UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

Programa de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental

LUCAS BUENO MENDES

Análise dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18CE em *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae) por meio de estudos experimentais

São Carlos

Estado de São Paulo

2011

LUCAS BUENO MENDES

Análise dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18CE em *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae) por meio de estudos experimentais

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 da Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Assoc. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola

São Carlos

Estado de São Paulo

2011

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

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

Mendes, Lucas Bueno

M928a Análise dos efeitos do agrotóxico Vertimec ® 18CE em *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae) por meio de estudos experimentais / Lucas Bueno Mendes ; orientador Evaldo Luiz Gaeta Espíndola. -- São Carlos, 2011.

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, 2011.

1. Ecotoxicologia. 2. Mesocosmos. 3. *Runoff.* 4. Agrotóxico. 5. Vertimec® 18CE. 6. Abamectina. 7. *Danio rerio.* I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): Bacharel **LUCAS BUENO MENDES.**

Dissertação defendida e julgada em 21.02.2011 perante a Comissão Julgadora:

APROVADO

Prof. Associado **EVALDO LUIZ GAETA ESPÍNDOLA – (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Renata Fracácio — Aprovado

Profª. Drª. **RENATA FRACACIO**
(Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"/campus de Sorocaba)

APROVADO

Drª. **ALINE FERNANDA CAMPAGNA**
(Aplysia – Assessoria e Consultoria Ambiental)

Prof. Associado **EVALDO LUIZ GAETA ESPÍNDOLA**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Engenharia Ambiental

Prof. Associado **PAULO CÉSAR LIMA SEGANTINE**
Presidente da Comissão da Pós-Graduação da EESC

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Assoc. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola, pela orientação, confiança, apoio, incentivo e paciência ao longo desses dois anos.

À Dra. Clarice Maria R. Botta pelo auxílio e por todas as contribuições.

À Dra. Cláudia Fileto pelo grande auxílio, participação e contribuição à pesquisa.

Aos amigos Ana, Andréa, André, Bruna, Danilo, Edna, Haroldo, Luciana e Raphael pelo prazer de trabalhar em conjunto.

Aos técnicos Marcelo Menezes Nogueira e Amandio Menezes Nogueira, que contribuíram intensamente para a realização desta pesquisa.

À Dra. Nelsy F. Verani e Beatriz K. Rodrigues pela oportunidade e pelas contribuições dadas para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos funcionários do CRHEA/SHS/EESC/USP.

À minha mãe, ao meu pai e aos meus irmãos, por estarem sempre ao meu lado, me apoiando em todos os momentos.

À Gláucia, por todo o incentivo e carinho.

Ao CNPq, pela bolsa concedida.

RESUMO

LUCAS, B. M. Análise dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18CE em *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae) por meio de estudos experimentais. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2011.

Nos últimos anos o aumento do consumo de agrotóxicos em todo o mundo tem preocupado agências nacionais e internacionais em decorrência dos diversos impactos ambientais e das sérias implicações à saúde humana. Dentre os inúmeros produtos utilizados na agricultura destaca-se o agrotóxico Vertimec® 18CE, indicado para 42 usos distintos, compreendendo 24 culturas, visando o combate de 17 diferentes pragas. Considerando os riscos ambientais associados ao uso de agrotóxicos, se faz necessária a realização de estudos mais abrangentes para melhor compreender as inter-relações existentes no processo de contaminação e os reais efeitos sobre a biota aquática. Nesse sentido, procurou-se, na presente pesquisa, avaliar os efeitos do Vertimec® 18CE sobre *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae) por meio de experimentos *in situ*, a partir da simulação da contaminação do ambiente aquático por água proveniente do carreamento superficial de parcelas de solo contaminadas e não contaminadas (controle), além da aplicação direta do contaminante na coluna d'água; bem como por experimentos laboratoriais com diferentes diluições do *runoff* (simulando o aporte diferenciado quantitativamente), com amostras ambientais dos mesocosmos e pela avaliação da sensibilidade ao produto comercial Vertimec® 18CE. Para isso foram utilizadas duas parcelas de solo com $8m^2$ cada e inclinação de 6%, das quais uma recebeu a contaminação segundo a dose recomendada para o cultivo de morango (0,125 litros de calda por m^2) e a outra somente aspersão com água, servindo como controle. Posteriormente foi simulada uma chuva de 20 a 30mm e coletada a água de *runoff* para a execução dos experimentos *in situ* e laboratoriais com as diluições de *runoff*. Simultaneamente foram realizadas análises físicas e químicas da água de *runoff* e dos mesocosmos, além da caracterização física e química do sedimento do experimento *in situ* e das parcelas de solo utilizadas. As análises limnológicas do experimento *in situ* demonstraram o aumento de nutrientes (nitrogênio e fósforo), material em suspensão e turbidez, com efeitos sobre a concentração de clorofila *a*, feofitina, condutividade e oxigênio dissolvido. Os resultados obtidos nos testes de toxicidade indicaram diferenças entre os testes laboratoriais (com condições mais controladas) e *in situ* (condições mais próximas ao sistema natural), registrando-se toxicidade crônica apenas no experimento *in situ*, para o tratamento com contaminação direta com o agrotóxico. Não foram observados efeitos agudos ou crônicos nos experimentos laboratoriais com as diluições de *runoff* e nem com as amostras de água dos mesocosmos. Os efeitos tóxicos registrados nos testes de toxicidade crônica de curta duração indicam maior tempo de permanência da formulação comercial em relação ao seu princípio ativo isolado, a abamectina, demonstrando os riscos potenciais do uso do produto comercial sem estudos prévios. Quanto à sensibilidade os valores de $CL_{50,}$48h estiveram entre 3,88 e 6,13 $\mu l.L^{-1}$ de Vertimec® 18CE (média de 4,74 $\mu l.L^{-1}$), enquanto que os valores da $CE_{50,}$48h estiveram entre 2,46 e 5,63 $\mu l.L^{-1}$ (média de 3,66 $\mu l.L^{-1}$). No teste crônico de curta duração obteve-se valores de 3,0 $\mu l.L^{-1}$; 2,0 $\mu l.L^{-1}$ e 2,5 $\mu l.L^{-1}$ para CEO, CENO e VC, respectivamente.

Palavras Chave: Ecotoxicologia, mesocosmos, *runoff*, agrotóxico, Vertimec® 18CE, abamectina, *Danio rerio*.

ABSTRACT

LUCAS, B. M. Analysis of the effects of the pesticide Vertimec ® 18CE in *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae) through experimental studies. Dissertation (Master's degree) School of engineering of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, SP, 2011.

In recent years the increased of pesticides use in the world has been concerned national and international agencies as a result of various environmental impacts and the serious implications to human health. Among the many products used in agriculture, stands out the pesticide Vertimec ® 18CE, nominated for 42 different uses, comprising 24 cultures, aimed to combat 17 different pests. Considering the environmental risks associated with pesticide use, it is necessary to carry out further studies to better understand the interrelationships within the process of contamination and the actual effects on aquatic biota. In this sense, this study aimed to evaluate the effects of Vertimec ® 18CE on *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae) through *in situ* experiments, by simulating the contamination of the aquatic environment by water from the surface *runoff* of contaminated and uncontaminated (control) soil, beyond the direct application of the contaminant in the water column, as well laboratory experiments with different dilutions of the *runoff* (simulating the contribution quantitatively different), with samples of the mesocoms and the assessment of the sensitivity to the commercial product Vertimec ® 18CE. For this we used two parcels of land with $8m^2$ each and incline of 6%, one received a recommended dose contamination for the cultivation of strawberries (0.125 l per m^2) and the other only water spraying, as a control. Subsequently we simulated a 20 to 30mm of rain and *runoff* water was collected for the addition of *in situ* and laboratory experiments with dilutions of *runoff*. Were performed physical and chemical analysis of *runoff* water and the mesocosms, as well as physical and chemical characterization of sediment of *in situ* experiment and the parcels of soil used. Limnological analyses of *in situ* experiment showed an increase of nutrients (nitrogen and phosphorus), suspended solids and turbidity, with effects on the concentration of chlorophyll, pheophytin, conductivity and dissolved oxygen. The results obtained in toxicity tests indicated differences between the laboratory tests (with more controlled conditions) and *in situ* (conditions closer to the natural system), registering only partial chronic toxicity in the *in situ* experiment, to treatment with direct pesticide contamination. There were no acute or chronic effects in laboratory experiments with dilutions or with *runoff* and water samples from mesocosms. Toxic effects reported in chronic toxicity tests indicated higher persistence of the commercial formulation in relation to its isolated active ingredient, abamectin, demonstrating the potential risks of the use of commercial product without prior studies. In relation to the sensitivity of $LC_{50,}$48h values were between 3.88 and 6.13 $\mu l.L^{-1}$ Vertimec® 18CE (medium value of 4.74 $\mu l.L^{-1}$), whereas the $EC_{50,}$48h values were among 2.46 and 5.63 $\mu l.L^{-1}$ (medium value of 3.66 $\mu l.L^{-1}$). In the partial chronic test we obtained a values of 3.0 $\mu l.L^{-1}$, 2.0 and 2.5 $\mu l.L$ $\mu l.L^{-1}$ for LOEC, NOEC and CV, respectively.

Key-words: Ecotoxicology, mesocosms, *runoff*, pesticide, Vertimec® 18CE, abamectin, *Danio rerio.*

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1: *Contextualização, justificativa e objetivos da pesquisa*

Figura 1: Transporte de agrotóxicos no ambiente. Modificado de Gavrilescu (2005). 7

Capítulo 2: *Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18CE sobre Danio rerio (Cypriniformes, Cyprinidae)*

Figura 1: Fórmula estrutural da avermectina B1a e B2b. Fonte: FISHER; MROZIK, 1989). 29
Figura 2: Valores dos testes de sensibilidade de *Danio rerio* ao cloreto de potássio em exposição de 48 horas. 33
Figura 3: Resultados dos testes de toxicidade avaliando a CL_{50},48h (A) e CE_{50},48h (B) para *Danio rerio* quando exposto ao Vertimec® 18CE durante 48 horas. 34

Capítulo 3: *Utilização de bioensaios in situ (mesocosmos) e laboratoriais com Danio rerio (Cypriniformes, Cyprinidae) para avaliação dos efeitos tóxicos dos resíduos do Vertimec®18CE.*

Figura 1: Parcelas de solo preparadas para a aplicação do agrotóxico e detalhe dos sulcos revestidos com lona plástica para armazenagem da água escoada superficialmente. 48
Figura 2: Procedimento de pulverização do agrotóxico Vertimec® 18CE na parcela, com uso de equipamentos de segurança (esquerda) e simulação de chuva nas parcelas de solo previamente preparadas (direita). 49
Figura 3: Coleta de água do *runoff* (esquerda) e armazenamento (direita) para posterior realização dos experimentos laboratoriais e *in situ*. 49
Figura 4: Esquema representativo do mesocosmos, com detalhes da estrutura do tanque de concreto (esquerda) e do mesocosmo, com pesos (direita). 52
Figura 5: Esquema da disposição dos mesocosmos no tanque de concreto (esquerda) e após adição da água do *runoff* e inserção das câmaras para realização dos testes *in situ*.(direita). . 53

Figura 6: Representação esquemática das armadilhas utilizadas para a realização dos testes in situ com *Danio rerio*. 54
Figura 7: Valores médios das variáveis físicas e químicas da água durante o período experimental (C: controle; RNC: *runoff* não contaminado; RC: *runoff* contaminado e V: aplicação direta do Vertimec®18CE). 56
Figura 8: Valores obtidos para clorofila *a* e feofitina durante o período amostral, nos diferentes tratamentos dos mesocosmos (C: controle; RNC: *runoff* não contaminado; RC: *runoff* contaminado e V: aplicação direta do Vertimec®18CE). 61
Figura 9: Valores obtidos para a análise granulométrica antes do início do experimento, para os diferentes tratamentos dos mesocosmos e para as parcelas de solo, contaminada e não contaminada (C: controle; RNC: *runoff* não contaminado; RC: *runoff* contaminado e V: direta do Vertimec®18CE; PNC: parcela não contaminada e PC: parcela contaminada). 62

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1: *Contextualização, justificativa e objetivos da pesquisa*

Tabela 1: Classificação toxicológica dos agrotóxicos em função do modo de ação (Fonte: Gavrilescu, 2005). 4
Tabela 2: Classificação toxicológica dos agrotóxicos em função da DL_{50} (Fonte: Embrapa, 2004) 5

Capítulo 2: *Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18CE sobre Danio rerio (Cypriniformes, Cyprinidae)*

Tabela 1: Resumo dos resultados do Teste de Tukey, com as comparações entre os diferentes grupos do teste crônico de curta duração. 35

Capítulo 3: *Utilização de bioensaios in situ (mesocosmos) e laboratoriais com Danio rerio (Cypriniformes, Cyprinidae) para avaliação dos efeitos tóxicos dos resíduos do Vertimec®18CE*

Tabela 1: Metodologia de análise de algumas variáveis limnológicas da água proveniente dos mesocosmos. 55
Tabela 2: Metodologias e referências utilizadas para análise das amostras de sedimento dos mesocosmos. 55
Tabela 3: Valores de material em suspensão total, inorgânico, orgânico e de turbidez, com seus respectivos desvios padrão, obtidos nos diferentes tratamentos nos experimentos in situ durante período de estudo (MST: material em suspensão total, MSI: material em suspensão inorgânico, MSO: material em suspensão orgânico). 57
Tabela 4: Valores médios e os respectivos desvios padrão para nutrientes durante o período experimental (C: controle; RNC: *runoff* não contaminado; RC: *runoff* contaminado e V: aplicação direta do Vertimec®18CE). 59

Tabela 5: Valores obtidos para matéria orgânica antes do início do experimento, para os diferentes tratamentos dos mesocosmos e para as parcelas de solo contaminada e não contaminada (C: controle; RNC: *runoff* não contaminado; RC: *runoff* contaminado e V: aplicação ação direta do Vertimec®18CE; I: início; PNC: parcela não contaminada e PC: parcela contaminada). 63

Tabela 6: Valores obtidos para a análise de Nitrogênio e Fósforo no sedimento inicial e ao final do experimento para os diferentes tratamentos dos mesocosmos (C: controle; RNC: *runoff* não contaminado; RC: *runoff* contaminado e V: aplicação direta do Vertimec®18CE; I: início; PNC: parcela não contaminada e PC: parcela contaminada). 63

Tabela 7: Valores obtidos para a análise físicas e químicas da água das diferentes diluições do *runoff* (RNC: *runoff* não contaminado e RC: *runoff* contaminado). 64

Tabela 8: Síntese dos resultados dos testes de toxicidade aguda e crônica de curta duração com *Danio rerio* nos experimentos laboratoriais (com amostras do *runoff* e da água dos mesocosmos) e in situ (C: controle; RNC: *runoff* não contaminado; RC: *runoff* contaminado e V : aplicação direta do Vertimec®18CE), com base na avaliação da mortalidade e biometria dos organismos-teste. 66

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: CONTEXTUALIZAÇÃO, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DA PESQUISA ***1***

1. INTRODUÇÃO **1**

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **3**

2.1. AGROTÓXICOS 3

2.2. OS PROBLEMAS CAUSADOS PELOS AGROTÓXICOS 6

2.3. A CONTAMINAÇÃO DO SOLO E DA ÁGUA POR AGROTÓXICOS 9

2.4. OS ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS: DEFINIÇÃO E IMPORTÂNCIA 11

2.5. O ORGANISMO-TESTE UTILIZADO: DANIO RERIO 15

3. JUSTIFICATIVA **16**

4. OBJETIVOS **20**

4.1. OBJETIVO GERAL 20

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 20

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **20**

CAPÍTULO 2: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO AGROTÓXICO VERTIMEC® 18CE SOBRE DANIO RERIO (CYPRINIFORMES, CYPRINIDAE) ***27***

1. INTRODUÇÃO **27**

2. METODOLOGIA **31**

2.1. CULTIVO E MANUTENÇÃO DOS ORGANISMOS 31

2.2 TESTES DE TOXICIDADE COM DANIO RERIO 32

3. RESULTADOS **33**

4. DISCUSSÃO **35**

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **40**

CAPÍTULO 3: UTILIZAÇÃO DE BIOENSAIOS IN SITU (MESOCOSMOS) E LABORATORIAIS COM DANIO RERIO (CYPRINIFORMES, CYPRINIDAE) PARA AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DOS RESÍDUOS DO VERTIMEC®18CE. ***44***

1. INTRODUÇÃO **45**

2. METODOLOGIA **47**

2.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL 47

2.2. CULTIVO, MANUTENÇÃO E TESTES DE SENSIBILIDADE COM DANIO RERIO 49

2.3. OS TESTES DE TOXICIDADE LABORATORIAIS 50

2.4. OS TESTES DE TOXICIDADE IN SITU 51

2.5. COLETA DE ÁGUA PARA AS ANÁLISES FÍSICAS, QUÍMICAS E BIOLÓGICAS DA ÁGUA 55

2.6. COLETA DE SEDIMENTO PARA AS ANÁLISES FÍSICAS E QUÍMICAS 55

3. RESULTADOS **56**

3.1. VARIÁVEIS FÍSICAS, QUÍMICAS E BIOLÓGICAS (CLOROFILA) DA ÁGUA 56

3.2. VARIÁVEIS FÍSICAS E QUÍMICAS DO SEDIMENTO, SOLO E DA ÁGUA DE RUNOFF 61

3.3. TESTES ECOTOXICOLÓGICOS 64

4. DISCUSSÃO **66**

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS **73**

CONSIDERAÇÕES FINAIS ***79***

APÊNDICE A: REGISTROS DOS TESTES DE TOXICIDADE ***80***

APÊNDICE B: PARÂMETROS FÍSICOS E QUÍMICOS DO EXPERIMENTO IN SITU ***99***

APÊNDICE C: FOTOS DOS EXPERIMENTOS ***106***

ANEXO ***108***

ESTRUTURAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado está estruturada em um capítulo introdutório (**Capítulo 1**), no qual se procurou contextualizar a pesquisa desenvolvida, discorrendo sobre os principais problemas dos agrotóxicos, os estudos ecotoxicológicos, os organismos-testes utilizados, os motivos que levaram ao desenvolvimento da pesquisa e os objetivos propostos (geral e específicos).

Posteriormente, optou-se pela subdivisão da dissertação em mais dois capítulos (**Capítulo 2 e 3**), os quais contemplam os itens Resumo, Introdução, Metodologia, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, além da inserção de um item final denominado **Considerações Finais** e a apresentação de todos os dados obtidos em campo e laboratório, constantes em **Apêndice**. Os seguintes tópicos foram abordados em cada capítulo:

Capítulo 2: Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18CE sobre *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae) – neste capítulo procurou-se avaliar os efeitos do Vertimec® 18CE sobre juvenis de *Danio rerio*, por meio de testes de toxicidade aguda e crônica de curta duração, determinando os possíveis efeitos na sobrevivência e crescimento da espécie.

Capítulo 3: Utilização de bioensaios *in situ* (mesocosmos) e laboratoriais com *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae) para avaliação dos efeitos tóxicos dos resíduos do Vertimec®18CE – procurou-se avaliar os efeitos diretos e indiretos da contaminação por Vertimec® 18CE, via aplicação direta e *runoff*, por meio de estudos laboratoriais e *in situ* com a espécie *Danio rerio*.

Salienta-se, ainda, que se procurou, na estruturação da dissertação, uma formatação mais próxima aos artigos científicos, facilitando a posterior publicação dos resultados obtidos na pesquisa. No entanto, também foram adotadas algumas das **Recomendações para Elaboração de Teses e Dissertações** da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, principalmente em relação às citações bibliográficas no corpo do texto e em cada item de Referências Bibliográficas.

Capítulo 1: *Contextualização, justificativa e objetivos da pesquisa*

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem-se verificado, de forma cada vez mais efetiva, que o desenvolvimento tecnológico, caracterizado pela maior intervenção humana sobre os recursos naturais, tem interferido de forma direta ou indireta na estrutura e funcionamento dos ecossistemas, trazendo sérias implicações à saúde humana e, ao mesmo tempo, promovendo um maior interesse da sociedade pelas questões ambientais e uma ampliação dos estudos com a finalidade de se tentar minimizar os efeitos gerados.

Nesse sentido, atualmente é possível encontrar diversas informações que circulam diariamente na mídia e em periódicos científicos, relacionadas aos problemas decorrentes da degradação ambiental pela ação antrópica. Grande parte dessa preocupação com o meio ambiente foi originada pelos acidentes com produtos químicos, como o caso do uso indiscriminado do DDT para o combate de doenças e pragas agrícolas durante os anos de 1940, o que provocou o declínio de algumas populações de pássaros nos Estados Unidos, e a contaminação por resíduos de DDT nas águas de diversas regiões do mundo, o que pode ser observado até os dias atuais. Além desse, existem muitos outros problemas ambientais decorrentes da interferência humana sobre os ecossistemas, provocados por diversas formas de contaminantes, como aqueles relacionados às contaminações ambientais por mercúrio, cádmio, bifenilas poli-cloradas, derramamento de petróleo e várias outras substâncias químicas (ZAGATTO, 2006a).

