

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
Programa de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental**

Laís Conceição Menezes da Silva

**Efeito da aclimação termal sobre a sensibilidade e
toxicidade termo-dependente ao Glifosato para *Ceriodaphnia silvestrii***

São Carlos – SP

2017

LAÍS CONCEIÇÃO MENEZES DA SILVA

**Efeito da aclimação termal sobre a sensibilidade e
toxicidade termo-dependente ao Glifosato para *Ceriodaphnia silvestrii***

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos pré-requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia Ambiental

Orientador:

Prof. Dr. Luiz Felipe Mendes de Gusmão

São Carlos – SP

2017

FOLHA DE JULGAMENTO

27/JAN/2017

Candidata: LAÍS CONCEIÇÃO MENEZES DA SILVA

Título da dissertação: "Efeito da aclimatação termal sobre a sensibilidade e toxicidade termo-dependente ao Glifosato® para *Ceriodaphnia silvestrii*"

Data da defesa: 27.01.2017

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Dr. Luiz Felipe Mendes de Gusmão
(Orientador)
(Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP)

APROVADA


Profª. Drª. Maria da Graça Gama Melão
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar-São Carlos)

Aprovada
M.G. Melão

Drª. Bruna Horvath Vieira
(Pós-Doutorado/CNPq)

APROVADA
Bruna H. Vieira

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental:
Prof. Associado Frederico Fabio Mauad

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

S586e Silva, Laís Conceição Menezes da
Efeito da aclimação termal sobre a sensibilidade
e toxicidade termo-dependente ao Glifosato para
Ceriodaphnia silvestrii / Laís Conceição Menezes da
Silva; orientador Luiz Felipe Mendes de Gusmão. São
Carlos, 2017.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
e Área de Concentração em Ciências da Engenharia
Ambiental -- Escola de Engenharia de São Carlos da
Universidade de São Paulo, 2017.

1. Aclimação. 2. Cladocera. 3. Herbicida. 4.
Mudança Climática. 5. Temperatura. I. Título.

AGRADECIMENTOS

À CAPES pelo auxílio financeiro,

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental (EESC/USP),

Ao meu orientador Felipe Gusmão pelo apoio, incentivo, colaboração e amizade. Sem você não teria conseguido! Obrigada por tudo!

Ao Prof. Dr. Evaldo G. Espíndola por todo aprendizado, acolhimento e amizade.

Aos membros da banca de qualificação e aos membros da banca de defesa pelas contribuições.

Aos meus colegas de laboratório, pelo acolhimento e amizade.

Ao técnico Amândio por todo aprendizado e colaboração no dia-a-dia.

À Profa. Dra. Maria Olímpia de Oliveira Rezende e a técnica Maria Diva Landgraf pelo acolhimento no Laboratório de Química Ambiental (IQSC) e colaboração com as análises químicas.

À Lívia (velhinha) por todo carinho, paciência, conselhos, aprendizado, caronas infinitas e principalmente pela sua amizade que me ajudou a superar os desafios do mestrado e da vida. Muito obrigada! Amu tu!

À Marina que foi a primeira pessoa a me acolher nesta cidade e me apresentar a ecotoxicologia. Obrigada pela ajuda, paciência, compreensão e por me ajudar a lidar com meus piores momentos. Amo você!

As minhas queridas amigas Nathali, Priscilla, Daniela e Tamiris por todo apoio, incentivo e amizade. Por mesmo longe estarem sempre preocupadas e dispostas a me ajudar superar a distância e as dificuldades do mestrado. Amo vocês!

Ao Gustavo por toda ajuda, paciência e apoio nesses dois anos! Não teria tido tanta coragem de vir para São Carlos sem seu apoio! Muito obrigada!

A todos os meus professores de graduação que me incentivaram a crescer como aluna e chegar onde estou principalmente a Profa. Dra. Andrezza J. G. Andreotti. Serei eternamente grata!

E a todos que direta ou indiretamente tornaram essa jornada mais leve e contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

“Desistir... eu já pensei seriamente nisso, mas nunca me levei realmente a sério; é que tem mais chão nos meus olhos do que o cansaço nas minhas pernas, mais esperança nos meus passos, do que tristeza nos meus ombros, mais estrada no meu coração do que medo na minha cabeça”.

Geraldo Eustáquio de Souza

RESUMO

SILVA, L. C. M **Efeito da aclimação termal sobre a sensibilidade e toxicidade termo-dependente ao Glifosato para *Ceriodaphnia silvestrii***. 2017. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

Nos últimos anos é crescente o número de estudos que preocupam-se em compreender como as mudanças climáticas podem interferir no equilíbrio dos ecossistemas globais. Dentre as linhas de pesquisa destacam-se as avaliações de toxicidade química termo-dependente (TQTD) já que uma das principais previsões é o aumento da temperatura global. Esta variável ambiental por si só, pode influenciar processos biológicos essenciais de organismos aquáticos ectotérmicos modificando a sensibilidade frente ao estresse ambiental. No entanto, não se deve subestimar a capacidade dos organismos a lidar com condições ambientais adversas, por isso, estudos atuais estão considerando aspectos de aclimação e adaptação a cenários desfavoráveis. A partir deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar o efeito da aclimação na toxicidade química termo-dependente para uma substância de referência (NaCl) e um herbicida (AKB[®]) que tem como princípio ativo o Glifosato, substância mais utilizada em agroquímicos no país. O organismo-teste utilizado foi o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, organismo padronizado para testes ecotoxicológicos e que possui papel chave na cadeia trófica e ciclo de energia do sistema. Os experimentos foram realizados combinando a metodologia de testes padronizados utilizando três temperaturas (20°C, 25°C e 30°C). A aclimação foi avaliada através da exposição direta e parental a condições diferenciadas de temperatura. O *endpoint* foi a imobilidade dos organismos, sendo que a toxicidade e os efeitos da aclimação foram analisados no programa R 3.3.2. Os resultados obtidos demonstraram um efeito significativo da temperatura na toxicidade de NaCl e do herbicida AKB[®] para *Ceriodaphnia silvestrii*. A tendência geral observada foi de TQTD positiva, com exceção da temperatura de origem 25°C nos testes com o herbicida. A aclimação promoveu diferenças tanto na toxicidade como na distribuição da sensibilidade dos organismos, evidenciando a importância de incorporá-la na avaliação da toxicidade termo-dependente de xenobióticos.

Palavras-chave: Aclimação. Cladocera. Herbicida. Mudança Climática. Temperatura.

ABSTRACT

SILVA, L. C. M. **The effect of thermal acclimation on the sensitivity and temperature-dependent toxicity of Glyphosate to *Ceriodaphnia silvestrii*.** 2017. Dissertation (MSc) – School of Engineering of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2017.

In recent years there has been a growing number of studies that are concerned with understanding how climate change can interfere with the balance of global ecosystems. Among the lines of research are the evaluations of temperature-dependent chemical toxicity (TDCT), since one of the main predictions is the increase in global temperature. This environmental variable alone can influence the essential biological processes of aquatic ectothermic organisms by modifying the sensitivity to environmental stress. However, the ability of organisms to deal with adverse environmental conditions should not be underestimated, so current studies are considering aspects of acclimation and adaptation to unfavorable scenarios. The objective of this study was to evaluate the effect of acclimation on the temperature-dependent chemical toxicity of a reference substance (NaCl) and an herbicide (AKB[®]) which has as its active ingredient glyphosate, the most used substance in agrochemicals in the country. The organism used was the cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*, standardized organism for ecotoxicological tests and which has key role in the trophic chain and energy cycle of the system. The experiments were performed by combining the standardized test methodology using three temperatures (20°C, 25°C and 30°C). The acclimation was evaluated through direct and parental exposure to different temperature conditions. The endpoint was the immobility of the organisms, and the toxicity and effects of acclimation were analyzed in software R 3.3.2. The results showed a significant effect of temperature on the toxicity of NaCl and the herbicide AKB[®] for *Ceriodaphnia silvestrii*. The overall trend observed was positive TDCT, except for the 25°C source temperature in the tests with the herbicide. The acclimation promoted differences in the toxicity and the distribution of the sensitivity of the organisms, evidencing the importance of incorporating it in the evaluation of the temperature-dependent toxicity of xenobiotics.

Keywords: Acclimation. Cladocera. Climate Change. Herbicide. Temperature.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	25
Figura 2 – Delineamento experimental para avaliação do efeito da aclimação reversível	27
Figura 3 – Delineamento experimental para avaliação do efeito da aclimação desenvolvimental.....	28
Figura 4 – Relação entre mortalidade e concentração de NaCl para organismos de cada temperatura de origem quando transferidos para cada temperatura de destino.....	36
Figura 5 – Relação entre mortalidade de <i>C. silvestrii</i> e concentração de NaCl em cada temperatura de destino para organismos provenientes de diferentes temperaturas.....	37
Figura 6 – Comparação das concentrações de efeito (CE_{25} , CE_{50} e CE_{75}) em três diferentes temperaturas de destino para organismos provenientes de três temperaturas de origem diferentes.	38
Figura 7 – Comparação das concentrações de efeito (CE_{25} , CE_{50} e CE_{75}) estimadas em três temperaturas de destino para organismos de três diferentes temperaturas de origem.	39
Figura 8 – Aspecto geral dos testes realizados com o herbicida AKB [®]	51
Figura 9 – Relação entre mortalidade e concentração de Glifosato para organismos de cada temperatura de origem quando transferidos para cada temperatura de destino.	57
Figura 10 – Relação entre mortalidade e concentração de Glifosato em cada temperatura de destino para organismos provenientes de diferentes temperaturas.....	58
Figura 11 – Comparação das concentrações de efeito (CE_{25} , CE_{50} e CE_{75}) em três diferentes temperaturas de destino para organismos provenientes de três temperaturas de origem diferentes.	59
Figura 12 – Comparação das concentrações de efeito (CE_{25} , CE_{50} e CE_{75}) estimadas em três temperaturas de destino para organismos de três diferentes temperaturas de origem.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação entre temperatura e toxicidade para organismos de ambientes aquáticos.....	16
Tabela 2 – Parâmetros estimados dos modelos gerados para cada combinação de temperatura de origem e destino.....	31
Tabela 3 – Razões das estimativas de e (CE_{50}) entre as três temperaturas de destino para organismos provenientes de cada temperatura de origem.....	34
Tabela 4 – Razões das estimativas de e (CE_{50}) entre as três temperaturas de origem em cada temperatura de destino.....	35
Tabela 5 – Parâmetros estimados dos modelos gerados para cada combinação de temperatura de origem e destino.....	53
Tabela 6 – Razões das estimativas de e (CE_{50}) entre as três temperaturas de destino para organismos provenientes de cada temperatura de origem.....	56
Tabela 7 – Razões das estimativas de e (CE_{50}) entre as três temperaturas de origem em cada temperatura de destino.....	56

SUMÁRIO

Capítulo I A Problemática das Mudanças Climáticas Globais.....	13
1. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
1.1. Mudanças climáticas e o uso de pesticidas	13
1.2. Variáveis ambientais e toxicidade termo-dependente	14
1.3. Aclimação e adaptação em um cenário de mudanças globais	18
1.4. Novas perspectivas para a ecotoxicologia	19
Capítulo II Avaliação do efeito da aclimação sobre a toxicidade termo-dependente do NaCl para o cladóceros <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	22
1. INTRODUÇÃO	23
Objetivo específico	24
2. MATERIAIS E MÉTODOS	25
2.1. Cultivo dos organismos-teste.....	25
2.2. Testes de Sensibilidade	25
2.2.1. Efeito da aclimação reversível sobre a sensibilidade termo-dependente.....	26
2.2.2. Efeito da aclimação desenvolvimental sobre a sensibilidade termo-dependente.....	27
2.3. Análise de dados	28
2.3.1. Ajustamento das curvas dose-resposta	28
2.3.2. Estimativa das concentrações de efeito	29
2.3.3. Comparação das concentrações de efeito	29
3. RESULTADOS	31
3.1. Ajustamento dos modelos	31
3.2. Comparação das concentrações de efeito	32
3.3. Razão das concentrações de efeito.....	33
4. DISCUSSÃO.....	40
4.1. Toxicidade termo-dependente de NaCl para <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	40
4.2. Efeito da aclimação desenvolvimental sobre a toxicidade de NaCl	42

5. CONCLUSÕES.....	45
Capítulo III Avaliação do efeito da aclimação sobre a toxicidade termo-dependente do herbicida AKB [®] para o cladóceros tropical <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	46
1. INTRODUÇÃO	47
Objetivo específico	49
2. MATERIAIS E MÉTODOS	49
2.1. Características do herbicida	49
2.2. Cultivo e sensibilidade dos organismos-teste	49
2.3. Testes de toxicidade.....	50
2.3.1. Efeito da aclimação reversível sobre a toxicidade termo-dependente... 51	
2.3.2. Efeito da aclimação desenvolvimental sobre a toxicidade termo-dependente.....	52
2.4. Análise de dados	52
3. RESULTADOS	52
3.1. Ajustamento dos modelos	52
3.2. Comparação das concentrações de efeito	54
3.3. Razão das concentrações de efeito.....	55
4. DISCUSSÃO.....	61
4.1. Toxicidade termo-dependente do herbicida AKB [®] para <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	61
4.2. Efeito da aclimação desenvolvimental sobre a toxicidade do herbicida AKB [®]	63
5. CONCLUSÕES.....	65
CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

Capítulo I A Problemática das Mudanças Climáticas Globais

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Mudanças climáticas e o uso de pesticidas

Mudanças climáticas são atualmente uma das principais ameaças aos ecossistemas aquáticos. Estes ecossistemas são particularmente sensíveis a, por exemplo, períodos longos de seca ou aumento na precipitação, ondas de calor ocasionando aumento da temperatura, entre outros eventos extremos cuja frequência é prevista de aumentar até o final do século (MOE et al., 2013). Entretanto, as alterações ambientais causadas por mudanças climáticas são apenas um dos múltiplos estressores aos quais estes ecossistemas estão expostos. A compreensão das interações entre mudanças climáticas e estes estressores é de grande importância nas avaliações de riscos ambientais, pois esta interação pode alterar a resposta dos organismos à exposição (NOYES et al., 2009).

Dentre os estressores antropogênicos mais comuns em ecossistemas aquáticos está a poluição ambiental por aditivos agrícolas, especialmente pesticidas, que têm como objetivo diminuir a proliferação de pragas, doenças e plantas daninhas das culturas (STEFFENS et al., 2013). Essas substâncias estão sendo cada vez mais utilizadas ao redor do planeta e inclusive no Brasil, onde as vendas desses produtos subiram 194% em 12 anos (2000-2012) com o estado de São Paulo liderando o ranking do país desde 2009 (IBAMA, 2013).

As alterações no ambiente associadas às mudanças climáticas estão modificando diretamente a disponibilidade dessas substâncias e processos químicos essenciais como volatilização, degradação e escoamento (DABROWSKI et al., 2002; BAILEY, 2004; BENITEZ et al., 2006), afetando com isso os organismos não-alvo desses compostos. Enquanto eventos extremos de seca poderão resultar na maior degradação dos agrotóxicos, reduzindo a concentração dos mesmos no solo e na água, solos muito úmidos, pelo aumento da precipitação, podem degrada-los para outras substâncias tóxicas que podem possuir maior mobilidade no sistema (BERG et al., 1999).

Modelos ambientais têm sugerido que as concentrações de contaminantes no ambiente aquático aumentam com tempestades mais intensas (CHIOVAROU; SIEWICKI, 2007), já que esses eventos favorecem o transporte desses compostos para os corpos d'água, tanto por lixiviação como por escoamento superficial, ocasionando

problemas graves de contaminação ambiental (NOYES et al., 2009). Os processos de volatilização também podem ser potencializados levando os contaminantes para outros sítios pouco expostos anteriormente, prejudicando os organismos locais. De acordo com as propriedades físicas e químicas de um agrotóxico, seu modo de aplicação e as condições ambientais, a perda por volatilização pode chegar até 50% do volume aplicado (BERG et al., 1999).

Modificações nos padrões de precipitação também podem influenciar mudanças no uso da terra, alterando os padrões de aplicação de pesticidas e herbicidas e a distribuição e abundância de pragas e ervas daninhas. O período anual das culturas também pode ser modificado estabelecendo novas culturas em regiões ainda inexploradas para este fim (BLOOMFIELD et al., 2006).

Apesar da evidência de que mudanças climáticas alteram o uso e a disponibilidade de pesticidas no ambiente (STEFFENS et al., 2013), o que sabemos sobre o efeito interativo de mudanças climáticas e pesticidas sobre ecossistemas aquáticos ainda é insuficiente. Um dos efeitos mais relevantes, porém ainda pouco investigado, é a alteração da toxicidade destes pesticidas com o aumento da temperatura observada em ambientes aquáticos em resposta às mudanças climáticas.

1.2. Variáveis ambientais e toxicidade termo-dependente

Quando se fala em alterações climáticas e seus eventos extremos, deve-se lembrar também das variáveis ambientais que são influenciadas afetando a sensibilidade dos organismos mesmo se não ocorrerem modificações na concentração dos contaminantes (HOOPER et al., 2013). Variáveis como pH, salinidade, radiação ultravioleta e temperatura são citadas como grandes influências na toxicidade de substâncias químicas (MAYER; ELLERSIECK; SERVICE, 1986; BREZONIK PL, KING SO, MACH CE, 1991; ZEPP et al., 2007; DELORENZO et al., 2009). Dentre essas variáveis, a temperatura é um fator determinante para a homeostase em organismos aquáticos, já que grande parte dos organismos presentes no sistema são animais ectotérmicos, sendo assim, as condições térmicas locais afetam diretamente a fisiologia, o metabolismo e outros processos biológicos essenciais destes organismos (PARSON, P.A., 1961; LYDY; BELDEN; TERNES, 1999; CHANG et al., 2007). Por exemplo, a temperatura pode alterar a toxicocinética das substâncias químicas fazendo

com que os processos de absorção química, eliminação e desintoxicação sejam alterados no sistema fisiológico dos organismos ectotérmicos. Sendo assim, é conveniente avaliar sua influência na toxicidade de outros estressores, como os pesticidas, relação essa conhecida como toxicidade química termo-dependente (TQTD) (ZHOU et al., 2014).

Estudos sobre a TQTD mostram que apesar de complexa ela geralmente possui uma relação positiva com os xenobióticos (HEUGENS et al., 2001). Apesar disso, deve-se tomar cuidado ao extrapolar os resultados de TQTD já que ela pode apresentar diferentes respostas dependendo da espécie do organismo e do químico testado (KWOK et al., 2007), como por exemplo o caso dos inseticidas piretróides que apresentam respostas tanto positivas quanto negativas de TQTD (RATUSHNYAK; ANDREEVA; TRUSHIN, 2005; WESTON et al., 2009). Alguns exemplos dos testes já realizados sobre as relações entre temperatura e toxicidade são apresentados na **Tabela 1**.

O estágio de desenvolvimento dos organismos investigados também pode afetar as respostas observadas de TQTD. Variações ontogenéticas (diferentes respostas dependendo de seu estágio de vida) na TQTD podem ser observadas, como demonstrado em trabalhos realizados com o molusco *Physella acuta* que apresentaram relação positiva no crescimento e reprodução, porém a toxicidade do fungicida pirimetanil para os embriões é maior em temperaturas abaixo da condição ótima (SEELAND et al., 2013). Sendo assim, variações ontogenéticas, fisiológicas e metabólicas tornam complexa a extrapolação de efeitos nos estudos de TQTD entre espécies diferentes. Além disso, de forma a se avaliar experimentalmente os efeitos da TQTD é necessário considerar também a capacidade dos organismos de aclimação e adaptação ao meio estressante.

Tabela 1 – Relação entre temperatura e toxicidade para organismos de ambientes aquáticos. O símbolo ↑ indica uma relação positiva da toxicidade com a temperatura, ↓ indica uma relação negativa entre toxicidade e temperatura, e – indica nenhuma relação entre toxicidade e temperatura*.

