinação da concentração de efeito não-observado (CENO) e a concentração de efeito observado (CEO).

Onde CEO (concentração de efeito observado) é a menor concentração que é possível observar efeitos. Através da determinação da CEO é possível obter a CENO (concentração de efeito não observado) que é a maior concentração onde não se observa efeito (ABNT, 2016).

2.5 TESTE DE SENSIBILIDADE COM *Daphnia magna*

Para validar os resultados dos testes de toxicidade aguda e crônica, foram realizados testes com uma substância de referência, para averiguar a sensibilidade dos organismos *D. magna* utilizados nos ensaios toxicológicos. A sensibilidade consistiu em realizar um teste expondo por 24 horas indivíduos jovens a diluições de uma solução de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) em meio ISO. A metodologia aplicada a este teste é a mesma do teste agudo, porém com concentrações pré-definidas, sendo 0,5; 0,7; 0,9; 1,1 e 1,3 mg/L. De acordo com a NBR 12.713 (2010) a faixa adequada da sensibilidade para *D. magna* está entre 0,6 e 1,7 mg/L.

2.6 TESTE DE AVALIAÇÃO DE RECUPERAÇÃO DE REPRODUÇÃO COM *D. magna*

No ambiente, a exposição a agentes contaminantes pode não ser contínua e permanente, por esse motivo Gabsi e Preuss (2014) destaca que entender os processos de recuperação de organismos, vem se destacando como um passo muito importante para a avaliação de riscos provocados pelos contaminantes dispostos no meio ambiente.

Para avaliar os efeitos causados pela exposição prolongada ao Tebuconazole um teste de recuperação da reprodução foi realizado com as *D. magna* sobreviventes do teste crônico previamente realizado. Portanto, no 21º dia de exposição (finalização do teste crônico) os organismos restantes foram transferidos para novos béqueres e dispostos em meio de cultivo (M4), onde permaneceram pelo prazo de 10 dias sobre as mesmas condições de cultivo (mesmo volume de alimentação e 3 trocas totais semanais). No 10º dia os organismos foram descartados e com base nas planilhas de controle foi avaliado o número de neonatos por concentração. Esta metodologia de exposição foi baseada em Sancho et al. (2016) com algumas adaptações.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 TESTES DE TOXICIDADE CRÔNICA COM *D. magna*

3.1.1 Teste preliminar de toxicidade crônica com *D. magna*

A sensibilidade ao dicromato de potássio verificada para os organismos utilizados nos testes de toxicidade crônica foi de 0,62 mg/L, o que indica que os organismos estavam aptos para serem utilizados na execução dos testes.

No teste de toxicidade crônica preliminar observou-se elevado nível de mortalidade dos indivíduos expostos antes de completar os 21 dias (duração do teste crônico). Os resultados do teste de toxicidade crônica preliminar estão demonstrados no Quadro 1:

Quadro 1 - Resultados do teste de toxicidade crônica preliminar com o fungicida Tebuconazole para o microcrustáceo *D. magna*.

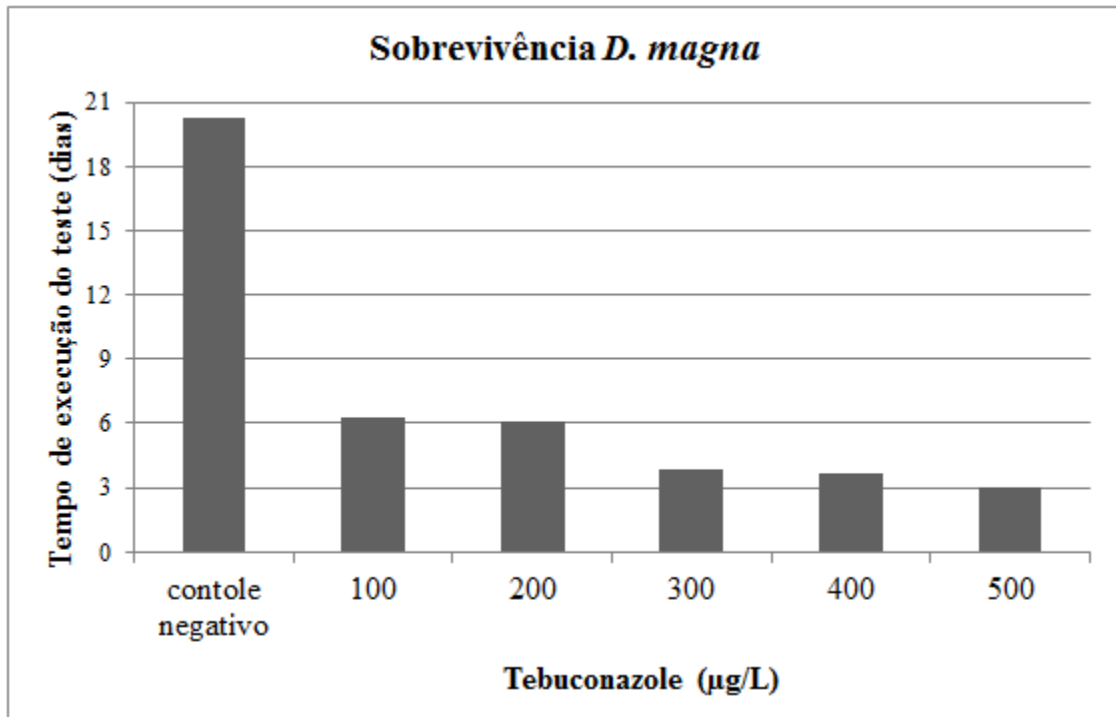
Amostra	Concentração (µg/L)	Longevidade: Sobreviventes (%) ¹	n	Reprodução: (nº total de filhotes / réplica) ¹	n	Crescimento (mm)	n
Tebuconazole (Teste preliminar de toxicidade crônica com <i>D. magna</i>)	Controle negativo	96.66	30	2.7 ± 1.30	23	2.9 ± 0.22	29
	100	3.33***	30	2.0 ± 0.00	2	2.8 ± 0.00	1
	200	0*	30	0*	0	0	0
	300	0*	30	0*	0	0	0
	400	0*	30	0*	0	0	0
	500	0*	30	0*	0	0	0
CEO (µg/L)		100		200		-	
CENO (µg/L)		-		100		-	