Dentre os diferentes contaminantes ambientais os agrotóxicos se tornaram um dos mais problemáticos, uma vez que a sua utilização vem aumentando em larga escala, sendo o Brasil, atualmente, o maior consumidor de agrotóxico do mundo (PACHECO, 2009). Isso ilustra o cenário preocupante em que se encontra o Brasil, evidenciando a importância do desenvolvimento de novos estudos para melhor caracterizar e quantificar a extensão dos impactos, incluindo não apenas os efeitos deletérios aos organismos, população e comunidades, mas também os efeitos em nível de

ecossistema, o que, neste caso, inclui uma análise dos efeitos nos diversos processos naturais (HOFFMAN, 2003).

O uso abusivo de agrotóxicos tem sido uma das principais fontes de poluição dos recursos hídricos superficiais e subterrâneos, da contaminação dos solos e alterações na biota, bem como por diversos problemas relacionados à saúde humana. Uma das principais questões amplamente discutidas em diversos segmentos da sociedade se relaciona com os efeitos não seletivos dos agrotóxicos, afetando espécies não-alvo, ocasionando uma pressão seletiva nas espécies e perturbações na dinâmica bioquímica, promovendo alterações nas características do ecossistema (EMBRAPA, 2004), além do processo de bioacumulação e biomagnificação (BURATINI; BRANDELLI, 2006), que aumentam a probabilidade de ocorrência de efeitos deletérios.

Frente aos efeitos deletérios ocasionados pelos agrotóxicos, verifica-se a necessidade de estudos que avaliem de forma mais ampla o efeito dos contaminantes no ambiente, os quais podem ocorrer por meio dos testes ecotoxicológicos, que são baseados em testes toxicológicos onde as espécies avaliadas são representativas do ecossistema, estudando efeitos como a mortalidade, sobrevivência, reprodução, biometria, comportamento, biomarcadores, entre outros, com a finalidade de prever possíveis impactos ambientais proporcionados pelo agente tóxico no ambiente natural (HOFFMAN, 2003). Buscando um mecanismo ainda mais eficiente para o estudo dos efeitos dos contaminantes no meio ambiente aquático, foram também desenvolvidas metodologias para estudos em micro e mesocosmos. Esses estudos são realizados com simulações do ambiente natural em escala reduzida, permitindo a análise dos efeitos de contaminantes em organismos, populações e comunidades sob condições semi-naturais, possibilitando a análise dos efeitos toxicológicos diretos e as implicações ecológicas indiretas (GRANEY et al., 1995).

É nesse contexto que esta pesquisa foi desenvolvida, tendo como objetivo a avaliação do potencial de toxicidade do agrotóxico Vertimec® 18CE, o qual vem sendo utilizado com frequência e em grandes quantidades nas culturas de batata e morango no município de Bom Repouso (MG), que tem como principal atividade econômica a agricultura (ESPINDOLA; BRIGANTE, 2009). Considerando que o município é uma região com extensa rede hídrica e que a população local utiliza de fontes naturais para abastecimento humano, irrigação de culturas e dessedentação de animais (CUNHA, 2009), direcionou-se a pesquisa para avaliar quais seriam as possíveis interferências do uso do agrotóxico nas culturas sobre os ecossistemas aquáticos, de forma indireta (por meio do *runoff* contaminado) e direta (aplicação direta na água), por meio de estudos

experimentais *in situ* e laboratorial, utilizando a espécie *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae), que possui norma padronizada para a avaliação da toxicidade.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Agrotóxicos

O constante crescimento populacional faz com que seja necessário o contínuo desenvolvimento de novas técnicas para o aumento da produção de alimentos. Assim, novas tecnologias ligadas ao setor agrícola foram desenvolvidas a fim de suprir a demanda alimentar, destacando-se, entre outros, a produção e utilização de substâncias químicas para o aumento da produtividade. Uma das técnicas relacionadas a essa necessidade é o plantio na forma de monocultivo, o que favoreceu o aparecimento de pragas, doenças, ervas daninhas e microrganismos, decorrentes do desequilíbrio que atingiu essas populações. Esse desequilíbrio trouxe sérios problemas para a produção agrícola, incentivando o uso de agroquímicos como pesticidas, fertilizantes, inseticidas e outros (ONGLEY, 1996).

No entanto, esse não é um problema atual. Registros datados de 1000 a.C. referem-se ao uso de substâncias químicas com a finalidade de diminuição de problemas agrícolas como pragas e doenças, com o intuito de aumentar a produção agrícola, sendo uma dessas práticas o uso de enxofre como fumigante (GAVRILESCU, 2005). Porém, a grande expansão do uso dessas substâncias ocorreu após a Segunda Guerra Mundial, com o desenvolvimento da indústria de síntese química. Desse modo, o atual padrão agrícola é baseado em uma agricultura sustentada pelo uso de agroquímicos (agrotóxicos, fertilizantes e corretivos), mecanização, técnicas de irrigação e espécies altamente selecionadas, visando sempre à elevada produtividade. Esse modelo está relacionado com a Revolução Verde implantada a partir da década de 1960 (CLEAVER, 1972; ONGLEY, 1996).

Na legislação brasileira, agrotóxico é definido como:

> *"...produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; além de substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento* (BRASIL, 1989)."

Os principais tipos de agrotóxicos são os inseticidas, fungicidas e herbicidas, entretanto existem diversos outros produtos como os rodenticidas, acaricidas, nematicidas, molusquicidas e

fumigantes (Tabela 1). Desse modo, os agrotóxicos são utilizados em diversas atividades, podendo interferir direta ou indiretamente no ambiente.

Tabela 1: Classificação toxicológica dos agrotóxicos em função do modo de ação (Fonte: Gavrilescu, 2005).

Tipo de pesticidas	
Tipo	**Ação**
Algicidas	Controle de algas em corpos d'água e piscinas
Antimicrobiano	Controle de microorganismos patogênicos
Atrativos	Atraem pragas específicas usando ferormônios naturais que confundem o comportamento de acasalamento de insetos
Avicidas	Controle de aves
Biopesticida	Substâncias naturais com propriedades pesticidas
Desfolhante	Causa a queda da folhagem, normalmente para auxiliar no processo de colheita
Dessecante	Auxilia no processo de secagem de plantas ou insetos
Fumigantes	Produzem vapores ou gases para controle de insetos e doenças comuns ao sole e ar
Fungicida	Controle de fungos
Herbicida	Controle de ervas daninhas
Regulador de crescimento de insetos	Acelera ou retarda a taxa de crescimento de insetos
Inseticida	Controle de insetos
Acaricida	Controle de ácaros
Moluscicida	Controle de moluscos
Nematicida	Controle de nematóides e organismos do solo
Ovicida	Controle de ovos de insetos
Piscicida	Controle de peixes
Regulador de crescimento vegetal	Acelera ou retarda o crescimento vegetal
Praguicida	Controle de pestes (vertebrados)
Repelente	Repele mosquitos, carrapatos e outros animais
Rodenticida	Controle de roedores

No Brasil, de acordo com o Decreto nº. 98.816/90, os agrotóxicos são classificados em função do seu potencial de toxicidade, a qual é subdividida em quatro classes (Tabela 2), denominadas por um número e uma cor (classe I, extremamente tóxicos, faixa vermelha; classe II, altamente tóxicos, faixa amarela; classe III, moderadamente tóxicos, faixa azul; e classe IV - pouco ou muito pouco tóxicos, faixa verde). Essa classificação tem como base os valores de DL_{50}, que é a dose capaz de promover a morte de 50% dos organismos em testes laboratoriais (EMBRAPA, 2004).

Tabela 2: Classificação toxicológica dos agrotóxicos em função da DL_{50} (Fonte: Embrapa, 2004)

Classe Toxicológica	**Descrição**	**Faixa indicativa de cor**
I	Extremamente tóxicos (DL_{50} < 50 mg.Kg^{-1} de peso vivo)	Vermelho vivo
II	Muito tóxicos (DL_{50} – 50 a 500 mg Kg^{-1} de peso vivo)	Amarelo intenso
III	Moderadamente tóxicos (DL_{50} – 500 a 5000 mg Kg^{-1} de peso vivo)	Azul intenso
IV	Pouco tóxicos (DL_{50} > 5000 mg Kg^{-1} de peso vivo)	Verde intenso

O caráter tóxico é caracterizado pela presença de grupos funcionais raros na natureza com propriedades distintas, o que confere diferentes graus de persistência ambiental, mobilidade e potenciais tóxico, carcinogênico, mutagênico e teratogênico ou algum efeito endócrino a diversos organismos, inclusive organismos não-alvos, como o homem (ARMAS, 2007).

Assim, o uso incorreto de agrotóxicos pode afetar de maneira drástica o ecossistema local. Alguns dos problemas relacionados ao uso de agrotóxico estão relacionados com alterações da fauna e flora, agindo sobre a vida selvagem, como insetos, microorganismos do solo e organismos aquáticos, podendo causar diversos efeitos negativos, como a redução do número de espécies, alterações comportamentais, reprodutivas e de desenvolvimento, suscetibilização a doenças, magnificação biológica, etc (DORES; DE-LAMONICA-FREIRE, 1999). Além disso, o uso de agrotóxicos pode provocar distúrbios em diversos processos, como por exemplo, na atividade de decomposição, que consequentemente pode afetar a sustentabilidade da cultura ou do ambiente em longo prazo (RÖMBKE; GARCIA, 2000).

No Brasil o consumo de agrotóxicos vem crescendo em larga escala. Em 1964 o consumo de agrotóxicos era de 16 mil toneladas, passando para mais de 128 mil toneladas em 1998, representando um aumento de 700% no período, enquanto a área cultivada em 1960 era de 28 milhões de hectares e de aproximadamente 50 milhões de hectares em 1998, um aumento de somente 78% (SPADOTTO; GOMES, 2004). Segundo um recente estudo da consultoria alemã Kleffmann Group, encomendado pela Associação Nacional de Defesa Vegetal (Andef), o Brasil é o maior mercado de agrotóxicos do mundo, movimentando cerca de US$ 7,1 bilhões, ante US$ 6,6 bilhões do segundo colocado, os Estados Unidos, apresentando um crescimento de US$ 1,7 bilhões

em relação ao ano de 2007. O consumo cresceu no país, apesar de a área plantada ter encolhido 2% em 2009 (PACHECO, 2009).

A legislação brasileira referente ao controle dos agrotóxicos, Lei 7.802, de 12 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto nº 98.816, de 11/01/90, é exigente e restritiva, requerendo a comprovação da eficiência agronômica, as garantias da minimização dos danos à população, seja ela de caráter ocupacional, alimentar ou de saúde pública, e dos possíveis impactos ambientais decorrentes do uso do composto. Atualmente, é exigida a avaliação dos riscos ambientais de cada produto, considerando a ecotoxicidade, que se constitui da exposição de organismos de diferentes compartimentos ambientais, decorrente da necessidade de um conhecimento mais aprofundado sobre o comportamento do agrotóxico no meio ambiente e os seus efeitos nos organismos (BRASIL, 1989).

O aumento do consumo de agrotóxico nas últimas décadas, e seus impactos sobre o ambiente e ao homem, fez com que vários países regulamentassem seu uso e a produção, objetivando minimizar as consequências prejudiciais ao ecossistema (ZAGATTO, 2006b).

2.2. Os problemas causados pelos agrotóxicos

As atividades humanas constituem fontes em potencial de contaminantes para os ecossistemas aquáticos e terrestres. Essas fontes podem ser caracterizadas como pontuais (fontes de fácil identificação no espaço e no tempo), tendo como exemplo o lançamento de esgotos domésticos urbanos; e difusas, que não é possível a identificação do ponto de lançamento dos contaminantes, como é o caso do arraste de fertilizantes e pesticidas pelo escoamento superficial em áreas cultivadas (MOZETO; ZAGATTO, 2006). Embora a agricultura seja apenas uma das fontes difusas de poluição, em muitos casos é considerada como a maior fonte poluidora de recursos hídricos, contribuindo com uma ampla diversidade de classes de poluentes (ONGLEY, 1996).

Os problemas ambientais promovidos pelo consumo de agrotóxicos estão relacionados principalmente com o destino que esse composto tem no ambiente. Os processos que ocorrem após a aplicação do agrotóxico compreendem retenção (sorção, absorção), transformação (degradação química e biológica) e transporte (deriva, volatilização, lixiviação e carreamento superficial), além de interações entre processos (Figura 1). Esses processos podem ser alterados de acordo com as condições ambientais, como o clima (temperatura ambiente, pluviosidade, intensidade de luz solar e ventos); atividade microbiológica; cobertura vegetal; a topografia do terreno; as propriedades físicas

e químicas do solo (teor de matéria orgânica e argila, pH e umidade); e pelas mudanças nas características estruturais e das propriedades químicas das substâncias envolvidas (DORES; DE-LAMONICA-FREIRE, 1999; EMBRAPA, 2004; GAVRILESCU, 2005).

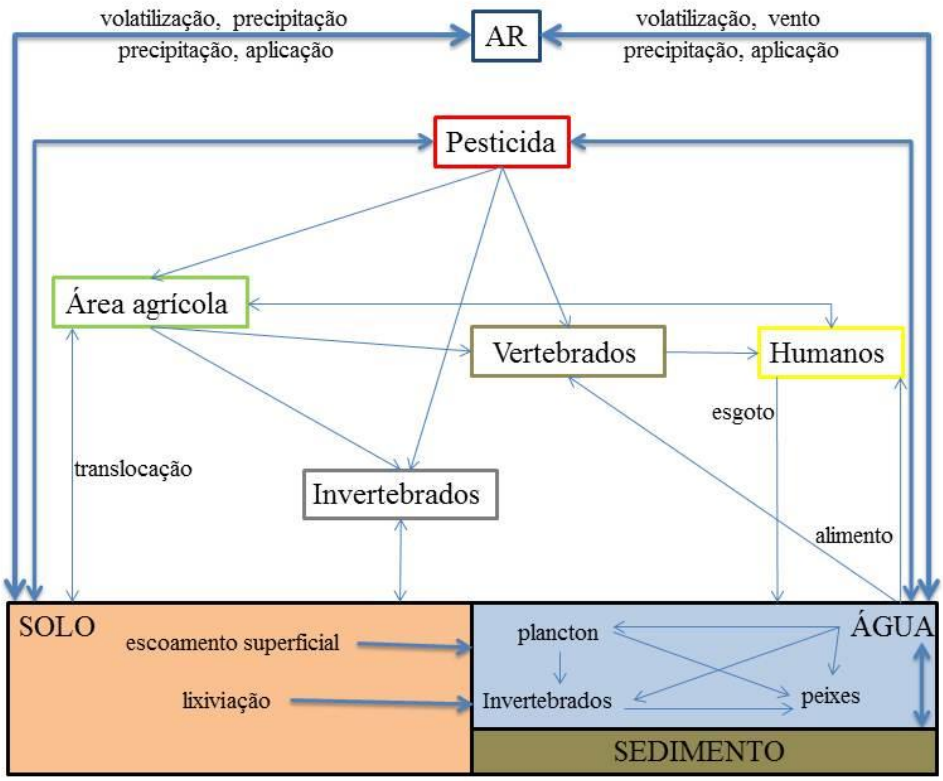


Figura 1: Transporte de agrotóxicos no ambiente. Modificado de Gavrilescu (2005).

Os agrotóxicos possuem efeitos que podem ser prejudiciais para o meio ambiente, como por exemplo, a contaminação de reservatórios hídricos subterrâneos e de diversos organismos que venham a consumir direta ou indiretamente compostos contaminados com resíduos de agrotóxicos. O contato com o agrotóxicos pode provocar o processo de bioacumulação, onde os contaminantes são assimilados e retidos por organismos, acarretando na ampliação da concentração do contaminante no organismo, aumentando a probabilidade de causar efeitos deletérios. Esse processo também pode acarretar a biomagnificação, que consiste na transferência do contaminante de um nível trófico ao outro, com concentrações crescentes à medida que há a transferência para um nível trófico mais elevado (BURATINI; BRANDELLI, 2006). Além disso, a presença de agrotóxicos no ambiente pode provocar impactos diversificados, pois pode exercer uma pressão seletiva nos

organismos e alterar a dinâmica bioquímica, provocando alterações nas características do ecossistema (EMBRAPA, 2004).

Os principais processos que influenciam o transporte dos agrotóxicos são a hidrólise, a fotodegradação, a ionização e a oxidação. O processo de atividade microbiológica pode influenciar na toxicidade do contaminante, podendo aumentar ou diminuir sua toxicidade e potencial de bioacumulação e, consequentemente, interferir na biomagnificação na cadeia trófica (ZAGATTO, 2006b). Os fenômenos de bioacumulação e biomagnificação, no entanto, dependem fatores como: a presença de um mecanismo de absorção ou "sorvedouro" representado principalmente pelos lipídios do organismo, as propriedades físico-químicas do agrotóxico que podem favorecer ou não sua entrada no organismo e a taxa de entrada e depuração do contaminante pelo organismo (VALARINI et al., 2003).

Os problemas relacionados com os agrotóxicos não são observados apenas em ecossistemas naturais, mas também sobre a saúde da população humana. Os agrotóxicos de uso agrícola foram responsáveis por 4074 casos de intoxicação, sendo que 144 resultaram em óbitos, totalizando 32,65% dos casos de óbito por intoxicação, segundo o levantamento do Sinitox de 2008. A intoxicação por agrotóxicos pode ser aguda, subaguda ou crônica, e ocorre, em sua maioria, pelo contato direto, principalmente em relação à população rural, e através do consumo de alimentos contaminados com resíduos. A intoxicação aguda causa sintomas como dor de cabeça, fraqueza, mal-estar, dor de estômago e sonolência. Em relação à intoxicação crônica o quadro clínico é de difícil determinação devido aos diferentes sintomas causados por cada tipo de agrotóxico (OPAS/OMS, 1996).

Existem diversos estudos na literatura internacional e nacional que demonstram o comportamento e os efeitos dos agrotóxicos no meio ambiente (GAVRILESCU, 2005; SILVA; SANTOS, 2007) e diversos estudos em escala de micro e mesocosmos, como na Austrália (BARRY; LOGAN, 1998), Holanda (SCHROER, et al., 2004), Estados Unidos (HOPKINS, et al., 2004) e Japão (CHANG et al., 2005). Entretanto, ainda existem poucos trabalhos, principalmente em escala de micro e mesocosmos, que avaliam esses comportamentos em condições tropicais. Como exemplos podem ser citados os trabalhos desenvolvidos por Laabs et al. (2007), Rodrigues (2007), Zacharias (2009), Vieira (2009), Novelli (2010) e Nunes (2010).

2.3. A contaminação do solo e da água por agrotóxicos

O destino final dos agrotóxicos depende da forma de sua aplicação, estimando-se que apenas uma pequena parcela do volume aplicado atinja os organismos alvo. Estudos com o combate de lagartas no cultivo de couve mostraram, por exemplo, que apenas 0,003% do pesticida é consumido pelas lagartas. Outros estudos indicam uma quantidade aproximada de 0,03 e 0,02%, respectivamente para o combate de afídeos e mirídeos no cultivo de cacau, enquanto que para o combate de lagartas com DDT reportou-se que uma quantidade impressionante de apenas 0,0000001% atinge o organismo alvo (PIMENTEL; LEVITAN, 1986).

Essa pequena eficiência está relacionada aos diferentes destinos que os agrotóxicos sofrem no ambiente, uma vez que apenas uma fração atinge a cultura, enquanto grande parte do volume aplicado é perdida por processos como a volatilização, percolação e carreamento superficial, o que pode ser agravado por fatores como a má aplicação (GRANEY, et al., 1995), promovendo a contaminação dos solos e águas que circundam a área de aplicação.

O solo é um recurso natural fundamental para o desenvolvimento de atividades agrícolas. Suas características possibilitam a sustentação das plantas, além de promover a disponibilidade de nutrientes e água (ANJOS; VAN RAIJ, 2004). A contaminação do solo por agrotóxicos pode ocorrer por meio de aplicações diretas, por resíduos provenientes da aplicação aérea ou por queda de partes das plantas que foram tratadas (PAPINI; ANDREA, 2004). Além disso, deve-se ressaltar a transferência de parte dos agrotóxicos do solo para atmosfera, através dos processos de vaporização direta, co-vaporização e associação com material particulado carregado pelo vento, o que favorece a distribuição destes produtos para outros ambientes, incluindo sua entrada em ambientes aquáticos (DORES; DE-LAMONICA-FREIRE, 1999).

Características como quantidade de nutrientes, umidade, temperatura e a presença de compostos como fertilizantes, corretivos e pesticidas influenciam diretamente a fauna edáfica. As principais vias de contaminação dos organismos edáficos ocorrem através de contato oral, pela ingestão de partículas contaminadas ou assimilação via superfície corpórea, por meio da solubilização do composto tóxico com a solução do solo. Há também a possibilidade de contaminação através da inalação de contaminantes, entretanto, ainda existem poucos estudos demonstrando a importância dessa via quando comparada com as outras duas formas de contaminação (VAN GESTEL; VAN STRAALEN, 2002). Quando assimilados, além de

contaminar os organismos esses compostos podem se bioacumular nos tecidos orgânicos, o que pode acarretar no fenômeno de biomagnificação na cadeia alimentar (EMBRAPA, 2004).