Substância química	Espécie	Grupo taxonômico	Temperaturas testadas	Toxicidade termo-dependente	Referência
Abamectina/Imidacloprid	<i>Copera annulata</i>	Insecta	25, 30 e 35°C	↑	CHANG et al. (2007)
Acetaminofeno	<i>Daphnia magna</i>	Crustacea	15, 21 e 25°C	↑	KIM et al. (2010)
Atrazina	<i>Microcystis aeruginosa</i>	Cyanobacteria	10, 15 e 25°C	↓	CHALIFOUR; JUNEAU (2011)
Atrazina	<i>Scenedesmus obliquus</i>	Chlorophyta	10, 15 e 25°C	↓	CHALIFOUR; JUNEAU (2011)
Cádmio	<i>Daphnia magna</i> <i>Daphnia pulex</i>	Crustacea	20°C e 26°C	↑	LEWIS; HORNING (1991)
Cádmio	<i>Moina Irrassa</i>	Crustacea	20, 25 e 30°C	↑	ZOU; BU (1994)
Cádmio	<i>Porcellio scaber</i>	Crustacea	12, 16, 20 e 24°C	↓	ABDEL-LATEIF; DONKER; VAN STRAALLEN (1998)
Cádmio	<i>Nucella lapillus</i>	Mollusca	5 e 10°C	↑	LEUNG; TAYLOR; FURNESS (2000)
Cádmio	<i>Daphnia magna</i>	Crustacea	10, 13, 16, 20, 23, 26, 29, 32 e 35°C	↑	HEUGENS et al. (2003)
Cádmio	<i>Crassostrea virginica</i>	Mollusca	20 e 28°C	↑	LANNIG; CHERKASOV; SOKOLOVA (2006)
Cádmio	<i>Orconectes immunis</i>	Crustacea	17, 20, 23 e 27°C	↑	KHAN et al. (2006)
Cádmio	<i>Thalassiosira nordenskioldii</i>	Bacillariophyceae	18, 24 e 30,5 °C	↑	WANG; WANG (2008)
Cádmio	<i>Lymnaea Luteola L.</i>	Mollusca	15, 20, 25 e 30°C	↑	SANGITA DAS; SHARMA; TABREZ AHMAD (2012)
Cádmio	<i>Chironomus riparius</i> <i>Chironomus yoshimatsui</i>	Insecta	20 e 27°C 20 e 30°C	↑	MO et al. (2013)
Carbaryl	<i>Rana clamitans</i>	Amphibia	17, 22 e 27°C	↑	BOONE; BRIDGES (1999)
Cobre	<i>Moina Irrassa</i>	Crustacea	20, 25 e 30°C	↑	ZOU; BU (1994)
Cobre	<i>Gammarus pulex</i>	Crustacea	15, 20 e 25°C	↑	BAT et al. (2000)
Cobre	<i>Dreissena polymorpha</i>	Mollusca	15, 20 e 25°C	↑	RAO; KHAN (2000)
Cobre	<i>Orconectes immunis</i>	Crustacea	17, 20, 23 e 27°C	↑	KHAN et al. (2006)
Cobre	<i>Daphnia pulex</i> <i>Diaptomus clavipes</i>	Crustacea	10, 20 e 30°C	↑	BOECKMAN; BIDWELL (2006)
Cobre	<i>Moina macrocopa</i>	Crustacea	22 e 27°C	↑	NANDINI; PICAZO-PAEZ; SARMA (2007)
Cobre	<i>Lymnaea Luteola L.</i>	Crustacea	15, 20, 25 e 30°C	↑	SANGITA DAS; SHARMA; TABREZ AHMAD (2012)
Cobre	<i>Oreochromis mossambicus</i>	Peixe	19, 29°C	↑	NUSSEY; VAN VUREN; DU PREEZ (1996)
Chumbo	<i>Gammarus pulex</i>	Crustacea	15, 20 e 25°C	↑	BAT et al. (2000)
Chumbo	<i>Orconectes immunis</i>	Crustacea	17, 20, 23 e 27°C	↑	KHAN et al. (2006)
Clorobenzeno	<i>Daphnia magna</i>	Crustacea	20 e 24°C	↑	COWGILL; TAKAHASHI; APPLGATH (1985)

Clorpirifós	<i>Chironomus tentans</i>	Insecta	10, 20 e 30°C	↑	LYDY; BELDEN; TERNES (1999)
Clortetraciclina	<i>Daphnia magna</i>	Crustacea	15, 21 e 25°C	↑	KIM et al. (2010)
Cromo	<i>Daphnia magna</i>	Crustacea	20 e 25°C	↑	MARTÍNEZ-JERÓNIMO; MARTÍNEZ-JERÓNIMO; ESPINOSA-CHÁVEZ (2006)
Diazinon	<i>Danio rerio</i>	Chordata	26, 28, 30 e 33.5°C	↑	OSTERAUER; KÖHLER (2008)
Dietanolamina	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Crustacea	20 e 24°C	↑	COWGILL; TAKAHASHI; APPLGATH (1985)
Dodecil sulfato de sódio	<i>Daphnia magna</i>	Crustacea	20°C e 26°C	↑	LEWIS; HORNING (1991)
Enrofloxacina	<i>Daphnia magna</i>	Crustacea	15, 21 e 25°C	↑	KIM et al. (2010)
Esfenvalerate (piretróide)	<i>Leopard frog Rana spp.</i>	Amphibia	18, 20 e 22°C	↑	MATERNA; RABENI; LAPOINT (1995)
Esfenvalerate (piretróide)	<i>Monoporeia affinis</i>	Crustacea	4 e 10°C	↑	JACOBSON; PREVODNIK; SUNDELIN (2008)
Etanol	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Crustacea	20 e 24°C	↑	TAKAHASHI; COWGILL; MURPHY (1987)
Etileno	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Crustacea	20 e 24°C	↑	COWGILL; TAKAHASHI; APPLGATH (1985)
Fenol	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Crustacea	20 e 24°C	↑	COWGILL; TAKAHASHI; APPLGATH (1985)
Glifosato	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Crustacea	20, 25 e 30°C	–	TSUI; CHU (2003)
Glifosato	<i>Salmo gairdneri</i>	Peixe	7, 12, 17°C	↑	FOLMAR; SANDERS; JULIN (1979)
Glifosato	<i>Lepomis macrochirus</i>	Peixe	7, 12, 17°C	↑	FOLMAR; SANDERS; JULIN (1979)
Mistura: ethoprop e malathion	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	Chordata	12, 15, 18, e 21 °C	↑	LAETZ et al. (2014)
Mercúrio	<i>Lymnaea Luteola L.</i>	Mollusca	15, 20, 25 e 30°C	↑	SANGITA DAS; SHARMA; TABREZ AHMAD (2012)
Níquel	<i>Danio rerio</i>	Chordata	26-33,5°C	↑	SCHEIL; KÖHLER (2009)
Paration	<i>Chironomus tentans</i>	Insecta	10, 20 e 30°C	↑	LYDY; LOHNER; FISHER (1990)
	<i>Chironomus riparius</i>			↑	LYDY; BELDEN; TERNES (1999)
Pentaclorobenzeno	<i>Chironomus tentans</i>	Insecta	10, 20 e 30°C	↑	LYDY; BELDEN; TERNES (1999)
Pentaclorofenol	<i>Simocephalus vetulus</i>	Crustacea	16 e 22°C	↑	WILLIS; LING; CHAPMAN (1995)
Piretróides	<i>Anolis carolinensis</i>	Chordata	15, 20, 25, 30, 35 e 38°C	↓	TALENT (2005)
Piretróides	<i>Daphnia magna</i>	Crustacea	23 e 28°C	↑	RATUSHNYAK; ANDREEVA; TRUSHIN (2005)
Piretróides	<i>Hyalella azteca</i>	Crustacea	13, 18, 23, e 28C.	↓	WESTON et al. (2009)
Pirimetanil	<i>Chironomus riparius</i>	Insecta	11, 14, 16, 22, 25 e 28°C	↑	MÜLLER et al. (2012)
Sulfato de cobre	<i>Ictalurus punctatus</i>	Chordata	21, 23, 25 e 27°C	↓	PERSCHBACHER (2005)
Zinco	<i>Moina Irrassa</i>	Crustacea	20, 25 e 30°C	↑	ZOU; BU (1994)
Zinco	<i>Gammarus pulex</i>	Crustacea	15, 20 e 25°C	↑	BAT et al. (2000)

* Esta é uma lista complementar àquela apresentada em HEUGENS et al. (2001)

1.3. Aclimação e adaptação em um cenário de mudanças globais

A aclimação é a capacidade de uma espécie desenvolver características fenotípicas plásticas de forma a garantir sua sobrevivência em uma nova condição ambiental (ANGILLETTA, 2009). A aclimação é geralmente verificada pela observação da variação de condições biológicas (e.g. taxa metabólica, crescimento, etc...) em resposta à variação de condições ambientais. Sendo assim, para se compreender o processo de aclimação, estados diferenciados de condições ambientais e biológicas devem ser observados concomitantemente. Como a habilidade de aclimação é uma característica essencial para o sucesso de uma espécie no ambiente (ANGILLETTA, 2009), há um grande interesse na avaliação da aclimação de organismos às variáveis ambientais às quais estes estão expostos no ambiente, tais como temperatura (SCHIFFER; HANGARTNER; HOFFMANN, 2013), salinidade (BOSSUS; MADSEN; TIPSMARK, 2015), pH (FANTAZZINI et al., 2015) e luz (CASATI et al., 2011). Dentre estas variáveis, a temperatura é a mais frequentemente estudada por ser a variável ambiental mais importante na regulação de processos biológicos através da alteração das taxas metabólicas (BROWN et al., 2004). A compreensão da capacidade de aclimação de organismos à temperatura tem se tornado cada vez mais necessária, visto que o aumento da temperatura média do planeta é uma das principais previsões dos modelos de mudanças climáticas globais (IPCC, 2014).

Compreender como ocorre o processo de aclimação é essencial para se avaliar como as espécies vão se adaptar às mudanças globais ou alterações em seu habitat. Do ponto de vista biológico, o processo de aclimação é dependente das características do organismo e de como ocorre sua exposição à variável de interesse. Estes dois fatores possibilitam classificar o processo de aclimação em três tipos: reversível, desenvolvimental e transgeracional. A aclimação reversível é aquela que ocorre em períodos de tempo relativamente curtos e, na maior parte das vezes, em somente um estágio de vida do organismo (ANGILLETTA, 2009), como regulações bioquímicas e fisiológicas em flutuações diárias e sazonais (SOMERO, 2010; WILLMING; QIN; MAUL, 2013). A aclimação desenvolvimental é aquela que ocorre quando o organismo é exposto ao longo de todo seu desenvolvimento a uma condição ambiental diferente da que seus pais estavam expostos. Este tipo de aclimação permite a plasticidade no desenvolvimento do organismo, fazendo com que a exposição a uma nova condição ambiental nos primeiros estágios de vida melhore o desempenho do

mesmo quando adulto. Essa forma de aclimação pode ajudar organismos ectotérmicos a prosperar em um cenário de temperaturas variáveis (SCOTT; JOHNSTON, 2012). Finalmente, a aclimação transgeracional é aquela que ocorre através de diversas gerações, possibilitando que o habitat experimentado pelos pais ao longo do desenvolvimento garanta melhor desempenho de sua prole e, por consequência, o êxito na sucessão da espécie por fatores não-genéticos (BONDURIANSKY; CREAN; DAY, 2012). Por exemplo, proles do cladóceros *Daphnia cucullata* provenientes de gerações que foram expostas a sinais químicos de predadores, desenvolveram aspecto morfológico de defesa que dificulta a predação (AGRAWAL; LAFORSCH; TOLLRIAN, 1999).

O estudo da aclimação é extremamente importante, pois nos permite avaliar experimentalmente processos que em última instância são responsáveis pela adaptação evolutiva, esta última extremamente difícil de se avaliar. No caso de mudanças ambientais de longo prazo, a seleção de herança não-genética através da aclimação pode ocasionar mudanças adaptativas, influenciando a direção da evolução genética (BONDURIANSKY; DAY, 2009; DAY; BONDURIANSKY, 2011). No processo de adaptação ocorre a seleção dos organismos e as consequentes variações genéticas que alteram o fenótipo, o que requer muitas gerações. Tanto a aclimação como a adaptação tem grande significância ecológica, pois são responsáveis por garantir o desempenho das espécies em um cenário de mudanças climáticas, sendo assim, estudos nessa área são extremamente importantes para prever respostas evolutivas (SUNDAY et al., 2014).

1.4. Novas perspectivas para a ecotoxicologia

Atualmente, há um grande interesse na compreensão dos impactos das mudanças globais em diferentes níveis ecológicos (BRANCH et al., 2013). Para aprimorar as previsões das consequências do estresse ambiental sofrido pelos organismos, cada vez mais ecotoxicologistas estão direcionando suas pesquisas para respostas ecológicas mais profundas com experimentos mais duradouros, utilizando várias gerações dos organismos-teste (FENG et al., 2008; JIN; GAO; BEARDALL, 2013; TATTERS et al., 2013), e desenvolvendo estudos cada vez mais interdisciplinares, principalmente quando buscam-se informações genéticas para determinada resposta obtida nos testes. Neste âmbito, conceitos de aclimação e adaptação estão envolvidos.

A avaliação do risco ambiental de um contaminante requer uma compreensão da relação entre a exposição e os efeitos, sendo que essa relação é estimada por modelos padronizados na avaliação de sua toxicidade sobre organismos-teste. Estes organismos são mantidos em cultivos laboratoriais contínuos, geralmente sob condições ótimas que favorecem sua reprodução e crescimento. Além disso, a temperatura utilizada em testes ecotoxicológicos de laboratório geralmente é representativa de uma média da temperatura do ambiente ou, mais frequentemente, uma temperatura ótima para o cultivo e manutenção daquele organismo em laboratório (LAU et al., 2014).

Esse tipo de condição, apesar de permitir que os dados sejam diretamente comparáveis, não representa as circunstâncias do campo onde os organismos podem experimentar diferentes temperaturas, subestimando os reais efeitos de estressores antropogênicos frente às variações climáticas (LAU et al., 2014). Sendo assim, é imprescindível o desenvolvimento de métodos e ferramentas que melhor analisem as potenciais interações de substâncias tóxicas e variáveis ambientais afetadas pelas mudanças climáticas, já que os dados coletados até o momento não são abrangentes o suficiente para determinar avaliações integradas de risco (HOOPER et al., 2013).

Variações de temperatura relacionadas com as mudanças climáticas podem trazer sérios impactos em componentes chave das cadeias alimentares aquáticas (TASSOU; SCHULZ, 2012), influenciando a toxicidade dos produtos químicos (HEUGENS et al., 2001). Através da revisão bibliográfica realizada (**Tabela 1**), percebeu-se que grande parte dos estudos que incorporam a avaliação dessas alterações sobre espécies aquáticas centralizam-se em avaliar os efeitos agudos de altas temperaturas, podendo assim extrapolar esses resultados para a população no futuro (MUNDAY, 2015).

Através disso, já que os efeitos negativos das variações ambientais são potencializados pela interação com a poluição ambiental, o diferencial do presente trabalho foi a combinação de testes padronizados com diferentes faixas de temperatura para avaliar aspectos de aclimação na TQTD de um herbicida. A substância escolhida para os testes foi o herbicida AKB[®] que tem como princípio ativo o Glifosato.

Herbicidas a base de Glifosato são indicados no controle de ervas daninhas anuais e perenes, monocotilidônias ou dicotiledôneas em diversas culturas de grãos e frutas (JR; SANTOS; RIBEIRO, 2002). Comercializado desde 1974 este princípio ativo para

herbicidas é o mais utilizado no mundo principalmente em culturas geneticamente modificadas, como por exemplo, a soja RR (Roudup Ready) modificada pelo mesma empresa que descobriu as propriedades herbicidas do Glifosato, a Monsanto (ABREU; MATTA; MONTAGNER, 2008). Em 2014, a produção global de soja atingiu 315,4 milhões de toneladas e o Brasil foi responsável por quase um terço desse valor (94,5 milhões de toneladas) sendo que 93% dessa soja eram RR (BENBROOK, 2016).

Apesar do Glifosato e de seus sais utilizados nas formulações de herbicidas serem considerados pouco tóxicos (classes toxicológicas III e IV), estudos ambientais relatam impactos em organismos terrestres (PLEASANTS; OBERHAUSER, 2013; BALBUENA et al., 2015; GAUPP-BERGHAUSEN et al., 2015), aquáticos (CAVALCANTE; MARTINEZ; SOFIA, 2008; VERA et al., 2012; CUHRA et al., 2015) e em 2015 o Glifosato foi classificado como provável carcinógeno em humanos pela agência internacional do câncer (IARC, 2015).

O organismo-teste escolhido para os experimentos foi o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, um microcrustáceo zooplânctônico de água doce. Cladóceros, na maioria, são filtradores, reproduzem-se por partenogênese, são consumidores de baixa ordem e participam ativamente na cadeia trófica aquática no fluxo da matéria e energia do sistema. Estes organismos são amplamente utilizados como ferramenta no diagnóstico de toxicidade ambiental, pela facilidade da manutenção de seu cultivo e a sua importância nos ecossistemas aquáticos. Através das informações apresentadas, o presente trabalho teve por objetivo contribuir para melhor entendimento das interações entre estressores, variáveis ambientais e a capacidade dos organismos de lidarem com cenários desfavoráveis, fornecendo informações para avaliações de riscos ambientais mais precisas com o intuito de proteger a vida aquática frente às mudanças climáticas globais.

Objetivo geral

Avaliar o efeito da aclimação sobre a sensibilidade ao NaCl e toxicidade termo-dependente do herbicida AKB[®] para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*.

Capítulo II Avaliação do efeito da aclimação sobre a sensibilidade ao NaCl para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*

Resumo: Diariamente os ecossistemas aquáticos sofrem com o estresse ambiental proporcionado por fatores naturais e antropogênicos. Neste sentido, os estudos ecotoxicológicos atuam mensurando e prevendo as consequências de cenários desfavoráveis com o intuito de proteger a vida aquática. A comunidade zooplancônica está entre as mais estudadas neste aspecto, principalmente cladóceros dos gêneros *Daphnia* e *Ceriodaphnia*. Dada a sua importância na cadeia trófica e sua capacidade de responder rapidamente à mudanças nas características bióticas e abióticas no sistema, estes podem ser utilizados como organismos modelo em estudos que avaliam consequências das mudanças climáticas globais. Com a finalidade de compreender como estes organismos lidam com condições desfavoráveis, este capítulo teve por objetivo avaliar o efeito da aclimação reversível e desenvolvimental sobre a sensibilidade ao NaCl para *Ceriodaphnia silvestrii*. Para isso, testes de sensibilidade foram realizados baseados na norma NBR 13373:2016 (ABNT, 2016), em três temperaturas (20°C, 25°C e 30°C) através de duas condições de aclimação para cada uma delas. O *endpoint* foi a imobilidade dos organismos, sendo que a sensibilidade e os efeitos da aclimação foram analisados no programa R 3.3.2. Os resultados demonstraram que a temperatura tem um efeito significativo na sensibilidade de *Ceriodaphnia silvestrii* ao NaCl. A tendência geral foi o aumento da toxicidade com o aumento da temperatura (TQTD positiva). A aclimação teve influência tanto na toxicidade como na distribuição da sensibilidade da população nos tratamentos utilizados. Estes resultados demonstram a importância de incorporá-la na avaliação da sensibilidade dos organismos às condições ambientais adversas.

1. INTRODUÇÃO

A comunidade zooplânctonica é a parcela heterotrófica dos organismos do plâncton, são consumidores primários, possuem importante papel no fluxo de energia, e juntamente com outros organismos participam da produção secundária e do transporte e regeneração de nutrientes na cadeia trófica. Estes organismos possuem um ciclo de vida curto, respondendo rapidamente a mudanças nas características bióticas e abióticas no sistema, sendo assim, podem ser modelos para estudos das mudanças climáticas globais (MEIRINHO, 2016).

Dentre os organismos zooplânctônicos, a ordem Cladocera está consolidada como ferramenta na análise de estudos ambientais, em especial organismos pertencentes aos gêneros *Ceriodaphnia* e *Daphnia*. Estes organismos são microcrustáceos filtradores que se alimentam de algas, bactérias e outras partículas em suspensão. Reproduzem-se tanto por reprodução assexuada (partenogênese), como sexuada, porém, a segunda só ocorre em condições adversas do ambiente onde as fêmeas fecundadas por machos liberam ovos de resistência que eclodirão quando o ambiente apresentar condições ambientais favoráveis para tal (HUTCHINSON; EDMONDSON, 1957; LAMPERT; SOMMER, 1997).

Em testes ecotoxicológicos as espécies que são comumente utilizadas são os cladóceros exóticos *Ceriodaphnia dubia* e *Daphnia magna*, sendo que ambos são originários de ambientes de clima temperado. *Ceriodaphnia silvestrii* é um cladóceros de ambientes de clima subtropical e tropical, sendo assim, utiliza-lo como organismo-teste para estudos ambientais colabora para a obtenção de respostas ecológicas mais próximas da realidade dessas regiões. No Brasil, existe uma norma que padroniza estes organismos para serem utilizados em testes ecotoxicológicos desde 1995. Em todas as versões desta norma, sendo que a última é do ano passado (ABNT, 2016), é recomendado aos laboratórios de pesquisas ecotoxicológicas realizar periodicamente testes de sensibilidade com substâncias de referência como o NaCl, para assegurar que o cultivo mantém uma faixa padrão de sensibilidade, garantindo a replicabilidade de testes anteriores.

Neste sentido, com o objetivo de mensurar a consequência das mudanças climáticas através das variações de temperatura, é pertinente inicialmente compreender

como essas variações modificam a sensibilidade dos organismos, avaliando a toxicidade termo-dependente de uma substância de referência. Além disso, deve-se lembrar que as mudanças climáticas e seus eventos extremos podem alterar a salinidade de ambientes de água doce. Por exemplo, períodos longos de seca podem aumentar a concentração de sais nestes ambientes, enquanto o aumento da precipitação e de tempestades pode diminuir (ANTON-PARDO; ARMENGOL, 2012).

Estudos sobre os efeitos da salinidade afirmam que ela produz mudanças na riqueza e na diversidade de espécies na comunidade zooplânctonica, sendo os cladóceros os mais suscetíveis a este tipo de alteração físico-química (JEPPESEN et al., 1994). Mudanças nos padrões de salinidade associadas com o aumento da temperatura podem modificar a sensibilidade dos organismos, alterando a toxicidade de xenobióticos, como metais (MCLUSKY; BRYANT; CAMPBELL, 1986) e pesticidas (DELORENZO et al., 2009) promovendo diferentes respostas dependentes do contaminante e/ou organismos-teste.

Através das informações apresentadas, este capítulo tem como objetivo avaliar a sensibilidade ao NaCl para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*. O diferencial para tal trata-se de avaliar a influência da aclimação na toxicidade, com o intuito de obter respostas mais realísticas da influência que alterações climáticas podem ter no equilíbrio dos ecossistemas globais.

Objetivo específico

Avaliar o efeito da aclimação reversível e desenvolvimental sobre a sensibilidade de *Ceriodaphnia silvestrii* ao NaCl.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Cultivo dos organismos-teste

Cultivos contínuos de *Ceriodaphnia silvestrii* foram estabelecidos no laboratório do Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA) localizado no Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA), da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP), tendo como base os procedimentos descritos na norma NBR 13373:2016 (ABNT, 2016). O meio de cultivo foi água reconstituída com pH entre 7,0 e 7,6 e dureza de 40 a 48 mg CaCO₃.L⁻¹. Os cultivos foram mantidos sob temperatura constante (25°C) e fotoperíodo de 16:8 claro/escuro. Como alimento utilizou-se a alga *Raphidocelis subcapitata* e complemento alimentar a base de ração de alevinos de peixe fermentada. Os organismos foram cultivados em béqueres de 1 Litro em uma densidade de até 70 organismos por litro. A renovação da água do cultivo foi realizada a cada dois dias.



Figura 1 – Aspectos gerais de *Ceriodaphnia silvestrii* (Foto: Laís C. Menezes da Silva, 2016)

2.2. Testes de Sensibilidade

Para realizar todos os testes e avaliar o efeito da temperatura sobre a sensibilidade do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* ao NaCl inicialmente foram realizados testes de sensibilidade na temperatura padrão de 25°C para verificar se o

cultivo inicial estava dentro da faixa de sensibilidade da carta controle do laboratório. Os procedimentos aplicados nos testes de sensibilidade foram baseados na norma NBR 13373:2016 (ABNT, 2016), utilizando como substância de referência o Cloreto de sódio (NaCl). Cada teste foi conduzido em cinco concentrações (0,6; 1,0; 1,3; 1,6 e 2,2 g/L) e um controle em quatro réplicas, cada uma contendo cinco neonatas (<24hs). As unidades experimentais foram béqueres de vidro contendo 10 ml da solução teste. Cada concentração da solução teste foi preparada a partir de uma solução mãe preparada anteriormente com concentração de 10 g/L. Os testes tiveram duração total de 48 horas, sem alimentação e fotoperíodo de 16:8 claro/escuro, tendo como *endpoint* a imobilidade dos organismos.

2.2.1. Efeito da aclimação reversível sobre a sensibilidade termo-dependente

Para testar o efeito da aclimação reversível na sensibilidade de *C. silvestrii*, foram realizados testes de sensibilidade com neonatas nascidas em temperatura diferente daquela às quais foram expostas. Neonatas de até 24 horas de vida, nascidas de fêmeas mantidas a 25°C, foram submetidas a teste de sensibilidade a 20°C e 30°C. Em todos os testes realizados nestas temperaturas, concomitantemente a sensibilidade a 25°C era checada a fim de garantir que diferenças nos valores de CE (concentração de efeito) ocorreram apenas pela temperatura e/ou aclimação. Com exceção da temperatura, o delineamento experimental utilizado foi o mesmo que os testes baseados na norma NBR 13373:2016 (ABNT, 2016), tendo como *endpoint* a imobilidade dos indivíduos. Para verificar se a diferença de temperatura à qual os organismos foram expostos em cada tratamento contribuiu para um aumento da mortalidade, os organismos sobreviventes dos controles (sem NaCl) de todos os tratamentos foram transferidos para suas respectivas temperaturas originais ao final dos testes, e acompanhados por um período de 24 horas após o término do experimento. Durante este período, não foi observada a mortalidade de organismos tanto nos controles da temperatura de origem como nos controles das temperaturas teste transferidos para suas temperaturas originais, indicando que a transferência de temperatura não induziu um aumento na mortalidade dos organismos. O delineamento desta primeira etapa está representado na **Figura 2**.