Fonte: A autora, 2017.

¹ A média para esta concentração é significativamente menor que a média verificada no controle considerando: *p<0,05; ***p<0,001.

A figura 3 apresenta o tempo médio (em dias) da sobrevivência dos organismos expostos ao fungicida Tebuconazole.

Figura 3 – Tempo médio (em dias) de sobrevivência do microcrustáceo *D. magna* exposto ao fungicida Tebuconazole.



Fonte: A autora, 2017.

Pode-se observar que as concentrações do fungicida Tebuconazole utilizadas neste teste (100 µg/L, 200 µg/L, 300 µg/L, 400 µg/L e 500 µg/L) apresentaram efeitos letais elevados, uma vez que a grande maioria dos organismos expostos não chegou a completar o 7º dia de exposição.

Através dos resultados observados na Figura 3 pôde-se constatar que as concentrações de 100 µg/L, 200 µg/L, 300 µg/L, 400 µg/L e 500 µg/L do fungicida Tebuconazole apresentaram efeitos de letalidade elevada, não permitindo a avaliação dos parâmetros de reprodução e crescimento. Desta forma, foram adotadas concentrações menores de 20 µg/L, 40 µg/L, 60 µg/L e 80 µg/L e um novo teste de toxicidade crônica foi executado.

3.1.2. Teste de toxicidade crônica com *D. magna*

O Quadro 2 apresenta os resultados obtidos no teste de toxicidade crônica com *D. magna* para os parâmetro correspondentes à longevidade, reprodução e ao crescimento dos microcrustáceos. As indicações com asteriscos são referentes aos resultados significativos obtidos através do teste estatístico de Dunnett, sendo ** 99% ($p < 0,01$) e ***99,9% ($p < 0,001$).

Quadro 2 - Resultados do teste de toxicidade crônica com o fungicida Tebuconazole para o microcrustáceo *D.magna*

Amostra	Concentração (µg/L)	Longevidade: Sobreviventes (%) ¹	n	Reprodução: (n° total de filhotes / réplica)	n	Crescimento (mm)	n
Tebuconazole (Teste de toxicidade crônica com <i>D. magna</i>)	Controle negativo	83.33	30	4.6 ± 2.20	28	2.9 ± 0.18	25
	20	16.66***	30	4.2 ± 2.10	18	2.7 ± 0.44	5
	40	30.00***	30	4.6 ± 2.80	25	2.9 ± 0.24	9
	60	36.66**	30	5.6 ± 2.50	18	2.9 ± 0.20	11
	80	20.00***	30	4.3 ± 2.00	14	2.8 ± 0.10	6
CEO (µg/L)		20		Sem Efeito		Sem efeito	
CENO (µg/L)		-		80		80	

Fonte: A autora, 2017.

¹ A média para esta concentração é significativamente menor que a média verificada no controle considerando: **p<0,01, ***p<0,001.

Ainda com base nos resultados do tratamento estatístico foi determinada a concentração de efeito observado (CEO) e a concentração de efeito não observado (CENO), ambas estão apresentadas no Quadro 2.