Os organismos edáficos são sensíveis aos agrotóxicos e estão relacionados direta ou indiretamente com funções benéficas, como armazenamento e disponibilidade de água; decomposição de partes de plantas e animais, com a liberação de nutrientes em formas disponíveis às plantas; manutenção de agregados de partículas; decomposição, transformação e ciclagem de nutrientes; supressão de organismos patógenos para as plantas e sequestro e degradação de agrotóxicos. O uso indiscriminado de agrotóxicos pode provocar um impacto sobre a diversidade de espécies e biomassa dos organismos. Alterações comportamentais e morfológicas também são verificadas em função do tipo e concentração do agrotóxico (NUNES, 2010). Desse modo, como os microrganismos presentes no solo possuem papel fundamental na transformação e liberação de nutrientes para as plantas, a disponibilidade de nutrientes pode ser alterada e a fertilidade do solo pode ficar comprometida (EMBRAPA, 2004).

Em relação ao ambiente aquático, sua contaminação por agrotóxicos pode ocorrer por diferentes formas, sendo as principais a aplicação intencional, como forma de controle para algas e invertebrados; deriva, onde os contaminantes são transportados por correntes de ar; escoamento superficial, decorrente da lixiviação em áreas contendo resíduos; lavagem do solo ou lixões contendo resíduos de produtos tóxicos; e chuvas contaminadas por resíduos voláteis presentes em agrotóxicos (Figura 1) (DORES; DE-LAMONICA-FREIRE, 1999; MOZETO; ZAGATTO, 2006; SILVA; SANTOS, 2007). Os agrotóxicos, além de atingirem sistemas superficiais como rios, represas e lagos, também podem atingir, através da percolação, as águas subterrâneas. A contaminação de águas subterrâneas é de difícil tratamento, assim, é necessário o desenvolvimento de procedimentos de prevenção à contaminação (SILVA; SANTOS, 2007).

A aplicação de agrotóxico em culturas agrícolas deixa resíduos do produto em partes dos vegetais (folhas, frutos e sementes) e outra parte atinge diretamente o solo. Devido ao potencial de absorção do solo e do potencial de degradação e mobilidade a substância pode permanecer retida no solo por longos períodos. Desse modo, os agrotóxicos podem atingir os corpos hídricos através das águas de lixiviação do solo ou, caso o produto tenha volatilizado durante ou após a aplicação, as águas provenientes das chuvas podem transportar esses contaminantes da atmosfera para sistemas hídricos (ZAGATTO, 2006b). Deve-se mencionar ainda a contaminação por aplicação acidental, na qual os agricultores, ao pulverizarem as culturas localizadas próximas aos corpos de água, acabam introduzindo o agrotóxico no sistema hídrico. Além disso, a lavagem inadequada de materiais

utilizados nos preparos da calda e outros equipamentos também comprometem os corpos de água, como frequentemente observado nas áreas rurais que foram avaliadas no município de Bom Repouso, Minas Gerais, no escopo das pesquisas desenvolvidas no Projeto Mogi-Guaçu (ESPINDOLA; BRIGANTE, 2009).

A avaliação dos riscos ambientais e da dinâmica dos contaminantes em um ambiente é baseada em conhecimentos das propriedades físico-químicas e ecotoxicológicas do contaminante. Após atingir o meio aquático ele pode permanecer dissolvido na água, ser adsorvido na matéria em suspensão, depositar-se no sedimento, se acumular nos organismos vivos, volatilizar-se ou ser degradado (ZAGATTO, 2006b). Os fatores ambientais definidos pelas características bióticas e abióticas também podem alterar a toxicidade de compostos químicos no ambiente aquático. Dentre os fatores bióticos destacam-se o tipo de organismo, estágio de desenvolvimento, tamanho, estado nutricional e de saúde, alterações sazonais no estado fisiológico, dentre outros, sendo que estes fatores bióticos influenciam a resposta ao poluente de diferentes maneiras. Quanto aos fatores abióticos que podem influenciar na toxicidade, verifica-se que todas as variáveis são importantes, como as características físicas e químicas da água que circunda o organismo vivo (temperatura, pH, teor de oxigênio dissolvido na água, salinidade e dureza), conteúdo de matéria orgânica e material particulado em suspensão, a velocidade do fluxo da água, dentre outros; além das características físico-químicas do próprio composto, como solubilidade, pressão de vapor e pH, e das características do sedimento (SILVA; SANTOS, 2007; SPRAGUE, 1985; ZAGATTO, 2006b).

Atualmente existem diversos trabalhos na área de impactos sobre sistemas aquáticos, como os de Caquet et al. (1989), Hopikins, et al. (2004), Chang et al. (2005) e Laabs et al. (2007), desenvolvidos na linha de ecotoxicologia aquática. Entretanto, apesar do conhecimento dos impactos decorrentes da descarga de contaminantes e nutrientes sobre os sistemas aquáticos, ainda é observada uma contínua degradação desses ambientes (MOZETO; ZAGATTO, 2006).

2.4. Os estudos ecotoxicológicos: definição e importância

A análise química das concentrações de um contaminante não é suficiente para que seja elaborada a avaliação de impacto ambiental, uma vez que existem diferentes formas de interação entre os contaminantes e os componentes do solo/água e biota que não podem ser compreendidos apenas com a análise química dos contaminantes (ZAGATTO, 2006a). É com o intuito de melhor

avaliar um possível impacto ambiental gerado pelo uso de contaminantes que os estudos ecotoxicológicos são realizados.

Os primeiros testes de toxicidade com dejetos industriais foram realizados entre 1863 e 1917, mas somente na década de 1930 é que foram realizados os primeiros testes de toxicidade aguda com organismos aquáticos. Nas décadas de 1950 e 1960 foram iniciados os estudos que objetivavam identificar agentes tóxicos, assim como fontes pontuais de poluição, com a finalidade de estabelecer critérios e padrões que permitissem a manutenção dos níveis de qualidade dos recursos hídricos. Já nos anos 60 o *Water Quality Act – USA* estabeleceu os primeiros padrões de qualidade das águas visando à proteção da vida aquática. Nessa mesma época iniciou-se a elaboração de pesquisas com ênfase na escolha de organismos sensíveis e representativos para tais estudos, assim como o estabelecimento de normas para melhorar a praticidade, confiabilidade e reprodutibilidade desses estudos (RAND et al. 1995; ZAGATTO, 2006a).

No entanto, foi somente em 1969 que o termo Ecotoxicologia foi sugerido, sendo o seu precursor René Truhaut. Esse novo ramo da ciência consiste de uma subárea da toxicologia, e é definida como o estudo dos efeitos de agentes tóxicos nos ecossistemas e em espécies não-alvo, visando promover a proteção do meio ambiente como um todo e não apenas de determinados compartimentos (AZEVEDO; CHASIN, 2003; HOFFMAN, 2003). Desse modo, os estudos ecotoxicológicos compreendem a análise das emissões, distribuição e destino dos agentes no meio abiótico; o contato e contaminação da biota, destacando o problema da contaminação das cadeias biológicas, em especial as cadeias alimentares; e por fim, a análise quantitativa e qualitativa dos efeitos tóxicos promovidos pelos agentes tóxicos, ressalvando o meio ambiente e os organismos afetados (TRUHAUT, 1977).

Os estudos ecotoxicológicos são baseados em bioensaios realizados em laboratórios; em microcosmo, onde as espécies avaliadas são representativas do ecossistema, com a finalidade de prever possíveis impactos ambientais proporcionados pelo agente tóxico no ambiente natural; em estudos em campos controlados ou mesocosmos, onde são testadas variações das condições naturais e aplicações químicas em sistemas fechados; e estudos de avaliação em campo ecológico, em que espécies naturais estão sujeitas ao contato com altas concentrações de agentes químicos (HOFFMAN, 2003).

Desse modo, a ecotoxicologia engloba diferentes ciências com a finalidade de estudar efeitos de compostos em ambientes naturais, combinando mecanismos, processos e respostas de química ambiental, ecologia e toxicologia, incluindo a distribuição e o comportamento dos

contaminantes no ambiente, o impacto no meio ambiente e os impactos sobre os organismos, além da inter-relação entre os organismos e o ambiente (EIJSACKERS, 1994). Assim, para esses estudos podem ser utilizados parâmetros como letalidade e efeitos subletais, como alterações no crescimento, desenvolvimento, reprodução, respostas farmacocinéticas, patologia, bioquímica, fisiologia e comportamento. Os efeitos podem ser expressos através de critérios mensuráveis como o número de organismos mortos, porcentagem de ovos não viáveis, alterações no tamanho e peso, porcentagem de inibição de enzima, incidência de tumor, dentre outros (SILVA; SANTOS, 2007).

Os testes de ecotoxicidade são baseados em dois tipos de exposição: aguda e crônica. O ensaio de toxicidade aguda avalia os efeitos, em geral severos e rápidos, sobre os organismos expostos ao contaminante por um curto período de tempo. Os parâmetros avaliados nesse tipo de teste geralmente são mortalidade e imobilidade. Para os ensaios de toxicidade crônica são observados os efeitos de concentrações subletais em exposições por períodos mais longos, onde são analisadas as alterações no desenvolvimento do organismo, danos a tecidos e fertilidade. Nos testes crônicos os organismos são expostos a um período de pelo menos 10% da duração da vida do organismo, observando efeitos que não são mensuráveis em exposições mais curtas. Entretanto, devido ao maior tempo do ciclo de vida de alguns organismos, nem sempre é possível elaborar testes que compreendam essa porcentagem. Desse modo, os testes crônicos de curta duração são ensaios que visam avaliar os efeitos do contaminante por um período intermediário entre os ensaios agudos e crônicos, utilizando as fases mais sensíveis do ciclo de vida do organismo (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006). Apesar de não ser teoricamente um teste crônico, os testes crônicos de curta duração são utilização é muito relevante em casos de estudos de contaminantes que estão presentes nos compartimentos em altas concentrações e em curtos períodos de tempo (de 1 a 4 dias), como é o caso de pesticidas (NORBERG-KING, 1990). Existem ainda outros tipos de testes, como é o caso do teste de evitação, onde é analisado o comportamento do animal mediante a exposição a um contaminante (GARCIA et al., 2007).

Os experimentos em micro e mesocosmos apresentam vantagens em relação aos estudos em laboratório, pois possibilitam o estudo de parâmetros que não podem ser avaliados em laboratórios devido às condições controladas destes. Os estudos em micro e mesocosmos permitem o estudo dos efeitos de contaminantes em organismos e comunidades sob condições semi-naturais simuladas. Isso possibilita a análise de uma situação mais próxima à realidade envolvendo não apenas os efeitos tóxicos diretos, mas também as implicações ecológicas indiretas, servindo como uma

ferramenta auxiliar para a extrapolação dos resultados obtidos em laboratório (GRANEY, et al., 1995).

Os experimentos *in situ* podem ser naturais; onde é utilizado o ambiente como um todo, seja ele lêntico ou lótico; ou simulados, utilizando subseções do ambiente naturais, como modelo desse tipo de sistemas, pode-se citar os construídos artificialmente em tanques ou represas artificiais (GRANEY et al., 1995). De acordo com Odum (1984) os mesocosmos podem ser definidos como um ecossistema artificial de pequena escala mantido sob condições naturais. Muitas características biológicas destes sistemas dependem de seu tamanho, assim, autores têm sugerido a caracterização dos experimentos de acordo com o volume de água. A Setac (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) sugere o termo mesocosmos para represamentos artificiais maiores que 15m^3 (CAQUET, 2000). Outros autores propõem volumes entre 1 e 10 m^3 (LALLI, 1990), 0,1 e 1000 m^3 (GRANEY et al., 1995) e de 1 a 300 m^3 (LA POINT et al., 1989). Entretanto, o limite do volume de água não faz referência aos parâmetros ecológicos relevantes, como estabilidade e auto-sustentabilidade, com a possibilidade de integrar os principais processos ecológicos e tolerar as simplificações substanciais das estruturas da comunidade. Assim, o termo mesocosmos poderia melhor caracterizar os ecossistemas artificiais sob condições ambientais naturais com suficiente complexidade e estabilidade para ser auto-sustentável, em que o sistema se apresenta multitrófico e tamanho suficiente para ser possível mensurar alterações e influências dos estressores sobre a estrutura e dinâmica (LALLI, 1990).

Os estudos em mesocosmos são direcionados para quatro aspectos principais da avaliação dos xenobióticos: estimativa do destino da substância (volatilização, compartimentalização e degradação); avaliação dos efeitos primários, efeitos diretos nos níveis de organização em nível de indivíduo, população e comunidade; validação de modelos matemáticos para o destino e efeitos dos contaminantes; e efeitos secundários e terciários indiretos na reestruturação da estrutura e função do ecossistema (BOYLE; FARCHILD, 1997).

Em relação aos organismos que são utilizados, sua escolha deve ser feita visando à representatividade em relação à comunidade do ambiente para que seja possível relacionar o estudo ecotoxicológico com as possíveis situações de contaminação (VAN GESTEL; VAN STRAALEN, 2002). Para essa escolha é necessário que sejam observados alguns critérios, como a sensibilidade do organismo, uma vez que este deve ter alta sensibilidade a uma ampla diversidade de agentes químicos, bem como o conhecimento de sua biologia. Outro critério é a disponibilidade de organismo, o que faz com que espécies que ocorram em períodos restritos ou em reduzida

densidade não sejam utilizadas. A escolha de espécies em que seja possível o cultivo em laboratório é recomendada para que o controle seja mais rigoroso. Nesse caso, é preferível que a espécie utilizada seja autóctone, representativa do ambiente de estudo e com importância ecológica para o ambiente. O último critério é a estabilidade genética da população, para que seja possível a obtenção de lotes uniformes de organismos para os experimentos (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2006).

Entretanto, a disponibilidade de organismos que atenda a todos esses critérios é de difícil obtenção. Assim, é recomendável que a escolha seja baseada no atendimento do maior número de critérios possível, em conjunto com a existência de estudos padronizados com o organismo teste escolhido ou organismos que possam servir de referência para a comparação (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2006).

2.5. O organismo-teste utilizado: Danio rerio

A utilização de espécies de peixes como bioindicadores para a avaliação da toxicidade ocorre em função da sua relevância ecológica e também de sua importância econômica, uma vez que estes representam fonte de alimento, servindo ainda para obtenção de renda de muitas populações ribeirinhas. Desta forma, se efeitos deletérios forem identificados em peixes após exposição a algum xenobiótico ou amostra ambiental, a contaminação de recursos hídricos também será identificada, demonstrando que impactos negativos poderão ocorrer na biota aquática, promovendo desequilíbrios no ecossistema e diversos problemas relacionados à saúde humana.

De acordo com Rand et al. (1995), os peixes podem absorver os contaminantes através do contato direto pela água, destacando a assimilação pela superfície corpórea e brânquias, ou pela ingestão de alimentos contaminados, o que pode promover a morte do organismo ou a bioacumulação nos tecidos, proporcionando diversos efeitos deletérios e, consequentemente, a biomagnificação na cadeia trófica. É importante ressaltar que fatores como tamanho, idade, estado nutricional e sexo podem afetar a taxa de absorção do contaminante, variando ainda de espécie para espécie em função da sensibilidade de cada uma.

A espécie *Danio rerio*, conhecida popularmente como paulistinha, é uma espécie de peixe de água doce típica de clima tropical que pertence à família *Cyprinidae*. A espécie *Danio rerio* possui cinco listras horizontais, uniformes e pigmentadas que se estendem por toda a extensão lateral. O macho pode ser diferenciado da fêmea pela sua forma mais alongada e delgada e sua

coloração levemente dourada, enquanto que as fêmeas são mais robustas, ligeiramente maiores, coloração prateada e lista abdominal incompleta (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2006).

Sua distribuição natural ocorre no sul e sudeste da Ásia, com maior predominância nas regiões do rio Ganges e Brahmaputra, sendo encontrada em lagoas rasas e águas paradas nas proximidades de campos de arroz. Seu habitat é geralmente caracterizado por pequenos corpos de água com temperatura entre 24 e 38ºC. Essa espécie é onívora, se alimentando principalmente de zooplâncton, fitoplâncton e insetos. O ciclo reprodutivo de *Danio rerio* é curto, atingindo o período de maturidade em cerca de 3 a 6 meses, com o período de desova influenciado pela temperatura, iniciando-se na estação das monções (FROESE; PAULY, 2009).

Apesar de não seu uma espécie nativa sua utilização é adequada devido a sua alta sensibilidade e à semelhança na sensibilidade em relação à espécie nativa *Hemigrammus marginatus* (bandeirinha) e até abaixo da espécie *Serrapinnus notomelas* (piabinha), e possuem a mesma sensibilidade que as espécies tradicionalmente utilizadas, *Danio rerio* (paulistinha) e *Poecilia reticulata* (guarú). Outras espécies exóticas, *Cyprinus carpio* (carpa comum) e *Tilapia rendalli* (tilápia), se mostraram menos sensíveis do que os demais (BERTOLETTI, 2009).

Atualmente, existe na literatura cientifica diversos trabalhos desenvolvidos utilizando a espécie *Danio rerio* como organismo teste, como os de Vittozzi e De Angelis (1991), Hopkins et al. (2004), Campagna et al. (2008) e Oliveira (2009), além de estudos ecotoxicológicos específicos com agrotóxico como os trabalhos de Fracácio et al. (2009), Campagna et al. (2006), Laabs et al. (2007), Rodrigues (2007) e Novelli (2010).

3. JUSTIFICATIVA

Atualmente, o intenso uso de agrotóxicos na agricultura tem chamado atenção de órgãos ambientais para os possíveis impactos ambientais provocados pelo aumento do consumo em todo o mundo. O desenvolvimento de culturas orgânicas tem avançado, mas ainda é uma pequena parcela quando comparado à extensão de áreas em que é realizado o cultivo baseado no uso de compostos químicos como fertilizantes, corretivos e agrotóxicos. Por outro lado, o aumento populacional e a crescente demanda por alimentos têm incentivado a utilização desses produtos. Assim, os agrotóxicos são utilizados com a finalidade de prevenção ou combate a pragas, buscando assegurar o aumento da produtividade nas atividades agropecuárias (CALDAS; SOUZA, 2000; KOLAR et al., 2008).

No entanto, o uso indiscriminado de agrotóxicos, associado às características ambientais como topografia e pluviosidade, possibilita o carreamento desses contaminantes para corpos d'água, o que pode afetar a comunidade biológica e o equilíbrio do ecossistema aquático. Considerando a magnitude e amplitude dos efeitos, bem como a utilização cada vez mais crescente dos agrotóxicos, faz-se necessário o desenvolvimento de diferentes testes de toxicidade, de forma a melhor avaliar os efeitos deletérios ocasionados aos ecossistemas terrestres e aquáticos, incluindo-se a análise da interação entre estes.

Entre os diversos agrotóxicos utilizados na agricultura, destaca-se o Vertimec® 18CE, cujo princípio ativo é a abamectina. A abamectina pertence ao grupo das avermectinas, grupo em que se enquadra também a ivermectina e a doramectina. As avermectinas são um complexo de agentes químicos relacionados, pertencentes a um grupo de antibióticos macrocíclicos obtidos a partir da fermentação do actinomiceto *Streptomyces avermetilis*. A abamectina foi lançada no mercado em 1985, e é constituída por uma mistura contendo cerca de 80 % de avermectina B_{1a} ($C_{48}H_{72}O_{14}$) e 20 % de avermectina B_{2b} ($C_{47}H_{70}O_{14}$), e possui ação inseticida e acaricida na agricultura, enquanto que na pecuária é usado como antiparasitário (BURG et al., 1979; HALLEY et al., 1989).

O agrotóxico Vertimec® 18CE é indicado para 42 usos distintos, compreendendo 24 culturas diferentes, visando o combate de 17 diferentes pragas (AGROFIT, 2010), principalmente insetos, ácaros e nematóides (KOLAR et al., 2008). A classificação toxicológica do Vertimec® 18CE é III, considerada como "medianamente tóxica", no entanto, a classificação toxicológica em relação ao ambiente coloca o produto como classe II, muito perigoso ao meio ambiente, destacando a alta persistência no ambiente e a toxicidade para microcrustáceos e peixes (AGROFIT, 2010).

As avermectinas são inseticidas e possuem alta toxicidade para peixes e invertebrados aquáticos (BURG et al., 1979). Essa substância é rapidamente foto-degradada em água e se adsorvem rapidamente nas partículas de solos, sedimentos e matéria orgânica; entretanto, as avermectinas oferecem risco ao ambiente aquático, especialmente se o uso for frequente (TIŠLER; ERŽEN, 2006). Além disso, Tišler e Eržen (2006) observaram elevada toxicidade da abamectina para fitoplâncton, zooplâncton e peixes, mesmo em baixas concentrações, com valores de CE_{50} e CL_{50} na ordem de $ng.L^{-1}$ e $\mu g.L^{-1}$ respectivamente, e a rápida degradação da abamectina na água. As medidas ao início dos testes apontaram para uma concentração superior a 80% da concentração nominal, chegando a diminuir em até 85% da concentração nominal ao final do tempo de exposição. Esses resultados demonstraram a quebra da avermectinas B_{1a}, promovendo a diminuição da concentração de contaminante na coluna d'água em um curto período de tempo. As informações

a respeito da degradação das avermectinas diferem entre os compartimentos aquático e terrestre, sugerindo uma maior persistência em ambientes terrestres. Na água, as avermectinas são rapidamente fotodegradadas, sendo que a meia-vida no verão é de 12h ou menos para ivermectina e de 4 a 6 h para abamectina, enquanto que no solo a meia vida é de 7 a 14 dias para a ivermectina e de 14 a 56 dias para a abamectina (ERŽEN et al., 2005).