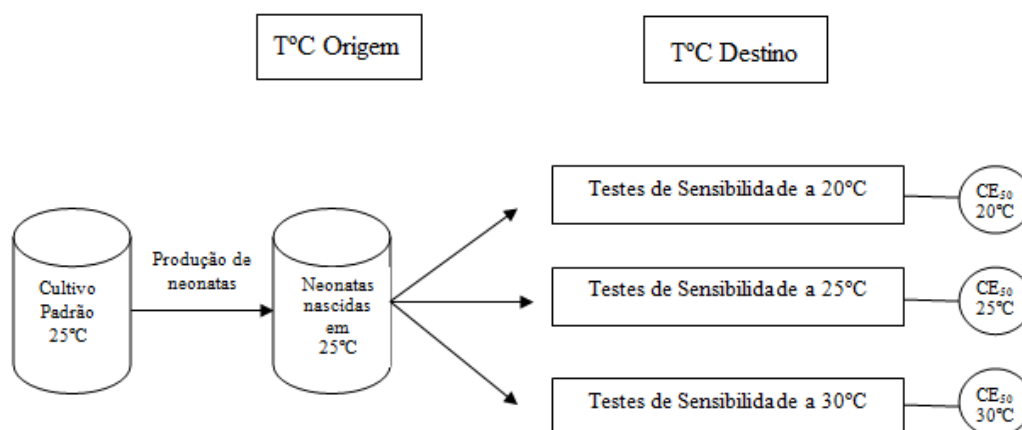


Figura 2 – Delineamento experimental para avaliação do efeito da aclimação reversível

2.2.2. Efeito da aclimação desenvolvimental sobre a sensibilidade termo-dependente

Com o objetivo de avaliar se a temperatura experimentada ao longo do desenvolvimento da fêmea altera a sensibilidade de suas neonatas, 70 neonatas de fêmeas do cultivo padrão a 25°C foram transferidas para béqueres de 1L para temperaturas de 20°C e 30°C. Estas foram cultivadas seguindo as mesmas condições do cultivo já estabelecidas no laboratório e normatizadas pela ABNT. O crescimento e a produção de neonatas foram acompanhados até a população do cultivo apresentar 10% das fêmeas iniciais. Os testes de sensibilidade foram conduzidos com a 2^a até a 9^a ninhada dessas adultas, devido a quantidade de réplicas necessárias para o embasamento estatístico. O *endpoint* assim como nos outros testes realizados foi a imobilidade dos indivíduos. O delineamento experimental desta segunda etapa está representado na figura abaixo:

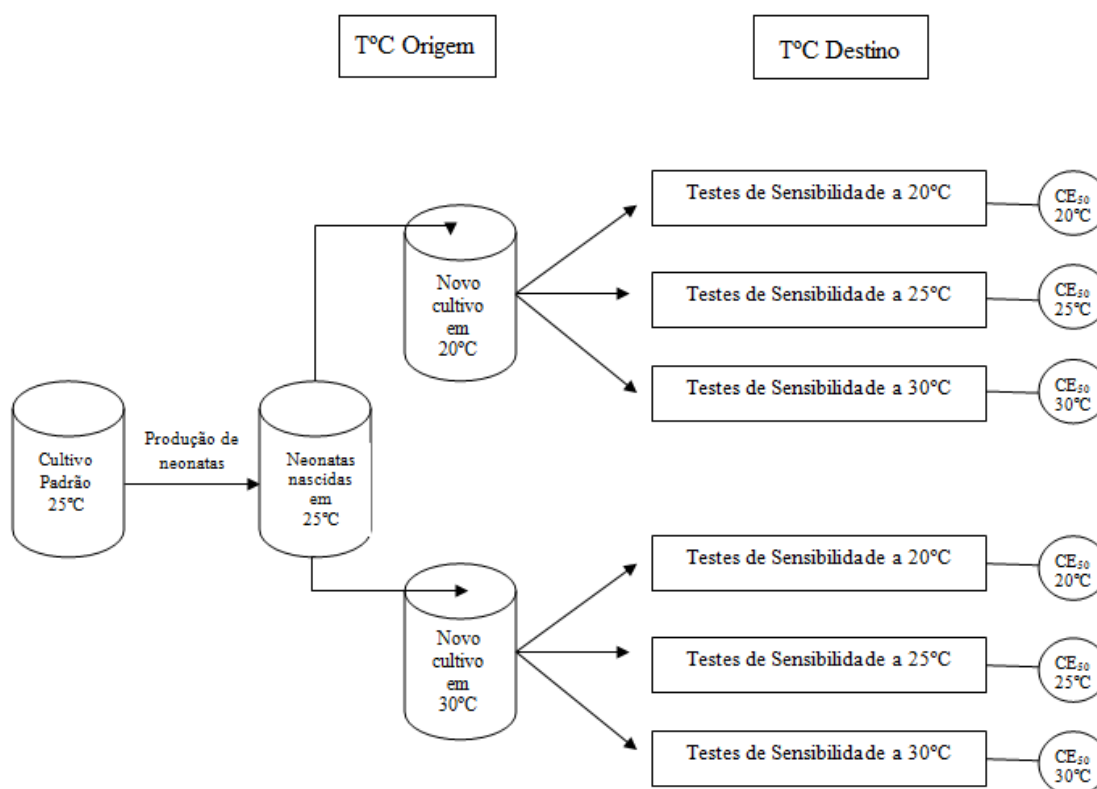


Figura 3 – Delineamento experimental para avaliação do efeito da aclimação desenvolvimental

2.3. Análise de dados

Os resultados de todos os experimentos foram organizados em uma matriz onde cada linha representa uma réplica individual, e cada coluna contém uma informação relativa àquela réplica (por exemplo, temperaturas de origem e destino, concentração de NaCl, número de animais mortos e vivos, etc...). Esta matriz de dados foi então importada para o programa R versão 3.3.2 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016), onde todas as análises dos dados foram feitas. Para os cálculos de estatísticas descritivas (médias, medianas, erro padrão da média e desvio padrão) e para a manipulação de dados foi utilizado o pacote plyr (WICKHAM, 2009a). Os gráficos foram plotados através do pacote ggplot2 (WICKHAM, 2009b) associado aos pacotes grid e gridExtra.

2.3.1. Ajustamento das curvas dose-resposta

O procedimento de ajustamento das curvas dose-resposta foi feito utilizando o pacote drc (RITZ et al., 2015) disponível para o programa R. Foram criados *subsets*

de dados da matriz principal contendo os resultados de todos os experimentos para cada condição de temperatura e aclimatação. Para cada um dos *subsets* de dados foi ajustada uma curva dose-resposta e seus respectivos limites de confiança. O modelo de dose-resposta ajustado aos dados foi do tipo log-logístico de quatro parâmetros, fixando-se os valores mínimo e máximo da resposta em 0 e 1 respectivamente (equivalente ao modelo LL.2 disponível no pacote drc). O modelo utilizado tem a seguinte equação:

$$y = \frac{1}{1 + (b(\log(x) - \log(e)))}$$

onde e é o ponto de inflexão no qual a curva é simétrica, e equivale ao CE_{50} . Após o ajustamento das curvas, foi avaliada a significância da diferença entre as inclinações das curvas e os valores de e (CE_{50}) através da fixação dos valores de e e inclinação (respectivamente). A comparação dos dois ajustes do modelo foi feita usando um teste de razão de verossimilhança (teste qui-quadrado).

2.3.2. Estimativa das concentrações de efeito

Além do valor de CE_{50} (e) já estimado no ajustamento das curvas, também foram estimadas para cada curva as concentrações de efeito CE_{25} e CE_{75} como indicadores de toxicidade para as frações mais sensíveis e mais tolerantes da população, respectivamente. Não foram escolhidas concentrações de efeito mais próximas dos extremos das curvas (como o CE_{10} e CE_{90}), pois estas porções das curvas tendem a apresentar uma distorção maior do que a porção mediana da mesma, levando a um erro maior na estimativa dos valores de CE (característica que ficou evidenciada nos limites de confiança mais amplos nos extremos das curvas estimadas). O erro padrão e os limites de confiança das estimativas de valores de CE foram definidos através do método “delta” implementado no pacote drc (RITZ et al., 2015).

2.3.3. Comparação das concentrações de efeito

A avaliação de aclimatação foi feita através de comparações das concentrações de efeito estimadas tanto para a temperatura de origem quanto para a temperatura de destino. Os procedimentos de análise e comparação dos parâmetros estimados dos modelos e dos valores estimados de CE foram feitos de forma similar ao apresentado em Jeske et al. (2009). As comparações de temperatura de origem foram

feitas entre curvas geradas para organismos provenientes de uma mesma temperatura de origem quando transferidos para temperaturas de destino diferentes (temperaturas-teste). Esta comparação possibilitou determinar o efeito da aclimação desenvolvimental na amplitude da variação da sensibilidade dos organismos expostos a temperaturas diferentes. Já as comparações de temperatura de destino foram feitas entre curvas geradas em cada temperatura de destino (a temperatura-teste) para organismos provenientes de diferentes temperaturas de origem. Esta comparação possibilita determinar o efeito da aclimação desenvolvimental na sensibilidade dos organismos expostos a uma mesma temperatura.

Os valores de CE foram comparados entre si para cada combinação de temperatura de origem e destino. A significância das diferenças entre os valores de CE foi determinada através da avaliação da sobreposição dos intervalos de confiança, sendo consideradas significantes diferenças nas quais os limites de confiança estimados não se sobrepuseram (PAYTON; GREENSTONE; SCHENKER, 2003). Além da comparação direta entre os valores de CE, a razão entre estes valores também foi calculada entre pares de temperatura de destino. A razão entre medidas de efeito é uma avaliação da “potência relativa” que a alteração de temperatura tem sobre a sensibilidade dos organismos, de maneira similar àquela utilizada para avaliar a potência de diferentes pesticidas sobre ervas daninhas (RITZ et al., 2006). A significância da diferença entre as razões também foi determinada através da avaliação da sobreposição dos limites de confiança. Para o parâmetro e (CE_{50}), foi feita uma comparação pareada das razões e diferenças deste parâmetro entre os modelos calculados através do teste-t considerando a hipótese nula de que a razão é igual a 1 ou que a diferença é igual a 0.

3. RESULTADOS

3.1. Ajustamento dos modelos

A forma dos modelos demonstrou uma variação marcada entre si tanto quando comparados tendo como referência as temperaturas de origem (**Figura 4**) como de destino (**Figura 5**). Entretanto, vários dos modelos ajustados demonstram similaridades tanto em seus parâmetros de inclinação como e (CE_{50}) (**Tabela 2**), de acordo com a referência de comparação (temperatura de origem ou destino).

Tabela 2 – Parâmetros estimados dos modelos gerados para cada combinação de temperatura de origem e destino. Os valores são as estimativas dos parâmetros \pm erro padrão da estimativa ($p < 0,05$, todas as estimativas).

T°C Origem	T°C Destino	Inclinação	e (CE_{50} g/L)
20	25	-8,7 \pm 1,11	1,36 \pm 0,02
20	30	-11,97 \pm 4,48	0,99 \pm 0,01
20	20	-9,23 \pm 1,43	1,52 \pm 0,02
25	20	-12,39 \pm 2,16	1,78 \pm 0,04
25	30	-3,82 \pm 0,5	0,69 \pm 0,02
25	25	-10,72 \pm 1,75	1,44 \pm 0,02
30	20	-13,94 \pm 3,07	1,7 \pm 0,03
30	25	-9,12 \pm 1,03	1,58 \pm 0,02
30	30	-4,08 \pm 0,33	0,91 \pm 0,02

3.1.1. Comparação dos modelos tendo como referência a temperatura de origem

A inclinação dos modelos gerados para a temperatura de origem 20°C não foram significativamente diferentes entre si (ANOVA, $F=0,463$, $p=0,63$), mas foram significativamente diferentes entre os modelos gerados para 25°C (ANOVA, $F=20$, $p < 0,001$) e 30°C (ANOVA, $F=30$, $p < 0,001$) (**Figura 4**). A comparação dos valores de e (CE_{50}) é apresentada na seção “Razão das concentrações de efeito”.

Para os organismos com origem a 25°C, a razão entre as inclinações dos modelos de temperatura de destino de 20°C/25°C não foi significativamente diferente de 1 (razão 1,15 \pm 0,23, $t=0,68$, $p=0,5$), mas foi significativamente diferente de 1 para as outras temperaturas (20°C/30°C=3,24 \pm 0,77, $t=2,88$, $p < 0,01$; 30°C/25°C=0,36 \pm 0,09, $t=-7,17$, $p < 0,0001$). Para os organismos com origem à 30°C, a razão entre as inclinações dos modelos de temperatura de destino de 20°C/25°C não foi significativamente

diferente de 1 (razão $1,53 \pm 0,28$, $t=1,9$, $p=0,06$), mas foi significativamente diferente de 1 para as outras temperaturas ($20^\circ\text{C}/30^\circ\text{C}=3,41 \pm 0,54$, $t=4,5$, $p<0,001$; $25^\circ\text{C}/30^\circ\text{C}=2,24 \pm 0,38$, $t=3,24$, $p<0,01$).

3.1.2. Comparação dos modelos tendo como referência a temperatura de destino

A inclinação dos modelos gerados para a temperatura de destino 20°C e 25°C não foram significativamente diferentes entre si (ANOVA, 20°C : $F=1,94$, $p=0,15$; 25°C : $F=0,57$, $p=0,56$), mas foram significativamente diferentes entre os modelos gerados para 30°C (ANOVA, $F=11,26$, $p<0,001$) (**Figura 5**). As razões das inclinações entre as curvas geradas para as temperaturas destino de 20°C e 25°C não foram significativamente diferentes de 1. A razão das inclinações das curvas geradas para a temperatura destino 30°C foram significativamente diferentes de 1 somente para as razões $20^\circ\text{C}/25^\circ\text{C}$ (razão $3,13 \pm 0,97$, $t=2,2$, $p<0,05$) e $20^\circ\text{C}/30^\circ\text{C}$ (razão $2,93 \pm 0,75$, $t=2,59$, $p<0,05$). A comparação dos valores de e (CE_{50}) é apresentada na seção “Razão das concentrações de efeito”.

3.2. Comparação das concentrações de efeito

3.2.1. Comparação das concentrações de efeito tendo como referência a temperatura de origem

Os valores de e (CE_{50}) foram significativamente diferentes para os modelos de temperatura de origem 20°C (ANOVA, $F=166,4$, $p<0,001$), 25°C (ANOVA, $F=194,4$, $p<0,001$) e 30°C (ANOVA, $F=271$, $p<0,001$) (**Figura 4**). Todos os valores de CE_{25} , CE_{50} e CE_{75} de organismos de diferentes temperaturas de origem sofreram uma tendência de redução com o aumento das temperaturas de destino (**Figura 6**). As sobreposições dos limites de confiança sugerem que os valores de CE_{25} , CE_{50} e CE_{75} para organismos provenientes de diferentes temperaturas de origem foram significativamente diferentes em cada temperatura de destino. A única exceção foi para organismos originários de 30°C , cujos valores de CE_{75} a 20°C e 25°C foram similares.

3.2.2. Comparação das concentrações de efeito tendo como referência a temperatura de destino

Os valores de e (CE_{50}) foram significativamente diferentes para os modelos de todas as temperaturas de destino (ANOVA, 20°C: $F=12,66$, $p<0,001$; 25°C: $F=23,4$, $p<0,001$; 30°C: $F=38,9$, $p<0,001$) (**Figura 5**). A variação dos valores de CE_{25} , CE_{50} e CE_{75} estimados para organismos provenientes de diferentes temperaturas de origem foi diferente nas três temperaturas de destino (**Figura 7**).

Para a temperatura de destino de 25°C, as sobreposições dos limites de confiança sugerem que os valores de CE_{25} , CE_{50} e CE_{75} para organismos provenientes das temperaturas de origem 20°C e 25°C não foram significativamente diferentes. Entretanto os valores de CE foram significativamente superiores em organismos provenientes de 30°C em comparação àqueles provenientes de 25°C e 20°C para a temperatura de destino de 25°C.

Para a temperatura de destino de 20°C, os valores de CE foram menores para os organismos provenientes de 20°C em comparação àqueles provenientes de 25°C e 30°C, e não foram significativamente diferentes entre organismos de origem 25°C e 30°C. A única exceção foi a estimativa de CE_{75} , que não foi diferente entre organismos provenientes de 20°C e 30°C.

Para a temperatura de destino de 30°C, os valores de CE foram menores em organismos provenientes de 25°C em comparação aos organismos provenientes de 20°C e 30°C. Os valores de CE_{25} e CE_{50} foram diferentes para organismos provenientes de 20°C e 30°C, sendo maiores nos organismos de origem à 20°C. Já o CE_{75} não foi significativamente diferente para organismos provenientes de 20°C e 30°C.

3.3. Razão das concentrações de efeito

3.3.1. Comparação das razões tendo como referência a temperatura de origem

A razão entre os valores de e (CE_{50}) entre os modelos gerados para cada temperatura de destino foi significativamente diferente de 1 para organismos provenientes de 20°C, 25°C e 30°C.

Tabela 3 – Razões das estimativas de e (CE_{50}) entre as três temperaturas de destino para organismos provenientes de cada temperatura de origem. Os valores são a razão \pm o erro padrão da estimativa. Os asteriscos indicam a significância da diferença das razões para 1 (teste-t, níveis de significância * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

		Temperatura de origem		
		20°C	25°C	30°C
Temperaturas de destino	$\frac{25^\circ\text{C}}{30^\circ\text{C}}$	$= 1,37 \pm 0,05$ ***	$\frac{20^\circ\text{C}}{30^\circ\text{C}} = 2,59 \pm 0,17$ ***	$\frac{20^\circ\text{C}}{25^\circ\text{C}} = 1,07 \pm 0,03$ **
	$\frac{25^\circ\text{C}}{20^\circ\text{C}}$	$= 0,90 \pm 0,04$ *	$\frac{25^\circ\text{C}}{20^\circ\text{C}} = 1,23 \pm 0,03$ ***	$\frac{20^\circ\text{C}}{30^\circ\text{C}} = 1,86 \pm 0,08$ ***
	$\frac{30^\circ\text{C}}{20^\circ\text{C}}$	$= 0,66 \pm 0,03$ ***	$\frac{30^\circ\text{C}}{25^\circ\text{C}} = 0,48 \pm 0,03$ ***	$\frac{25^\circ\text{C}}{30^\circ\text{C}} = 1,72 \pm 0,08$ ***

3.3.2. Comparação das razões tendo como referência a temperatura de destino

Para os organismos na temperatura de destino 20°C, a razão entre os valores de e (CE_{50}) foi significativamente diferente de 1 para os modelos dos organismos de todas as temperaturas de origem. Para os organismos na temperatura de destino 25°C, a razão entre os valores de e (CE_{50}) dos modelos dos organismos de temperatura de origem 20°C/25°C não foi significativamente diferente de 1, mas foi significativamente diferente de 1 para as outras temperaturas de origem. Para os organismos na temperatura de destino 30°C, a razão entre os valores de e (CE_{50}) dos modelos dos organismos de temperatura de origem 20°C/30°C não foi significativamente diferente de 1, mas foi significativamente diferente de 1 para as outras temperaturas.

Tabela 4 – Razões das estimativas de e (CE_{50}) entre as três temperaturas de origem em cada temperatura de destino. Os valores são a razão \pm o erro padrão da estimativa. Os asteriscos indicam a significância da diferença das razões para 1 (teste-t, níveis de significância * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

		Temperatura de destino		
		20°C	25°C	30°C
Temperaturas de origem	$\frac{30^\circ C}{25^\circ C}$	$= 0,96 \pm 0,02$ *	$\frac{20^\circ C}{30^\circ C} = 0,87 \pm 0,03$ ***	$\frac{20^\circ C}{25^\circ C} = 1,45 \pm 0,09$ ***
	$\frac{25^\circ C}{20^\circ C}$	$= 1,17 \pm 0,04$ ***	$\frac{20^\circ C}{25^\circ C} = 0,94 \pm 0,03$ ^{NS}	$\frac{20^\circ C}{30^\circ C} = 1,08 \pm 0,05$ ^{NS}
	$\frac{30^\circ C}{20^\circ C}$	$= 1,12 \pm 0,04$ **	$\frac{30^\circ C}{25^\circ C} = 1,09 \pm 0,02$ **	$\frac{25^\circ C}{30^\circ C} = 0,75 \pm 0,06$ ***

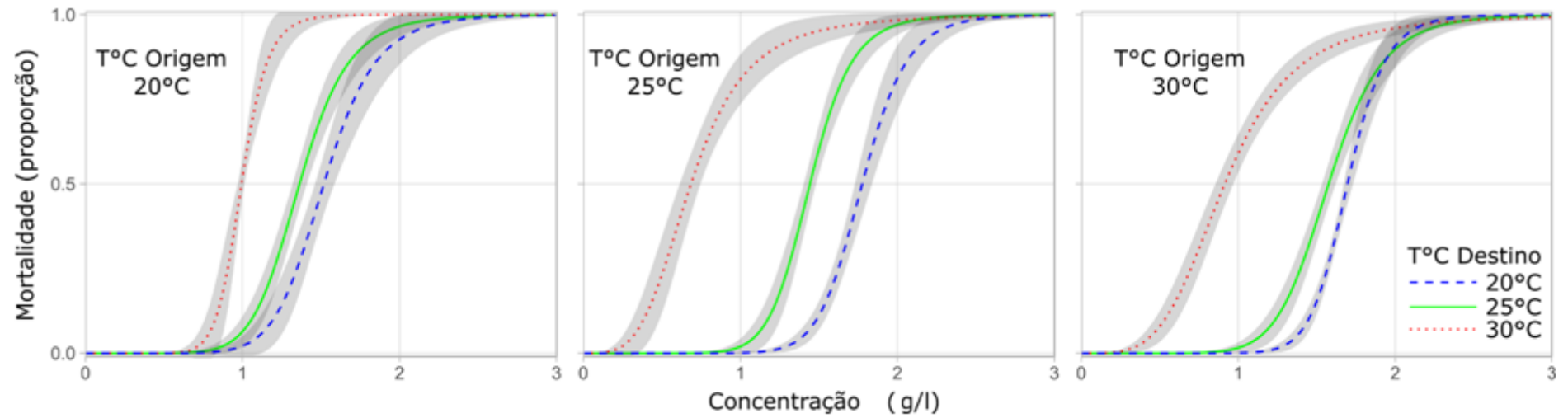


Figura 4 – Relação entre mortalidade e concentração de NaCl para organismos de cada temperatura de origem quando transferidos para cada temperatura de destino.