Para o parâmetro longevidade a análise estatística dos resultados revelou diferenças significativas, quando comparado ao controle negativo em todas as diluições. Desta forma verificou-se que a longevidade dos organismos foi demasiadamente afetada pelo fungicida Tebuconazole.

Através de verificação do comprimento de cada organismo (medida que considerou o tamanho do início da cabeça até o final da carapaça), foram obtidos os resultados para o parâmetro crescimento apresentados no quadro 2 .

Através da comparação dos comprimentos dos organismos expostos e não expostos ao Tebuconazole (Quadro 2), pode-se constatar que não foram observados efeitos significativos para nenhuma das concentrações avaliadas.

Para o parâmetro crescimento Qi et al. (2015) encontrou efeitos significativos nas concentrações acima de 50 µg/L para rac-tebuconazole e somente acima de 400 µg/L para S-tebuconazole. Ainda Sancho et al. (2016), observou efeitos a partir da concentração 410 µg/L de Tebuconazole.

Quando analisado o número de filhotes produzidos por postura e comparados com o controle negativo, os resultados obtidos nesta pesquisa não indicaram efeitos significativos. Dados da literatura indicam que o Tebuconazole é capaz de provocar a redução na

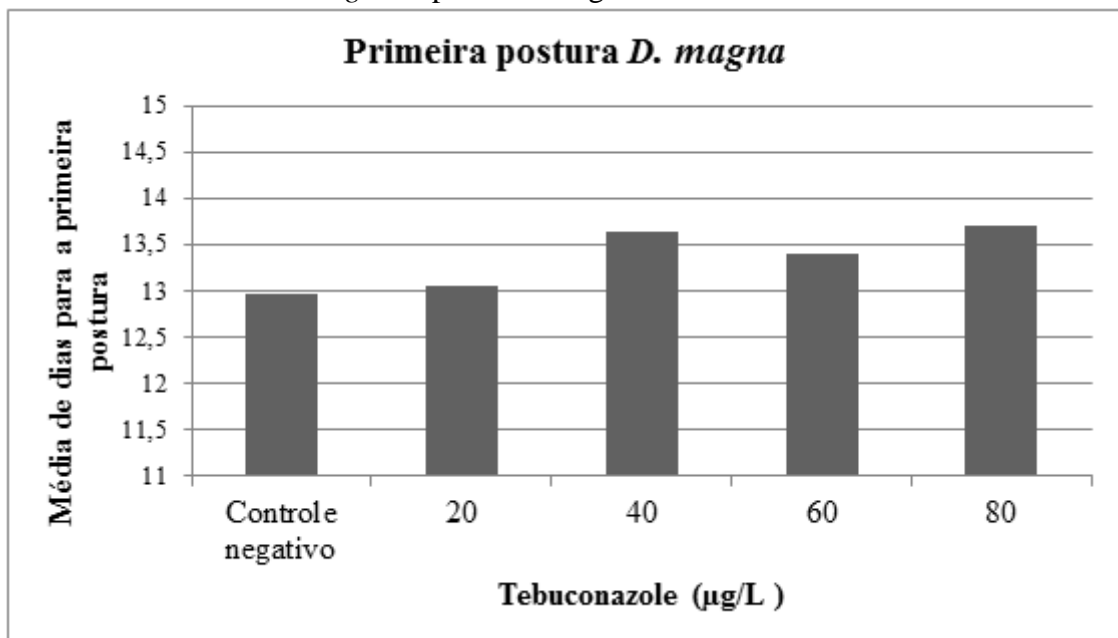
reprodução, como relatado por Qi et al. (2015), que observou em sua pesquisa que o número de neonatos por fêmea foi significativamente reduzido a partir da concentração de 100 µg/L de S-tebuconazole. Ainda Sancho et al. (2016) observou em seus experimentos efeitos significativos na reprodução somente a partir da concentração de 410 µg/L de Tebuconazole. Os mesmos efeitos não foram observados para esta pesquisa.

Nos testes de toxicidade crônica realizados no decorrer desta pesquisa, a maior concentração de Tebuconazole utilizada foi correspondente a 80 µg/L, pôde-se observar que outros autores (Qi et al. (2015) e Sancho et al. (2016)) verificaram resultados significativos para o parâmetro reprodução somente em concentrações superiores que as utilizadas nesta pesquisa.

No teste de toxicidade crônica preliminar, realizado nesta pesquisa, foram utilizadas concentrações superiores a 100 µg/L, porém os organismos não sobreviveram, indicando os altos níveis de letalidade do fungicida Tebuconazole, inviabilizando assim a avaliação de outros parâmetros analisados pelos autores acima citados.