Entretanto, ainda existem poucas informações sobre a toxicidade de abamectina, principalmente para avaliações *in situ*, e mais raras ainda a respeito da toxicidade da fórmula comercial, Vertimec® 18CE, o que justifica a necessidade de mais estudos para a compreensão das interações entre os compartimentos e organismos.

Como mencionado anteriormente, o Vertimec® 18CE é um composto amplamente utilizado em diversas culturas, incluindo culturas de morango e batata. Uma recente pesquisa realizada pela ANVISA (2007) destacou que as culturas de tomate, alface e morango são as que mais deixam resíduos de agrotóxicos nos alimentos, indicando o risco de contaminação dos alimentos por resíduos do Vertimec® 18CE.

O município de Bom Repouso, localizado ao sul de Minas Gerais, é um exemplo de local onde a utilização do Vertimec® 18CE é realizada com freqüência e em grandes quantidades (NUNES, 2010). O município tem como principal atividade econômica a agricultura, com cultivo de morango e batata, que são os plantios mais comuns na região mais elevada da bacia de montante do rio Mogi-Guaçu, o que faz com que o estado de Minas Gerais seja responsável por 40% da produção de morango e primeiro produtor de batata inglesa (RODRIGUES, 2007). Devido à sua localização privilegiada, o município de Bom Repouso possui uma área rica em nascentes, incluindo a nascente do Rio Mogi-Guaçu, que se encontra a 1594 metros de altitude. A área apresenta mais de 700 nascentes catalogadas (ESPÍNDOLA; BRIGANTE, 2009). Essas características, associadas ao fato da região possuir topografia acidentada e alta incidência de chuvas, favorecem um maior impacto sobre os corpos d'água devido ao aumento do escoamento superficial, o que provoca carreamento de insumos agrícolas para os ecossistemas aquáticos.

Estudos prévios desenvolvidos por Brigante e Espíndola (2003), Rodrigues (2007), Espindola e Brigante (2009), Lima (2010) e Nunes (2010), na região de montante da bacia hidrográfica do rio Mogi-Guaçu, demonstraram os efeitos tóxicos decorrentes da contaminação por agrotóxicos, principalmente devido ao seu uso nos plantios de morango e batata. Rodrigues (2007), por exemplo, realizou análises físico-químicas do solo da região, além de estudos ecotoxicológicos com o percolado desses solos, relatando a contaminação por agrotóxicos mesmo em áreas

consideradas como livre de influência de agrotóxicos, confirmando os efeitos negativos do uso de agrotóxicos e fertilizantes nos sistemas naturais. Mais recentemente, Nunes (2010), avaliando amostras de solo da mesma região, identificou efeitos deletérios em *Eisenia andrei* (Oligochaeta), registrando-se alterações no crescimento, reprodução e comportamento da espécie, além de modificações estruturais (estrangulamento, afilamento, etc). Os estudos de Novelli (2010), a partir da utilização de *runoff* contaminado e da aplicação direta do produto em sistemas experimentais (mesocosmos), também possibilitaram identificar os efeitos do agrotóxico sobre a comunidade zooplanctônica, o que ainda foi registrado por Vieira (2009) para a comunidade fitoplanctônica no mesmo experimento. A continuidade dos estudos de Novelli (op.cit) permitiu avaliar de forma complementar os efeitos indiretos do agrotóxico, a partir do *runoff* contaminado, sobre *Daphnia similis*, *Danio rerio* e *Chironomus xanthus* em estudos experimentais laboratoriais. Além disso, Bastos (2010) verificou efeitos deletérios sobre o crescimento e biomassa da macrófita *Pistia stratiotes*, bem como sobre a fauna de macroinvertebrados associada, demonstrando que os efeitos são bem mais acentuados do que o relatado na literatura, mesmo considerando a concentração indicada para uso.

Verifica-se, portanto, que as informações a respeito do uso de Vertimec® 18CE não são ainda suficientes para uma clara compreensão dos efeitos nocivos aos organismos não-alvos. Assim, baseado no pequeno número de informações, diversos órgãos vêm permitindo o uso da abamectina e de seus derivados em atividades agropecuárias. Entretanto, o estado de São Paulo elaborou um projeto de lei na tentativa de banir 14 princípios ativos que são utilizados na formulação de mais de 200 agrotóxicos, dentre eles a Abamectina, princípio ativo do Vertimec® 18CE, porém tal projeto de lei não foi aprovado (BRASIL 2010). Países como Estados Unidos, Japão e Canadá já vetaram o uso da maioria dos compostos que estão na lista apresentada pelo projeto de lei. Dentre os motivos da proibição podem ser citados o risco de contaminação ambiental, o elevado índice de câncer, as mutações e os problemas no sistema nervoso. Esse fato demonstra a necessidade do desenvolvimento de estudos que tenham como objetivo uma análise mais ampla da ação deletéria do contaminante, visando uma melhor compreensão dos efeitos provocados pelo uso do Vertimec® 18CE no ambiente.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

O objetivo geral dessa pesquisa é avaliar a toxicidade aguda e crônica do Vertimec® 18CE em *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae), por meio de estudos experimentais laboratoriais e *in situ*.

4.2. Objetivos específicos

a) Determinar as faixas de sensibilidade do Vertimec® 18CE para o organismo-teste (*Danio rerio)* bem como os efeitos crônicos (curta duração);

b) Avaliar as modificações (com base nas variáveis físicas, químicas e biológicas) em ecossistemas aquáticos por meio de experimentos *in situ* (mesocosmos) e em condições laboratoriais, em decorrência da aplicação direta do Vertimec® 18CE e da água proveniente do *runoff* (contaminado e não contaminado);

c) Avaliar a sensibilidade de *Danio rerio* às amostras de água provenientes do *runoff* das parcelas de solo contaminadas ou não por Vertimec® 18CE, através de testes de toxicidade aguda e crônica de curta duração;

d) Avaliar e comparar os efeitos agudos e crônicos da exposição de *Danio rerio* no experimento *in situ* e laboratorial com amostras dos mesocosmos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Monitoramento de resíduos de agrotóxicos nos alimentos:* Trabalho desenvolvido pela ANVISA, com as vigilâncias sanitárias dos estados do AC, BA, DF, ES, GO, MS, MG, PA, PR, PE, RJ, RS, SC, SP, SE, TO, e com os laboratórios IAL/SP, IOM/FUNED e LACEN/PR. (Relatório de Atividades 2001 – 2006) 2007. 19 p.

ANJOS, L. H. C. dos; VAN RAIJ, B. Indicadores de processos de degradação de solos. In: ROMERO, A. R. (Org) *Avaliação e contabilização de impactos ambientais*, São Paulo: Editora Unicamp, 2004, p. 84-111, Cap 5.

ARAGÃO, M.A.; ARAÚJO, R.: Método de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (EDS), *Ecotoxicologia aquática*: princípios e aplicações. São Carlos: RiMa Editora, 2006. p 117-152, Cap. 6.

ARMAS, E. D.; MONTEIRO, R. T. R.; ANTUNEZ, P. M. SANTOS, M. A. P. F.; CAMARGO, B. C. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes. *Química nova*, 30 (5), p. 1119-1127. 2007.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, AL. A. M. *As bases toxicológicas da ecotoxicologia*. São Carlos: RiMa, 2003. 340p.

BASTOS, M. B. *Avaliação da toxicidade do agrotóxico Vertimec 18CE em organismos aquáticos em mesocosmos com diferentes características nutricionais*. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental) - USP - Escola de Engenharia de São Carlos. 2010.

BARRY, M. J.; LOGAN D. C. The use of temporary pond microcosms for aquatic toxicity testing: direct and indirect effects of endosulfan on community structure. *Aquatic toxicology*, 41, p. 101–124. 1998.

BOYLE, T. P; FAIRCHILD, J. The role of mesocosm studies in ecological risk analysis. *Ecological Application*, 7(4), p. 1099-1102. 1997.

BRASIL. *Diário Oficial. Resolução - RE No- 2.248, de 18 de maio de 2010*. Disponivel em:ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpsessp/bibliote/informe_eletronico/2010/iels.mai.10/Iels94/U_RS-MS-ANVISA-RE-2248_180510.pdf Acesso em: 25 jan de 2010.

BRASIL. *Lei n.º 7.802, de 12 de julho de 1989*. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. , 1989. 8p.

BRIGANTE, J. ESPÍNDOLA, E. L. G. (Eds.) *Limnologia fluvial:* um estudo no rio Mogi-Guaçu. São Carlos: RiMa Editora, 2003. 255 p.

BURATINI, S. B; BRANDELLI, A. Bioacumulação. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (EDS), *Ecotoxicologia aquática*: princípios e aplicações. São Carlos: RiMa Editora, 2006, p 55-88, Cap. 4.

BURG, R. W.; MILLER, B. M.; BAKER, E. E.; BIRNBAUM, J.; CURRIE, S. A.; HARTMAN, R.; KONG, Y.; MONAGHAN, R. L.; OLSON, G.; PUTTER, I.; TUNAC, J. B.; WALLIC, H.; STAPLEY, E. O.; OIWA, R.; OMURA, S. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrobial agents and chemotheraphy*, 15 (3), p. 361-367. 1979.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. K. R. Avaliação de risco crônico da ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. *Saúde Pública*, 34 (5), p. 529-537. 2000.

CAMPAGNA, A. F.; ELER, M. N.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; SENHORINI, J. A.; DO RÊGO, R. F.; SILVA, L. O. L. Dimethoate 40% organophosphorus pesticide toxicity in *Prochilodus lineatus* (Proshilodontidae, Characiformes) eggs and larvae. *Brazilian Journal of biology*: 66 (2B): p. 633-640. 2006.

CAMPAGNA, A. F.; FRACÁCIO, R.; RODRIGUES, B. K. ; ELER, M. N. ; VERANI, N. F.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Analyses of the sediment toxicity of Monjolinho River, São Carlos, São Paulo State, Brazil, using survey, growth and gill morphology of two fish species (*Danio rerio* and *Poecilia reticula*ta). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 51(1), p. 193-201, 2008.

CAQUET, T.; LAGADIC, L.; STEVEN, R. S. Mesocosm in ecotoxicology: Outdoors aquatic system. *Review of environmental contamination and toxicology*, 165, p. 1-38. 1989.

CHANG, K. H.; SAKAMOTO, M. e HANAZATO, T. Impact of pesticide application on zooplankton communities with different densities of invertebrate predators: An experimental analysis using small-scale mesocosms. *Aquatic toxicology*, 72, p. 373–382. 2005.

CLEAVER, H. M. Some contradictions of capitalism. The contradictions of the green revolution. *The american economic review*, 62(1/2). p. 177-186. 1972.

CUNHA, G. P. Q. *Caracterização ambiental da região de montante do rio Mogi-Guaçu (Bom Repouso, MG): estratégias para replicabilidade e diretrizes para elaboração do plano de adequação ambiental*. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2009. 233p

DOMINGUES, D. F.; BERTOLETTI, E. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (EDS), *Ecotoxicologia aquática*: Princípios e aplicações. São Carlos: RiMa Editora, 2006. p 153-184, Cap 7.

DORES, E. F. G. C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas: vias de contaminação e dinâmica dos pesticidas no ambiente. Pesticidas. *Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 9, p. 1-18. 1999.

EIJSACKERS, H.; Ecotoxicology of soil organisms: seeking the way in a pitch dark labirinth. In: DONKER, M. H.; EIJSACKERS, H.; HEIMBACH, F. *Ecotoxicology of soil organisms*. Lewis Publishers London Boca Raton. 1994. p. 3-33, Cap 1.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). *Monitoramento do risco ambiental de agrotóxico*: princípios e recomendações. Jaguariúna: Embrapa meio ambiente, 2004. 29p.

ESPINDOLA, E. L. G.; BRIGANTE, J. *Projeto Mogi-Guaçu: desenvolvendo ações socioambientais*. 1. ed. São Carlos, SP: Rima Editora, 2009. v. 1. 382 p.

FRACÁCIO, R.; RODRIGUES, B. K.; CAMPAGNA, A. F.; VERANI, N. F.; DORNFELD, C. B.; ESPÍNDOLA, E. L. G. In situ and laboratory evaluation of toxicity with Danio rerio Buchanan (1822) and Poecilia reticulata Peters (1859). *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 21, p. 111-112, 2009.

FROESE, R.; PAULY, D. (Eds) *World Wide Web electronic publication.* Disponível em: www.fishbase.org. Acesso em: 16 out. 2009.

GARCIA, M.; RÖMBKE, J.; BRITO, M. T.; SCHEFFCZYK, A. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. *Environmental pollution,* 153, p. 450-456. 2007.

GAVRILESCU, M. Fate of pesticide in the environment and its bioremediation. *Engineering in life sciences,* 5(6) p. 497-526. 2005.

GRANEY, R. L.; GIESY, J. P.; CLARK, J. R. Field studies. In: RAND, G. M. *Fundamentals of aquatic toxicology.* Effects, environmental fate and risk assessment. Taylor & Francis, Washington, USA. p.257-305, 1995.

HALLEY, B. A.; JACOB, T. A.; LU, A.Y. H. The environmental impact of the use of invermectin: environmental effects and fate. *Chemosphere*, 18 (7-8), p. 1543-1563. 1989.

HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. L.; CAIRNS, j.: Introduction. In: HOFFMAN, D. J.; RATTNER, B. A.; BURTON, G. L.; CAIRNS, J. *Handbook of ecotoxicology*. Boca Raton, Lewis Publishers, 2003. p. 1-15, Cap 1.

HOPKINS, W.A.; STAUB, B. P.; SNODGRASSA, J. W. TAYLOR, B. E.; DEBIASE, A. E.; ROE, J. H.; JACKSON, B. P.; CONDGON, J. D. Responses of benthic fish exposed to contaminants in outdoor microcosms - examining the ecological relevance of previous laboratory toxicity tests. *Aquatic toxicology* 68, p.1–12. 2004.

KOLAR, L.; ERŽEN, K. N.; LENNY HOGERWERF, L.; VAN GESTEL, C. A. M. Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. *Environmental pollution*, 151, p. 182-189. 2008.

LA POINT, T. W., FAIRCHILD, J. F.; LITTLE, E. E.; FINGER, S. E. Laboratory and field techniques in ecotoxicological research: strengths and limitations. In: BODOU, A.; IBEYRE, F. *Aquatic toxicology:* fundamentals, concepts and methodologies. V. 2. CRC Press, Boca Raton, USA. 1989. p. 239-255.

LAABS, V.; WEHRHAN, A.; PINTO, A.; DORES, E.; AMELUNG, W. Pesticide fate in tropical wetlands of Brazil: an aquatic microcosm study under semi-field condictions. *Chemosphere*, 67, p. 975-989. 2007.

LALLI, C. M. Enclosed experimental ecosystems: a review and recommendations. *Springer verlag*, New York, 1990. 218p.

LIMA, N. C. *Avaliação do impacto da contaminação do solo de áreas agrícolas de Bom Repouso (MG) por meio de ensaios ecotoxicológicos.* Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia

Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2010. 130p.

MOZETO, A. A.; ZAGATTO, P. A. Introdução de agentes químicos no ambiente. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (EDS), *Ecotoxicologia aquática*: princípios e aplicações. São Carlos: RiMa Editora, 2006, p. 15-38, Cap. 2.

NORBERG-KING, T. J. Seven-days tests and chronic tests. *Evironmental toxicology and Chemistry*, 9, 1436. 1990.

NOVELLI, A. *Efeito do Vertimec® 18CE e de seu principio ativo, a abamectina, em ambiente aquático: uma análise laboratorial e in situ*. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2010. 167p.

NUNES, M. E. T. *Avaliação dos efeitos de agrotóxicos sobre a fauna edáfica por meio de ensaios ecotoxicológicos com Eisenia Andrei (Annelida, Oligochaeta) e com comunidade natural de solo*. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2010.

ODUM, E. P. The mesocosm. *BioScience*, 34 (9). 1984.

OLIVEIRA, R. *Zebrafish early life-stages and adults as a tool for ecotoxicity assessment*. Dissertação (Mestrado em toxicologia e ecotoxicologia). Universidade de Aveiro. 2009. 157p.

ONGLEY, E. D. Control of water pollution from agriculture. *FAO irrigation and drainage paper*, (55), 1996. p. 101.

OPAS/OMS. *Manual de vigilância da saúde de Populações Expostas à Agrotóxicos*. Organização Pan-Americana de Saúde. Brasília, 1997. 72p.

PAPINI, S.; ANDREA, M. M. Ação de minhocas *Eisenia foetida* sobre a dissipação dos herbicidas simazina e paraquat aplicados no solo. *Revista brasileira de ciências do solo*, 28, p. 67-73, 2004.

PACHECO, P. *Brasil lidera uso mundial de agrotóxicos*. Estado de São Paulo, São Paulo. 07 ag. 2009. Caderno economia e negócios. Disponível em: http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20090807/not_imp414820,0.php. Acesso em: 17 out 2009.

PIMENTEL, D.; LEVITAN, L. Pesticides: Amounts Applied and Amounts Reaching Pests *BioScience*, 36(2), p. 86-91 1986.

RAND, G. M.; WELLS, P. G. MCCARTY, S. L. Introduction to aquatic toxicology In: RAND, G.M., PETROCELLI, S.R. *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and application*. London, Hemisphere Publishing Corporation. 1995, p. 01-69. 666p.

RODRIGUES, B. K. *Avaliação dos impactos de agrotóxicos na região do Alto Mogi-Guaçu (MG) por meio de ensaios laboratoriais com Danio rerio* (CYPRINIDAE, CYPRINIFORMES).

Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007. 135p.

RÖMBKE, J.; GARCIA, M.: Assessment of ecotoxicological effects of pesticides on the soil fauna and soil processes under tropical conditions. In: Lieberei, R., Bianchi, H-K., Boehm, V., Reisdorff, C., (Eds.) *Neotropical Ecosystems*, Proceedings of the German-Brazilian Workshop, Hamburg. 2000, p. 543-548.

SCHROER, A. F. W.; BELGERS, J. D. M. BROCK, T. C. M.; MATSER, A. M. MAUND, S. J. VAN DEN BRINK, P. J. Comparison of laboratory single species and field population-level effects of the pyrethroid insecticide l-Cyhalothrin on freshwater invertebrates. *Archives of environmental contamination and toxicology*. 46, p324–335. 2004.

SILVA, J. M.; SANTOS, J. R.; Toxicologia de agrotóxicos em ambientes aquáticos. *Oecol. Bras* (4). 2007

SINITOX: *Sistema nacional de informações tóxico-farmacológicas*. 2008. Disponível em: http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=151 Acessado em 8 set 2010.

SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS (AFROFIT). Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons . Acesso em 1 dez 2010.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. S.; Impactos ambientais de agrotóxicos: Monitoramento e Avaliação. In: ROMERO, A. R. (Org) *Avaliação e contabilização de impactos ambientais*, São Paulo: Editora Unicamp, 2004. p 112-122, Cap 6.

SPRAGUE, J.B. Factors that modify toxicity. *In*: G.M. RAND & S.R. PETROCELLI, (eds.), *Fundamentals of aquatic toxicology*: methods and applications**.** Hemisphere, New York. 1985. 68p.

TIŠLER, T.; ERŽEN, N. K. Abamectin in the aquatic environment. *Ecotoxicology*.15, p. 495-502. 2006.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspective. *Ecotoxicology and environmental safety*. 1. p. 151-173. 1977.

VALARINI, P. J.; DE NARDO, E. A. B.; GOMES, M. A. F.; FERREIRA, C. J. A.; CASTRO, V. L. S. S. Dinâmica e efeitos de agrotóxicos no meio ambiente. In: FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P. (Ed.). *Doenças em fruteiras tropicais de interesse agroindustrial*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 625-687.

VAN GESTEL, C. A. M.; VAN STRAALEN N. M.; Ecotoxicological test systems for terrestrial invertebrates. In: DONKER, M. H.; EIJSACKERS, H.; HEIMBACH, F. *Ecotoxicology of soil organisms*. Lewis Publishers London Boca Raton. 1994. p. 3-33, Cap 1.

VIEIRA, B. H. *Efeitos do agrotóxico Vertimec® no fitoplâncton: um estudo laboratorial e "in situ"*. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2009. 181p.

VITTOZZI, L.; DE ANGELIS, G. A critical review of comparative acute toxicity data on freshwater fish. *Aquatic Toxicology*, 19, p. 167-204. 1991.