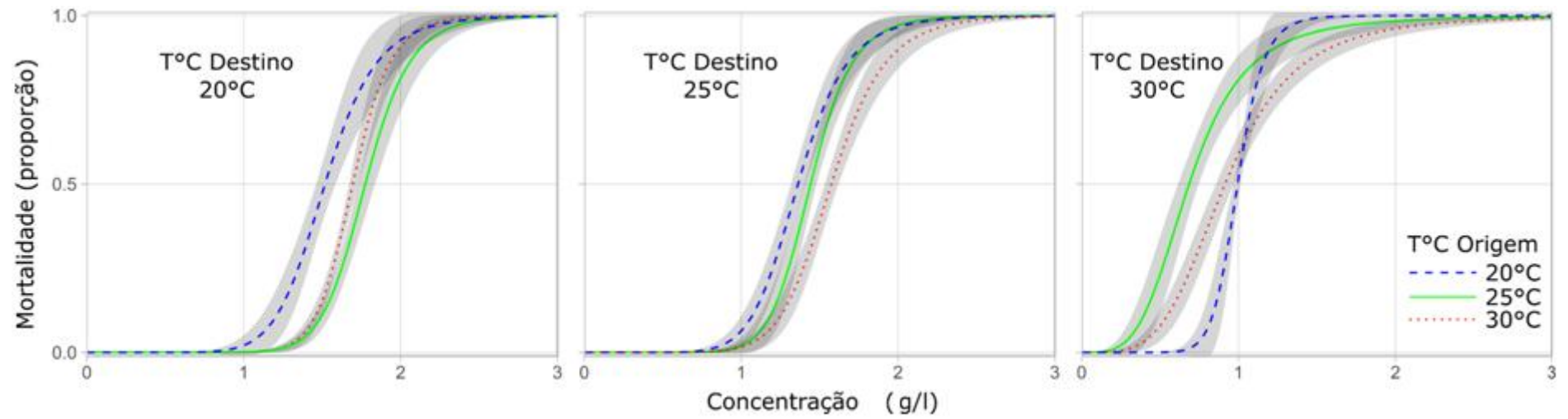


Figura 5 – Relação entre mortalidade de *C. silvestrii* e concentração de NaCl em cada temperatura de destino para organismos provenientes de diferentes temperaturas.

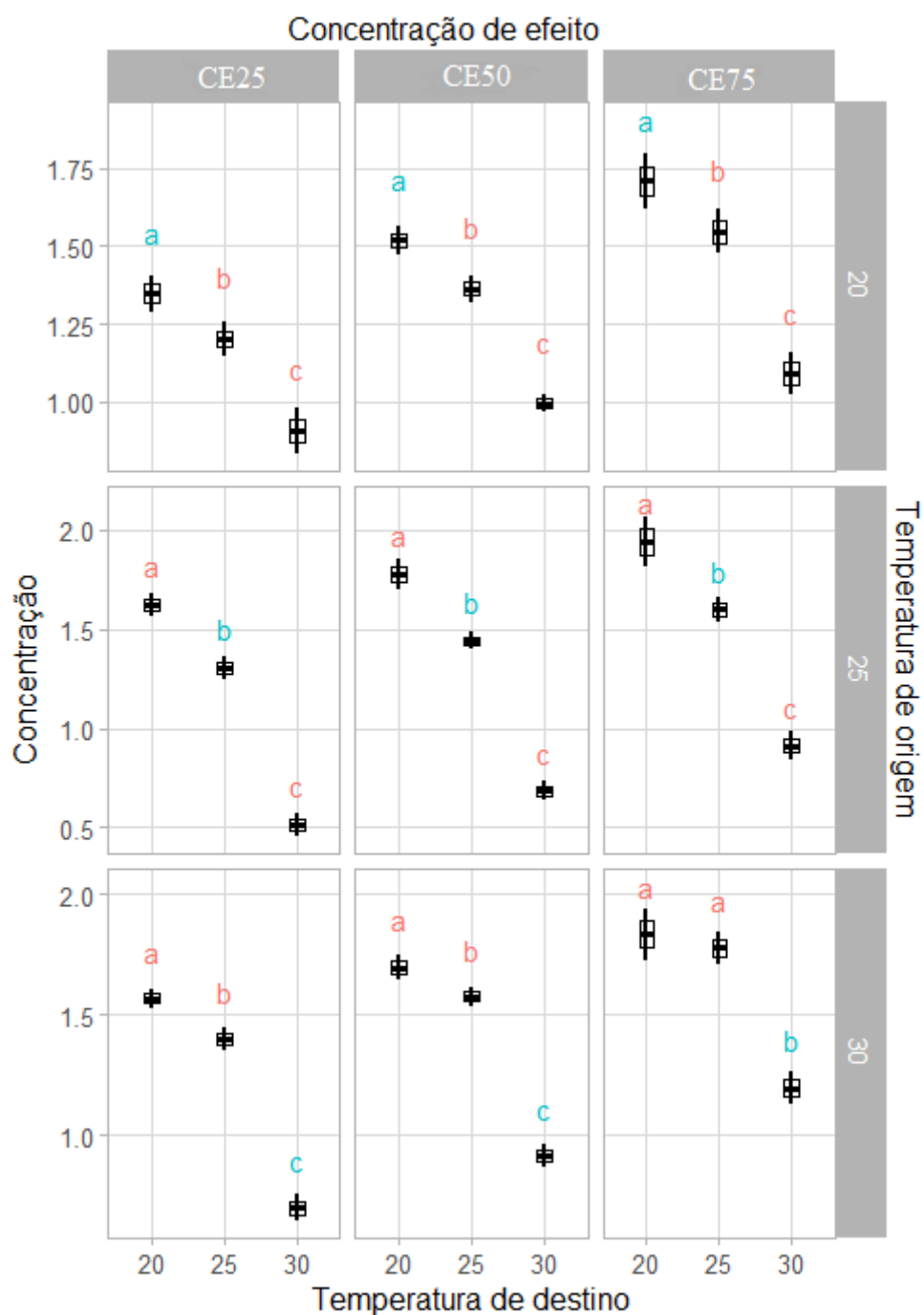


Figura 6 – Comparação das concentrações de efeito (CE_{25} , CE_{50} e CE_{75}) em três diferentes temperaturas de destino para organismos provenientes de três temperaturas de origem diferentes. A caixa indica o valor médio e o erro da média, e a barra vertical indica os limites mínimo e máximo das estimativas dos modelos. Letras diferentes indicam que as estimativas são significativamente diferentes. As letras azuis indicam os testes onde as temperaturas de origem e destino foram iguais.

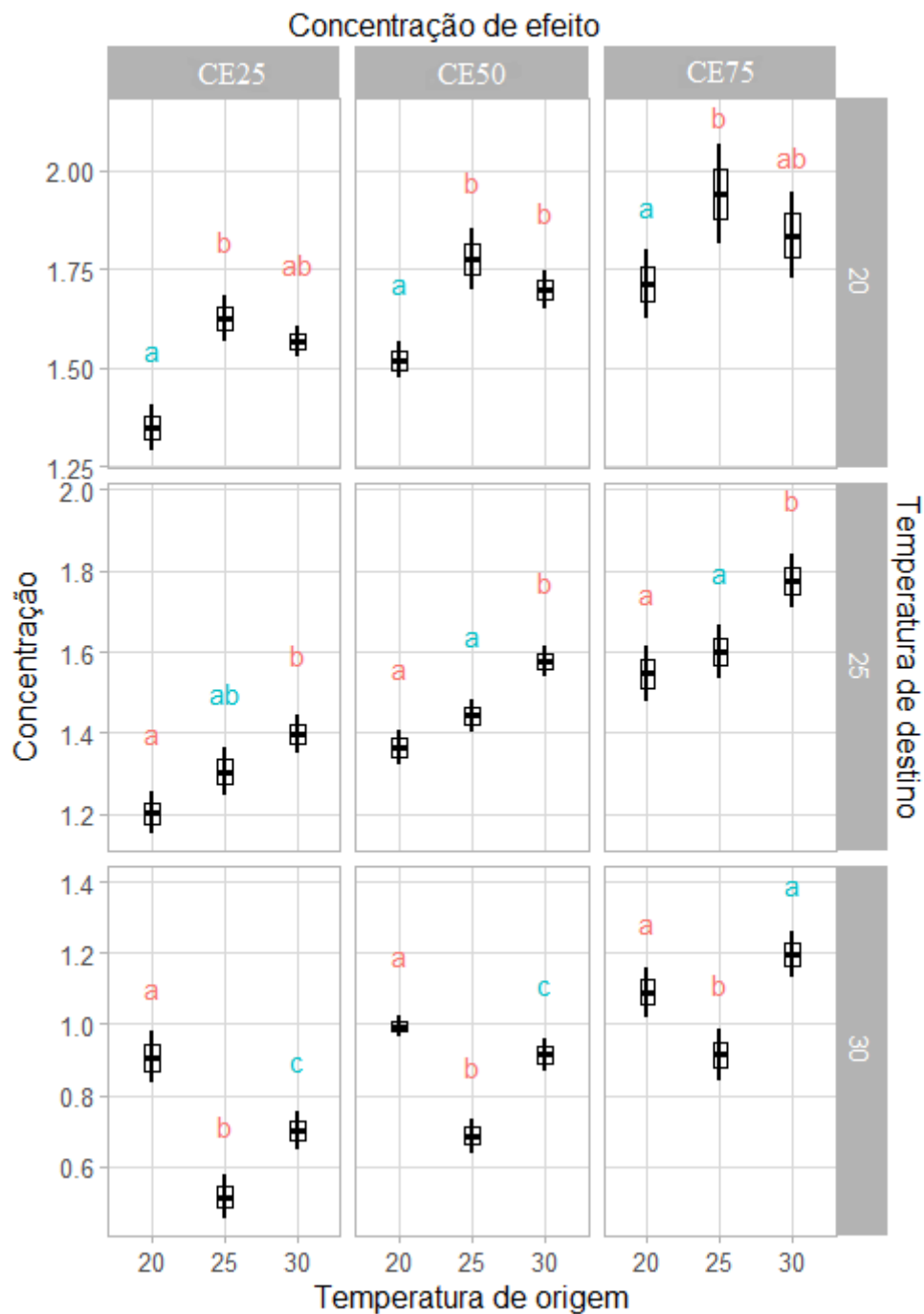


Figura 7 – Comparação das concentrações de efeito (CE_{25} , CE_{50} e CE_{75}) estimadas em três temperaturas de destino para organismos de três diferentes temperaturas de origem. A caixa indica o valor médio e o erro da média, e a barra vertical indica os limites mínimo e máximo das estimativas dos modelos. Letras diferentes indicam que as estimativas são significativamente diferentes. As letras azuis indicam os testes onde as temperaturas de origem e destino foram iguais.

4. DISCUSSÃO

4.1. Toxicidade termo-dependente de NaCl para *Ceriodaphnia silvestrii*

Os resultados demonstraram que a temperatura tem um efeito significativo na toxicidade de NaCl para o Cladóceros *C. silvestrii*. A tendência geral observada para organismos provenientes das três temperaturas de origem foi a de um aumento da toxicidade de NaCl com o aumento da temperatura de destino (**Figura 6**). Este resultado corrobora o efeito observado para diversos organismos aquáticos, para os quais a toxicidade a contaminantes tende a aumentar com o aumento da temperatura (**Tabela 1**). Em cladóceros, uma relação positiva entre a toxicidade e temperatura é comumente observada, como por exemplo, *Daphnia magna* exposta à cádmio (LEWIS; HORNING, 1991; HEUGENS et al., 2003), níquel (FERREIRA et al., 2010), cromo (MARTÍNEZ-JERÓNIMO; MARTÍNEZ-JERÓNIMO; ESPINOSA-CHÁVEZ, 2006), dodecil sulfato de sódio (SDS) (LEWIS; HORNING, 1991) e à diversos fármacos (KIM et al., 2010); *Daphnia pulex* exposta ao cobre (BOECKMAN; BIDWELL, 2006), ao SDS (LEWIS; HORNING, 1991) e a microcistina (HIETALA; LAURÉN-MÄÄTTÄ; WALLS, 1997); *Ceriodaphnia dubia* exposta ao clorobenzeno, fenol, dietanolamina e etilenoglicol (COWGILL; TAKAHASHI; APPLGATH, 1985) e ao etanol (TAKAHASHI; COWGILL; MURPHY, 1987); *Moina irrasa* exposta à cobre, cádmio e zinco (ZOU; BU, 1994); *Moina macropa* exposta ao cobre (NANDINI; PICAZO-PAEZ; SARMA, 2007); e *Simocephalus vetulus* exposto ao pentaclorofenol (WILLIS; LING; CHAPMAN, 1995).

As informações referentes à avaliação do efeito da temperatura sobre a toxicidade presentes na literatura são derivadas de experimentos com uma metodologia relativamente parecida, onde, em geral, é inicialmente estabelecido um período de aclimação dos organismos-teste às diferentes temperaturas por mais de uma geração, constituindo uma aclimação multi-geracional (e.g LEWIS; HORNING, 1991). No caso dos Cladocera, a aclimação geralmente consiste em manter cultivos dos organismos em temperaturas diferentes por um determinado período de tempo antes da avaliação de toxicidade. Após este período de aclimação, testes de toxicidade são executados na mesma temperatura em que os organismos foram mantidos ou cultivados (e.g TSUI; CHU, 2003). Isto seria o equivalente neste trabalho aos resultados

observados para organismos de mesma temperatura de origem e destino (CE_{50} da **Tabela 2** para testes de temperatura de origem e destino iguais: $20^{\circ}C=1,52\pm 0,02$; $25^{\circ}C=1,44\pm 0,02$; $30^{\circ}C=0,91\pm 0,02$). Comparando-se apenas este resultado com o que é reportado na literatura (**Tabela 1**), os resultados deste trabalho confirmam a tendência de que a temperatura promove um aumento na sensibilidade à contaminantes em Cladocera.

Os resultados apresentados neste trabalho também demonstram que o aumento observado na toxicidade não é linear. Este efeito não linear fica claro quando se observa que a diferença de CE_{50} é maior entre as temperaturas de $25^{\circ}C$ e $30^{\circ}C$ do que de $20^{\circ}C$ e $25^{\circ}C$. A relação não linear entre toxicidade e temperatura é geralmente observada em estudos nos quais mais de duas temperaturas teste são utilizadas. Por exemplo, HEUGENS ET AL. (2003) observou o aumento na toxicidade de Cádmio para *Daphnia magna* ao longo de um gradiente de nove temperaturas teste entre $10^{\circ}C$ e $35^{\circ}C$, no qual a redução foi mais acentuada de $10^{\circ}C$ à $20^{\circ}C$, e em temperaturas maiores a CE_{50} não foi significativamente diferente. Boeckman e Bidwell (2006) observaram que a sensibilidade de *Daphnia pulex* ao cobre a $10^{\circ}C$ e $20^{\circ}C$ foi superior do que aquela observada para $30^{\circ}C$. *Daphnia magna* exposta à acetaminofeno, enrofloxacina e clortetraciclina demonstrou uma toxicidade menor a $15^{\circ}C$ do que a $21^{\circ}C$ e $25^{\circ}C$ (KIM et al., 2010).

A razão pela qual a relação entre sensibilidade e temperatura geralmente não é linear para *C. silvestrii* e para outros cladóceros ainda não é bem compreendida. Apesar de comumente observada em testes de toxicidade com Cladocera, a relação não linear entre sensibilidade e temperatura não é discutida na maioria dos estudos. Além disso, a relação não linear entre a sensibilidade e temperatura não pode ser observada em trabalhos onde apenas duas temperaturas teste foram utilizadas (e.g. COWGILL; TAKAHASHI; APPLGATH, 1985; TAKAHASHI; COWGILL; MURPHY, 1987; LEWIS; HORNING, 1991; WILLIS; LING; CHAPMAN, 1995; RATUSHNYAK; ANDREEVA; TRUSHIN, 2005; MARTÍNEZ-JERÓNIMO; MARTÍNEZ-JERÓNIMO; ESPINOSA-CHÁVEZ, 2006; NANDINI; PICAZO-PAEZ; SARMA, 2007). Uma hipótese levantada na literatura é a de que a relação não linear entre temperatura e sensibilidade pode estar relacionada à amplitude de tolerância termal do organismo – quando são expostos a temperaturas fora da amplitude de tolerância termal ótima, o

efeito tóxico pode ser mais acentuado (BAO; KOUTSAFTIS; LEUNG, 2008). Este efeito foi observado, por exemplo, para o copépodo *Tigriopus japonicus* exposto ao cobre (BAO; KOUTSAFTIS; LEUNG, 2008), e provavelmente explica o aumento rápido da toxicidade de cádmio para *Daphnia magna* quando exposta à temperaturas acima de 20°C (HEUGENS et al., 2003). *Ceriodaphnia silvestrii* é um cladócero tropical amplamente distribuído em ecossistemas de água doce brasileiros de ambientes tropicais e sub-tropicais, reportado em estados como São Paulo, Goiás e Rio Grande do Sul (ELMOOR-LOUREIRO, 1997; ROCHA, O; GUNTZEL, A. M., 2000). A amplitude de tolerância termal de *C. silvestrii* ainda é desconhecida, entretanto estudos laboratoriais e cultivos desta espécie demonstram que ela apresenta ótimo desenvolvimento e reprodução a 25°C (MELÃO, 1999; SANTOS; MELÃO; LOMBARDI, 2006). Considerando a relação entre sensibilidade e temperatura observada para *C. silvestrii*, é provável que a temperatura de 30°C esteja próxima do limiar máximo da amplitude de tolerância termal desta espécie, o que justificaria a sensibilidade muito maior observada para esta temperatura.

4.2. Efeito da aclimação desenvolvimental sobre a toxicidade de NaCl

Pouco se sabe sobre o efeito da aclimação sobre a sensibilidade de espécies a contaminantes. Neste trabalho foi observado que, quando *C. silvestrii* passa por aclimação desenvolvimental em diferentes temperaturas, organismos aclimatados a temperaturas mais altas apresentaram em geral uma menor sensibilidade relativa quando transferidos para temperaturas mais baixas (**Figura 7, Tabela 4**). Quando animais provenientes de 25°C e 30°C foram expostos à NaCl a 20°C, estes apresentaram valores de CE maiores do que àqueles observados para organismos aclimatados à 20°C. Quando animais aclimatados à 30°C foram transferidos para 25°C, estes apresentaram CE superior àqueles animais provenientes de 20°C e 25°C para esta mesma temperatura de destino. O mesmo não foi observado para a temperatura de destino de 30°C: organismos provenientes de 20°C apresentaram toxicidade inferior àqueles aclimatados a 30°C, e àqueles organismos provenientes de 25°C apresentaram toxicidade superior àquela dos organismos aclimatados a 30°C. No único outro trabalho no qual neonatas de Cladocera foram transferidas para temperaturas diferentes de suas mães de forma similar ao que foi feito nos experimentos deste estudo observou-se que a toxicidade do cromo para *Daphnia magna* não teve relação com as temperaturas de cultivo das mães (20°C e

25°C) (MARTÍNEZ-JERÓNIMO; MARTÍNEZ-JERÓNIMO; ESPINOSA-CHÁVEZ, 2006). A diferença entre o observado neste estudo e o reportado em Martínez-Jerónimo; Martínez-Jerónimo; Espinosa-Chávez (2006) pode estar relacionada com o fato de que a amplitude de temperatura testada com *C. silvestrii* (10°C) foi superior àquela testada com *D. magna* (5°C). A amplitude maior de temperatura no presente estudo pode ter colocado *C. silvestrii* mais próxima dos seus extremos de tolerância, aumentando a probabilidade de observar um efeito. Isto pode ser verdade, pois diferenças não significativas foram observadas entre algumas CE₅₀ em amplitudes de 5°C em nosso estudo (**Figura 7**).

Os resultados deste experimento sugerem que a aclimação desenvolvimental à temperaturas elevadas teve um efeito protetivo nos organismos quando estes foram expostos subsequentemente à temperaturas mais baixas. Infelizmente avaliações deste tipo não foram feitas para cladóceros até o momento, porém efeitos similares foram observados em estudos que avaliaram o efeito de choque térmico sobre a sensibilidade de espécies deste grupo. Por exemplo, *Daphnia magna* cultivada a 20°C e exposta por um período de 4 horas à temperatura de 34°C apresentou uma tolerância maior quando exposta a uma concentração letal de Malathion em comparação aos organismos provenientes de 20°C ou que foram expostos por 4 horas à 30°C, 32°C ou concentrações subletais de Malathion (BOND; BRADLEY, 1995, 1997). Acredita-se que este efeito protetivo no nível celular possa estar relacionado com a formação de complexos protéicos de alta massa molecular com a enzima glutationa S-transferase, que é associada ao efeito do choque térmico, quando os organismos são expostos a altas temperaturas (BOND; BRADLEY, 1997). A formação destes complexos protéicos, conhecidos como proteínas de choque térmico (HSP em inglês), é bem estudada na literatura (LINDQUIST; CRAIG, 1988). Além de conferirem um efeito protetivo em condições de estresse térmico, as HSP estão relacionadas também a outras condições de estresse, como a exposição a contaminantes como pesticidas (BAGCHI; BHATTACHARYA; STOHS, 1996). Apesar do efeito protetivo que a aclimação desenvolvimental ofereceu à *C. silvestrii*, não é possível assumir que esta resposta seja resultante da produção de HSP como observado em condições de estresse térmico. Isto por que o efeito protetivo oferecido por proteínas de choque térmico é rápido e temporário, enquanto os efeitos protetivos oferecidos pela termo-aclimação são lentos

e permanentes (KORHONEN; LAGERSPETZ, 1996). Sendo assim, os processos fisiológicos e bioquímicos envolvidos em prover tal efeito protetivo podem não ser os mesmos. Somente estudos comparando os efeitos de choque térmico e termo-aclimatação poderão elucidar esta questão.

Além da alteração dos valores de CE_{50} , outro resultado observado neste estudo que demonstra o efeito da aclimatação é a alteração da inclinação dos modelos (**Tabela 2**). Quanto menor o valor da inclinação do modelo (quanto mais negativo) mais acentuada é a inclinação da curva. Quanto maior o valor de inclinação (mais próximo de zero), mais suave é a curva do modelo. Este valor de inclinação tem uma significância importante para a compreensão da distribuição de sensibilidade na população estudada. Como a curva do modelo tem sua inflexão no valor de e (CE_{50}), a inclinação pode indicar como é a distribuição de sensibilidade nas frações mais e menos sensíveis da população. Quando comparamos as inclinações dos modelos gerados para cada temperatura de destino (**Figura 5**), verificamos que para as temperaturas de destino de 20°C e 25°C não houve diferença significativa entre as inclinações. Isto sugere que a distribuição de sensibilidade na população alterou de forma homogênea em relação à temperatura de destino. Isto pode ser confirmado com o padrão similar de distribuição dos valores de CE_{25} (as frações mais sensíveis da população), CE_{75} (frações menos sensíveis da população) e CE_{50} (**Figura 7**). Entretanto, as inclinações mais acentuadas dos modelos das populações transferidas de 20°C e 25°C para 30°C indicam que a sensibilidade das frações mais e menos sensíveis da população ficaram mais próximas da sensibilidade mediana (CE_{50}). Já os organismos que cresceram a 30°C apresentaram uma distribuição de sensibilidade mais ampla, com inclinação da curva mais suave e valores de CE_{25} e CE_{75} mais afastados do CE_{50} .