Esta pesquisa avaliou ainda o tempo médio para a ocorrência da primeira postura dos organismos, como pode ser observado na figura 4.

Figura 4 - Média (em dias) para a ocorrência da primeira postura durante o teste de toxicidade crônica com *D. magna* exposta ao fungicida Tebuconazole.



Fonte: A autora, 2017.

Pôde ser observado quando comparado com o verificado no controle negativo, que o fungicida Tebuconazole ocasionou um retardo no início da reprodução do microcrustáceo *D. magna*. Sendo que para o controle negativo os organismos começaram a se reproduzir em média no 12,96° dia de exposição, e já para a concentração que apresentou efeito mais significativo a reprodução iniciou no 13,70° dia, a diferença média observada foi inferior a 1 dia. Outros autores (Qi et al. (2015) e Sancho et al. (2016)) observaram interferência do fungicida no número médio de dias para a ocorrência da primeira prole dos organismos expostos.

Sendo que Qi et al.(2015) em sua pesquisa utilizando Rac-tebuconazole verificou que o número médio de dias para a primeira postura foi de 8,4 dias para 200 µg/L, 10,8 dias para 300 µg/L e 14,2 dias para 400 µg/L de Rac-Tebuconazole, enquanto a média para o controle negativo havia sido de 7,3 dias.

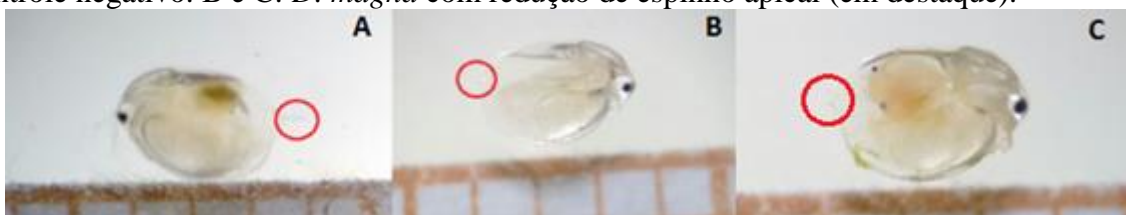
Já Sancho et al. (2016), observou que o início da reprodução foi significativamente aumentado ($p < 0,05$) de 7,8 dias no controle para 10,6 (36%) e 10,9 (40%) dias para as *D. magna* expostas a 1,14 mg/L (1140 µg/L) de Tebuconazole durante 14 e 21 dias de exposição, respectivamente.

Quando comparado os resultados obtidos nesta pesquisa com os averiguados pelos autores (Qi et al.(2015) e Sancho et al. (2016)), observa-se que a interferência sobre o início da reprodução obtida no teste de toxicidade crônica foi inferior à encontrada na literatura.

Ao final da exposição do teste crônico (21° dia) realizou-se a observação de cada indivíduo em lupa de 40x de aumento, onde procurou-se detectar a ocorrência de possíveis alterações morfológicas.

A figura 5-A apresenta algumas das alterações morfológicas observadas, onde (A) apresenta uma *D. magna* que foi mantida em meio de cultivo M4 (controle negativo), (B) e (C) demonstram as alterações morfológicas observadas em alguns dos organismos expostos ao Tebuconazole.

Figura 5 - Alterações morfológicas em *D. magna* expostas ao Tebuconazole. A: *D. magna* controle negativo. B e C: *D. magna* com redução de espinho apical (em destaque).



Fonte: A autora, 2017.

As *D. magna* apresentadas na Figura 5-B e 5-C foram expostas as concentrações de 40 µg/L e de 80 µg/L respectivamente, pode-se observar o encurtamento do espinho apical dos organismos expostos quando comparado ao controle (Figura 5-A).

Dos organismos observados em lupa de 40 vezes de aumento, 32,50 % dos indivíduos expostos ao fungicida Tebuconazole apresentaram encurtamento do espinho apical, enquanto que para o controle negativo apenas 6,9% dos organismos apresentou esta deformidade morfológica.

3.1.3 Teste de toxicidade crônica com a primeira geração de neonatos das *D. magna* expostas.

Com a 1º geração de neonatos provenientes do teste de toxicidade crônica, foi realizado um novo teste crônico, com a intenção de avaliar os efeitos multigeracionais do fungicida Tebuconazole. As condições e concentrações utilizadas para a execução deste teste foram similares ao teste de toxicidade crônica com os organismos parentais.

O quadro 3 apresenta os resultados para os parâmetros longevidade, reprodução e crescimento obtidos no teste de toxicidade crônica com a 1º geração dos organismos expostos ao fungicida Tebuconazole.