ZACHARIAS, A. S. B. Efeitos ecotoxicológicos dos resíduos do Vertimec® 18CE utilizado na agricultura em organismos planctônicos. 2008. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008, 85p.

ZAGATTO, P. A. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (EDS), *Ecotoxicologia aquática*: princípios e aplicações. São Carlos: RiMa Editora, 2006a. Cap. 1, p 01-13.

ZAGATTO, P. A. Avaliação de risco e do potencial de periculosidade ambiental de agentes químicos para o ambiente aquático. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (EDS), *Ecotoxicologia aquática*: princípios e aplicações. São Carlos: RiMa Editora, 2006b. Cap. 16, p 383-411.

Capítulo 2: *Avaliação dos efeitos do agrotóxico Vertimec® 18CE sobre Danio rerio (Cypriniformes, Cyprinidae)*

Resumo

Diversos problemas ambientais e de saúde humana têm sido relatados e relacionados mundialmente com o aumento do uso de agrotóxicos nas atividades agropastoris. A contaminação ocorre de forma pontual e difusa e, via de regra, os problemas advém das características de cada produto, da forma de utilização/aplicação e, principalmente, pelo fato de que estes não atingem apenas as espécies-alvo, influenciando direta e indiretamente outras espécies, com amplos efeitos sobre a estrutura e funcionamento dos ecossistemas terrestres e aquáticos. Considerando essa temática, procurou-se avaliar os efeitos de um agrotóxico amplamente utilizado na agricultura, o Vertimec® 18CE, por meio de estudos laboratoriais com o organismo aquático *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae). Para tanto, testes de toxicidade agudos e crônica de curta duração foram realizados sob condições controladas de temperatura, fotoperíodo, dureza, pH, condutividade e oxigênio dissolvido, segundo as normas da ABNT (2004 e 2007), para avaliar a sensibilidade da espécie ao produto comercial, uma vez que não existem informações sobre sua toxicidade. Os resultados obtidos indicaram uma $CL_{50,}$48h de 4,74 µl.L^{-1}, $CE_{50,}$48h de 3,66 µl.L^{-1} e valores de CEO, CENO e VC de 3 µl.L^{-1}, 2 µl.L^{-1} e 2,5 µl.L^{-1}, respectivamente. Os resultados obtidos nos testes agudos estão próximos aos relatados na literatura para *Cyprinus carpio* e *Danio rerio* na presença da abamectina (principal ingrediente ativo do Vertimec® 18CE), indicando a elevada toxicidade da formulação comercial. No teste de toxicidade crônica de curta duração verificou-se maior persistência do contaminante na coluna d'água. A alta toxicidade, em conjunto com a maior persistência do agrotóxico (formulação comercial), demonstra o risco de contaminação ambiental advindo do uso não controlado do produto. Além disso, os resultados salientam a importância da avaliação específica da formulação comercial no processo de regulamentação de agrotóxicos em função das diferenças na toxicidade entre estas e seus respectivos princípios ativos.

Palavras-chave: Vertimec® 18CE, abamectina, ecotoxicologia aquática, *Danio rerio*

1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o agronegócio é responsável por 33% do Produto Interno Bruto (PIB), 42% das exportações totais e 37% dos empregos brasileiros, rendendo ao país cerca de US$ 36 bilhões, com superávit de US$ 25,8 bilhões. A atual crescente demanda por produtos de origem agrícola tem pressionado o sistema agrícola brasileiro, o que pode ser verificado pelo aumento da safra de grãos, que passou de 57,8 para 123,2 milhões de toneladas entre 1990/1991 e 2002/2003, respectivamente. Na maioria das vezes esse aumento de produtividade tem resultado no uso crescente de insumos

agrícolas, principalmente dos pesticidas (BRASIL, 2004), implicando no aumento dos problemas ambientais e nos riscos à saúde humana.

Apesar da utilização em larga escala, o uso incorreto desses pesticidas pode afetar a estrutura e funcionamento dos ecossistemas naturais, a partir de alterações na fauna e flora, causando efeitos negativos, como a redução do número de espécies, alterações comportamentais, reprodutivas e de desenvolvimento, suscetibilização a doenças e magnificação biológica (DORES; DE-LAMONICA-FREIRE, 1999). Além disso, o uso de agrotóxicos pode provocar distúrbios em diversos processos, como por exemplo, na atividade de decomposição no solo, que consequentemente afetará a sustentabilidade da cultura ou do ambiente em longo prazo (RÖMBKE; GARCIA, 2000). Desse modo, a possibilidade de contaminação ambiental evidencia a necessidade de se desenvolverem estudos que visem compreender os riscos associados ao consumo de agrotóxicos e sua influência na manutenção dos serviços ambientais.

É nesse sentido que a legislação brasileira referente ao controle dos agrotóxicos tem se tornado mais exigente e restritiva, requerendo a comprovação da eficiência agronômica, as garantias da minimização dos danos à população, seja ela de caráter ocupacional, alimentar ou de saúde pública, e dos possíveis impactos ambientais originados pelo uso do composto. A Lei 7.802, de 12 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto nº 98.816, de 11/01/90, exige a avaliação dos riscos ambientais de cada produto (BRASIL, 1989), considerando a ecotoxicidade de organismos de diferentes níveis da cadeia alimentar, decorrente da necessidade de um conhecimento mais aprofundado sobre o comportamento do agrotóxico no meio ambiente e os seus efeitos nos organismos (SPADOTTO; GOMES, 2004).

Entre os diversos agrotóxicos utilizados nas culturas, tem sido verificado o uso da abamectina, que representa o principal princípio ativo utilizado na formulação do agrotóxico Vertimec® 18CE. A abamectina (Figura 1), pertence ao grupo das avermectinas (abamectina, doramectina e ivermectina), um complexo de agentes químicos pertencentes a um grupo de antibióticos macrocíclicos obtidos a partir da fermentação do actinomiceto *Streptomyces avermetilis*, sendo constituída por uma mistura contendo cerca de 80 % de avermectina B_{1a} ($C_{48}H_{72}O_{14}$) e 20 % de avermectina B_{2b} ($C_{47}H_{70}O_{14}$). A abamectina possui ação inseticida e acaricida na agricultura, enquanto que na pecuária é usado como antiparasitário (BURG et al., 1979; HALLEY et al., 1989).

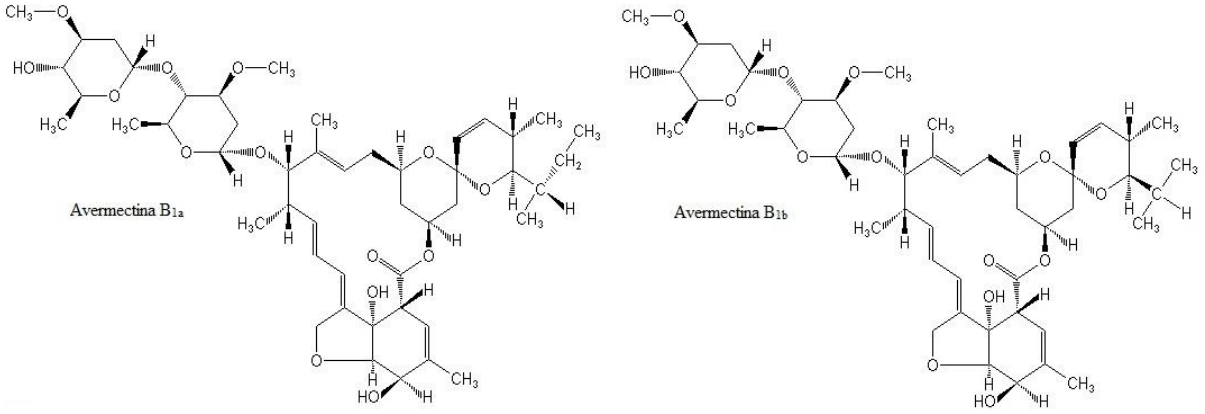


Figura 1: Fórmula estrutural da avermectina B1a e B2b. Fonte: FISHER; MROZIK, 1989).

As avermectinas foram descobertas em 1975, representando um poderoso anti-helmíntico. Posteriormente sua utilização foi ampliada devido as suas propriedades inseticida e acaricida (FISHER; MROZIK, 1992). Na União Européia os anti-helmíticos são compostos com amplo uso na veterinária, principalmente, a ivermectina, uma lactona macrociclica. Na América do Norte esse mesmo composto é aplicado em cerca de 50% dos tratamentos anti-helmíntico veterinários. Na África é utilizado em humanos para combater a Onchocerca, também denominada de *river blindness*, e a filariose (SANDERSON et al., 2007).

Os compostos dessa classe possuem alta toxicidade para peixes e invertebrados aquáticos (BURG et al., 1979), com valores de CE_{50} e CL_{50} na ordem de $ng.L^{-1}$ a $\mu g.L^{-1}$ (TIŠLER; ERŽEN, 2006). Essa substância é rapidamente foto-degradada em água e se adsorvem rapidamente nas partículas de solos, sedimentos e matéria orgânica. Entretanto, as avermectinas oferecem risco ao ambiente aquático, especialmente se o uso for frequente (TIŠLER; ERŽEN, 2006).

As avermectinas agem de diferentes formas atuando sobre a neurotransmissão: reduz a diferença no potencial de membrana nas fibras musculares, promove a abertura dos canais de cloreto e agem sobre a transmissão GABAérgica (FISHER; MROZIK, 1992). Os mecanismos de ação sobre os diferentes organismos ainda não são totalmente claros, sendo encontradas diferenças quando comparados os mecanismos envolvidos em vertebrados e invertebrados (CHALMERS et al., 1986; FISHER; MROZIK, 1992). Nos nematodos e artrópodes as avermectinas agem principalmente sobre os canais de cloreto regulados pelo glutamato e GABA (ácido gama-aminobutírico), promovendo uma forte entrada de íons cloreto, e a interrupção da transmissão do sinal. Entretanto, esse mecanismo de ação pode não ser específico para os artrópodes e nematodos,

afetando diretamente outros organismos, como no caso de peixes, em que as avermectinas podem atravessar a barreira hemato-encefálica ocasionando efeitos tóxicos (TIŠLER; ERŽEN, 2006).

O agrotóxico Vertimec® 18CE, formulação comercial, é indicado para 42 usos distintos, compreendendo 24 culturas diferentes, para o combate de 17 diferentes pragas (AGROFIT, 2010), sendo as principais utilizações o controle de insetos, ácaros e nematóides (KOLAR et al., 2008). A classificação toxicológica do Vertimec® 18CE é III, considerada como "medianamente tóxica", no entanto, a classificação toxicológica em relação ao ambiente coloca o produto como classe II, muito perigoso ao meio ambiente, destacando a alta persistência no ambiente e a toxicidade para microcrustáceos e peixes (AGROFIT, 2010).

Apesar de sua indicação para ampla finalidade, as informações sobre as consequências do uso de Vertimec® 18CE ainda não são suficientes para uma clara compreensão dos efeitos nocivos aos organismos não-alvos. Desse modo, diversos órgãos vêm permitindo o uso da abamectina e seus derivados em atividades agropecuárias em diversos países. No estado de São Paulo um projeto de lei em 2009 colocou em avaliação o uso de 14 princípios ativos que são utilizados na formulação de mais de 200 agrotóxicos, dentre eles a abamectina, princípio ativo do Vertimec® 18 CE (BRASIL 2010). Entretanto, mesmo considerando seus efeitos deletérios acentuados, o uso da abamectina ainda foi liberado.

A preocupação quanto à expansão do consumo de agrotóxicos se deve à grande quantidade de pesticidas que não atinge os organismos alvo. Diferentes estudos apontam para a ínfima parcela do volume aplicado que atinge os objetivos no controle de pragas. Dentre esses estudos, foram encontrados valores de 0,003% no combate às lagartas; entre 0,03 e 0,02%, respectivamente para o combate de afídeos e mirídeos no cultivo de cacau; e apenas 0,0000001% para o combate de lagartas com o uso de DDT (PIMENTEL; LEVITAN, 1986). Essa baixa eficiência está relacionada aos diferentes destinos que os agrotóxicos sofrem no ambiente, uma vez que apenas uma pequena fração atinge a cultura e grande parte do volume aplicado é perdida por processos como a volatilização, percolação e carreamento superficial (GRANEY et al., 1995). Ressalta-se, ainda, que grandes volumes de agrotóxicos são perdidos pela forma incorreta da aplicação e que muitos riscos à saúde ambiental e humana são decorrentes ainda do descarte inadequado das embalagens e pela negligência dos agricultores, além da falta de uma melhor sistematização para liberação, comercialização e uso do produto.

Considerando a possibilidade de contaminação direta dos recursos hídricos pelos agrotóxicos e a crescente utilização do Vertimec® 18CE na agricultura, procurou-se, neste estudo,

avaliar os efeitos do produto sobre *Danio rerio*, por meio de experimentos laboratoriais, possibilitando reconhecer de forma mais efetiva os efeitos deletérios agudos e crônicos (de curta duração) sobre este representante de níveis tróficos superiores.

2. METODOLOGIA

2.1. Cultivo e manutenção dos organismos

Os juvenis de *Danio rerio* foram obtidos comercialmente e mantidos no Laboratório de Ecotoxicologia e Ecofisiologia de Organismos Aquáticos, do Núcleo de Estudos em Ecossistemas Aquáticos (NEEA), do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CRHEA), da Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo (USP).

As condições para a manutenção dos organismos seguiram as recomendações das normas estabelecidas pela Associação Brasileira de Nomras Técnicas (ABNT) para testes de toxicidade com peixes (ABNT, 2004; ABNT, 2007). Seguindo as recomendações estabelecidas, os juvenis de *Danio rerio* foram aclimatados por um período mínimo de 10 dias antes da realização dos testes, em aquários de 30 litros, em água reconstituída, sendo monitorados os valores de temperatura (medidor OD YSI), pH (potenciômetro B374), condutividade elétrica (condutivímetro 145A), oxigênio dissolvido (medidor de OD YSI) e dureza (Hach, DR/2000). A água reconstituída foi mantida em aeração constante, com temperatura controlada em 25ºC ± 2ºC, fotoperíodo de 12:12h claro/escuro, com características de dureza entre 40 e 48 $mg.L^{-1}$ e pH entre 7,0 e 7,6. Foram realizadas trocas de água diárias de cerca de 1/3 do volume do aquário e alimentação duas vezes ao dia com ração comercial Tetramin® até 24h antes da montagem dos testes.

Para avaliar as condições fisiológicas dos organismos-teste, foram realizados mensalmente testes de sensibilidade com a substância de referência cloreto de potássio, determinando-se a CL_{50} em 48h (ABNT, 2004). No decorrer do estudo foram realizados 13 testes de sensibilidade, elaborando-se uma carta-controle com as informações referentes à faixa de sensibilidade da espécie, a qual foi constituída pelo valor de CL_{50} de cada teste, CL_{50} média, desvio-padrão e coeficiente de variação. Os organismos utilizados apresentaram, em geral, comprimento médio de 1,50 cm (± 0,50).

Para assegurar a homogeneidade do lote, 10% do total de juvenis de *Danio rerio* que seriam utilizados nos testes foram avaliados biometricamente, sendo esses organismos posteriormente descartados devido ao estresse ocasionado pelo manuseio. O comprimento padrão foi obtido com

um paquímetro digital profissional e o peso total de cada indivíduo foi obtido em balança analítica Mettler, modelo AE 240.

2.2 Testes de toxicidade com Danio rerio

Os testes agudos estáticos (48 horas) foram realizados com 2 réplicas, contendo cinco organismos cada, obedecendo a proporção de 1g de peixe para 1 litro de solução, sob condições de temperatura de 25°C ±2 e fotoperíodo de 12 horas, seguindo as recomendações da ABNT (ABNT, 2004). A análise da toxicidade aguda consistiu no parâmetro mortalidade, determinando-se a CL_{50} e da avaliação da imobilidade dos organismos, o que possibilitou o cálculo da CE_{50}.

Os testes de toxicidade crônica de curta duração (168 horas) seguiram a metodologia descrita na ABNT (2007), modificando-se apenas a fase de vida do organismo-teste (de larvas recém eclodidas para juvenil). Os testes foram conduzidos com 4 réplicas, contendo 10 organismos cada, obedecendo a proporção de $1g.L^{-1}$, sob condições de temperatura (25°C ±2) e fotoperíodo de 12 horas, com duração de sete dias, em condições semi-estáticas. Para os testes de toxicidade crônica de curta duração foi avaliada a sobrevivência, calculando-se a CEO (menor concentração do agente químico que causa efeito deletério, estatisticamente significativo), a CENO (maior concentração do agente químico que não causa efeito deletério, estatisticamente significativo) e o valor crônico (VC), referente à média geométrica entre a CEO e a CENO (ABNT, 2007). Também foi realizada a avaliação biométrica dos organismos sobreviventes, obtendo-se o peso fresco (g), em balança analítica Mettler, modelo AE 240, e o comprimento total (mm), com paquímetro digital. Para esse parâmetro foi aplicado o teste de variância (AYRES et al., 2000) para análise estatística, sendo considerado como significativos os testes que apresentaram valores de $p<0,05$. Quando significativo foi realizado um pós-teste para identificação da variável que apresentou diferença significativa para peso e/ou comprimento (ABNT, 2007).

Medidas de pH (potenciômetro B374), condutividade (condutivímetro 145A), dureza (Hach DR/2000) e oxigênio dissolvido (oxímetro YSI) foram realizadas nos testes de toxicidade aguda e crônica de curta duração ao início e final dos experimentos e a cada troca de água nos testes de toxicidade crônicas de curta duração.

3. RESULTADOS

A faixa de sensibilidade do organismo-teste, estabelecida para a substância de referência cloreto de potássio (KCl), está apresentada na Figura 2, correspondendo aos resultados de 13 testes (exposição em intervalos de 48 horas). O resultado da $CL_{50,}$48h ao cloreto de potássio foi de 785,88 $mg.L^{-1}$, com limites inferior e superior de 584,21 e 987,55 $mg.L^{-1}$, respectivamente, e coeficiente de variação de 12,83%, estando dentro da faixa da carta controle laboratorial, estabelecida entre 554 e 919 $mg.L^{-1}$. Todos os resultados obtidos nos testes de sensibilidade constam no Apêndice A.

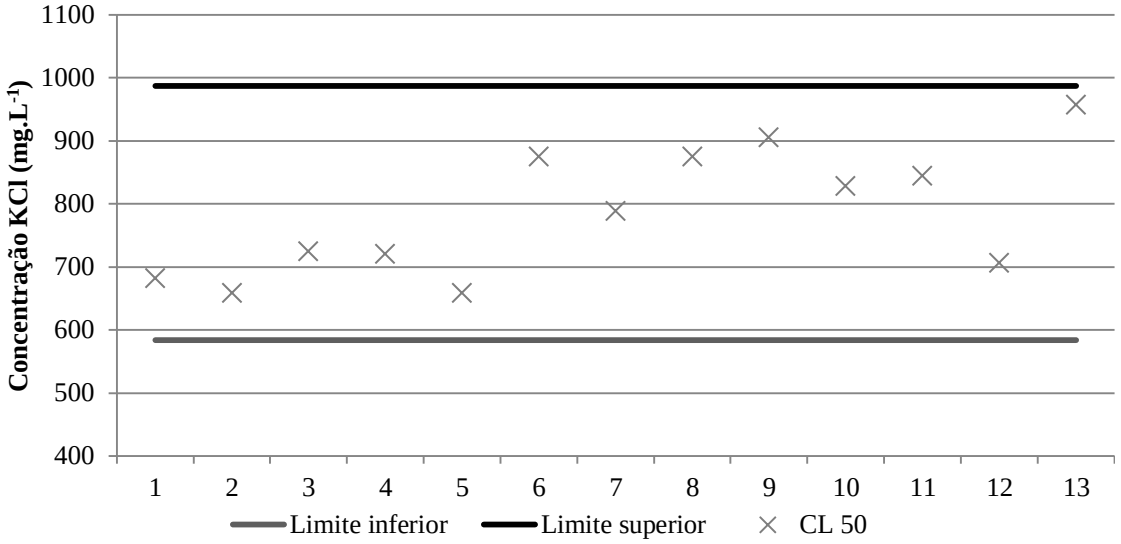
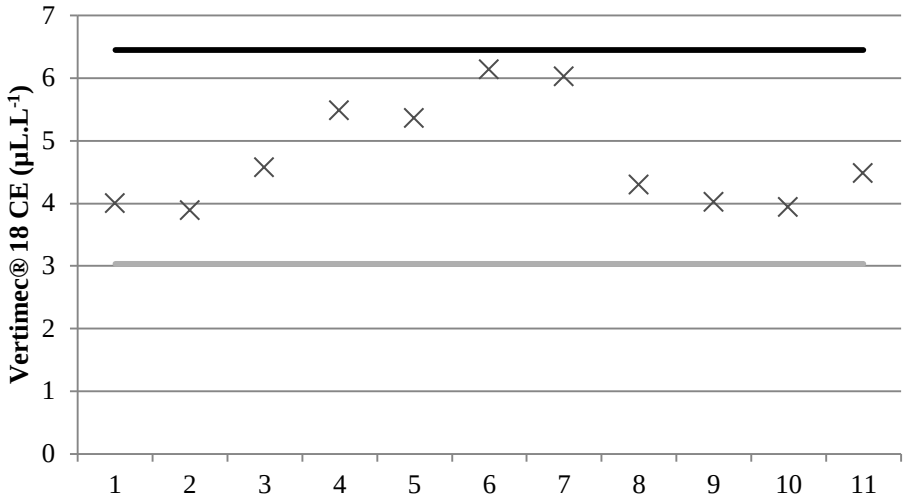
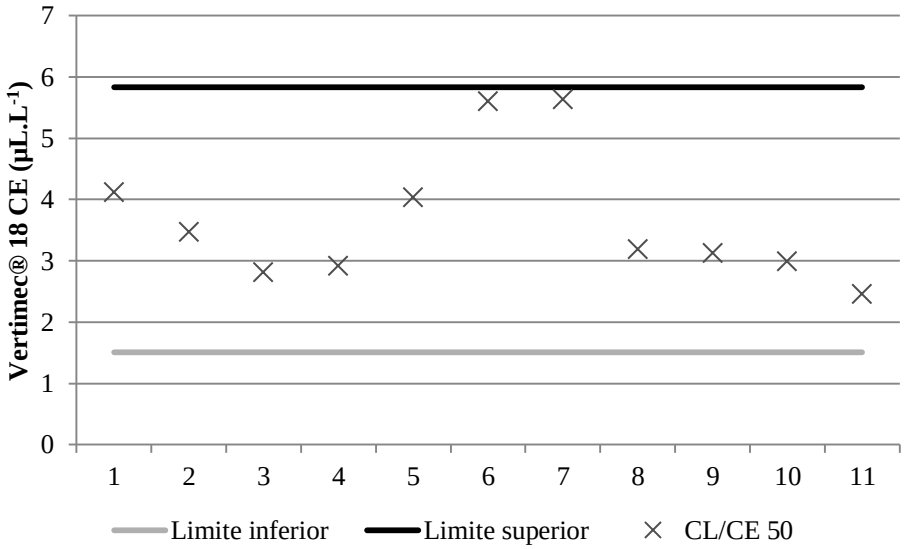


Figura 2: Valores dos testes de sensibilidade de *Danio rerio* ao cloreto de potássio em exposição de 48 horas.