A variação da inclinação dos modelos pode ser um indicador que o processo de aclimatação desenvolvimental pode não ser homogêneo dentro de uma mesma população ou coorte. Indivíduos expostos a uma temperatura de 30°C podem estar sob uma condição de estresse maior do que àqueles expostos a 20°C e 25°C. Se o processo de aclimatação não for homogêneo dentro da população, haverá diferenças em termos de aclimatação individual à condição de estresse, com indivíduos aclimatando de forma mais eficiente e outros de forma menos eficiente ao longo do seu desenvolvimento. Se considerarmos que a sensibilidade de indivíduos que se aclimataram de forma mais

eficiente será menor do que àqueles que se aclimataram de forma menos eficiente durante seu desenvolvimento, o resultado seria um modelo no qual a amplitude de sensibilidade na população seria maior, assim como observado para organismos que desenvolveram a 30°C. A não homogeneidade da aclimação individual dentro da população pode estar associada a diferenças genéticas e fenotípicas dos organismos. Durante o processo de adaptação à nova condição ambiental, indivíduos cuja aclimação foi menos efetiva poderão ser eliminados da população. Estudos multigeracionais com Cladocera têm demonstrado que populações alteram sua sensibilidade em relação a um estressor ao longo das gerações (e.g LOUREIRO et al., 2015). Neste estudo, o período de aclimação desenvolvimental foi associado apenas a uma geração, estudos transgeracionais seriam necessários para confirmar que os resultados obtidos indicam o início de um processo de adaptação.

5. CONCLUSÕES

- A temperatura tem um efeito significativo na toxicidade de NaCl para *C. silvestrii*, sendo que a tendência geral foi uma relação positiva entre estas duas variáveis.
- A temperatura tem um efeito não linear sobre a sensibilidade de *C. silvestrii* ao NaCl.
- A inclinação das curvas de sensibilidade alterou de acordo com a temperatura de aclimação desenvolvimental.
- A aclimação desenvolvimental às temperaturas mais altas conferiu um efeito protetivo para *C. silvestrii* quando exposta ao NaCl para temperaturas mais baixas.

Capítulo III Avaliação do efeito da aclimação sobre a toxicidade termo-dependente do herbicida AKB[®] para o cladóceros tropical *Ceriodaphnia silvestrii*

Resumo: Através das previsões do crescimento populacional e do aumento da demanda por recursos naturais, um dos ramos que terá que se expandir é a agricultura. O Brasil está entre os grandes exportadores agrícolas e também entre os maiores consumidores de agroquímicos no mundo. Como consequência da intensa atividade deste setor cita-se principalmente a contaminação ambiental por pesticidas, que trás graves consequências para o equilíbrio dos ecossistemas globais, podendo ser potencializada no cenário atual de alterações climáticas. Nesta perspectiva, são crescentes os estudos que avaliam a influência de fatores ambientais na toxicidade destes xenobióticos, dentre eles, a temperatura é o principal fator considerado. No Brasil, o ingrediente ativo mais utilizado nas formulações de agroquímicos é o Glifosato. Sendo assim, é conveniente avaliar a sua influência na homeostase da vida aquática. Sem subestimar a capacidade dos organismos de lidar com o estresse ambiental provocado por estes contaminantes, o objetivo deste capítulo foi avaliar o efeito da aclimação reversível e desenvolvimental sobre a toxicidade termo-dependente de herbicida a base de Glifosato para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*. Para isso, testes de toxicidade aguda foram realizados, tendo como base a norma NBR 13373:2016 (ABNT, 2016), utilizando como formulação teste o herbicida AKB[®] em três temperaturas (20°C, 25°C e 30°C) através de duas condições de aclimação para cada uma delas. O *endpoint* foi a imobilidade dos organismos, sendo que a toxicidade e os efeitos da aclimação foram analisados no programa R 3.3.2. Os resultados demonstraram que a temperatura tem um efeito significativo na toxicidade do herbicida para *Ceriodaphnia silvestrii*. Sendo que este efeito foi dependente do tipo de aclimação ao qual os organismos estavam expostos. Na aclimação reversível, a toxicidade apresentou um padrão de resposta em forma de U, tendo uma menor toxicidade na temperatura ótima do organismo (25°C). Na aclimação desenvolvimental, a relação encontrada foi termo-dependente positiva, no entanto, os organismos demonstraram ser mais sensíveis quando aclimatados a 20°C do que a 30°C. Estes resultados demonstram a importância de não se fazer generalizações dos efeitos da temperatura na toxicidade de xenobióticos, e também a relevância da inclusão da aclimação nas avaliações de riscos ambientais em um cenário de alterações climáticas.

1. INTRODUÇÃO

Segundo previsão da Organização das Nações Unidas, a população mundial chegará aos 11 bilhões até 2100, sendo que em 2015 já alcançou os 7,3 bilhões de pessoas (ONU, 2015). Esse crescimento populacional demandará aumento na produção de alimentos, captação e tratamento de água potável, além da necessidade de recursos naturais como matéria prima e fontes alternativas de energia. Sobre a demanda na produção de alimentos, espera-se que aumente em 70% até a metade do século. Com isso, um dos ramos que terá que expandir fortemente é a agricultura, principalmente em países em desenvolvimento como o Brasil (FAO, 2009).

Por causa do clima tropical e subtropical, o Brasil possui a vantagem de permitir que a produção agrícola ocorra o ano todo. Além disso, o custo do plantio é menor que em países de clima temperado favorecendo a exportação. As previsões até o fim do século afirmam que regiões com potencial agrícola e detentoras de uma gama de espécies nativas podem ser exploradas, como exemplo cita-se, a Amazônia, as regiões do Cerrado e do Pantanal (LAURANCE; SAYER; CASSMAN, 2014). Com a expansão agrícola, grandes sistemas de captação de água também serão necessários tanto para irrigação como para produção de energia. Na América do Sul, 150 usinas hidrelétricas estão sendo planejadas apenas na região andina amazônica (FINER; JENKINS, 2012).

Como consequência, os ecossistemas aquáticos dessas regiões terão fluxos hidrológicos alterados, aumento da temperatura e redução dos níveis de oxigênio dissolvido, aumento da carga de sedimento e nutrientes provenientes do uso de fertilizantes e, principalmente, aumento no nível de poluentes no sistema, como os pesticidas (DUDGEON et al., 2006). Sob esse enfoque, os ecossistemas de água doce tropicais e subtropicais estão entre os mais ameaçados do planeta (LAURANCE; SAYER; CASSMAN, 2014), esta preocupação cresce ainda mais em um contexto de alterações climáticas que podem intensificar as consequências do crescimento das atividades agrícolas nos próximos anos.

Como visto no **capítulo I**, o Brasil é um dos grandes consumidores de agrotóxicos no mundo. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), mais de 50% dos produtos utilizados anualmente no país são herbicidas, sendo o Glifosato e seus sais os líderes disparados em comercialização (IBGE, 2012). Em 2014, as vendas

chegaram a quase 200 mil toneladas, consumo cinco vezes maior do que o segundo mais vendido, o princípio ativo 2,4D (IBAMA, 2014).

Desde 2008 existe a problemática da reavaliação deste princípio ativo pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que em 2013 após nota técnica elaborada pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) concluiu que as evidências de mutagenicidade, carcinogenicidade, toxicidade para reprodução e desenvolvimento e desregulação endócrina eram insuficientes para banir o produto. Porém, em 2015 a agência internacional do câncer colocou novamente o assunto em discussão fazendo com que a ANVISA reavaliasse a situação que está em análise desde fevereiro do ano passado (ANVISA, 2016).

Apesar das afirmações de que as informações sobre os danos que o Glifosato pode causar são insuficientes, diversos trabalhos exploram as consequências que ele pode causar com a exposição humana, as quais incluem efeitos crônicos gastrointestinais, renais, hepáticos, cardíacos, pulmonares e sanguíneos por ingestão (JR; SANTOS; RIBEIRO, 2002). Outra informação alarmante é que a exposição cutânea ao Glifosato pode contribuir para o Mal de Parkinson pela semelhança química com um co-fator associado ao sistema nervoso que tem relação com a memória e o aprendizado (ANADÓN et al., 2009). Benbrook (2016) apresenta um conjunto de referências que exploram os efeitos crônicos mais profundamente, além de uma revisão sobre seu uso a nível global demonstrando que a avaliação do potencial toxicológico do Glifosato deve ser reconsiderado especialmente em um cenário de alterações climáticas que pode propiciar mais exposição ao herbicida.

Devido a sua alta solubilidade em água (JR; SANTOS; RIBEIRO, 2002), o Glifosato é altamente susceptível ao transporte por escoamento superficial. O aumento das tempestades associado às mudanças climáticas pode colaborar para maior transferência desse tóxico para os corpos d'água. Assim, os primeiros a sofrer os impactos da combinação das alterações climáticas e substâncias antropogênicas como o Glifosato podem ser os organismos aquáticos. Citam-se os peixes, os invertebrados aquáticos, algas e plantas aquáticas, bactérias aquáticas e protozoários como organismos que sofrerão as consequências das alterações ambientais, pois estes já possuem estudos que comprovam os efeitos deletérios do Glifosato (LUIS; SOLANGE; MIR, 2011).

A partir das informações apresentadas sobre as modificações do uso da terra causadas pelo crescimento populacional e o alto consumo de produtos agrícolas vinculados, achou-se pertinente unir a avaliação de uma variável ambiental que será uma das principais influências das mudanças climáticas globais e um herbicida do princípio ativo mais utilizado em nível nacional e mundial.

Objetivo específico

Avaliar o efeito da aclimatação reversível e desenvolvimental sobre a toxicidade termo-dependente do herbicida AKB[®] para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Características do herbicida

O herbicida AKB[®] é indicado para o controle de ervas daninhas pós-emergentes da espécie *Brachiaria decumbens*. A aplicação é realizada na parte aérea das plantas (folhas) e a ação do princípio ativo vai até raiz provocando a morte da planta entre sete e dez dias. O produto adquirido para os testes é a formulação do herbicida para uso doméstico indicado para o controle das ervas daninhas em calçadas, jardins, parques e terrenos em geral. No rótulo, é informado que o herbicida é pronto para uso, sendo assim não é necessário o preparo de calda para diluir o produto (GRUPO KELLDRIN, 2016). Sobre a composição, a concentração do princípio ativo indicada pelo fabricante é de 0,96% de Glifosato não havendo informações sobre os ingredientes inertes contidos no produto.

2.2. Cultivo e sensibilidade dos organismos-teste

Assim como descrito no **capítulo 2**, cultivos contínuos de *Ceriodaphnia silvestrii* foram estabelecidos no laboratório tendo como base os procedimentos descritos na norma NBR 13373:2016 (ABNT, 2016). A água reconstituída utilizada como meio de cultivo tinha como características físicas e químicas pH entre 7,0 e 7,6, dureza de 40 a 48 mg CaCO₃.L⁻¹ e 25°C. O fotoperíodo foi de 16:8 claro/escuro. Como alimento utilizou-se a alga *Raphidocelis subcapitata* e complemento alimentar a base de ração de alevinos de peixe fermentada. Os organismos foram cultivados em béqueres de 1 Litro em uma densidade de até 70 organismos por litro. A renovação da água do cultivo foi realizada a cada dois dias.

Em cada etapa dos testes de toxicidade termo-dependente, testes de sensibilidade eram realizados em conjunto para verificar a condição dos cultivos para garantir a confiabilidade dos resultados. Os procedimentos foram baseados na norma NBR 13373:2016 (ABNT, 2016) utilizando como substância de referência o Cloreto de Sódio (NaCl). Os testes consistiam na exposição dos organismos a cinco concentrações do sal (0,6; 1,0; 1,3; 1,6 e 2,2 g/L) preparadas a partir de uma solução mãe de 10g/L e um controle em quatro réplicas, cada uma contendo cinco neonatas (<24hs). Como recipientes-teste utilizaram-se béqueres de vidro com 10 ml da solução teste. Os testes tiveram duração total de 48 horas, sem alimentação e fotoperíodo de 16:8 claro/escuro, tendo como *endpoint* a imobilidade dos organismos.

2.3. Testes de toxicidade

A avaliação da toxicidade termo-dependente de *C. silvestrii* ao herbicida AKB[®] foi realizada utilizando os mesmos procedimentos dos testes de sensibilidade com NaCl, com algumas alterações. Primeiramente, testes preliminares em escala logarítmica foram realizados para definir a CE₅₀ para o organismo-teste a 25°C. As diluições do herbicida nesta etapa foram realizadas diretamente na água utilizada nos testes. Os testes seguiram os padrões da norma 13373:2016 (ABNT, 2016). Os organismos foram expostos a cinco concentrações e um controle, com quatro réplicas contendo cinco neonatas cada (<24hs). Como recipientes-teste utilizaram-se béqueres de vidro com 10 ml da solução teste (**Figura 8**). Os testes tiveram duração total de 48 horas, sem alimentação e fotoperíodo de 16:8 claro/escuro. Ocorreram quatro baterias de testes com três repetições cada para encontrar a faixa ideal para o cálculo da CE₅₀.



Figura 8 – Aspecto geral dos testes realizados com o herbicida AKB[®]

2.3.1. Efeito da aclimação reversível sobre a toxicidade termo-dependente

Para testar o efeito da aclimação reversível na toxicidade termo-dependente do herbicida AKB[®] para *C. silvestrii*, foram realizados testes de toxicidade com neonatas nascidas em temperatura diferente daquela à qual foram expostas. Neonatas de até 24 horas de vida, nascidas de fêmeas mantidas a 25°C, foram submetidas a testes de toxicidade a 20°C e 30°C. Com exceção da temperatura, o delineamento experimental utilizado foi o mesmo que os testes padrão baseados na norma NBR 13373:2016 (ABNT, 2016). Cinco concentrações (25; 50; 100; 200 e 400 µl) foram estabelecidas após os testes preliminares preparadas a partir de solução mãe com 1% da concentração de Glifosato informada no produto comercial. A toxicidade aguda foi avaliada através do cálculo da CE₅₀ considerando o número de organismos imóveis após 48 horas de exposição. Apenas os testes com sobrevivida maior que 90% dos organismos no controle foram considerados (ABNT, 2016). Para verificar se a diferença de temperatura à qual os organismos foram expostos em cada tratamento contribuiu para um aumento da mortalidade, os organismos sobreviventes dos controles (sem Glifosato) de todos os tratamentos foram transferidos para suas respectivas temperaturas originais ao final dos testes, e acompanhados por um período de 24 horas após o término do experimento.

Durante este período, não foi observada a mortalidade de organismos tanto nos controles da temperatura de origem como nos controles das temperaturas teste transferidos para suas temperaturas originais, sugerindo que a transferência de temperatura não induziu um aumento na mortalidade dos organismos. O delineamento desta primeira etapa é o mesmo apresentado na **Figura 2**.

2.3.2. Efeito da aclimação desenvolvimental sobre a toxicidade termo-dependente

Com o objetivo de avaliar se a temperatura experimentada ao longo do desenvolvimento da fêmea altera a toxicidade termo-dependente de sua prole, 70 neonatas de fêmeas do cultivo padrão a 25°C foram transferidas para béqueres de 1L para temperaturas de 20°C e 30°C. Estas foram cultivadas seguindo as mesmas condições do cultivo já estabelecidas no laboratório e normatizadas pela ABNT (ABNT, 2016). O crescimento e a produção de neonatas foram acompanhados até a população do cultivo apresentar 10% das fêmeas iniciais. Os testes de toxicidade foram conduzidos com a 2ª até a 9ª ninhada dessas adultas, seguindo a mesma metodologia do teste de toxicidade reversível. O *endpoint* foi a imobilidade dos indivíduos e para cada teste foi calculada a CE₅₀ assim como nos outros testes realizados. O delineamento desta segunda etapa é o mesmo apresentado na **Figura 3**.

2.4. Análise de dados

Os resultados foram analisados seguindo o procedimento descrito no **Capítulo II**.

3. RESULTADOS

3.1. Ajustamento dos modelos

A forma dos modelos demonstrou uma variação mais marcada quando comparados tendo como referência as temperaturas de origem (**Figura 9**) do que quando comparados em relação à temperatura de destino (**Figura 10**). Os valores de e (CE₅₀) dos modelos ajustados tanto nas temperaturas de origem como de destino demonstram maiores diferenças entre si do que suas inclinações (**Tabela 5**).

Tabela 5 – Parâmetros estimados dos modelos gerados para cada combinação de temperatura de origem e destino. Os valores são as estimativas dos parâmetros \pm erro padrão da estimativa ($p < 0,05$, todas as estimativas).

T°C Origem	T°C Destino	Inclinação	e (CE ₅₀ µg/L)
20	25	-5,33±0,74	124,3±5,79
20	30	-2,51±0,29	90,8±6,37
20	20	-6,05±0,91	181,12±7,9
25	20	-3,21±0,36	123,2±7,43
25	30	-2,27±0,25	165,4±12,12
25	25	-4,25±0,56	224,7±10,6
30	20	-2,97±0,41	301,8±21
30	25	-6,52±0,95	252,7±11,7
30	30	-2,67±0,31	199,3±13,6

3.1.1. Comparação dos modelos tendo como referência a temperatura de origem

A inclinação dos modelos gerados para a temperatura de origem 20°C (ANOVA, $F=30,723$, $p=0$), 25°C (ANOVA, $F=14,744$, $p < 0,0001$) e 30°C (ANOVA, $F=23,27$, $p=0$) foram significativamente diferentes entre si. A comparação dos valores de e (CE₅₀) é apresentada na seção “Razão das concentrações de efeito”.

Para os organismos com origem à 20°C, a razão das inclinações dos modelos de temperatura de destino 20°C/25°C não foi significativamente diferente de 1 (razão 1,13±0,27, $t=0,50$, $p=0,6$), mas foi significativamente diferente de 1 para as razões entre as temperaturas de destino 20°C/30°C (razão 2,41±0,6, $t=2,34$, $p < 0,05$) e 25°C/30°C (razão 2,13±0,37, $t=3,09$, $p < 0,01$). Para os organismos com origem à 25°C, as razões das inclinações entre as temperaturas de destino 25°C/20°C (razão 1,32±0,34, $t=0,95$, $p=0,34$), 20°/30°C (razão 1,41±0,28, $t=1,49$, $p=0,14$) e 25°/30°C (razão 1,87±0,5, $t=1,75$, $p=0,08$) não foram significativamente diferentes de 1. Para os organismos com origem à 30°C, as razões das inclinações entre as temperaturas de destino 30°C/20°C (razão 0,9±0,24, $t=-0,43$, $p=0,7$) e 25°C/20°C (razão 2,1±0,7, $t=1,82$, $p=0,07$) não foram significativamente diferentes de 1, mas a razão 30°C/25°C (razão 0,41±0,1, $t=-6,22$, $p=0$) foi significativamente diferente de 1.

3.1.2. Comparação dos modelos tendo como referência a temperatura de destino

A inclinação dos modelos gerados para a temperatura de destino de 20°C foram significativamente diferentes entre si (ANOVA, $F=15,414$, $p=0$), porém não houveram diferenças entre as inclinações dos modelos gerados para a temperatura de destino de 25°C (ANOVA, $F=4,88$, $p=0,09$) e 30°C (ANOVA, $F=1,03$, $p=0,6$). A comparação dos valores de e (CE_{50}) é apresentada na seção “Razão das concentrações de efeito”. Para a temperatura de destino de 20°C, as razões das inclinações das curvas geradas para organismos das temperaturas de origem 20°C/25°C (razão $1,88\pm 0,35$, $t=2,51$, $p=0,01$) e 20°C/30°C (razão $2,04\pm 0,42$, $t=2,5$, $p=0,01$) foram significativamente diferentes de 1, porém não foi significativamente diferente de 1 para a razão 25°C/30°C (razão $1,08\pm 0,19$, $t=0,42$, $p=0,7$).

3.2. Comparação das concentrações de efeito

3.2.1. Comparação das concentrações de efeito tendo como referência a temperatura de origem

Os valores de e (CE_{50}) foram significativamente diferentes para os modelos de temperatura de origem 20°C (ANOVA, $F=61,616$, $p=0$), 25°C (ANOVA, $F=56,517$, $p=0$) e 30°C (ANOVA, $F=17,709$, $p=0$) (**Figura 9**). Para a temperatura de origem de 25°C, as sobreposições dos limites de confiança sugerem que os valores de CE_{25} para as temperaturas de destino de 20°C e 30°C não foram significativamente diferentes, sendo que o valor de CE para 25°C foi maior que os dois (**Figura 11**). No caso da CE_{75} , as temperaturas de destino 25°C e 30°C não foram significativamente diferentes, sendo que o valor de CE para 20°C foi menor que os dois.

Para a temperatura de origem 20°C, os valores de CE_{25} , CE_{50} e CE_{75} reduziram com o aumento de temperatura, sendo significamente diferentes entre si, com exceção dos valores de CE_{75} para as temperaturas de destino 25°C e 30°C que foram similares. Para a temperatura de origem 30°C, os valores de CE_{25} e CE_{50} para as temperaturas de destino 20°C e 25°C não foram significamente diferentes entre si. Os valores de CE_{25} e CE_{50} para a temperatura de destino de 30°C foi significamente inferior que os valores para 20°C e 25°C. No caso da CE_{75} foram os valores para a temperatura de destino 25°C

e 30°C que não foram significativamente diferentes, sendo o valor para 20°C significativamente superior comparado aos dois.

3.2.2. Comparação das concentrações de efeito tendo como referência a temperatura de destino

Os valores de e (CE_{50}) foram significativamente diferentes entre os modelos gerados para organismos das três temperaturas de origem nas temperaturas de destino 20°C (ANOVA, $F=91,712$, $p=0$), 25°C (ANOVA, $F=106,27$, $p=0$) e 30°C (ANOVA, $F=51,08$, $p=0$). Para a temperatura de destino 25°C, as sobreposições dos limites de confiança sugerem que apenas os valores de CE_{25} foram significativamente entre si (**Figura 12**). No caso de CE_{50} e CE_{75} , os valores para as temperaturas de origem 25°C e 30°C não foram significativamente diferentes entre si, com exceção para 20°C que foi significativamente inferior para as duas temperaturas de origem.

Para a temperatura de destino 20°C, os valores de CE_{25} e CE_{50} , foram significativamente diferentes entre si, sendo os valores de CE para as temperaturas de origem em 25°C < 20°C < 30°C para ambos. No caso de CE_{75} , os valores seguem o mesmo padrão 25°C < 20°C < 30°C, porém só o valor para a temperatura de origem de 30°C é significativamente maior que as temperaturas de origem 20°C e 25°C. Para a temperatura de destino 30°C, os valores de CE_{25} , CE_{50} e CE_{75} demonstram uma relação positiva com o aumento da temperatura de origem. Porém, os valores de CE para as temperaturas de origem 25°C e 30°C não foram significativamente diferentes entre si. Os valores para a temperatura de origem 20°C foram significativamente diferentes e inferiores às demais temperaturas.

3.3. Razão das concentrações de efeito

3.3.1. Comparação das razões tendo como referência a temperatura de origem

A razão entre os valores de e (CE_{50}) para os modelos gerados em cada temperatura de destino foi significativamente diferente de 1 para organismos provenientes de 20°C, 25°C e 30°C.