Quadro 3 - Resultados do teste de toxicidade crônica com a primeira geração de neonatos das *D. magna* expostas ao fungicida Tebuconazole.

Amostra	Concentração (µg/L)	Longevidade: Sobreviventes (%) ¹	n	Reprodução: (nº total de filhotes / réplica) ¹	n	Crescimento (mm)	n
Tebuconazole (Teste de toxicidade crônica / 1º geração dos organismos expostos)	Controle negativo	93.33	30	6.7 ± 2.60	29	3.1 ± 0.11	29
	20	86.66	30	5.3 ± 2.90	28	3.0 ± 0.10	26
	40	73.33	30	5.9 ± 3.80	20	3.0 ± 0.07	22
	60	73.33	30	6.2 ± 3.60	28	3.1 ± 0.13	22
	80	40.00***	30	4.6 ± 3.3*	17	3.0 ± 0.12	12
CEO (µg/L)		80		80		Sem Efeito	
CENO (µg/L)		60		60		80	

Fonte: A autora, 2017.

¹ A média para esta concentração é significativamente menor que a média verificada no controle considerando: *p<0,05, ***p<0,001.

Tanto a longevidade quanto a reprodução só apresentaram efeitos significativos na maior concentração de Tebuconazole avaliada referente a 80 µg/L. Já quando avaliado o parâmetro crescimento não foram observados efeitos significativos em nenhuma das concentrações analisadas.

Pode-se observar através da comparação com os resultados obtidos para a longevidade no teste de toxicidade crônica com os organismos parentais (quadro 2), que os organismos provenientes da 1ª geração, que também ficaram expostos às concentrações de 20 µg/L, 40 µg/L, 60 µg/L e 80 µg/L, demonstraram menores níveis de mortalidade, desta forma indicando maior resistência a exposição ao fungicida Tebuconazole.

Já quanto a análise referente ao parâmetro de reprodução da *D. magna* foi verificado efeito significativo na concentração de 80 µg/L, a maior concentração avaliada neste teste de toxicidade crônica.

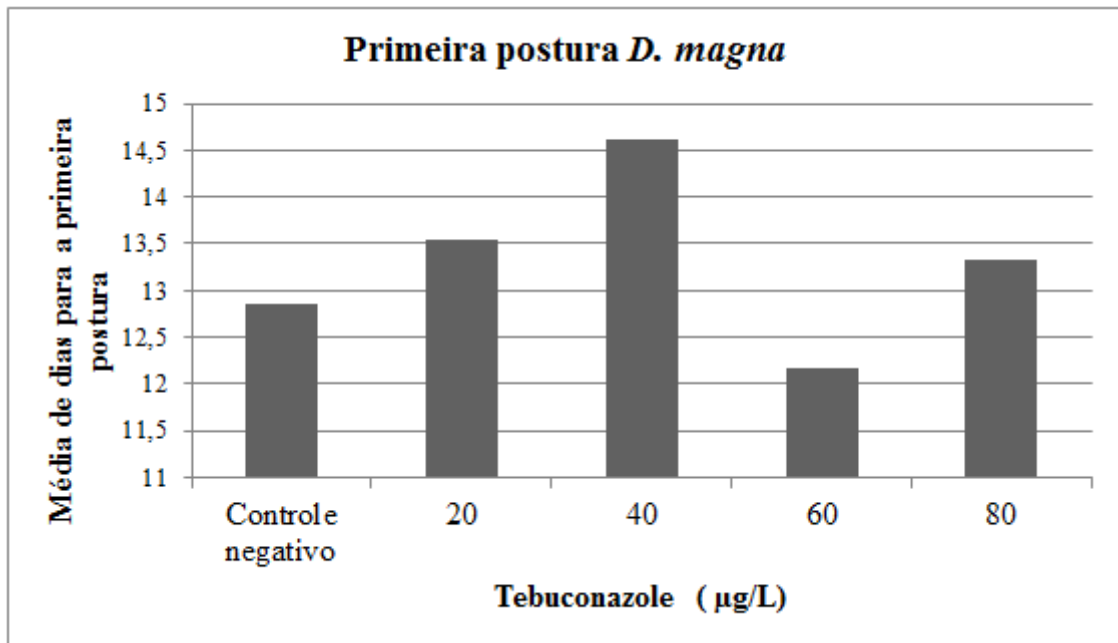
Porém o número médio total de filhotes produzidos foi superior ao observado no teste realizado com os organismos parentais (quadro 2), este resultado pode ser atribuído ao mecanismo de defesa do microcrustáceo *D. magna*, visto que os organismos foram expostos a concentrações elevadas de Tebuconazole, sentido assim a necessidade de aumentar a produção de filhotes .