Os resultados dos 11 testes de toxicidade para o agrotóxico Vertimec® 18CE estão apresentados na Figura 3 (e no Apêndice A), na qual se verifica a faixa de sensibilidade de *D. rerio* por meio da CL_{50}48h e da CE_{50}48h.



A



B

Figura 3: Resultados dos testes de toxicidade avaliando a CL_{50},48h (A) e CE_{50},48h (B) para *Danio rerio* quando exposto ao Vertimec® 18CE durante 48 horas.

Os valores de $CL_{50,}$48h encontrados estiveram compreendidos entre as concentrações de 3,88 µl.L^{-1} e 6,13 µl.L^{-1}, com média de 4,74 µl.L^{-1}, limite inferior de 3,03 µl.L^{-1}, limite superior de 6,44 µl.L^{-1} e coeficiente de variação de 18%. Paralelamente foi realizada uma análise contabilizando os organismos que apresentaram sinais evidentes de comprometimento no desempenho natatório, avaliado pela imobilidade temporária dos organismos, que possibilitou o cálculo da $CE_{50,}$48h. Nesta análise os valores encontrados para a $CE_{50,}$48h estiveram entre 2,46 µl.L^{-1} e 5,63 µl.L^{-1}, com CE_{50} média de 3,66 µl.L^{-1}, limite inferior de 1,50 µl.L^{-1}, limite superior de 5,83 µl.L^{-1} e coeficiente de variação de 29,48%.

Com a finalidade de compreender melhor os efeitos relacionados à contaminação dos ecossistemas aquáticos por Vertimec® 18CE, foi realizado um teste crônico de curta duração. Os resultados do teste de Tukey de comparações múltiplas, a partir da observação de letalidade, estão resumidos na Tabela 1 ($F=56,42$; $p<0,05$) e Apêndice A. Os valores da CEO, CENO e VC foram respectivamente de 3 $\mu l.L^{-1}$, 2 $\mu l.L^{-1}$ e 2,5 $\mu l.L^{-1}$.

Tabela 1: Resumo dos resultados do Teste de Tukey, com as comparações entre os diferentes grupos do teste crônico de curta duração.

	C	0,5 $\mu l.L^{-1}$	1 $\mu l.L^{-1}$	2 $\mu l.L^{-1}$	3 $\mu l.L^{-1}$	4 $\mu l.L^{-1}$	6 $\mu l.L^{-1}$
C	-	**sd**	**sd**	**sd**	*	*	*
0,5 $\mu l.L^{-1}$	-	-	**sd**	**sd**	*	*	*
1 $\mu l.L^{-1}$	-	-	-	**sd**	*	*	*
2 $\mu l.L^{-1}$	-	-	-	-	*	*	*
3 $\mu l.L^{-1}$	-	-	-	-	-	.	*
4 $\mu l.L^{-1}$	-	-	-	-	-	-	*

* = diferença significativa (p=0.05) **sd** = sem diferença significativa
Tukey value (7,21) = 4,62 s = 0,964

A realização desse teste também permitiu avaliar os possíveis efeitos do contaminante nos organismos que apresentaram sinal de comprometimento fisiológico e/ou comportamental nos testes agudos. A partir da aplicação do teste de Tukey (ANOVA) verificou-se diferença significativa ($H=25,248$; $p<0,05$) na comparação do controle com os tratamentos com 3 $\mu l.L^{-1}$, 4 $\mu l.L^{-1}$ e 6 $\mu l.L^{-1}$ de Vertimec® 18CE. Em relação à avaliação biométrica dos indivíduos (comprimento e peso) não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) entre os diferentes tratamentos. As informações detalhadas quanto à análise biométrica estão apresentadas no Apêndice A.

Os valores obtidos para a temperatura (entre 23 e 26°C), pH (entre 6,97 e 7,55), oxigênio dissolvido (entre 4,55 e 8,10 $mg.L^{-1}$), condutividade (entre 145 e 160 $\mu S.cm^{-1}$) e dureza (entre 40 a 42 $mg.L^{-1}$ de $CaCO_3$) estiveram de acordo com as recomendações das normas da ABNT (2004) e ABNT (2007). Os valores obtidos estão detalhados no Apêndice A.

4. DISCUSSÃO

O Vertimec® 18CE é uma formulação comercial que tem como princípio ativo a abamectina. O produto possui em sua composição 18 $g.L^{-1}$ (1,8% m/v) de abamectina e 939 $g.L^{-1}$ (98,2% m/v) de ingredientes inertes. É um composto amplamente utilizado em diversas culturas, incluindo as de morango, batata, café, tomate e algodão, entre outras. Atualmente, as informações a respeito do uso

de Vertimec® 18CE não são suficientes para uma clara compreensão dos efeitos nocivos aos organismos não-alvos e é justamente essa falta de informação quanto aos efeitos dos contaminantes no ambiente que tem sido utilizado como argumento para a permissão do uso de diversas substâncias nocivas ao ambiente. Entretanto, uma recente pesquisa realizada pela ANVISA (2007) demonstrou que as culturas de tomate, alface e morango são as que mais deixam resíduos de agrotóxicos nos alimentos, indicando o risco de contaminação dos alimentos por resíduos do Vertimec® 18CE, já que este agrotóxico tem sido amplamente utilizado, principalmente no cultivo de morango.

Os primeiros estudos referentes aos impactos das avermectinas estão relacionados à sua aplicação veterinária. No Reino Unido, por exemplo, verificou-se a diminuição na população de insetos que participam do processo de decomposição do esterco, promovendo a redução da taxa de decomposição, sugerindo que a expansão do uso desses produtos poderia afetar as áreas de pastagem devido à deficiência no processo de ciclagem de nutrientes. Essa mortalidade é consequência dos resíduos de ivermectinas presentes nas fezes dos indivíduos tratados com o fármaco, atingindo espécies não-alvo (WALL; STRONG, 1987). Posteriormente, um estudo realizado por Chiu et al. (1990) demonstrou que 60 a 80% das doses aplicadas no uso veterinário é eliminada nas fezes, independente da via de administração. Em 1996, os Estados Unidos da América realizaram uma avaliação de risco ambiental para a ivermectina, verificando-se que *Daphnia magna* foi a espécie mais sensível, com CL_{50},48h = 25 $ng.L^{-1}$, e concentração de efeito não observado (CENO) na ordem de 10 $ng.L^{-1}$. Em 2003, um grupo europeu desenvolveu estudos com ivermectina e apresentou um relatório com a distribuição de sensibilidade para 17 espécies diferentes de crustáceos e moluscos (SANDERSON et al., 2007). Apesar dos diversos trabalhos avaliando os efeitos agudos e crônicos das avermectinas (abamectina, ivermectina e doramectina) existem poucos relacionados às formulações comerciais que apresentam alguma avermectina em sua composição.

Os riscos decorrentes da contaminação de ambientes por avermectinas estão diretamente associados ao tempo de degradação da substância no ambiente. Dados sobre a taxa de degradação das avermectinas diferem entre os compartimentos aquático e terrestre, sugerindo uma maior persistência em ambientes terrestres. Na água, as avermectinas são rapidamente fotodegradadas, sendo que a meia-vida no verão é de 12h ou menos para ivermectina e de 4 a 6h para abamectina, enquanto que no solo a meia vida é de 7 a 14 dias para a ivermectina e de 14 a 56 dias para a abamectina (ERŽEN et al., 2005). Entretanto, consta na bula do Vertimec® 18CE que o produto é

altamente persistente e perigoso ao meio ambiente, sugerindo a presença de outras substâncias que afetem a biodisponibilidade e a toxicidade do produto em relação ao seu princípio ativo.

No presente estudo, realizado com a formulação comercial Vertimec® 18CE, verificou-se valores próximos aos obtidos em diferentes estudos com a abamectina. A $CL_{50,}$48h média foi de 4,74 µl.L^{-1} de Vertimec® 18CE, que corresponde a concentração nominal de 85,32 µg.L^{-1} de abamectina. Os diversos estudos com a abamectina apresentam valores que variam de acordo com a espécie testada; entretanto, as concentrações observadas são muito baixas, da ordem de µg.L^{-1}. Tišler e Eržen (2006), por exemplo, registraram o valor de $CL_{50,}$96h de 55,1 µg.L^{-1} e $CE_{50,}$96h de 49,3 µg.L^{-1} para *Danio rerio*. Wislocki et al. (1989) apresentaram valores de $CL_{50,}$96h para a abamectina de 3,2; 9,6; 24 e 40 µg.L^{-1} para a truta arco-íris (*Oncorrhynchus mykiss*), perca-sol (*Lepomis macrochirus*), bagre americano (*Ictalurus punctatus*) e carpa (*Cyprinus carpio*), respectivamente. No trabalho de Halley et al. (1989), com a ivermectina, os autores obtiveram valores muito próximos aos de Wislocki et al. (1989), com a $CL_{50,}$96h de 3,0 µg.L^{-1} para a truta arco-íris e de 4,8 µg.L^{-1} para a perca-sol. As diferenças nos valores da CL_{50} para abamectina encontradas no presente estudo, em comparação com aqueles realizados por Tišler e Eržen (2006) com *Danio rerio*, podem estar associadas às diferenças no tempo de exposição dos organismos (96 horas); ao caráter semi-estático do teste realizado pelos autores (realizada renovação da solução teste); e pela utilização da fórmula comercial ao invés do princípio ativo.

Durante a avaliação toxicológica também foram observados efeitos dos contaminantes sobre o comportamento e a fisiologia dos organismos. De acordo com o aumento da concentração de Vertimec® 18CE na solução teste, foram verificadas alterações na coloração dos organismos (mais escura e opaca); habilidade natatória comprometida, em que os organismos ficam mais em estado de repouso no fundo dos recipientes; e diminuição da frequência respiratória. A partir da observação e contabilização dos organismos temporariamente imóveis obteve-se uma CE_{50}48h de 3,66 µl.L^{-1}, que corresponde a concentração nominal de 65,88 µg.L^{-1} de abamectina. Esses valores estão abaixo da CL_{50}48h. A avaliação da CE_{50} visa considerar os efeitos que não se restrinjam a sobrevivência dos indivíduos, já que a imobilidade é uma evidência do comprometimento da saúde do organismo, afetando o comportamento, influenciando indiretamente o ecossistema local.

A avaliação do desempenho natatório é um importante parâmetro ecológico, pois está relacionado ao aumento da vulnerabilidade à predação, à diminuição da capacidade de forrageamento e ao decréscimo da taxa de crescimento dos organismos (FLOYD el al., 2008), constituindo informação adicional na avaliação dos riscos de contaminação ambiental (BEGEEL et

al., 2010). Esse efeito é caracterizado pela incapacidade ou comprometimento natatório em que alguns dos organismos, embora ainda estejam vivos, ficam imóveis no fundo do recipiente teste tornando-se temporariamente incapacitados de nadar normalmente. No decorrer dos testes foi observado que parte dos organismos que apresentaram tal sintoma sofreu recuperação parcial, enquanto que outros foram a óbito ou continuaram comprometidos. Resultados semelhantes foram obtidos por Tišler e Eržen (2006), com a abamectina, sendo o efeito considerado como um *endpoint* importante na avaliação da toxicidade dos compostos. Além disso, estudos têm demonstrado que inseticidas com ação neurotóxica podem agir negativamente na habilidade natatória e na evitação da predação (FLOYD et al., 2008), dando suporte para a importância desta análise no presente estudo.

Esse efeito está relacionado à ação neurotóxica da abamectina. O mecanismo de ação da abamectina se deve à sua ligação a receptores pós-sinápticos, promovendo um aumento da liberação do neurotransmissor GABA no neurônio pré-sináptico. Esse mecanismo hiperpolariza o potencial de repouso nas células pós-sinápticas, dificultando a neurotransmissão, afetando a contração muscular e, consequentemente, resulta na paralisia dos organismos, podendo levar ao óbito. Além disso, a ligação da abamectina ao glutamato e sua ação nos canais de íons cloreto também podem promover efeitos fisiológicos semelhantes (CHALMERS et al., 1986; CAMPBELL, 1989).

Com a finalidade de compreender melhor os efeitos decorrentes de uma exposição prolongada ao Vertimec® 18CE realizou-se o teste crônico de curta duração. Os resultados obtidos demonstram efeitos significativos em relação ao controle a partir da concentração de 3 $\mu l.L^{-1}$ do agrotóxico. Esses resultados evidenciam que o maior tempo de exposição dos organismos ao contaminante em concentrações abaixo da CL_{50},48h promovem a mortandade dos indivíduos devido ao maior tempo em contato com o produto. O ensaio crônico de curta duração permitiu observar que as evidências de comprometimento fisiológico e comportamental, utilizadas na avaliação da $CE_{50,}$48h, tem sua frequência aumentada, e que os organismos que apresentam tais indícios em sua maioria acaba morrendo devido ao efeitos negativos do contaminante em exposições mais duradouras. A maior frequência de alterações no comportamento e fisiologia dos organismos também indica os riscos do contato prolongado com o produto, já que estes organismos se apresentam mais vulneráveis à predação e tem a capacidade de forrageamento e desenvolvimento diminuído, afetando indiretamente o equilíbrio da comunidade (FLOYD el al., 2008). Esses resultados demonstram a gravidade da aplicação indiscriminada, que não respeita o tempo mínimo para uma nova aplicação do produto, prática comum no Brasil, colocando em risco o ambiente.

É importante ressaltar a escassez de estudos ecotoxicológicos com a fórmula comercial Vertimec® 18CE, principalmente com organismos aquáticos. A maioria dos estudos desenvolvidos com a fórmula comercial está relacionada à sua eficiência no combate de pragas e estudos comparativos da eficiência de diferentes fórmulas comerciais, como os estudos de Murugan e Ramachandran, (2000) que compararam a eficiência do Vertimec 18CE em relação a outros inseticidas como o Mavrik, Curacron, Polytrin; e o trabalho de Andrade et al. (2010), no qual se avaliou a eficiência de formulações à base de abamectina no combate ao ácaro *Brevipalpus phoenicis*. Outros trabalhos que também podem ser citados na avaliação ecotoxicológica do Vertimec 18CE vêm sendo desenvolvidos no Núcleo de Estudos em Ecossistemas Aquáticos (CRHEA/SHS/EESC/USP), destacando os de Zacharias (2008), Vieira (2009) e Novelli (2010), com organismos aquáticos, e Decina (2009) e Nunes (2010), com organismos terrestres.

Geralmente, a toxicidade dos produtos comerciais é determinada com base nos estudos realizados com os princípios ativos constituintes em sua forma pura; entretanto, diferentes resultados apontam para a diferença de toxicidade entre a formulação comercial e o princípio ativo (BEGEEL et al., 2010). No estudo realizado para comparar a toxicidade da fórmula comercial Roundup® 360 SL em relação aos seus constituintes, o Glifosato e a Isopropilamina, por exemplo, verificou-se que substâncias presentes na fórmula comercial, como as aminas alifáticas de polioxietileno (um surfactante utilizado para aumentar o transporte do herbicida no tecido vegetal), podem promover o aumento da toxicidade para o fitoplâncton, quando é comparada a fórmula comercial em relação às misturas de ingredientes ativos que fazem parte da composição do produto (LIPOK et al., 2010). Beggel et al. (2010), em um estudo com as fórmulas Talstar® e Termidor® e seus respectivos princípios ativos, a bifentrina (um piretróide) e o fipronil (um fenil-pirazol), dois inseticidas, apresentaram valores 5 vezes mais tóxicos para o Talstar® e 2 vezes mais tóxicos para o Termidor® quando comparados aos seus princípios ativos puros em ensaios com a larva de peixes da espécie *Pimephales promelas*.

Os ingredientes inertes também podem aumentar o potencial tóxico de formulações comerciais, incluindo o desenvolvimento de neurotoxicidade, genotoxicidade e disfunção hormonal, o que pode ocorrer pelo aumento da absorção cutânea, da mobilidade e pela persistência ambiental. Entretanto, nem sempre é claro se os ingredientes inertes são diretamente responsáveis por determinados efeitos tóxicos ou se esses efeitos são atribuíveis às interações entre ingredientes ativos e inertes. Isso ocorre porque esses ingredientes raramente são identificados nas bulas dos produtos, impossibilitando o desenvolvimento de estudos para avaliação dos efeitos dos compostos

separadamente (COX; SURGAN, 2006). Visando diminuir os riscos de contaminação ambiental, em 1994 a Associação Médica Americana solicitou ao Congresso dos Estados Unidos, agências governamentais e outras agências que não medissem esforços para apoiar a inclusão dos ingredientes ativos e inertes nos rótulos de pesticidas, além do incentivo a educação sanitária relacionada ao uso de agrotóxicos.

Os resultados obtidos na presente pesquisa demonstram a importância de se avaliar especificamente as diferentes formulações comerciais, uma vez que existem diferenças no potencial tóxico e na persistência desses produtos quando comparados aos ingredientes ativos, constituintes isolados ou em suas devidas proporções. Além disso, fica evidente os riscos da utilização contínua da formulação comercial Vertimec® 18CE sem que sejam tomadas as devidas medidas de precaução para a preservação da saúde humana e qualidade ambiental.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). *Monitoramento de resíduos de agrotóxicos nos alimentos:* Trabalho desenvolvido pela ANVISA, com as vigilâncias sanitárias dos estados do AC, BA, DF, ES, GO, MS, MG, PA, PR, PE, RJ, RS, SC, SP, SE, TO, e com os laboratórios IAL/SP, IOM/FUNED e LACEN/PR. (Relatório de Atividades 2001 – 2006) 2007. 19 p.

ANDRADE, D. J.; OLIVEIRA, C. A. L.; SANTOS, N. C. MORAIS, M. R. Toxicidade diferencial de produtos à base de abamectina ao ácaro *Brevipalpus phoenicis* (Geijskes, 1939) (Acari: Tunupalpidae) em citros. Revista Bras. Fruticultura, 32(1), p. 082-089, 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). *NBR 15088*. Ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda – método de ensaio com peixes. 2004. 14p

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). *NBR 15499*. Ecotoxicologia aquática: toxicidade crônica de curta duração – método de ensaio com peixes. 2007. 25p.

AYRES M.; AYRES JR., M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. *Bio Estat 2.0***:** aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq, 2000. 272 p

BEGGEL, S.; WERNER, I.; CONNON, R. E.; GEIST, J. P. Sublethal toxicity of commercial insecticide formulations and their active ingredients to larval fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Science of the Total Environment*, 408, p3169–3175, 2010.

BRASIL. *Lei n.º 7.802, de 12 de julho de 1989*. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. , 1989. 8p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Estatística/Agronegócio brasileiro. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br. 2004. Acesso em 10 dez 2010.

BRASIL. Diário Oficial. Resolução - RE No- 2.248, de 18 de maio de 2010. Disponivel em:ftp://ftp.saude.sp.gov.br/ftpsessp/bibliote/informe_eletronico/2010/iels.mai.10/Iels94/U_RS-MS-ANVISA-RE-2248_180510.pdf Acesso em: 25 jan de 2010.