Tabela 6 – Razões das estimativas de e (CE_{50}) entre as três temperaturas de destino para organismos provenientes de cada temperatura de origem. Os valores são a razão \pm o erro padrão da estimativa. Os asteriscos indicam a significância da diferença das razões para 1 (teste-t, níveis de significância * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

		Temperatura de origem		
		20°C	25°C	30°C
Temperaturas de destino	$\frac{25^\circ\text{C}}{30^\circ\text{C}}$	$= 1,37 \pm 0,12$ **	$\frac{20^\circ\text{C}}{30^\circ\text{C}} = 0,75 \pm 0,07$ ***	$\frac{25^\circ\text{C}}{20^\circ\text{C}} = 0,84 \pm 0,07$ *
	$\frac{20^\circ\text{C}}{25^\circ\text{C}}$	$= 1,46 \pm 0,09$ ***	$\frac{25^\circ\text{C}}{20^\circ\text{C}} = 1,82 \pm 0,14$ ***	$\frac{30^\circ\text{C}}{20^\circ\text{C}} = 0,66 \pm 0,06$ ***
	$\frac{20^\circ\text{C}}{30^\circ\text{C}}$	$= 1,99 \pm 0,17$ ***	$\frac{25^\circ\text{C}}{30^\circ\text{C}} = 1,36 \pm 0,12$ **	$\frac{30^\circ\text{C}}{25^\circ\text{C}} = 0,79 \pm 0,07$ **

3.3.2. Comparação das razões tendo como referência a temperatura de destino

A razão entre os valores de e (CE_{50}) para os modelos gerados para organismos provenientes de 20°C, 25°C e 30°C em cada temperatura de destino foi significativamente diferente de 1, com excessão da razão das temperaturas de origem 25°C/30°C na temperatura de destino de 25°C.

Tabela 7 – Razões das estimativas de e (CE_{50}) entre as três temperaturas de origem em cada temperatura de destino. Os valores são a razão \pm o erro padrão da estimativa. Os asteriscos indicam a significância da diferença das razões para 1 (teste-t, níveis de significância * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$).

		Temperatura de destino		
		20°C	25°C	30°C
Temperaturas de origem	$\frac{20^\circ\text{C}}{25^\circ\text{C}}$	$= 1,47 \pm 0,11$ ***	$\frac{20^\circ\text{C}}{30^\circ\text{C}} = 0,49 \pm 0,03$ ***	$\frac{20^\circ\text{C}}{25^\circ\text{C}} = 0,55 \pm 0,06$ ***
	$\frac{20^\circ\text{C}}{30^\circ\text{C}}$	$= 0,60 \pm 0,05$ ***	$\frac{20^\circ\text{C}}{25^\circ\text{C}} = 0,55 \pm 0,04$ ***	$\frac{20^\circ\text{C}}{30^\circ\text{C}} = 0,46 \pm 0,04$ ***
	$\frac{25^\circ\text{C}}{30^\circ\text{C}}$	$= 0,41 \pm 0,04$ ***	$\frac{25^\circ\text{C}}{30^\circ\text{C}} = 0,89 \pm 0,06$ ^{NS}	$\frac{25^\circ\text{C}}{30^\circ\text{C}} = 0,83 \pm 0,08$ *

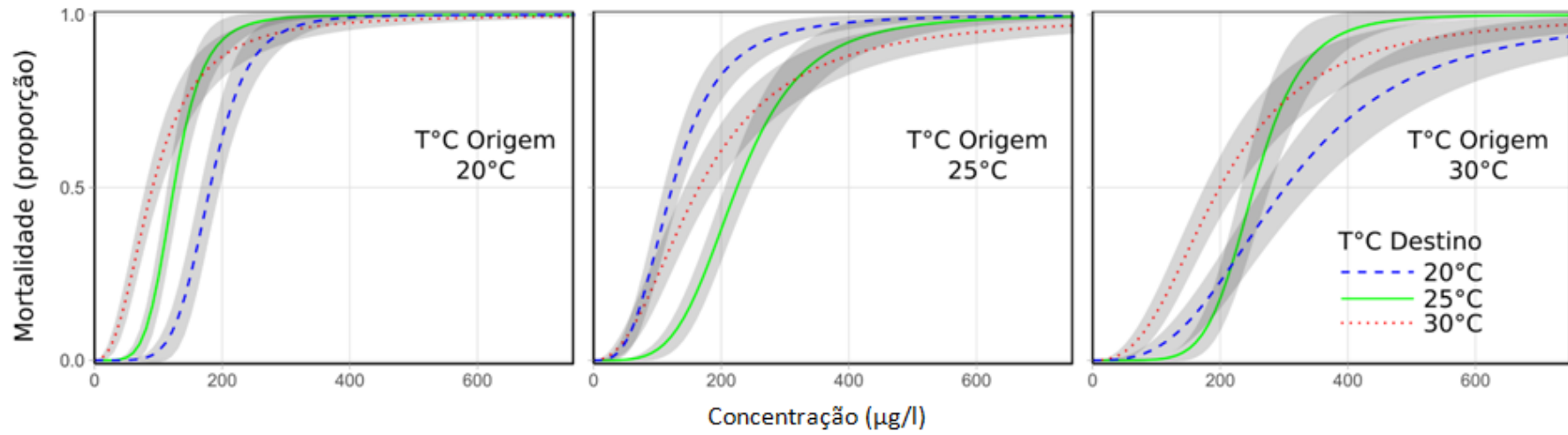


Figura 9 – Relação entre mortalidade e concentração de Glifosato para organismos de cada temperatura de origem quando transferidos para cada temperatura de destino.

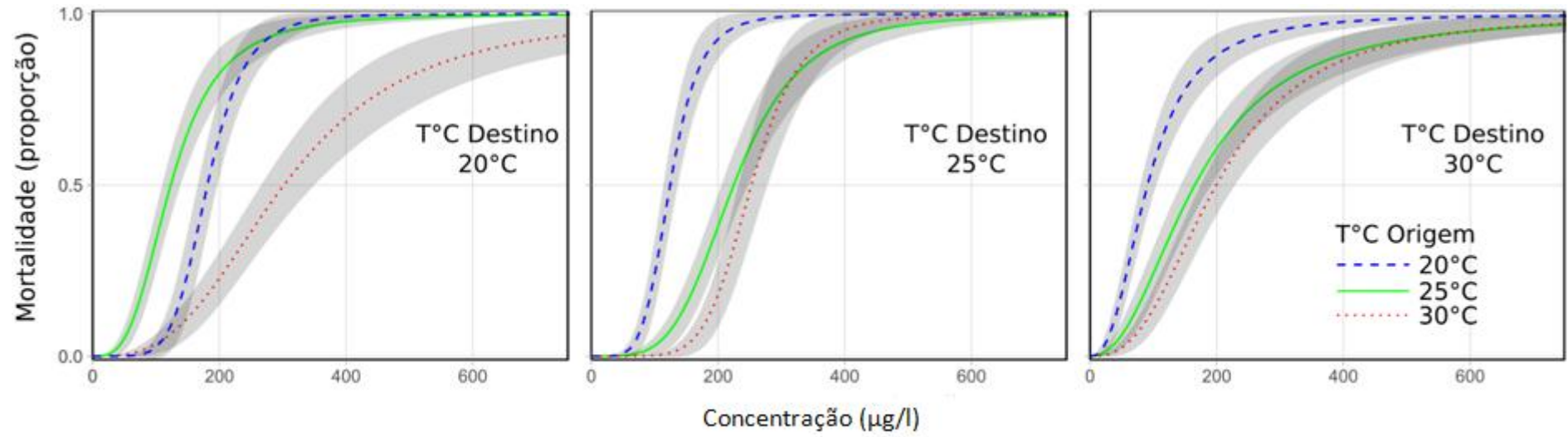


Figura 10 – Relação entre mortalidade e concentração de Glifosato em cada temperatura de destino para organismos provenientes de diferentes temperaturas.

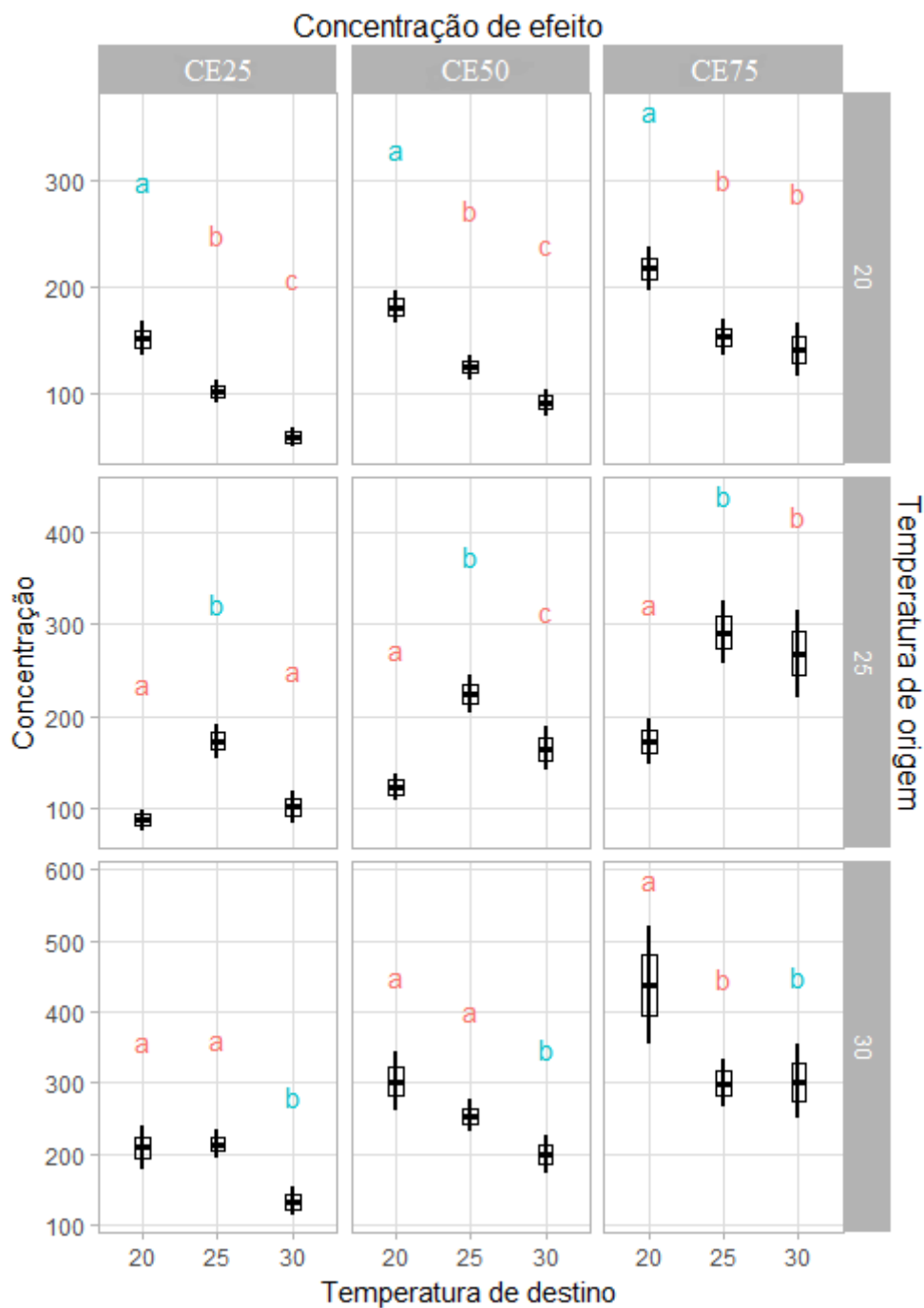


Figura 11 – Comparação das concentrações de efeito (CE_{25} , CE_{50} e CE_{75}) em três diferentes temperaturas de destino para organismos provenientes de três temperaturas de origem diferentes. A caixa indica o valor médio e o erro da média, e a barra vertical indica os limites mínimo e máximo das estimativas dos modelos. Letras diferentes indicam que as estimativas são significativamente diferentes. As letras azuis indicam os testes onde as temperaturas de origem e destino foram iguais.

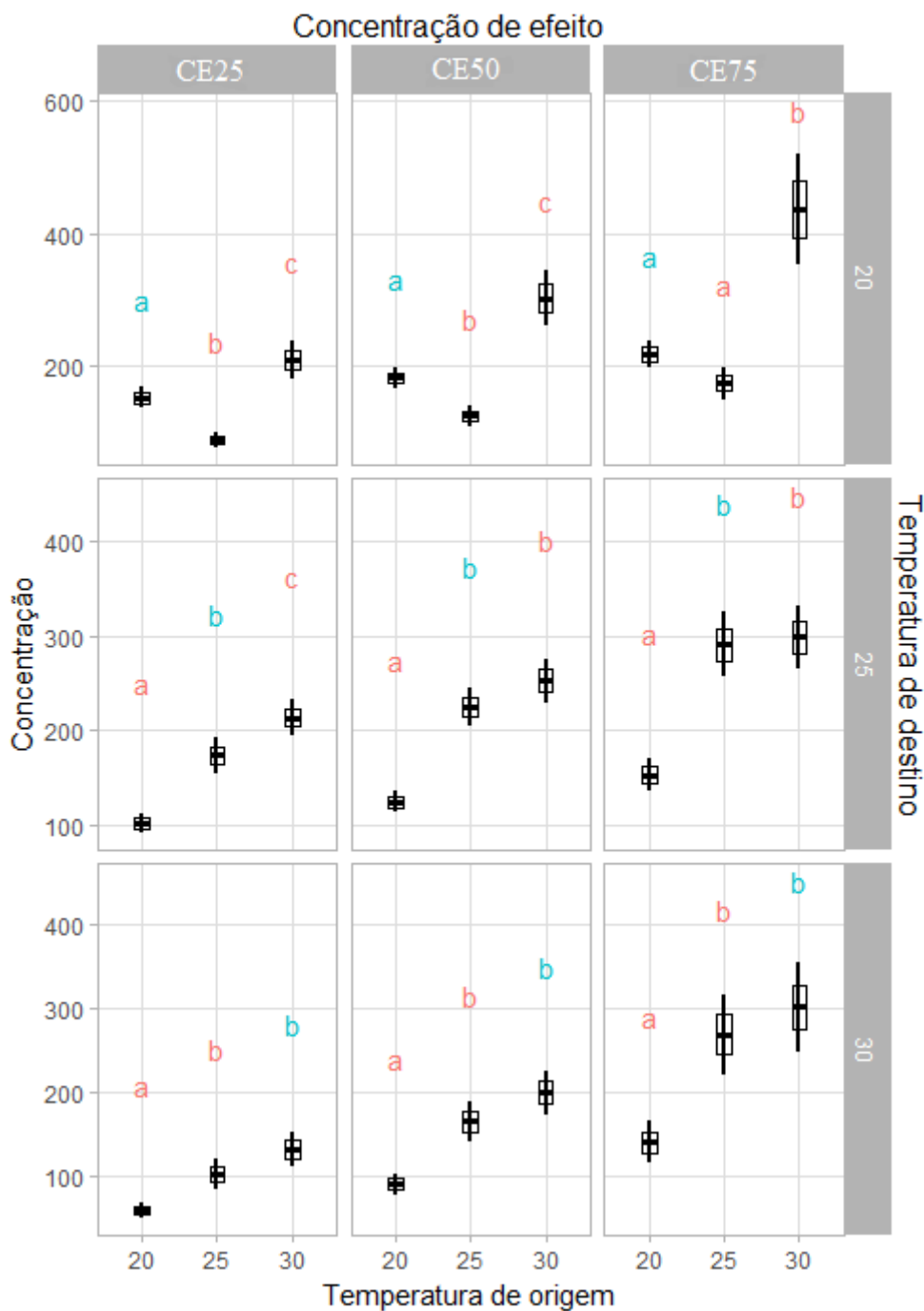


Figura 12 – Comparação das concentrações de efeito (CE₂₅, CE₅₀ e CE₇₅) estimadas em três temperaturas de destino para organismos de três diferentes temperaturas de origem. A caixa indica o valor médio e o erro da média, e a barra vertical indica os limites mínimo e máximo das estimativas dos modelos. Letras diferentes indicam que as estimativas são significativamente diferentes. As letras azuis indicam os testes onde as temperaturas de origem e destino foram iguais.

4. DISCUSSÃO

4.1. Toxicidade termo-dependente do herbicida AKB[®] para *Ceriodaphnia silvestrii*

Foram observados dois padrões do efeito da temperatura sobre a toxicidade do herbicida à base de Glifosato para *C. silvestrii* (**Figura 11**). Para as temperaturas de origem 20°C e 30°C observou-se que a toxicidade aumenta com o aumento da temperatura de destino. Este efeito positivo também foi observado para a toxicidade do herbicida Roundup[®] para duas espécies de peixes (FOLMAR; SANDERS; JULIN, 1979), e é comumente observado para outras espécies e xenobióticos (**Tabela 1**). Entretanto, para a temperatura de origem de 25°C foi observada uma toxicidade menor à temperatura de destino de 25°C em comparação à toxicidade observada para as temperaturas de 20°C e 30°C. Além disso, assim como observado para o NaCl, a temperatura teve um efeito não linear sobre a toxicidade do herbicida para *C. silvestrii* (**Tabela 6**). Devido ao efeito diferenciado na temperatura de origem 25°C, este efeito não linear foi diferente para organismos desta temperatura de origem em comparação àqueles originários das temperaturas 20°C e 30°C. A razão pela qual a toxicidade termo-dependente observada em organismos originários à 25°C foi diferente daquela observada para organismos à 20°C e 30°C pode ser resultado de dois fatores: a faixa de tolerância térmica da espécie e o efeito da temperatura sobre a toxicidade da mistura presente na formulação comercial utilizada.

Uma das hipóteses que poderiam explicar a não linearidade e a menor toxicidade observada à 25°C é a de que a toxicidade é menor na temperatura de desempenho máximo, aumentando nos extremos da faixa de tolerância térmica da espécie (BAO; KOUTSAFTIS; LEUNG, 2008). De acordo com esta hipótese, o padrão de toxicidade diretamente proporcional à temperatura comumente reportado na literatura só é verdadeiro quando as estimativas são feitas dentro da faixa de tolerância térmica da espécie. Estudos que testaram o efeito de grandes amplitudes de temperatura sobre a toxicidade parecem dar suporte a esta hipótese (SNELL et al., 1991; BOECKMAN; BIDWELL, 2006; PRATO; SCARDICCHIO; BIANCOLINO, 2008). Este pode ser o caso para *C. silvestrii*, pois a menor toxicidade relativa foi observada para organismos com aclimação desenvolvimental à 25°C, a mesma temperatura sugerida como sendo próxima do ótimo da espécie. Porém, esta hipótese ainda não explica o fato da menor

toxicidade ter sido observada apenas em organismos originários de 25°C, e não em organismos originários de 20°C ou 30°C e transferidos para a temperatura de destino de 25°C. Além disso, o efeito da temperatura sobre a toxicidade de Glifosato em *Ceriodaphnia* ainda não é bem compreendido. Por exemplo, nos experimentos de Tsui e Chu (2003) a temperatura não influenciou significativamente a toxicidade de Roundup® para *Ceriodaphnia dubia*.

Outro fator que pode ter contribuído para o resultado de toxicidade termo-depedente observado, é o fato de que a substância teste utilizada neste estudo é uma mistura comercial cujo princípio ativo é o Glifosato. Os resultados observados são resultado de efeito tóxico de uma mistura de diferentes substâncias químicas componentes da fórmula do produto. Cada uma das substâncias presentes na mistura pode apresentar uma toxicidade termo-dependente diferenciada, o que pode resultar em um efeito não linear na toxicidade da mistura quando esta é exposta a diferentes temperaturas. Além disso, os efeitos tóxicos de uma mistura podem ser diferentes daqueles observados para as mesmas substâncias isoladas, uma vez que podem ocorrer diversos tipos de interações entre estas substâncias, resultando em efeitos aditivos, antagônicos ou sinérgicos. Se a intensidade destas interações também for alterada com a temperatura, é provável que a toxicidade da mistura também pode não ser linear. Infelizmente não existem estudos do efeito da interação entre temperatura sobre a toxicidade de misturas com Glifosato. Porém, estudos sobre a toxicidade de misturas comerciais com Glifosato sugerem que estas misturas podem ser muito mais tóxicas que o princípio ativo isolado. Por exemplo, Luis; Solange; Mir (2011) revisaram uma série de informações sobre as diferenças de toxicidade do ingrediente ativo e de produtos formulados com Glifosato, especialmente o Roundup®, produto a base de Glifosato mais utilizado no mundo. Eles observaram que misturas comerciais demonstraram ser sete vezes mais tóxicas que o Glifosato em algas e plantas aquáticas, 13 vezes em protozoários, 42 vezes em peixes, 70 vezes em crustáceos e 130 vezes em sapos. Infelizmente não existem informações sobre a composição do herbicida AKB® utilizado neste estudo, dificultando a comparação com o Roundup®. Entretanto, considerando que ambos os produtos tem o mesmo fim e utilizam o mesmo e único princípio ativo, a composição geral dos produtos é provavelmente similar. Sendo assim, é provável que tenha tido um efeito considerável da toxicidade de mistura do pesticida testado neste estudo. Este efeito

somente poderá ser elucidado com estudos específicos com misturas à base de Glifosato expostas a diferentes temperaturas.

4.2. Efeito da aclimação desenvolvimental sobre a toxicidade do herbicida AKB[®]

Nesta etapa dos experimentos observou-se um resultado semelhante ao obtido anteriormente para o NaCl. Organismos aclimatados a uma temperatura mais alta apresentaram menor sensibilidade quando transferidos para temperaturas mais baixas (**Figura 12, Tabela 5**). No entanto, este padrão só foi observado na relação 30°C/20°C. Quando animais provenientes de 30°C foram expostos ao herbicida a 20°C, o valor de CE₅₀ dobrou em comparação com o valor obtido para os organismos que já estavam aclimatados aquela condição (**Tabela 5**). Entretanto, animais aclimatados a 25°C não responderam da mesma forma assim como foi visto nos experimentos com NaCl. Para o herbicida, nas temperaturas de destino 25°C e 30°C a aclimação não teve efeito significativo e não diferenciou as respostas dos organismos com temperatura de origem 25°C e 30°C.

Os poucos estudos que investigaram o efeito direto da temperatura sobre a toxicidade do herbicida Roundup[®] sugerem um aumento na toxicidade deste herbicida em baixas temperaturas. Por exemplo, Golovanova e Aminov (2013) avaliaram o efeito do herbicida Roundup[®] sobre a atividade das enzimas glicosidases em peixes e invertebrados com uma combinação de diferentes temperaturas e pH e constataram que a inibição foi maior na temperatura mais baixa combinada com pH ácido. Já Baier et al. (2016) avaliaram os efeitos do herbicida Roundup[®] sobre o desenvolvimento de girinos em duas temperaturas (15°C e 20°C) e observaram que na temperatura mais baixa 34% dos girinos tiveram caudas deformadas, enquanto no controle da mesma temperatura e nos tratamentos a 20°C não houve anomalias. Infelizmente, até o momento não existem trabalhos na literatura que testaram um delineamento experimental similar ao apresentado neste estudo utilizando Glifosato e/ou herbicidas contendo Glifosato, portanto comparações diretas não podem ser feitas. O único estudo que considerou as três temperaturas testadas neste trabalho, 20°C, 25°C e 30°, não avaliou o efeito da aclimação e os resultados da influência da temperatura não foram significativos (TSUI; CHU, 2003). Entretanto, os resultados da comparação de aclimação

desenvolvimental neste estudo corroboram os resultados mencionados acima, sugerindo uma maior toxicidade relativa em organismos provenientes de baixas temperaturas.