Quanto ao parâmetro crescimento, pode ser observado no quadro 3 que não foram averiguadas diferenças estatísticas significativas para os neonatos provenientes de organismos já expostos ao fungicida Tebuconazole.

Porém quando esses resultados são comparados com os obtidos no teste de toxicidade crônica realizado com os organismos parentais (quadro 2), é possível observar que a primeira geração dos organismos expostos apresentou um aumento do comprimento médio.

Além disso, foi possível observar que o retardamento da primeira postura no teste de toxicidade crônica com os neonatos (figura 6), foi similar ao observado no teste com os organismos parentais (figura 4). Desta forma quando avaliado o tempo de ocorrência da primeira postura, pôde-se constatar que o comportamento verificado nos organismos parentais se manteve para os organismos da primeira geração.

Figura 6 - Média (em dias) para a ocorrência da primeira postura do teste de toxicidade crônica com a primeira geração de neonatos das *D. magna* expostas ao fungicida Tebuconazole.



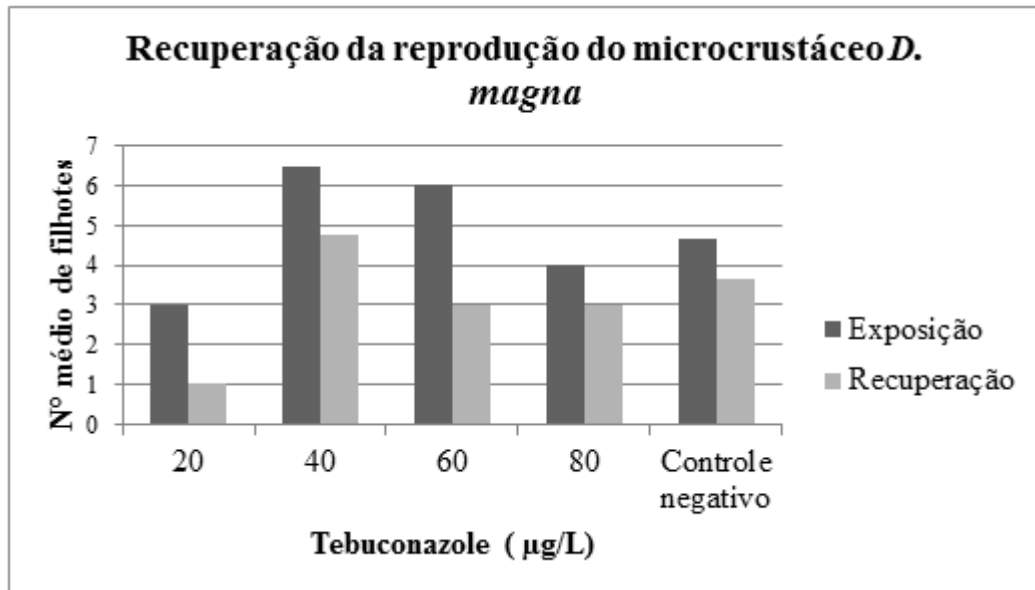
Fonte: A autora, 2017)

Com base nos resultados obtidos, observou-se que os organismos advindos de gerações já expostas adquiriram maior resistência a exposição ao agente químico, aumentando sua longevidade, o número médio de neonatos por fêmea, apresentando ainda comprimento médio maior que o dos organismos parentais.

3.2 RECUPERAÇÃO DA REPRODUÇÃO DO TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA COM *D.magna*.

A figura 7 apresenta o número médio de filhotes por concentração no decorrer da exposição (21 dias), e durante o período de avaliação da recuperação da reprodução (10 dias).

Figura 7 - Comparação do número médio de filhotes entre os períodos de exposição e recuperação ao fungicida Tebuconazole.



Fonte: A autora, 2017.

Pode-se observar (figura 7) uma redução da reprodução no período de recuperação, resultado esse que foi observado tanto para os organismos expostos ao Tebuconazole, quanto para os que permaneceram em meio M4 (controle negativo).

Sancho et al. (2016), que em sua pesquisa também utilizou o organismo teste *D. magna*, observou que após 14 dias de exposição ao Tebuconazole e posteriores 7 dias de recuperação em meio M4, não foi possível reestabelecer os valores normais de reprodução. Ele atribuiu esse resultado a necessidade de períodos maiores de recuperação.

Já Hayashi et al. (2008), que expôs os organismos a diferentes concentrações de Ibuprofeno utilizando a configuração de 10 dias de exposição X 10 dias em meio M4, observou que a reprodução da *D. magna* apresentou um aumento considerável durante o período de recuperação.