BURG, R. W.; MILLER, B. M.; BAKER, E. E.; BIRNBAUM, J.; CURRIE, S. A.; HARTMAN, R.; KONG, Y.; MONAGHAN, R. L.; OLSON, G.; PUTTER, I.; TUNAC, J. B.; WALLIC, H.; STAPLEY, E. O.; OIWA, R.; OMURA, S. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrobial agents and chemotheraphy*, 15 (3), p. 361-367. 1979.

CAMPBELL, W. C. *Invermectin and Abamectin*. Springer Verlag. New Yaork, 363p. 1989.

CHALMERS, A. E.; MILLER, T. A.; OLSEN, R. W. The actions of avermectin on crayfish nerve and muscle. *European Journal of Pharmacology*, 129, p. 371-374. 1986.

CHIU S.H.L. et al. Absorption, tissue distribution, and excretion of tritium-labeled ivermectin in cattle, sheep, and rat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38, p. 2072-2078, 1990.

COX, C.; SURGAN, M. Unidentified Inert Ingredients in Pesticides: Implications for Human and Environmental Health*Environonmental Health Perspective.* 114, p. 1803–1806, 2006.

DECINA, T. G. T. *Avaliação do efeito não-alvo do inseticida/acaricida Vertimec® 18CE sobre a comunidade edáfica*. 2009. Monografia do curso de Graduação em Engenharia Ambiental. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009, 60p.

DORES, E. F. G. C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas: vias de contaminação e dinâmica dos pesticidas no ambiente. Pesticidas. *Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 9, p. 1-18, 1999

ERŽEN, N. K. Degradation of abamectin and doramectin n Sheep Grazed Pasture. *Ecotoxicology*, 14, 627-635p. 2005.

FISHER, M. H.; MROZIK, H. The chemistry and pharmacology of avermectins. *Annual Review of Pharmacologyl and Toxicolgy*. 32, 537-553p. 1992.

FLOYD, E. Y.; GEIST, J.; WERNER, I. Acute, sublethal exposure to a pyrethroid insecticide alters behavior, growth, and predation risk in larvae of the fathead minnow. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27 (8), p. 1780–1787, 2008.

GRANEY, R. L.; GIESY, J. P.; CLARK, J. R. Field studies. In: RAND, G. M. *Fundamentals of aquatic toxicology.* Effects, environmental fate and risk assessment. Taylor & Francis, Washington, USA. 1995. p.257-305.

HALLEY, B. A.; JACOB, T. A.; LU, A.Y. H. The environmental impact of the use of invermectin: environmental effects and fate. *Chemosphere*, 18 (7-8), p. 1543-1563, 1989.

KOLAR, L.; ERŽEN, K. N.; LENNY HOGERWERF, L.; VAN GESTEL, C. A. M. Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. *Environmental pollution*, 151, p. 182-189. 2008.

LIMA, N. C. *Avaliação do impacto da contaminação do solo de áreas agrícolas de Bom Repouso (MG) por meio de ensaios ecotoxicológicos.* Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2010. 130p.

LIPOK, J.; STUDNIK, H.; GRUYAERT S. The toxicity of Roundup® 360 SL formulation and its main constituents: Glyphosate and isopropylamine towards non-target water photoautotrophs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, p. 1681–1688. 2010.

MURAGAN, M. RAMACHANDRAN, K. Bioefficacy of Vertimec 1.8EC against diamondback moth Plutella xylostella (L.) on cabbage. *Pestology*, Volume 24(1), p. 12-14. 2000.

NOVELLI, A. *Efeito do Vertimec® 18CE e de seu principio ativo, a abamectina, em ambiente aquático: uma análise laboratorial e in situ*. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2010. 167p.

NUNES, M. E. T. *Avaliação dos efeitos de agrotóxicos sobre a fauna edáfica por meio de ensaios ecotoxicológicos com Eisenia Andrei (Annelida, Oligochaeta) e com comunidade natural de solo*. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2010.

PIMENTEL, D.; LEVITAN, L. Pesticides: Amounts Applied and Amounts Reaching Pests *BioScience*, 36(2), p. 86-91 1986.

RÖMBKE, J.; GARCIA, M.: Assessment of ecotoxicological effects of pesticides on the soil fauna and soil processes under tropical conditions. Lieberei, R., Bianchi, H-K., Boehm, V., Reisdorff, C.,

(Eds.) *Neotropical Ecosystems*, Proceedings of the German-Brazilian Workshop, Hamburg. 2000, p. 543-548.

SANDERSON, H.; LAIRD, B.; POPE, L.; BRAIN, R.; WILSON, C.; JOHNSON, D.; BRYNING, G.; PEREGRINE, A. S.; BOXALL, A.; SOLOMON, K. Assessment of the environmental fate and effects of ivermectin in aquatic mesocosmos. *Aquatic Toxicology*, 85, p. 229-240, 2007.

SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS (AFROFIT). Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons . Acesso em 1 dez 2010.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. S.; Impactos ambientais de agrotóxicos: Monitoramento e Avaliação. In: ROMERO, A. R. (Org) *Avaliação e contabilização de impactos ambientais*, São Paulo: Editora Unicamp, 2004. p 112-122, Cap 6.

TIŠLER, T.; ERŽEN, N. K. Abamectin in the aquatic environment. *Ecotoxicology*, 15, p. 495-502. 2006.

VIEIRA, B. H. *Efeitos do agrotóxico Vertimec® no fitoplâncton: um estudo laboratorial e "in situ"*. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009. 181p.

WALL, R., STRONG, L. Environmental consequences of treating cattle with the antiparasitic drug ivermectin. *Nature* 327, p. 418–421. 1987.

WISLOCKI, P. G.; GROSSO, L. S.; DYBAS, R. A. Environmental aspects of abamectin use in protection. In: CAMPBELL, W. C. *Invermectin and Abamectin*. Springer Verlag. New Yaork, 1989. 363p.

ZACHARIAS, A. S. B. *Efeitos ecotoxicológicos dos resíduos do Vertimec® 18CE utilizado na agricultura em organismos planctônicos*. 2008. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008, 85p.

Capítulo 3: *Utilização de bioensaios in situ (mesocosmos) e laboratoriais com Danio rerio (Cypriniformes, Cyprinidae) para avaliação dos efeitos tóxicos dos resíduos do Vertimec® 18CE.*

Resumo

O alto consumo de agrotóxicos tem sido relatado em todo o mundo, demonstrando a importância de estudos mais específicos para a avaliação dos riscos de contaminação ambiental, envolvendo, principalmente, os experimentos *in situ*, o que possibilitaria uma melhor compreensão dos efeitos em nível de ecossistema. Entre os diversos agrotóxicos utilizados nas atividades agropastoris, tem-se o Vertimec® 18CE, cujo princípio ativo é a abamectina, o qual é amplamente utilizado como acaricida e inseticida em diversas culturas agrícolas, mesmo considerando a incipiência de informações sobre os efeitos tóxicos com o uso da formulação comercial. Dentro desse contexto, procurou-se avaliar os efeitos diretos e indiretos da contaminação por Vertimec® 18CE, via aplicação direta e *runoff*, por meio de estudos laboratoriais e *in situ* com a espécie *Danio rerio*. Para tanto, foram utilizadas parcelas de solo de 8m^2 e 6% de inclinação, sendo uma controle (aspersão com água) e outra contaminada com a dose recomendada do agrotóxico para o cultivo de morango (0,125 litro de calda por m^2). Posteriormente, simulou-se uma chuva (com 20 a 30mm) e a água proveniente do *runoff* foi coletada para ser utilizada em experimentos *in situ* (mesocosmos com controle, água contaminada, água não contaminada e aplicação direta do agrotóxico) e laboratoriais (a partir de diluições do *runoff*). Amostras de água dos mesocosmos foram coletadas para realização de testes de toxicidade em condições laboratoriais, permitindo uma comparação com os experimentos *in situ*. Simultaneamente, amostras de água, sedimento e de solo foram coletadas para análises físicas e químicas. Os resultados obtidos não indicaram toxicidade aguda, evidenciando efeitos tóxicos crônicos apenas no experimento *in situ*, com efeito na sobrevivência e biometria dos organismos, não sendo encontradas evidências de toxicidade nos testes laboratoriais. As análises limnológicas demonstram o aumento de nutrientes (nitrogênio e fósforo), material em suspensão, turbidez, clorofila e condutividade nos tratamentos que receberam o *runoff*, verificando-se ainda redução na concentração de oxigênio dissolvido. A análise conjunta dos testes de toxicidade com *D. rerio* nos experimentos *in situ* e laboratoriais, associada aos resultados das variáveis limnológicas, permitem inferir sobre os efeitos diretos e indiretos do Vertimec® 18CE sobre a estrutura do ecossistema aquático. Além disso, evidencia a necessidade de que estudos ecotoxicológicos também sejam conduzidos com as formulações comerciais do agrotóxico e não somente com seu princípio ativo, uma vez que existem diferenças no tempo de permanência do produto, nos mecanismos de ação e nas respostas dos componentes biológicos frente ao elemento estressor.

Palavras-chave: *in situ*, mesocosmos, *runoff*, Vertimec® 18CE, abamectina, *Danio rerio*.

1. INTRODUÇÃO

Os atuais níveis de consumo de agrotóxicos têm alertado para os riscos da contaminação dos ambientes aquáticos. Atualmente, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos em todo o mundo, movimentando um mercado de US$ 7,1 bilhões, ante aos US$ 6,6 bilhões dos Estados Unidos, segundo colocado, apresentando um crescimento de US$ 1,7 bilhões no ano de 2007, apesar da diminuição de aproximadamente 2% da área cultivada no mesmo período (PACHECO, 2009).

Os problemas ambientais promovidos pelo consumo de agrotóxicos estão relacionados principalmente com o destino que eles têm no ambiente, considerando que apenas uma parcela muito pequena do volume aplicado atinge os organismos-alvo (PIMENTEL; LEVITAN, 1986). Os processos que ocorrem após a aplicação do agrotóxico compreendem retenção (sorção, absorção), transformação (degradação química e biológica) e transporte (deriva, volatilização, lixiviação e carreamento superficial), além da interações entre eles (PIMENTEL; LEVITAN, 1986; GAVRILESCU, 2005). Esses diferentes processos podem promover a contaminação dos recursos naturais, principalmente os corpos d'água próximos aos cultivos. Nesse contexto, destaca-se a contaminação pelo carreamento superficial (*runoff*), um dos principais meios de contaminação de águas superficiais (ONGLEY, 1996; LERCH; BLANCHRD, 2003), que está relacionado a fatores intrínsecos do local, como às características do solo, da água e da geomorfologia; fatores antropogênicos, tipo de uso do solo e gerenciamento de agrotóxicos; fatores climáticos, como, pluviosidade e temperatura; e propriedades físicas e químicas dos agrotóxicos (LERCH; BLANCHRD, 2003). É importante ressaltar que esses fatores diferem quando são comparados ambientes tropicais e temperados. Considerando que a grande maioria dos estudos está centralizada na Europa e América do Norte e que estes não podem ser diretamente utilizados para a compreensão dos efeitos em áreas de clima tropical (MOREIRA et al., 2010), o desenvolvimento de estudos que avaliem por meio de ferramentas mais realísticas os efeitos dos contaminantes em ambientes de clima tropical tornam-se imprescindíveis.

Por outro lado, apesar dos estudos laboratoriais serem importantes ferramentas no estudo ecotoxicológicos, verifica-se ainda uma limitação na compreensão dos diversos processos que ocorrem, pois os testes laboratoriais, apesar de importantes, desconsideram a complexidade do ambiente e as diferentes interações entre os organismos, fatores essenciais para a compreensão do destino e efeitos dos contaminantes sobre a biota (PABLO et al., 2008). A avaliação *in situ* permite o estudo dos efeitos de contaminantes em organismos e comunidades sob condições semi-naturais simuladas, possibilitando a análise de uma situação mais próxima à realidade envolvendo não

apenas os efeitos tóxicos diretos, mas também as implicações ecológicas indiretas, servindo como uma ferramenta auxiliar para a extrapolação dos resultados obtidos em laboratório. Desse modo, os estudos em mesocosmos simulam uma situação mais realística do que as obtidas exclusivamente por meio de estudos laboratoriais, possibilitando a análise dos diferentes fatores que interferem na mobilidade, disponibilidade e toxicidade dos contaminantes no ambiente aquático e seus efeitos sobre a comunidade (GRANEY et al., 1995). Entretanto, apesar de suas vantagens em relação à sua relevância, apresentam maiores custos na elaboração, são mais trabalhosos para a instalação e manutenção e apresentam baixa replicabilidade (PETERSEN et al., 1999).

Os estudos em mesocosmos contaminados com agrotóxicos têm sido empregados em vários países devido à necessidade de validação dos estudos desenvolvidos em laboratórios (NOVELLI, 2010), a exemplo da Alemanha (MOHR et al., 2007), Austrália (BARRY; LOGAN, 1998; PABLO et al., 2008), Canadá (SANDERSON et al., 2007), Espanha (LÓPEZ-MANCISIDOR et al., 2008), Estados Unidos (RELYEA, 2006; DOWNING et al., 2008), Holanda (SCHROER et al., 2004) e Japão (CHANG et al., 2005). Destacam-se alguns estudos desenvolvidos para a avaliação *in situ* da contaminação por agrotóxicos via *runoff*, como Estados Unidos (LERCH; BLANCHRD, 2003; BRADY et al., 2006) e Portugal (MOREIRA-SANTOS et al., 2005; LOPES et al., 2007; MOREIRA et al., 2010), além dos trabalhos de VIEIRA (2010) e NOVELLI (2010), realizados no Brasil.

Dentre os diversos agrotóxicos comercializados no Brasil, verifica-se que o Vertimec® 18CE vem sendo amplamente indicado para 42 usos distintos, em 24 culturas agrícolas diferentes, visando o controle de 17 diferentes pragas (AGROFIT, 2010), principalmente para o controle de insetos e ácaros na agricultura e nematóides na pecuária (BURG et al., 1979; HALLEY et al., 1989; KOLAR et al., 2008). A classificação toxicológica do Vertimec® 18CE é III, considerada como "medianamente tóxica", e pertence a classe II em relação ao meio ambiente (muito perigoso), sendo altamente persistente e extremamente tóxico para microcrustáceos e peixes. A abamectina, princípio ativo do Vertimec® 18CE, pertence ao grupo das avermectinas, e é obtida a partir da fermentação do actinomiceto *Streptomyces avermetilis*, constituindo-se de uma mistura contendo cerca de 80 % de avermectina B_{1a} ($C_{48}H_{72}O_{14}$) e 20 % de avermectina B_{2b} ($C_{47}H_{70}O_{14}$)..

Apesar de existirem estudos ecotoxicológicos com a abamectina (WISLOCK et al., 1989; TIŠLER; ERŽEN, 2006; SANDERSON et al., 2007) existem poucos com a fórmula comercial Vertimec® 18CE, podendo citar os trabalhos de Vieira (2009) e Novelli (2010), que avaliaram os efeitos sobre as comunidades fito e zooplanctônicas, respectivamente. A falta de estudos com

formulações comerciais está relacionada ao processo de regulamentação de agrotóxicos no Brasil, que não exige estudos com o produto comercial, mas apenas com o princípio ativo, fato que muitas vezes promove uma avaliação ineficaz visto as diferenças dos riscos de contaminação pelas fórmulas comerciais que, em muitos casos, devido à presença de substâncias como os surfactantes, entre outros, apresentam toxicidade e persistência maior que do princípio ativo isoladamente (COX; SURGAN, 2006; BEGEEL et al., 2010; LIPOK et al., 2010), subestimando os reais riscos da utilização desses produtos.

Em meio ao cenário brasileiro de uso crescente de agrotóxicos, associado a deficiência de informações para região tropical e a inexistência de dados sobre os efeitos deletérios dos produtos comerciais, procurou-se nesta pesquisa compreender os possíveis efeitos ambientais relacionados à contaminação de ambientes aquáticos por carreamento superficial (*runoff*) de áreas contaminadas por agrotóxicos, além da contaminação direta pelos mesmos, por meio de experimentos *in situ* e laboratoriais.

2. METODOLOGIA

2.1. Delineamento experimental

Na presente pesquisa procurou-se avaliar os efeitos do Vertimec®18CE sobre *Danio rerio* a partir de experimentos envolvendo a aplicação do agrotóxico no solo e sua entrada ao ecossistema aquático por meio do *runoff* e a aplicação direta do agrotóxico no ecossistema aquático. Para isso foram desenvolvidos experimentos *in situ* em mesocosmos (com adição do *runoff*); experimentos laboratoriais a partir do *runoff* (contaminado e não contaminado) em diferentes diluições; e uma simulação do estudo *in situ* sob condições laboratoriais (utilizando-se água dos experimentos em mesocosmos).

Para atingir os objetivos propostos, uma parcela de solo com $8m^2$ (2m x 4m), em terreno com 6% de inclinação (Figura 1), localizadas nas dependências do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (Universidade de São Paulo), no município de Itirapina, SP, foi contaminada com o agrotóxico Vertimec® 18CE (Syngenta Proteção de Cultivos Ltda, São Paulo, Brasil), com auxílio de um pulverizador costal (Figura 2). As concentrações utilizadas foram as indicadas para o uso em culturas de morango, ($0,75\ ml.L^{-1}$), o que representa 0,125 litros de $calda.m^2$. Outra parcela, de dimensão semelhante, recebeu apenas uma aspersão com água, servindo como controle. Após a

contaminação, simulou-se uma chuva característica da região (que variam entre 20 e 30mm, segundo dados obtidos na Estação Climatológica do CRHEA/SHS/EESC/USP), o que possibilitou a coleta da água escoada pelo solo contaminado e da parcela controle (Figura 3) para realização dos testes de toxicidade laboratoriais e *in situ*.

Após preparação e coleta da água do *runoff* (contaminado e não contaminado), parte das amostras foi transferida para o laboratório para a realização de testes de toxicidade com amostras do *runoff* em diferentes diluições e análise das variáveis físicas e químicas, objetivando, com isso, verificar os possíveis efeitos originados pelo solo contaminado e não contaminado, além de efeitos indiretos, como o da turbidez. Outra parte da amostra foi adicionada nos mesocosmos para desenvolvimento dos experimentos *in situ*, buscando-se, nessa fase experimental, reconhecer os efeitos indiretos e diretos do agrotóxico em nível de alterações estruturais de um ecossistema aquático. Após a montagem dos experimentos *in situ* amostras de água foram coletadas para a realização dos experimentos laboratoriais com as amostras provenientes do campo e para análises físicas e químicas da água. As amostras para as análises físicas e químicas foram congeladas em temperatura abaixo de -18°C, enquanto que as amostras de *runoff* e água dos mesocosmos foram mantidas a temperatura inferior a 10°C, sem congelamento. Os experimentos foram realizados em abril de 2010. Informações sobre os procedimentos adotados são apresentadas em itens específicos. No Apêndice C encontram-se fotos adicionais sobre os procedimentos experimentais adotados.

Figura 1: Parcelas de solo preparadas para a aplicação do agrotóxico e detalhe dos sulcos revestidos com lona plástica para armazenagem da água escoada superficialmente.

Figura 2: Procedimento de pulverização do agrotóxico Vertimec® 18CE na parcela, com uso de equipamentos de segurança (esquerda), e simulação de chuva nas parcelas de solo previamente preparadas (direita).

Figura 3: Coleta de água do *runoff* (esquerda) e armazenamento (direita) para posterior realização dos experimentos laboratoriais e in situ.

2.2. Cultivo, manutenção e testes de sensibilidade com Danio rerio

Os juvenis de *Danio rerio* foram obtidos comercialmente e mantidos no Laboratório de Ecotoxicologia e Ecofisiologia de Organismos Aquáticos, do Núcleo de Estudos em Ecossistemas Aquáticos (NEEA), do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CRHEA), da Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo (USP).

As condições para a manutenção dos organismos seguiram as recomendações das normas estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) para testes de toxicidade com peixes (ABNT, 2004; ABNT, 2007). Seguindo as recomendações estabelecidas, os juvenis de *Danio rerio* foram aclimatados por um período mínimo de 10 dias antes da realização dos testes, em aquários de 30 litros, em água reconstituída, sendo monitorados os valores de temperatura (medidor OD YSI), pH (potenciômetro B374), condutividade elétrica (condutivímetro 145A), oxigênio dissolvido (medidor de OD YSI) e dureza (Hach, DR/2000). A água reconstituída foi mantida em aeração constante, com temperatura controlada em 25ºC ± 2ºC, fotoperíodo de 12:12h claro/escuro, com características de dureza entre 40 e 48 $mg.L^{-1}$ e pH entre 7,0 e 7,6. Foram feitas trocas de água diárias de cerca de 1/3 do volume do aquário e alimentação duas vezes ao dia com ração comercial Tetramin® até 24h antes da montagem dos testes.

Para avaliar as condições fisiológicas dos organismos-teste, foram realizados mensalmente testes de sensibilidade com a substância de referência cloreto de potássio, determinando-se a CL_{50} em 48h (ABNT, 2004). No decorrer do estudo foram realizados 13 testes de sensibilidade, elaboradando-se uma carta-controle com as informações referentes à faixa de sensibilidade da espécie, a qual foi constituída pelo valor de $CL_{50,}$48h de cada teste, $CL_{50,}$48h média, desvio-padrão e coeficiente de variação. Os organismos utilizados em todos os ensaios apresentaram, em geral, comprimento médio de 1,50 cm (± 0,50).