Com relação à alteração da inclinação dos modelos (**Tabela 5**) que indica a distribuição da sensibilidade dos organismos testados, algumas diferenças podem ser observadas. Quando se compara as inclinações das curvas de sensibilidade com a mesma temperatura de origem e destino, observa-se que a distribuição da sensibilidade possui essa sequência $20^{\circ}\text{C} < 25^{\circ}\text{C} < 30^{\circ}\text{C}$. Este resultado corrobora aqueles obtidos para NaCl, no entanto entre 20°C e 25°C neste caso não houve diferenças significativas, mesmo assim, ambas inclinações foram mais acentuadas que a de 30°C . Quando se compara as inclinações dos modelos gerados para cada temperatura de origem (**Figura 9**) pode-se ver claramente como organismos aclimatados a 30°C possuem uma distribuição mais suave entre as frações mais e menos sensíveis da população. O maior valor de e ($\text{CE}_{50} = 301,8 \mu\text{g/l}$) nestes experimentos foi justamente na curva menos acentuada das inclinações apresentadas, com animais provenientes de 30°C para a temperatura de destino de 20°C (**Figura 10**). Um resultado interessante é que as inclinações das curvas com temperatura de origem 25°C não apresentaram diferenças significativas entre si, ou seja, estes organismos tiveram o mesmo padrão de distribuição da sensibilidade nas diferentes temperaturas de destino. Esta temperatura de origem é exatamente a que diferiu na resposta da toxicidade termo-dependente ao herbicida. Tais resultados demonstram a importância da inclusão da aclimação nos estudos de TDQT para os organismos aquáticos, uma vez que a aclimação desenvolvimental alterou o padrão de resposta de *C. silvestrii* para o herbicida AKB[®].

Atualmente já existe uma preocupação crescente de avaliar os efeitos da aclimação na toxicidade de estressores ambientais e antropogênicos para Cladocera. Por exemplo, Cuco et al. (2016) avaliaram o efeito da aclimação sobre a toxicidade de dois fungicidas (tebuconazole e sulfato de cobre) para dois genótipos de *Daphnia spp.* Os organismos foram aclimatados durante cinco gerações antes de serem utilizados nos experimentos categorizando uma aclimação multigeracional. Através de seus resultados, eles também constataram que o padrão de TQTD positiva não deve ser generalizado, já que em seus testes as respostas foram dependentes do genótipo e do químico testado. Loureiro et al. (2015) investigaram o efeito da aclimação a

temperatura e salinidade para *Daphnia galeata*. Os organismos foram aclimatados e avaliados desde a primeira até a nona geração contemplando tanto a aclimação desenvolvimental como a multigeracional. Os resultados obtidos demonstraram uma toxicidade termo-dependente positiva ao NaCl, no entanto, após nove gerações o efeito foi anulado nos organismos que foram aclimatados anteriormente aos dois estressores, sendo que o mesmo não foi observado para os organismos que foram aclimatados somente nos tratamentos com temperatura. Muysen; Messiaen; Janssen (2010) também avaliaram para *Daphnia magna* o efeito da aclimação a dois estressores, neste caso, temperatura e um metal. Os organismos foram aclimatados durante cinco semanas categorizando também uma aclimação multigeracional. Seus resultados mostraram que os organismos foram mais sensíveis na temperatura mais alta, apresentando um cenário de TQTD positiva, entretanto, os organismos aclimatados aos dois estressores tiveram seus limites de tolerância térmica potencializados. Estes exemplos confirmam a relevância de incorporar a aclimação na avaliação da toxicidade de xenobióticos, pois isto pode colaborar para o melhor entendimento das estratégias utilizadas pelos cladóceros para lidar com as alterações ambientais e assegura previsões mais realísticas em um cenário de mudanças climáticas.

5. CONCLUSÕES

- A temperatura tem um efeito significativo na toxicidade do herbicida AKB[®] para *C. silvestrii*, sendo que para as temperaturas de origem 20°C e 30°C foi observada TQTD positiva, enquanto que para organismos provenientes de 25°C a toxicidade seguiu o padrão em forma de U.
- A temperatura tem um efeito não linear sobre a toxicidade do herbicida para *C. silvestrii* independente dos padrões de resposta terem sido diferenciados nas três temperaturas de origem.
- A inclinação das curvas de toxicidade diferenciou-se nas temperaturas de origem indicando que a aclimação tem papel na distribuição da sensibilidade dentro de uma população.

- A aclimação desenvolvimental a 30°C diminui a sensibilidade de *C. silvestrii* quando exposta ao herbicida a 20°C. Este resultado pode evidenciar um efeito protetivo motivado pelas alterações de temperatura.

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Através dos resultados do presente trabalho pode-se concluir que a temperatura teve um efeito significativo na toxicidade de NaCl e do herbicida AKB[®] para *Ceriodaphnia silvestrii*. Sendo que a tendência geral para ambos foi a relação positiva entre temperatura e toxicidade. Em cladóceros, essa relação é comumente observada. A única exceção ocorreu na temperatura de origem 25°C para os experimentos com o herbicida. Além disso, observou-se que a diferença entre a toxicidade nas temperaturas não é linear e que a razão entre os efeitos da temperatura pode estar ligada principalmente a amplitude de tolerância térmica dos organismos. Sendo assim, para avaliar a toxicidade termo-dependente se faz necessário conhecer os limites de tolerância inferiores e superiores dos organismos-teste e testar o efeito da aclimação sobre a TQTD dentro dessa amplitude para não extrapolar resultados.

Outra conclusão importante é que a aclimação às temperaturas mais altas aparentemente pode conferir um efeito protetivo para *C. silvestrii*. Neste trabalho a aclimação na temperatura mais alta (30°C), conferiu uma melhor aptidão dos organismos quando expostos a temperaturas mais baixas com relação aos organismos que já estavam naquela condição. Além disso, observou-se que a população aclimatada nesta condição (30°C) teve uma sensibilidade mais distribuída em ambos os experimentos demonstrando que a aclimação mudou significativamente o perfil de resposta da população frente às alterações no ambiente.

Apesar de este estudo ter revelado resultados relevantes no que se refere aos aspectos de aclimação a temperatura, ele é apenas uma porta de entrada para estudos futuros nesta perspectiva de alterações climáticas. Para não subestimar ou superestimar efeitos, deve-se lembrar de que apenas estudos reversíveis não são suficientes para compreender como os organismos lidam com as pressões ambientais. Além disso, é necessário conhecer quais são os fatores metabólicos e fisiológicos responsáveis pelas respostas dos organismos frente à combinação de estressores ambientais e/ou antropogênicos. Sendo assim, estudos celulares e moleculares são importantes ferramentas nos estudos de aclimação.

Desta forma, espera-se que as pesquisas futuras deem maior importância a aspectos ecológicos na avaliação de xenobióticos nos ecossistemas aquáticos, uma vez que eles ajudam a elucidar questões de como os organismos lidam com condições adversas no ambiente. Compreender os mecanismos que estão envolvidos por trás dos processos de aclimação e adaptação pode colaborar para previsões de impactos ambientais mais precisas em um cenário de alterações climáticas. Para tal, experimentos com maior diversidade de organismos-teste, contendo maior espectro de variáveis e avaliando estes aspectos ecológicos, serão grandes desafios para o futuro da ecotoxicologia na previsão dos reais efeitos que mudanças ambientais podem causar nos ecossistemas globais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-LATEIF, H. M.; DONKER, M. H.; VAN STRAALLEN, N. M. Interaction Between Temperature and Cadmium Toxicity in the Isopod *Porcellio scaber*. **Functional Ecology**, v. 12, n. 4, p. 521–527, 1998.

ABNT. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia spp* (Crustacea, Cladocera)**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=323252>>.

ADLEY BERGSON GONÇALVES DE ABREU; MARCIA HELENA DE RIZZO DA MATTA; ÉMERSON MONTAGNER. Desenvolvimento e validação de método de análise de glifosato em grãos de soja. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 5–9, 2008.

AGRAWAL, A. A.; LAFORSCH, C.; TOLLRIAN, R. Transgenerational Induction of Defences in Animals and Plants. **Nature**, v. 401, n. 6748, p. 60–63, 1999.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; MARTÍNEZ, M. A.; CASTELLANO, V. J.; MARTÍNEZ, M.; MARTIN, M. T.; NOZAL, M. J.; BERNAL, J. L. Toxicokinetics of Glyphosate and Its Metabolite Aminomethyl Phosphonic Acid in Rats. **Toxicology Letters**, v. 190, n. 1, p. 91–95, 8 out. 2009.

ANGILLETTA, M. J., Jr. **Thermal adaptation: a theoretical and empirical synthesis**. [s.l.: s.n.]

ANTON-PARDO, M.; ARMENGOL, X. Effects of salinity and water temporality on zooplankton community in coastal Mediterranean ponds. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, Research and Management for the conservation of coastal lagoon ecosystems. v. 114, p. 93–99, 1 dez. 2012.

ANVISA. **Reavaliação de agrotóxicos - Notícias**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas13/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/reavaliacao-de-agrotoxicos/219201/pop_up?_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_viewMode=print&_101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU_languageId=en_US>. Acesso em: 8 nov. 2016.

BAGCHI, D.; BHATTACHARYA, G.; STOHS, S. J. In vitro and in vivo induction of heat shock (stress) protein (Hsp) gene expression by selected pesticides. **Toxicology**, v. 112, n. 1, p. 57–68, 1 ago. 1996.

BAIER, F.; GRUBER, E.; HEIN, T.; BONDAR-KUNZE, E.; IVANKOVIĆ, M.; MENTLER, A.; BRÜHL, C. A.; SPANGL, B.; ZALLER, J. G. Non-Target Effects of a Glyphosate-Based Herbicide on Common Toad Larvae (*Bufo bufo*, Amphibia) and Associated Algae Are Altered by Temperature. **PeerJ**, v. 4, p. e2641, 1 nov. 2016.

BAILEY, S. W. Climate Change and Decreasing Herbicide Persistence. **Pest Management Science**, v. 60, n. 2, p. 158–162, fev. 2004.

BALBUENA, M. S.; TISON, L.; HAHN, M.-L.; GREGGERS, U.; MENZEL, R.; FARINA, W. M. Effects of Sublethal Doses of Glyphosate on Honeybee Navigation. **The Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. Pt 17, p. 2799–2805, set. 2015.

BAO, V. W.; KOUTSAFTIS, A.; LEUNG, K. M. Temperature-dependent Toxicities of Chlorothalonil and Copper Pyrethrin to the Marine Copepod “*Tigriopus japonicus*” and Dinoflagellate “*Pyrocystis lunula*”. **Australasian Journal of Ecotoxicology**, v. 14, n. 2/3, p. 45, set. 2008a.

BAT, L.; AKBULUT, M.; ÇULHA, M.; GÜNDOĞDU, A.; SATILMIŞ, H. H. Effect of Temperature on the Toxicity of Zinc, Copper and Lead to the Freshwater Amphipod *Gammarus pulex pulex*(L., 1758). **Turkish Journal of Zoology**, v. 24, n. 4, p. 409–416, 2000.

BENBROOK, C. M. Trends in Glyphosate Herbicide Use in the United States and Globally. **Environmental Sciences Europe**, v. 28, n. 1, p. 3, 2016.

BENITEZ, F. J.; REAL, F. J.; ACERO, J. L.; GARCIA, C. Photochemical Oxidation Processes for the Elimination of Phenyl-Urea Herbicides in Waters. **Journal of Hazardous Materials**, v. 138, n. 2, p. 278–287, 16 nov. 2006.

BERG, F. van den; KUBIAK, R.; BENJEY, W. G.; MAJEWSKI, M. S.; YATES, S. R.; REEVES, G. L.; SMELT, J. H.; LINDEN, A. M. A. van der. Emission of Pesticides into the Air. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 115, n. 1–4, p. 195–218, 1 out. 1999.

BLOOMFIELD, J. P.; WILLIAMS, R. J.; GOODDY, D. C.; CAPE, J. N.; GUHA, P. Impacts of Climate Change on the Fate and Behaviour of Pesticides in Surface and Groundwater--A UK Perspective. **The Science of the Total Environment**, v. 369, n. 1–3, p. 163–177, 1 out. 2006.

BOECKMAN, C. J.; BIDWELL, J. R. The Effects of Temperature, Suspended Solids, and Organic Carbon on Copper Toxicity to Two Aquatic Invertebrates. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 171, n. 1–4, p. 185–202, 1 abr. 2006.

BOND, J.-A.; BRADLEY, B. P. Heat-shock reduces the toxicity of malathion in *Daphnia magna*. **Marine Environmental Research**, Responses of Marine Organisms to Pollutants. v. 39, n. 1, p. 209–212, 1 jan. 1995.

BOND, J.-A.; BRADLEY, B. P. Resistance to Malathion in Heat-Shocked *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, n. 4, p. 705–712, 1 abr. 1997.

BONDURIANSKY, R.; CREAN, A. J.; DAY, T. The Implications of Nongenetic Inheritance for Evolution in Changing Environments. **Evolutionary Applications**, v. 5, n. 2, p. 192–201, 2012.

BONDURIANSKY, R.; DAY, T. Nongenetic Inheritance and Its Evolutionary Implications. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 40, n. 1, p. 103–125, 2009.

BOONE, M. D.; BRIDGES, C. M. The Effect of Temperature on the Potency of Carbaryl for Survival of Tadpoles of the Green Frog (*Rana clamitans*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 7, p. 1482–1484, 1 jul. 1999.

BOSSUS, M. C.; MADSEN, S. S.; TIPSMARK, C. K. Functional Dynamics of Claudin Expression in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*): Response to Environmental Salinity. **Comparative Biochemistry and Physiology -Part A : Molecular and Integrative Physiology**, v. 187, p. 74–85, 2015.

BRANCH, T. A.; DEJOSEPH, B. M.; RAY, L. J.; WAGNER, C. A. Impacts of Ocean Acidification on Marine Seafood. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 28, n. 3, p. 178–186, 2013.

BREZONIK PL, KING SO, MACH CE. The influence of water chemistry on trace metal bioavailability and toxicity to aquatic organisms. In: Metal ecotoxicology: concepts and applications. Advances in trace substances research series. **Lewis Publishers, Chelsea, MI**, 1991.

BROWN, J. H.; GILLOOLY, J. F.; ALLEN, A. P.; SAVAGE, V. M.; WEST, G. B. Toward a metabolic theory of ecology. **Ecology**, v. 85, n. 7, p. 1771–1789, 1 jul. 2004.

CASATI, P.; MORROW, D. J.; FERNANDES, J. F.; WALBOT, V. UV-B Signaling in Maize: Transcriptomic and Metabolomic Studies at Different Irradiation Times. **Plant Signaling and Behavior**, v. 6, n. 12, p. 1926–1931, 2011.

CAVALCANTE, D. G. S. M.; MARTINEZ, C. B. R.; SOFIA, S. H. Genotoxic effects of Roundup® on the fish *Prochilodus lineatus*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 655, n. 1–2, p. 41–46, ago. 2008.

CHALIFOUR, A.; JUNEAU, P. Temperature-Dependent Sensitivity of Growth and Photosynthesis of *Scenedesmus obliquus*, *Navicula pelliculosa* and Two Strains of *Microcystis aeruginosa* to the Herbicide Atrazine. **Aquatic Toxicology**, v. 103, n. 1–2, p. 9–17, 2011.

CHANG, X.; ZHAI, B.; LIU, X.; WANG, M. Effects of Temperature Stress and Pesticide Exposure on Fluctuating Asymmetry and Mortality of *Copera annulata* (Selys) (Odonata: Zygoptera) Larvae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 67, n. 1, p. 120–127, 2007.

COWGILL, U. m.; TAKAHASHI, I. t.; APPLGATH, S. l. A Comparison of the Effect of Four Benchmark Chemicals on *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia-affinis* Tested at Two Different Temperatures. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 4, n. 3, p. 415–422, 1 jun. 1985.

CUCO, A. P.; ABRANTES, N.; GONÇALVES, F.; WOLINSKA, J.; CASTRO, B. B. Toxicity of Two Fungicides in *Daphnia*: Is It Always Temperature-Dependent? **Ecotoxicology**, v. 25, n. 7, p. 1376–1389, 1 set. 2016.

CUHRA, M.; TRAAVIK, T.; DANDO, M.; PRIMICERIO, R.; HOLDERBAUM, D. F.; BØHN, T. Glyphosate-Residues in Roundup-Ready Soybean Impair *Daphnia magna* Life-Cycle. **Journal of Agricultural Chemistry and Environment**, v. 4, n. 1, p. 24–36, 2015.

DABROWSKI, J. M.; PEALL, S. K. C.; REINECKE, A. J.; LIESS, M.; SCHULZ, R. Runoff-Related Pesticide Input into the Lourens River, South Africa: Basic Data for Exposure Assessment and Risk Mitigation at the Catchment Scale. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 135, n. 1–4, p. 265–283, mar. 2002.

DAY, T.; BONDURIANSKY, R. A Unified Approach to the Evolutionary Consequences of Genetic and Nongenetic Inheritance. **The American Naturalist**, v. 178, n. 2, p. E18–36, ago. 2011.

DELORENZO, M. E.; WALLACE, S. C.; DANESE, L. E.; BAIRD, T. D. Temperature and Salinity Effects on the Toxicity of Common Pesticides to the Grass Shrimp, *Palaemonetes pugio*. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 44, n. 5, p. 455–460, 2009.

DUDGEON, D.; ARTHINGTON, A. H.; GESSNER, M. O.; KAWABATA, Z.-I.; KNOWLER, D. J.; LÉVÊQUE, C.; NAIMAN, R. J.; PRIEUR-RICHARD, A.-H.; SOTO, D.; STIASSNY, M. L. J.; SULLIVAN, C. A. Freshwater Biodiversity: Importance, Threats, Status and Conservation Challenges. **Biological Reviews**, v. 81, n. 2, p. 163–182, 1 maio 2006.

ELMOOR-LOUREIRO, L. M. **Manual de identificacao de cladoceros limnicos do brasil**. Brasilia: Universa, 1997.

FANTAZZINI, P.; MENGOLI, S.; PASQUINI, L.; BORTOLOTTI, V.; BRIZI, L.; MARIANI, M.; DI GIOSIA, M.; FERMANI, S.; CAPACCIONI, B.; CAROSELLI, E.; PRADA, F.; ZACCANTI, F.; LEVY, O.; DUBINSKY, Z.; KAANDORP, J. A.; KONGLERD, P.; HAMMEL, J. U.; DAUPHIN, Y.; CUIF, J.-P.; WEAVER, J. C.; FABRICIUS, K. E.; WAGERMAIER, W.; FRATZL, P.; FALINI, G.; GOFFREDO, S. Gains and Losses of Coral Skeletal Porosity Changes with Ocean Acidification Acclimation. **Nature Communications**, v. 6, 2015.

FAO. **How_to_Feed_the_World_in_2050**. [s.l.] Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2009. Disponível em: <http://www.fao.org/fileadmin/templates/wsfs/docs/expert_paper/How_to_Feed_the_World_in_2050.pdf>. Acesso em: 7 nov. 2016.

FENG, Y.; WARNER, M. E.; ZHANG, Y.; SUN, J.; FU, F.-X.; ROSE, J. M.; HUTCHINS, D. A. Interactive effects of increased pCO₂, temperature and irradiance on the marine coccolithophore *Emiliania huxleyi* (Prymnesiophyceae). **European Journal of Phycology**, v. 43, n. 1, p. 87–98, 1 fev. 2008.

FERREIRA, A. L. G.; SERRA, P.; SOARES, A. M. V. M.; LOUREIRO, S. The Influence of Natural Stressors on the Toxicity of Nickel to *Daphnia magna*.

Environmental Science and Pollution Research, v. 17, n. 6, p. 1217–1229, 1 jul. 2010.

FINER, M.; JENKINS, C. N. Proliferation of Hydroelectric Dams in the Andean Amazon and Implications for Andes-Amazon Connectivity. **PLOS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35126, 18 abr. 2012.

FOLMAR, L. C.; SANDERS, H. O.; JULIN, A. M. Toxicity of the Herbicide Glyphosate and Several of Its Formulations to Fish and Aquatic Invertebrates. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 8, n. 3, p. 269–278, 1 maio 1979.

GAMA-FLORES, J. L.; HUIDOBRO-SALAS, M. E.; SARMA, S. S. S.; NANDINI, S. Somatic and Population Growth Responses of *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia pulex* (Cladocera) to Changes in Food (*Chlorella vulgaris*) Level and Temperature. **Journal of Environmental Biology**, v. 32, n. 4, p. 489–495, jul. 2011.

GAUPP-BERGHAUSEN, M.; HOFER, M.; REWALD, B.; ZALLER, J. G. Glyphosate-Based Herbicides Reduce the Activity and Reproduction of Earthworms and Lead to Increased Soil Nutrient Concentrations. **Scientific Reports**, v. 5, p. 12886, 5 ago. 2015.

GOLOVANOVA, I. L.; AMINOV, A. I. Influence of the herbicide roundup on the activity of glycosidase in young fish and their prey at different temperatures and pH level. **Vestnik of Astrakhan State Technical University. Series: Fishing Industry**, n. 1, p. 129–134, 2013.

GONÇALVES, A. M. M.; CASTRO, B. B.; PARDAL, M. A.; GONÇALVES, F. Salinity effects on survival and life history of two freshwater cladocerans (*Daphnia magna* and *Daphnia longispina*). **Annales de Limnologie - International Journal of Limnology**, v. 43, n. 1, p. 13–20, 2007.

GRUPO KELLDRIN. **AKB Herbicida : Kelldrin**. Disponível em: <<http://kelldrin.com.br/produto/akb-herbicida/>>. Acesso em: 9 nov. 2016.

HEUGENS, E. H. W.; HENDRIKS, A. J.; DEKKER, T.; STRAALLEN, N. M. van; ADMIRAAL, W. A Review of the Effects of Multiple Stressors on Aquatic Organisms and Analysis of Uncertainty Factors for Use in Risk Assessment. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 31, n. 3, p. 247–284, 1 jan. 2001.

HEUGENS, E. H. W.; JAGER, T.; CREYGHTON, R.; KRAAK, M. H. S.; HENDRIKS, A. J.; VAN STRAALLEN, N. M.; ADMIRAAL, W. Temperature-Dependent Effects of Cadmium on *Daphnia magna*: Accumulation versus Sensitivity. **Environmental Science & Technology**, v. 37, n. 10, p. 2145–2151, 15 maio 2003.

HIETALA, J.; LAURÉN-MÄÄTTÄ, C.; WALLS, M. Sensitivity of *Daphnia* to Toxic Cyanobacteria: Effects of Genotype and Temperature. **Freshwater Biology**, v. 37, n. 2, p. 299–306, 1 abr. 1997.