Pôde-se observar no teste realizado nesta pesquisa, que os efeitos causados pelo Tebuconazole sobre os organismos continuam mesmo após 10 dias de recuperação em meio M4. Já que a reprodução não se reestabeleceu e sim decaiu ainda mais.

Esses resultados podem ser atribuídos ao curto tempo de recuperação (21 X 10), já que com base na literatura consultada (Sancho et al. (2016)), o tempo de permanência em meio não tóxico é um fator determinante para o reestabelecimento dos valores normais de reprodução do microcrustáceo *D. magna*.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados destacam a importância de estudar os efeitos de substâncias químicas a longo prazo, uma vez que o fungicida Tebuconazole, substância estudada nesta pesquisa, apresentou efeitos significativos de toxicidade crônica para o microcrustáceo *D.magna* mesmo em concentrações inferiores ao VMP (valor máximo permitido), que conforme estabelecido pela Portaria 2.914/2011 para o Tebuconazole é de 180 µg/L.

Observaram-se efeitos significativos de toxicidade sobre os parâmetros reprodução, morfologia, afetando principalmente a longevidade dos organismos.

Pôde-se avaliar ainda que os neonatos provenientes de organismos expostos ao fungicida Tebuconazole se tornaram mais resistentes quanto ao parâmetro longevidade.

Através da realização do teste de recuperação da reprodução, pôde-se concluir que o período de 10 dias, em meio não tóxico, não foi suficiente para reestabelecer os parâmetros normais de reprodução do microcrustáceo *D. magna*.

5. RECOMENDAÇÕES

Com base nos testes realizados neste trabalho e nos resultados obtidos, recomenda-se para futuros estudos:

- Avaliar também a 2^o e 3^o geração de neonatos provenientes de organismos expostos ao fungicida Tebuconazole.

- Desenvolver metodologias para a realização de testes de recuperação da reprodução com o microcrustáceo *D. magna*.

- Desenvolver testes com concentrações inferiores a 20 µg/L de Tebuconazole, uma vez que nesta concentração já foram observados efeitos significativos sobre a longevidade e a morfologia do microcrustáceo *D. magna*.

REFERÊNCIAS

- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta Pública nº 67, de 15 de setembro de 2005**. Disponível em:< [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP\[11760-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP[11760-1-0].PDF)>. Acesso em: jan. 2017.
- ARAGÃO, M. A; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Org.) **Ecotoxicologia Aquática - princípios e aplicações**. São Carlos: RIMA, 2006.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12.713**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Cladocera, Crustacea): NBR 12.713. Rio de Janeiro. 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13.373**: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera): NBR 13.373. Rio de Janeiro. 2017
- BRASIL. **Lei nº 7802, de 11 de julho de 1989**. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília, 11 jul. 1989. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/LEIS/L7802.htm>. Acesso em: 26 ago. 2016.
- BRASIL. **Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011**. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso em: 15 out. 2016.
- BRASIL. **Portaria nº 3, de 16 de janeiro de 1992**. Ratifica os termos das diretrizes e orientações referentes a orientações de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos, e da outras providências. Diário Oficial. Brasília, DF. 4 de fev. 1992. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/fitossanidade/JOAQUIMGONCALVESMACHADONETO/port_%200392_anvisa_class_toxicol.pdf>. Acesso em: 16 Mar. 2017.
- BRENTANO, D. M. **Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com *Daphnia Magna*: Avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário**. 2006. 149f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Engenharia Sanitária Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Santa Catarina. 2006. Disponível em:<<https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/88729/230242.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em : 15 Ago 2016
- BRILHANTE, O. M.; CALDAS, L.Q.A. **Gestão e avaliação de risco em saúde ambiental**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 155 p. 1999. Disponível em:<<http://www.eadcopp.com.br/v01/pdf/Gestaoeavaliacaoderiscoemsaudeambiental.pdf>>. Acesso em: 10 Set 2016.

CHASIN, A. A. M.; LIMA, I. V. **Toxicologia para químicos**. Minicursos CRQ-IV, 2010. Disponível em: <http://www.crq4.org.br/sms/files/file/toxicologia_mini2010.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2016.

CLARE, J. **Daphnia: Na aquarist's guide**. Disponível em: <http://www.caudata.org/daphnia/>. Acesso em 17maio 2016.

DA SILVEIRA, S.B.; **Toxicidade do Tebuconazol em quatro espécies fitoplanctônicas dulcícolas subtropicais**. 2012. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em biologia de ambientes aquáticos continentais do Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Rio Grande, FURG, (SC) 2012. Disponível em: <<http://www.argo.furg.br/bdtd/0000010069.pdf>> Acesso em: 21 de agosto 2016.

EPA - U. S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms**. EPA-821-R-02-012. Office of Water. Washington DC, 2002.

FILHO, A. S. F.; MAGALHAES, D. P. **A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos**. O ecologia Brasiliensis Rio de Janeiro v.12, n.3, p. 355-381, 2008.

FISPQ. Ficha de informações de segurança de produtos químicos: **Tebuconazole RIVAL200 EC**, 2001.

FLOHR, L. **Ensaio toxicológicos com *Daphnia magna* como alternativa para classificação de resíduos sólidos industriais**. Dissertação de Mestrado. Florianópolis, 2007. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/90613/243670.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 3 set 2016.

FUZINATTO, C. F. **Avaliação da qualidade da água de rios localizados na ilha de Santa Catarina utilizando parâmetros toxicológicos e o índice de qualidade de água**. Dissertação de Mestrado. Florianópolis, 2009. Disponível em:<<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/92241>>. Acesso em 29 jul 2016.

GABSI F., PREUSS T.G. Modelling the impact of the ecological scenario on population recovery from chemical stress exposure: A case study using *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v. 156, p.221–229,2014.

HAYASHI, Y. et al. Reproduction recovery of the crustacean *Daphnia magna* after chronic exposure to ibuprofen. **Ecotoxicology**, v 17 , p. 246-251, 2008.

JUDAI, M. A.; ANTUNES, P. A. O. Toxicidade Em Trabalhadores Por Exposição a. **Saúde, Saneamento e Meio Ambiente**, v. 9, n. 11, p. 177–185, 2013. Disponível em: <http://www.amigosdanatureza.org.br/publicacoes/index.php/forum_ambiental/article/view/670/694> Acesso em 20 out 2016.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes Ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA/ GTZ, 2004.

KRÜGER, R.A. **Análise da toxicidade e da genotoxicidade de agrotóxicos utilizados na agricultura utilizando bioensaios com *Allium cepa***. 2009. 43 f. Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) - Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo.

MARTINS, D. V. R. "**Avaliação ecotoxicológica de efluentes de celulose branqueada de eucalipto ao longo do tratamento biológico.**" Dissertação (mestrado em Engenharia Civil) – Programa de pós-graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, (MG), 2008. Disponível em: <<http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/3709/texto%20completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>> Acesso em: 12 Ago 2016.

QI, S. Z. et al. Comparative toxicity of rac- and S-tebuconazole to *Daphnia magna*. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 50, n. 7, p. 456-462, 2015.

RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P.; ROCHA, M. M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. **Cad. Saúde Pública** 30: p.1-3, Rio de Janeiro, 2014.

RODRIGUES, L. **Estudo de agrotóxicos usados em agricultura através da técnica de difração de raio x.** 2012. 75 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Nuclear) – Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SANCHO, E. VILLARROEL M.J., FERRANDO M.D. Assessment of chronic effects of tebuconazole on survival, reproduction and growth of *Daphnia magna* after different exposure times. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 124 p.10-17, 2016.

SAVOY, V. L. T.. Classificação dos agrotóxicos. **Biológico**, São Paulo, v. 73, n. 1, p.91-92, jan. 2011.

SEHNEM, N.T. **Avaliação da capacidade de biodegradação de Tebuconazole por isolados microbianos de solos contaminados e de ambientes amazônicos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias). Porto Alegre, 2009.

ANEXOS

ANEXO A

Preparo do meio M4 – Cultivo da *Daphnia Magna*

A tabela abaixo é utilizada como base para o preparo do meio M4 em um volume de 5 L de água deionizada. O M4 deve ser mantido aerado, por no mínimo, 24 horas antes de realizar a manutenção dos lotes de cultivo.

SOLUÇÃO	VOLUME (mL)
Solução de Cloreto de Cálcio	16
Solução de Sulfato de Magnésio	4
Solução de Cloreto de Potássio	4
Solução de Bicarbonato de Sódio	4
Solução Catiônica	0,5
Solução Aniônica	2,5
Solução de Silicato	1
Solução de Ferro/EDTA	25
Solução de Fosfato	2,5
Solução Vitamínica	0,5

Fonte: NBR 12.713 (ABNT, 2016)

ANEXO B**Preparo do meio ISO – Cultivo da *Daphnia magna***

O quadro abaixo é utilizado como base para o preparo de meio ISO em um volume de 5 L de água deionizada. O ISO deve ser mantido aerado, por no mínimo, 24 horas antes de realizar a manutenção dos lotes de cultivo.

SOLUÇÃO	VOLUME (mL)
Solução de Cloreto de Cálcio	16
Solução de Sulfato de Magnésio	4
Solução de Cloreto de Potássio	4
Solução de Bicarbonato de Sódio	4

Fonte: NBR 12.713 (ABNT, 2016)