HOCHMUTH, J. D.; DE SCHAMPHELAERE, K. A. C. The Effect of Temperature on the Sensitivity of *Daphnia magna* to Cyanobacteria Is Genus Dependent. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**, v. 33, n. 10, p. 2333–2343, out. 2014.

HOOPER, M. J.; ANKLEY, G. T.; CRISTOL, D. A.; MARYOUNG, L. A.; NOYES, P. D.; PINKERTON, K. E. Interactions between Chemical and Climate Stressors: A Role for Mechanistic Toxicology in Assessing Climate Change Risks. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**, v. 32, n. 1, p. 32–48, jan. 2013.

HUTCHINSON, G. E.; EDMONDSON, Y. H. **A treatise on limnology: introduction to lake biology and the limnoplankton**. [s.l.] Wiley, 1957.

IARC. **IARC Monographs - Monographs available in PDF format**. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol112/index.php>>. Acesso em: 2 nov. 2016.

IBAMA. **Boletim de Comercialização de Agrotóxicos e Afins**. Brasil: Ministério do Meio Ambiente, 2013. Disponível em: <http://ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/boletim%20de%20comercializacao_2000_2012.pdf>. Acesso em: 19 ago. 2015.

IBAMA. **Comercialização de agrotóxicos e afins**. [s.l.] Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, 2014. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3>>. Acesso em: 8 nov. 2016.

IBGE. **IBGE | Biblioteca | Detalhes | Indicadores de desenvolvimento sustentável: Brasil 2012**. Disponível em: <<http://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=259908>>. Acesso em: 8 nov. 2016.

IPCC. **Climate Change 2014: Synthesis Report**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.ipcc.ch/pdf/assessment-report/ar5/syr/SYR_AR5_FINAL_full.pdf>. Acesso em: 20 ago. 2015.

JACOBSON, T.; PREVODNIK, A.; SUNDELIN, B. Combined Effects of Temperature and a Pesticide on the Baltic Amphipod *Monoporeia affinis*. **Aquatic Biology**, v. 1, p. 269–276, 31 jan. 2008.

JEPPESEN, E.; SØNDERGAARD, M.; KANSTRUP, E.; PETERSEN, B.; ERIKSEN, R. B.; HAMMERSHØJ, M.; MORTENSEN, E.; JENSEN, J. P.; HAVE, A. Does the Impact of Nutrients on the Biological Structure and Function of Brackish and Freshwater Lakes Differ? **Hydrobiologia**, v. 275–276, n. 1, p. 15–30, fev. 1994.

JESKE, D. R.; XU, H. K.; BLESSINGER, T.; JENSEN, P.; TRUMBLE, J. Testing for the Equality of EC50 Values in the Presence of Unequal Slopes with Application to Toxicity of Selenium Types. **Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics**, v. 14, n. 4, p. 469–483, 1 dez. 2009.

JIN, P.; GAO, K.; BEARDALL, J. Evolutionary Responses of a Coccolithophorid *Gephyrocapsa oceanica* to Ocean Acidification. **Evolution; International Journal of Organic Evolution**, v. 67, n. 7, p. 1869–1878, jul. 2013.

JR, O. P. de A.; SANTOS, T. C. R. dos; RIBEIRO, N. M. B. e M. L. Glifosato: Propriedades, Toxicidade, Usos e Legislação. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 589–593, 2002.

KHAN, M. a. Q.; AHMED, S. A.; CATALIN, B.; KHODADOUST, A.; AJAYI, O.; VAUGHN, M. Effect of Temperature on Heavy Metal Toxicity to Juvenile Crayfish, *Orconectes Immunis* (Hagen). **Environmental Toxicology**, v. 21, n. 5, p. 513–520, out. 2006.

KIM, J.; PARK, J.; KIM, P.-G.; LEE, C.; CHOI, K.; CHOI, K. Implication of Global Environmental Changes on Chemical Toxicity-Effect of Water Temperature, pH, and Ultraviolet B Irradiation on Acute Toxicity of Several Pharmaceuticals in *Daphnia magna*. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 4, p. 662–669, 1 abr. 2010.

KNILLMANN, S.; STAMPFLI, N. C.; NOSKOV, Y. A.; BEKETOV, M. A.; LIESS, M. Elevated Temperature Prolongs Long-Term Effects of a Pesticide on *Daphnia spp.* due to Altered Competition in Zooplankton Communities. **Global Change Biology**, v. 19, n. 5, p. 1598–1609, maio 2013.

KORHONEN, I. A.; LAGERSPETZ, K. Y. H. Heat shock response and thermal acclimation in *Asellus aquaticus*. **Journal of Thermal Biology**, v. 21, n. 1, p. 49–56, 1 fev. 1996.

KWOK, K. W. H.; LEUNG, K. M. Y.; LUI, G. S. G.; CHU, S. V. K. H.; LAM, P. K. S.; MORRITT, D.; MALTBY, L.; BROCK, T. C. M.; VAN DEN BRINK, P. J.; WARNE, M. S. J.; CRANE, M. Comparison of Tropical and Temperate Freshwater Animal Species' Acute Sensitivities to Chemicals: Implications for Deriving Safe Extrapolation Factors. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 3, n. 1, p. 49–67, jan. 2007.

LAETZ, C. A.; BALDWIN, D. H.; HEBERT, V. R.; STARK, J. D.; SCHOLZ, N. L. Elevated Temperatures Increase the Toxicity of Pesticide Mixtures to Juvenile *Coho salmon*. **Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 146, p. 38–44, jan. 2014.

LAMPERT, W.; SOMMER, U. **Limnoecology: the ecology of lakes and streams**. [s.l.] Oxford University Press, 1997.

LANNIG, G.; CHERKASOV, A. S.; SOKOLOVA, I. M. Temperature-Dependent Effects of Cadmium on Mitochondrial and Whole-Organism Bioenergetics of Oysters (*Crassostrea virginica*). **Marine Environmental Research**, v. 62 Suppl, p. S79-82, jul. 2006.

LAU, E. T. C.; YUNG, M. M. N.; KARRAKER, N. E.; LEUNG, K. M. Y. Is an Assessment Factor of 10 Appropriate to Account for the Variation in Chemical Toxicity

to Freshwater Ectotherms under Different Thermal Conditions? **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 21, n. 1, p. 95–104, jan. 2014.

LAURANCE, W. F.; SAYER, J.; CASSMAN, K. G. Agricultural expansion and its impacts on tropical nature. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 29, n. 2, p. 107–116, fev. 2014.

LEUNG, K. M. Y.; TAYLOR, A. C.; FURNESS, R. W. Temperature-dependent physiological responses of the dogwhelk *Nucella lapillus* to cadmium exposure. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 80, n. 4, p. 647–660, ago. 2000.

LEWIS, P. A.; HORNING, W. B. Differences in Acute Toxicity Test Results of Three Reference Toxicants on *Daphnia* at Two Temperatures. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 10, n. 10, p. 1351–1357, 1 out. 1991.

LINDQUIST, S.; CRAIG, E. A. The Heat-Shock Proteins. **Annual Review of Genetics**, v. 22, n. 1, p. 631–677, 1 dez. 1988.

LOUREIRO, C.; CUCO, A. P.; CLARO, M. T.; SANTOS, J. I.; PEDROSA, M. A.; GONÇALVES, F.; CASTRO, B. B. Progressive acclimation alters interaction between salinity and temperature in experimental *Daphnia* populations. **Chemosphere**, v. 139, p. 126–132, nov. 2015.

LUIS, G.; SOLANGE, M.; MIR, L. Effects of Herbicide Glyphosate and Glyphosate-Based Formulations on Aquatic Ecosystems. In: KORTEKAMP, A. (Ed.). **Herbicides and Environment**. [s.l.] InTech, 2011.

LYDY, M. J.; BELDEN, J. B.; TERNES, M. A. Effects of Temperature on the Toxicity of M-Parathion, Chlorpyrifos, and Pentachlorobenzene to *Chironomus Tentans*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 37, n. 4, p. 542–547, nov. 1999.

LYDY, M. J.; LOHNER, T. W.; FISHER, S. W. Influence of pH, temperature and sediment type on the toxicity, accumulation and degradation of parathion in aquatic systems. **Aquatic Toxicology**, v. 17, n. 1, p. 27–44, 1 jul. 1990.

MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F.; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, L.; ESPINOSA-CHÁVEZ, F. Effect of Culture Conditions and Mother's Age on the Sensitivity of *Daphnia magna* straus 1820 (Cladocera) Neonates to Hexavalent Chromium. **Ecotoxicology**, v. 15, n. 3, p. 259–266, 1 abr. 2006.

MATERNA, E. J.; RABENI, C. F.; LAPOINT, T. W. Effects of the Synthetic Pyrethroid Insecticide, Esfenvalerate, on Larval Leopard Frogs (*Rana spp.*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 14, n. 4, p. 613–622, 1 abr. 1995.

MAYER F. L.; ELLERSIECK M. R.; SERVICE U. S. F. and W. **Manual of acute toxicity: interpretation and data base for 410 chemicals and 66 species of freshwater animals**. [s.l.] U.S. Dept. of the Interior, Fish and Wildlife Service, 1986.

MCLUSKY, D. S.; BRYANT, V.; CAMPBELL, R. The effect of temperature and salinity on the toxicity of heavy metals to marine and estuarine invertebrates. **Oceanography and Marine Biology: An Annual Review**, 1986. Disponível em: <<http://www.vliz.be/en/imis?module=ref&refid=199039&printversion=1&dropIMISitle=1>>. Acesso em: 13 dez. 2016.

MCLUSKY, D. S.; HAGERMAN, L. The toxicity of chromium, nickel and zinc: effects of salinity and temperature, and the osmoregulatory consequences in the mysid *Praunus flexuosus*. **Aquatic Toxicology**, v. 10, n. 4, p. 225–238, 1 jul. 1987.

MEIRINHO, PA. **Ecologia do zooplâncton**. Disponível em: <http://www.ecologia.ib.usp.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=167&Itemid=469>. Acesso em: 27 out. 2016.

MELÃO, M. G. G. Desenvolvimento e aspectos reprodutivos de cladóceros e copépodos de águas continentais brasileiras. In: POMPÊO, M. L. M. (Ed.). **Perspectivas da Limnologia no Brasil**. [s.l: s.n.]p. 45–57.

MO, H.; YOO, D.; BAE, Y. J.; CHO, K. Effects of Water Temperature on Development and Heavy Metal Toxicity Change in Two Midge Species of *Chironomus riparius* and *C. yoshimatsui* in an Era of Rapid Climate Change. **Entomological Research**, v. 43, n. 2, p. 123–129, 1 mar. 2013.

MOE, S. J.; DE SCHAMPHELAERE, K.; CLEMENTS, W. H.; SORENSEN, M. T.; VAN DEN BRINK, P. J.; LIESS, M. Combined and Interactive Effects of Global Climate Change and Toxicants on Populations and Communities. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**, v. 32, n. 1, p. 49–61, jan. 2013.

MÜLLER, R.; SEELAND, A.; JAGODZINSKI, L. S.; DIOGO, J. B.; NOWAK, C.; OEHLMANN, J. Simulated Climate Change Conditions Unveil the Toxic Potential of the Fungicide Pyrimethanil on the Midge *Chironomus riparius*: A Multigeneration Experiment. **Ecology and Evolution**, v. 2, n. 1, p. 196–210, jan. 2012.

MUNDAY, P. L. Evolutionary Ecology: Survival of the Fittest. **Nature Climate Change**, v. 5, n. 2, p. 102–103, fev. 2015.

MUYSSSEN, B. T. A.; MESSIAEN, M.; JANSSEN, C. R. Combined cadmium and temperature acclimation in *Daphnia magna*: Physiological and sub-cellular effects. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 5, p. 735–742, jul. 2010.

NANDINI, S.; PICAZO-PAEZ, E. A.; SARMA, S. S. S. The combined effects of heavy metals (copper and zinc), temperature and food (*Chlorella vulgaris*) level on the demographic characters of *Moina macrocopa* (Crustacea: Cladocera). **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 42, n. 10, p. 1433–1442, 13 ago. 2007.

NOYES, P. D.; MCELWEE, M. K.; MILLER, H. D.; CLARK, B. W.; VAN TIEM, L. A.; WALCOTT, K. C.; ERWIN, K. N.; LEVIN, E. D. The Toxicology of Climate Change: Environmental Contaminants in a Warming World. **Environment International**, v. 35, n. 6, p. 971–986, 2009.

NUSSEY, G.; VAN VUREN, J. H. J.; DU PREEZ, H. H. Acute toxicity tests of copper on juvenile Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Cichlidae), at different temperatures. **South African Journal of Wildlife Research**, v. 26, n. 2, p. 47–55, 1996.

ONU. **World Population Prospects**. [s.l.] Organização das Nações Unidas, 2015. Disponível em: <https://esa.un.org/unpd/wpp/publications/files/key_findings_wpp_2015.pdf>. Acesso em: 7 nov. 2016.

OSTERAUER, R.; KÖHLER, H.-R. Temperature-Dependent Effects of the Pesticides Thiachloprid and Diazinon on the Embryonic Development of Zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 86, n. 4, p. 485–494, 2008.

PARSON, P.A. Heredity - Abstract of article: Fly size, emergence time and sternopleural chaeta number in *Drosophila*. **Heredity**, v. 16, n. 4, p. 455–473, nov. 1961.

PAYTON, M. E.; GREENSTONE, M. H.; SCHENKER, N. Overlapping confidence intervals or standard error intervals: What do they mean in terms of statistical significance? **Journal of Insect Science**, v. 3, n. 34, p. 1–6, 1 out. 2003.

PERSCHBACHER, P. W. Temperature effects on acute copper toxicity to juvenile channel catfish *Ictalurus punctatus*. **Aquaculture**, v. 243, n. 1–4, p. 225–228, 3 jan. 2005.

PLEASANTS, J. M.; OBERHAUSER, K. S. Milkweed Loss in Agricultural Fields because of Herbicide Use: Effect on the Monarch Butterfly Population. **Insect Conservation and Diversity**, v. 6, n. 2, p. 135–144, 1 mar. 2013.

PRATO, E.; SCARDICCHIO, C.; BIANCOLINO, F. Effects of Temperature on the Acute Toxicity of Cadmium to *Corophium insidiosum*. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 136, n. 1–3, p. 161–166, 1 jan. 2008.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2016.

RAO, D. G. V. P.; KHAN, M. A. Q. Zebra Mussels: Enhancement of Copper Toxicity by High Temperature and Its Relationship with Respiration and Metabolism. **Water Environment Research**, v. 72, n. 2, p. 175–178, 1 mar. 2000.

RATUSHNYAK, A.; ANDREEVA, M. G.; TRUSHIN, M. V. Effects of Type II Pyrethroids on *Daphnia magna*: Dose and Temperature Dependences. **Rivista Di Biologia**, v. 98, n. 2, p. 349–357, ago. 2005.

RITZ, C.; BATY, F.; STREIBIG, J. C.; GERHARD, D. Dose-Response Analysis Using R. **PLOS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0146021, 30 dez. 2015.

RITZ, C.; CEDERGREEN, N.; JENSEN, J. E.; STREIBIG, J. C. Relative potency in nonsimilar dose–response curves. **Weed Science**, v. 54, n. 3, p. 407–412, 1 maio 2006.

ROCHA, O; GUNTZEL, A. M. Crustacea Branchiopoda. In: **Invertebrados de água doce**. São Paulo: Biota/Fapesp, 2000. 4p. 109–120.

ROSLEV, P.; R. HANSEN, L.; ØRSTED, M. Quantifying sublethal effects of glyphosate and Roundup® to *Daphnia magna* using a fluorescence based enzyme activity assay and video tracking. In: **Anais...** In: SETAC EUROPE 25TH ANNUAL MEETING. 2015. Disponível em: <[http://vbn.aau.dk/da/publications/quantifying-sublethal-effects-of-glyphosate-and-roundup-to-daphnia-magna-using-a-fluorescence-based-enzyme-activity-assay-and-video-tracking\(62071cba-217f-468d-8cb4-c7f0ba8d86d1\).html](http://vbn.aau.dk/da/publications/quantifying-sublethal-effects-of-glyphosate-and-roundup-to-daphnia-magna-using-a-fluorescence-based-enzyme-activity-assay-and-video-tracking(62071cba-217f-468d-8cb4-c7f0ba8d86d1).html)>. Acesso em: 2 nov. 2016.

SANGITA DAS; SHARMA, A. K.; TABREZ AHMAD. The Temperature Dependence of the Acute Toxicity of Heavy Metals (Cadmium, Copper and Mercury) to a Freshwater Pond Snail, *Lymnae aluteola l*. **Environment Conservation Journal**, v. 13, n. 1/2, p. 11–15, 2012.

SANTOS, M.; MELÃO, M. G. G.; LOMBARDI, A. T. Life history characteristics and production of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday (Crustacea, Cladocera) under different experimental conditions. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 18, n. 2, p. 199–212, 2006.

SCHEIL, V.; KÖHLER, H.-R. Influence of Nickel Chloride, Chlorpyrifos, and Imidacloprid in Combination with Different Temperatures on the Embryogenesis of the Zebrafish *Danio rerio*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 56, n. 2, p. 238–243, fev. 2009.

SCHIFFER, M.; HANGARTNER, S.; HOFFMANN, A. A. Assessing the Relative Importance of Environmental Effects, Carry-over Effects and Species Differences in Thermal Stress Resistance: A Comparison of Drosophilids across Field and Laboratory Generations. **Journal of Experimental Biology**, v. 216, n. 20, p. 3790–3798, 2013.

SCOTT, G. R.; JOHNSTON, I. A. Temperature during Embryonic Development Has Persistent Effects on Thermal Acclimation Capacity in Zebrafish. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 35, p. 14247–14252, 2012.

SEELAND, A.; ALBRAND, J.; OEHLMANN, J.; MÜLLER, R. Life Stage-Specific Effects of the Fungicide Pyrimethanil and Temperature on the Snail *Physella acuta* (Draparnaud, 1805) Disclose the Pitfalls for the Aquatic Risk Assessment under Global Climate Change. **Environmental Pollution**, v. 174, p. 1–9, 2013.

SNELL, T. W.; MOFFAT, B. D.; JANSSEN, C.; PERSOONE, G. Acute Toxicity Tests Using Rotifers. IV. Effects of Cyst Age, Temperature, and Salinity on the Sensitivity of *Brachionus calyciflorus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 21, n. 3, p. 308–317, jun. 1991.

SOMERO, G. N. The Physiology of Climate Change: How Potentials for Acclimatization and Genetic Adaptation Will Determine “Winners” and “Losers”. **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 6, p. 912–920, 2010.

STEFFENS, K.; LARSBO, M.; MOEYS, J.; JARVIS, N.; LEWAN, E. Predicting Pesticide Leaching under Climate Change: Importance of Model Structure and Parameter Uncertainty. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 172, p. 24–34, 2013.

SUNDAY, J. M.; CALOSI, P.; DUPONT, S.; MUNDAY, P. L.; STILLMAN, J. H.; REUSCH, T. B. H. Evolution in an Acidifying Ocean. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 29, n. 2, p. 117–125, 2014.

TAKAHASHI, I. T.; COWGILL, U. M.; MURPHY, P. G. Comparison of Ethanol Toxicity to *Daphnia magna* and *Ceriodaphnia dubia* Tested at Two Different Temperatures: Static Acute Toxicity Test Results. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 39, n. 2, p. 229–236, 1 ago. 1987.

TALENT, L. G. Effect of Temperature on Toxicity of a Natural Pyrethrin Pesticide to Green Anole Lizards (*Anolis carolinensis*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 12, p. 3113–3116, dez. 2005.

TASSOU, K. T.; SCHULZ, R. Combined Effects of Temperature and Pyriproxyfen Stress in a Full Life-Cycle Test with *Chironomus riparius* (Insecta). **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**, v. 31, n. 10, p. 2384–2390, out. 2012.

TATTERS, A. O.; ROLEDA, M. Y.; SCHNETZER, A.; FU, F.; HURD, C. L.; BOYD, P. W.; CARON, D. A.; LIE, A. A. Y.; HOFFMANN, L. J.; HUTCHINS, D. A. Short- and Long-Term Conditioning of a Temperate Marine Diatom Community to Acidification and Warming. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 368, n. 1627, 2013.

TSUI, M. T. K.; CHU, L. M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere**, v. 52, n. 7, p. 1189–1197, ago. 2003.

VERA, M. S.; DI FIORI, E.; LAGOMARSINO, L.; SINISTRO, R.; ESCARAY, R.; IUMMATO, M. M.; JUÁREZ, A.; RÍOS DE MOLINA, M. del C.; TELL, G.; PIZARRO, H. Direct and Indirect Effects of the Glyphosate Formulation Glifosato Atanor® on Freshwater Microbial Communities. **Ecotoxicology (London, England)**, v. 21, n. 7, p. 1805–1816, out. 2012.

WANG, M.-J.; WANG, W.-X. Temperature-Dependent Sensitivity of a Marine Diatom to Cadmium Stress Explained by Subcellular Distribution and Thiol Synthesis. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 22, p. 8603–8608, 15 nov. 2008.

WEBER, A. K.; PIROW, R. Physiological responses of *Daphnia pulex* to acid stress. **BMC Physiology**, v. 9, p. 9, 21 abr. 2009.

WESTON, D. P.; YOU, J.; HARWOOD, A. D.; LYDY, M. J. Whole Sediment Toxicity Identification Evaluation Tools for Pyrethroid Insecticides: III. Temperature Manipulation. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**, v. 28, n. 1, p. 173–180, jan. 2009.

WICKHAM, H. plyr: Tools for splitting, applying and combining data. **R package version 0.1**, v. 9, p. 651, 2009a.

WICKHAM, H. **Ggplot2: elegant graphics for data analysis**. [s.l.] Springer, 2009b.

WILLIS, K. J.; LING, N.; CHAPMAN, M. A. Effects of temperature and chemical formulation on the acute toxicity of pentachlorophenol to *Simocephalus vetulus* (Schoedler, 1858) (Crustacea: Cladocera). **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 29, n. 2, p. 289–294, 1 jun. 1995.

WILLMING, M. M.; QIN, G.; MAUL, J. D. Effects of Environmentally Realistic Daily Temperature Variation on Pesticide Toxicity to Aquatic Invertebrates. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 12, p. 2738–2745, 2013.

ZEPP, R. G.; ERICKSON III, D. J.; PAUL, N. D.; SULZBERGER, B. Interactive Effects of Solar UV Radiation and Climate Change on Biogeochemical Cycling. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 6, n. 3, p. 286–300, 2007.

ZHOU, G.-J.; WANG, Z.; LAU, E. T. C.; XU, X.-R.; LEUNG, K. M. Y. Can we predict temperature-dependent chemical toxicity to marine organisms and set appropriate water quality guidelines for protecting marine ecosystems under different thermal scenarios? **Marine Pollution Bulletin**, v. 87, n. 1–2, p. 11–21, 15 out. 2014.

ZOU, E.; BU, S. Acute Toxicity of Copper, Cadmium, and Zinc to the Water Flea, *Moina Irrasa* (Cladocera). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 52, n. 5, p. 742–748, 1 maio 1994.