Para garantir a homogeneidade do lote, 10% do total de juvenis de *Danio rerio* que seriam utilizados nos testes foram avaliados biometricamente, os quais foram posteriormente descartados devido ao estresse ocasionado pelo manuseio. O comprimento padrão foi obtido com um paquímetro digital profissional e o peso total de cada indivíduo foi obtido em balança analítica Mettler, modelo AE 240.

2.3. Os testes de toxicidade laboratoriais

Foram realizados testes de toxicidade aguda e crônica de curta duração com amostras provenientes do *runoff* das parcelas controle e contaminadas com o agrotóxico Vertimec® 18CE, além de testes com as amostras de água coletadas dos mesocosmos após adição do *runoff*.

Para os testes realizados no laboratório com a água do *runoff* foram feitas diluições de 6,25%, 25,0%, 50,0% e 75,0%, além da amostra pura (100%), utilizando para a diluição a mesma água de cultivo dos organismos. Já para os testes com as amostras dos mesocosmos foi coletada

água de cada mesocosmo com auxílio de um tubo de PVC, via sifonamento. Parte do volume coletado foi utilizada para a elaboração do teste e o restante foi acondicionado para as trocas de água.

Os testes agudos e crônicos de curta duração de ambos os experimentos foram conduzidos com 2 réplicas, contendo 10 organismos cada, sob condições de temperatura (25°C ±2) e fotoperíodo de 12 horas e duração de 48h (agudo) e 168h (crônico de curta duração). O teste agudo foi conduzido em regime estático, enquanto que o crônico de curta duração em regime semi-estático, realizadando duas trocas de água de 50% do volume total do teste, a primeira no tempo 48h e a segunda a 98h a partir do início do teste. Ao final de 48h foi feita a avaliação da mortalidade dos organismos de ambos os testes com a finalidade de avaliar os efeitos agudos. Os testes seguiram as recomendações da norma ABNT (2004; 2007), modificando-se apenas a fase de vida dos organismos-teste nos testes de toxicidade crônicos de curta duração (de larvas recém eclodidas para juvenil), considerando como *endpoint* a mortalidade e imobilidade temporária dos indivíduos, avaliada a partir da contabilização dos organismos que permaneceram imóveis por pelo menos 5 segundos.

As variáveis pH (potenciômetro B374), condutividade (condutivímetro 145A), dureza (Hach, DR/2000), oxigênio dissolvido (oxímetro OD YSI) e mortalidade foram avaliadas a cada 24 horas (ABNT 2007). Para os testes crônicos de curta duração também foram avaliadas a sobrevivência por meio da análise de variância (ANOVA), e o cálculo da CEO (menor concentração do agente químico que causa efeito deletério, estatisticamente significativo), CENO (maior concentração do agente químico que não causa efeito deletério, estatisticamente significativo) e valor crônico (VC), referente a media geométrica entre a CEO e a CENO, para o teste de diluições com o *runoff* (ABNT, 2007). Realizou-se, ainda, a avaliação biométrica, obtendo-se o peso fresco (g) e comprimento total (mm) dos organismos sobreviventes. Para esse parâmetro foi aplicado o teste de variância ANOVA (AYRES et al., 2000) para análise estatística, sendo considerado como significativos os testes que apresentaram valores de $p<0,05$. Quando significativo foi realizado um pós-teste para identificação da variável que apresentou diferença significativa para peso e/ou comprimento (ABNT, 2007).

2.4. Os testes de toxicidade in situ

Os experimentos em mesocosmos também foram realizados nas dependências do CRHEA, utilizando-se tanques cilíndricos de polietileno com 60 cm de diâmetro por 90 cm de comprimento,

com capacidade para 200 litros, os quais foram previamente lavados com HNO_3, acetona e água destilada. Com o intuito de manter as condições ambientais próximas às observadas em campo, os mesocosmos foram colocados dentro de um tanque de concreto (de 10,24m^2 por 1,14m de profundidade), construído às margens da represa do Lobo. Dentro desse tanque de concreto já existia água (proveniente da represa), sedimento (uma camada de cerca de 8cm) e uma comunidade biológica estabelecida. Assim, os mesocosmos foram inseridos no tanque de concreto e preenchidos com água do próprio local, mantendo um contato direto com o sedimento. Para evitar o deslocamento e a passagem de água, sedimento e organismos entre os mesocosmos, pesos de concreto (de aproximadamente 12 kg cada um) foram presos na superfície dos mesmos. Os mesocosmos permaneceram em repouso por dois dias, promovendo a sedimentação do material particulado ressuspenso no momento da montagem do experimento, bem como uma maior estabilização de cada unidade experimental (Figura 4).

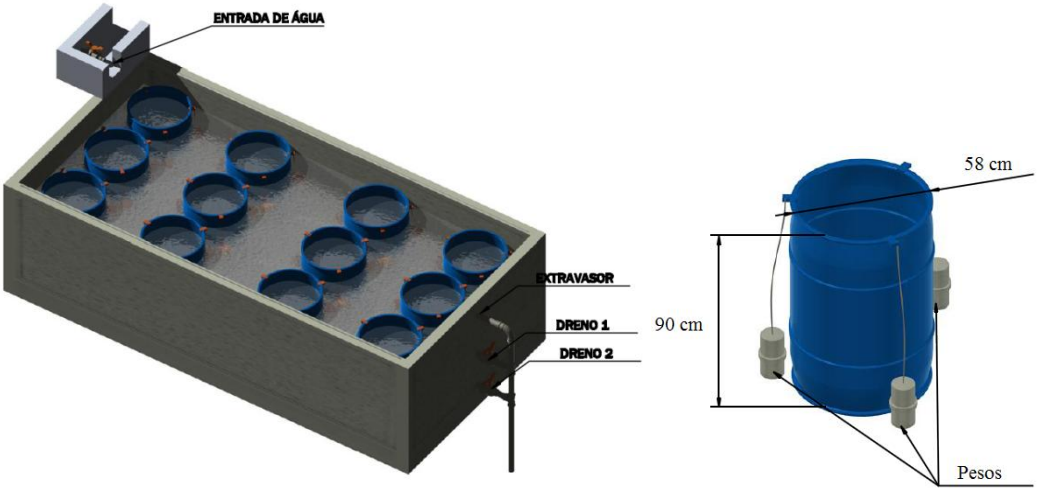


Figura 4: Esquema representativo do mesocosmos, com detalhes da estrutura do tanque de concreto (esquerda) e do mesocosmo, com pesos (direita).

O experimento foi realizado em 4 tratamentos, todos em triplicata, sendo delimitados em: 1) mesocosmo controle: **C** (nenhum contaminante foi adicionado, permanecendo na condição já encontrada no tanque de concreto); 2) mesocosmo com o *runoff* não contaminado: **RNC** (com 10% de água de escorrimento do solo não contaminado); 3) mesocosmo com o *runoff* contaminado: **RC** (com 10% de água de escorrimento do solo que recebeu a aplicação do agrotóxico) e 4) mesocosmo com Vertimec®18CE: **V** (no qual foi adicionado o agrotóxico puro diretamente na água, correspondendo a 0,4mL de Vertimec®18CE/200L (Figura 5). A concentração adicionada diretamente no mesocosmo (Tratamento V) representa aquela que foi estimada na água do *runoff*

puro, ou seja, representa 100% da concentração de Vertimec®18CE escoada superficialmente (NOVELLI, 2010). Para os mesocosmos que receberam a água de escorrimento (contaminado ou não com o agrotóxico), fez-se necessária a retirada de 20 L de água de cada réplica, a qual foi substituída pela água do *runoff*.

Figura 5: Esquema da disposição dos mesocosmos no tanque de concreto (esquerda) e após adição da água do *runoff* e inserção das câmaras para realização dos testes *in situ* (direita).

Após a montagem da estrutura experimental básica, procedeu-se a instalação das câmaras para realização dos testes de toxicidade *in situ*, as quais foram instaladas 24 horas antes do início do experimento. As câmeras foram confeccionadas em tubos de PVC, com 20 cm de comprimento, 7,5 cm de diâmetro e capacidade para 900ml de água, possuindo uma abertura superior, uma inferior e duas laterais (dispostas paralelamente), as quais foram fechadas com telas de 500µm de abertura de malha (Figura 6). O conjunto formado por 3 câmaras (teste em triplicata) foi suspenso em cada mesocosmo por meio de cordas, a aproximadamente 20 cm da lâmina de água. Um total de 10 organismos-teste foi adicionado em cada câmara, totalizando 30 organismos para cada mesocosmo e 90 para cada tratamento. Os indivíduos que foram utilizados nos testes foram aclimatados nos tanques em potes de 1 litro (um pote para cada 10 indivíduos), com metade do volume de água de cultivo e metade de água da represa, por um período de duas horas antes da inclusão nas câmaras. Os testes *in situ* tiveram duração de 7 dias (168h), sendo considerados para análise os mesmos parâmetros referentes aos testes crônicos de curta duração realizados

posteriormente no laboratório com as amostras dos mesocosmos e *runoff*. Os testes seguiram as recomendações da norma ABNT (2007) para teste de toxicidade crônica de curta duração com peixes, modificando-se apenas a fase de vida dos organismos-teste (de larvas recém eclodidas para juvenil). Os procedimentos metodológicos adotados na montagem do experimento *in situ* seguiram as recomendações de Fracácio et al. (2009).

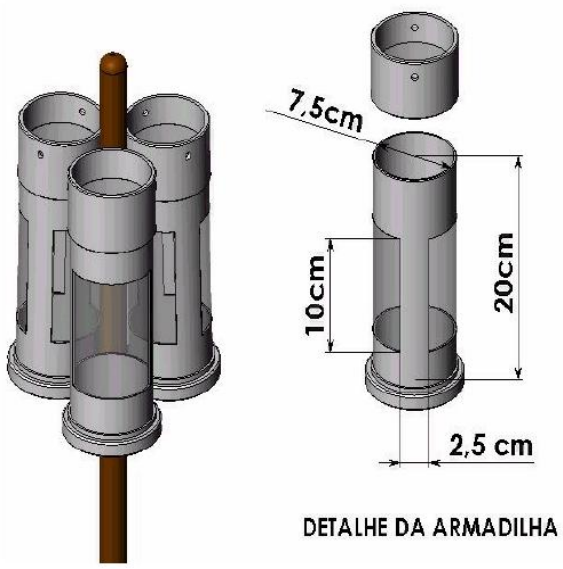


Figura 6: Representação esquemática das armadilhas utilizadas para a realização dos testes *in situ* com *Danio rerio*.

Anteriormente à contaminação foi realizada a primeira coleta de água e sedimento e, após a montagem do experimento *in situ*, com a inclusão das câmaras de testes, deu-se início a coleta de amostras de água para a determinação das variáveis limnológicas, as quais foram realizadas, 3 horas após a aplicação do Vertimec®18CE e da adição da água proveniente do *runoff* (parcela contaminada e não contaminada) e a cada 48h a partir da segunda coleta, sendo o sedimento coletado novamente somente ao final do experimento.

Durante o período de estudo os mesocosmos ficaram cobertos com lona plástica transparente no período noturno (todos os dias), evitando-se os efeitos da precipitação, principalmente em relação à diluição e a possível ressuspensão do material de fundo de cada mesocosmo. Não foi necessário cobrir o experimento durante o período diurno devido a ausência de precipitação durante o período experimental.

2.5. Coleta de água para as análises físicas, químicas e biológicas da água

Amostras de água foram coletadas em cada mesocosmo com auxílio de um tubo de PVC, via sifonamento, procurando-se amostrar em diferentes profundidades e áreas de cada unidade experimental. Após coletadas, as amostras foram transferidas para frascos de polietileno, para posterior análise em laboratório, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Metodologia de análise de algumas variáveis limnológicas da água proveniente dos mesocosmos.

Variável (unidade)	Metodologia	Referência
Temperatura (°C) pH Condutividade elétrica ($\mu S.cm^{-1}$) Oxigênio dissolvido ($mg.L^{-1}$)	Medidor portátil HORIBA U-10	-
Material em suspensão total, orgânico e inorgânico ($mg.L^{-1}$)	Gravimetria em filtros GF/C Milipore (1,2μm)	TEIXEIRA et al., (1965)
Nitrito e nitrato ($\mu g.L^{-1}$)	Espectofotometria	MACKERETH et al., (1978)
Íon amônio ($\mu g.L^{-1}$)	Espectofotometria	KOROLEFF (1976)
Nitrogênio orgânico total ($\mu g.L^{-1}$)	Espectofotometria	APHA (1995)
Fósforo total e dissolvido, fosfato inorgânico ($\mu g.L^{-1}$)	Espectofotometria	APHA (1995)
Silicato ($\mu g.L^{-1}$)	Espectofotometria	GOLTERMAN et al., (1978)
Clorofila ($\mu g.L^{-1}$)	Espectofotometria	NUSH (1980)

2.6. Coleta de sedimento para as análises físicas e químicas

Amostras de sedimento também foram coletadas para análise das características físicas e químicas, sendo coletadas três amostras entre os mesocosmos antes do início do experimento e duas amostras por unidade experimental ao final do experimento, com auxílio de draga de Eckman, as quais foram imediatamente homogeneizadas e acondicionadas em potes plásticos. As amostras foram secas em temperatura ambiente para posterior determinação do conteúdo de matéria orgânica, composição granulométrica e concentração de fósforo total e nitrogênio orgânico total (Tabela 2).

Tabela 2: Metodologias e referências utilizadas para análise das amostras de sedimento dos mesocosmos.

Variável (unidade)	Metodologia	Referência
Matéria orgânica (%)	Incineração	TRINDADE (1980)
Granulometria (%)	Peneiramento e densímetro	ABNT (1968)
Fósforo total ($\mu g.g^{-1}$)	Espectofotometria	ANDERSEN (1976)
Nitrogênio orgânico total (%)	KJELDHAL	APHA (1995)

3. RESULTADOS

3.1. Variáveis físicas, químicas e biológicas (clorofila) da água

Os resultados obtidos para pH, oxigênio dissolvido, temperatura e condutividade estão apresentados na Figura 7, e também no Apêndice B.

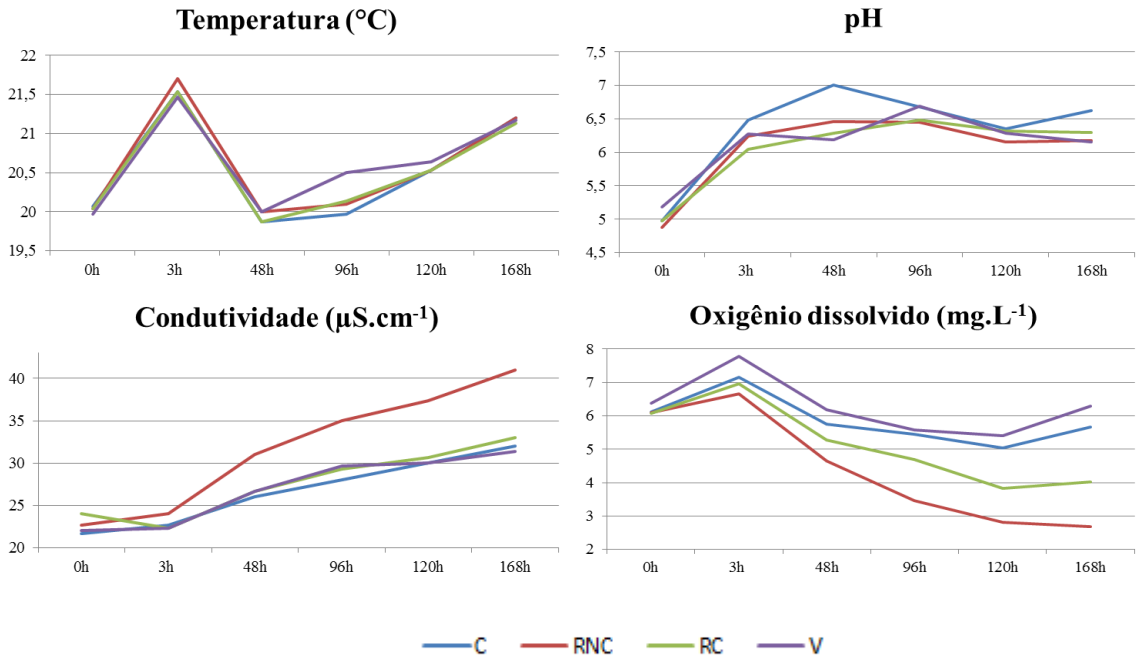


Figura 7: Valores médios das variáveis físicas e químicas da água durante o período experimental (C: controle; RNC: *runoff* não contaminado; RC: *runoff* contaminado e V: aplicação direta do Vertimec®18CE).

Em relação à temperatura da água, foram verificadas variações entre 19,87 e 21,53°C, sem diferenças nos diferentes tratamentos. Para o pH registrou-se aumento em todos os tratamentos após 3 h do início do experimento, com valores iniciais próximos a 5,0 (4,87) e entre 6,0 e 7,0 nas demais medições, sendo que no controle (C) foram obtidos os valores de pH mais elevados. Para a condutividade foi observado um aumento gradativo no decorrer do experimento, com valores que variaram entre 21,66 µS.cm^{-1} (para o tratamento Controle) e 38,67 µS.cm^{-1} (para o tratamento RNC). Os maiores valores de condutividade foram registrados no tratamento RNC. Os valores de oxigênio dissolvido revelam um aumento de OD na segunda coleta (3h) para todos os tratamentos e posterior decréscimo no decorrer do experimento. A concentração mínima registrada foi de 2,56mg.L^{-1} no tempo 168h para o tratamento RNC, com uma tendência de aumento a partir da análise em 120h, exceto para o tratamento RNC. Ressalta-se que o decréscimo da concentração de

oxigênio dissolvido foi mais acentuado para os tratamentos onde foi adicionada a água do *runoff*, evidenciando o efeito da turbidez na redução dos valores de oxigênio dissolvido.

Os valores de turbidez e material em suspensão estão apresentados na Tabela 3 e Apêndice B.

Tabela 3: Valores de material em suspensão total, inorgânico, orgânico e de turbidez, com seus respectivos desvios padrão, obtidos nos diferentes tratamentos nos experimentos *in situ* durante período de estudo (MST: material em suspensão total, MSI: material em suspensão inorgânico, MSO: material em suspensão orgânico).

Período (horas)	MST ($mg.L^{-1}$)	MSI ($mg.L^{-1}$)	MSO ($mg.L^{-1}$)	Turbidez (NTU)
		C - Controle		
0h	6,99 (±4,13)	1,69 (±1,26)	5,31 (±2,88)	-
3h	8,97 (±1,13)	3,58 (±0,93)	5,39 (±0,49)	13 (±1,0)
48h	7,77 (±2,39)	2,19 (±1,71)	5,58 (±0,94)	6,67 (±2,08)
96h	4,90 (±0,81)	0,35 (±0,82)	4,56 (±0,13)	32 (±3,46)
120h	7,48 (±2,66)	2,31 (±0,64)	5,17 (±0,64)	13,33 (±1,53)
168h	15,01 (±15,16)	7,69 (±5,35)	7,32 (±2,85)	13,67 (6,35)
		RNC – *Runoff* não contaminado		
0h	48,07 (±6,32)	11,7 (±2,89)	36,40 (±3,58)	-
3h	189,5 (±13,79)	147,17 (±16,25)	42,33 (±3,90)	263,33 (±34,27)
48h	37,73 (±18,4)	22,21 (±4,47)	15,52 (±13,99)	139,33 (±23,46)
96h	27,43 (±5,62)	16,37 (±2,88)	11,07 (±2,74)	161,33 (±34,78)
120h	20,54 (±1,08)	12,49 (±0,44)	8,05 (±0,80)	87 (±19,16)
168h	14,33 (±2,85)	7,76 (±1,74)	6,57 (±2,11)	52,67 (±15,31)
		RC – *Runoff* contaminado		
0h	50,66 (±11,47)	12,17 (±5,41)	38,50 (±6,09)	-
3h	98,47 (±18,20)	66,9 (±17,03)	31,57 (±14,87)	223 (±16,64)
48h	30,26 (±17,54)	21,60 (±15,20)	8,67 (±2,77)	118,33 (±5,51)
96h	17,39 (±11,65)	9,90 (±9,12)	7,50 (±2,53)	145,67 (±7,09)
120h	56,53 (±34,25)	35,59 (±21,85)	20,94 (±12,80)	92 (±13,08)
168h	20,00 (±7,96)	12,4 (±6,63)	7,60 (±1,95)	57,33 (±4,62)
		V – adição direta de Vertimec® 18CE		
0h	5,80 (±0,65)	1,15 (±0,17)	4,65 (±0,49)	-
3h	8,75 (±2,26)	2,98 (±1,03)	5,77 (±1,23)	16 (±2,65)
48h	8,25 (±1,72)	2,50 (±0,82)	5,75 (±0,90)	9,67 (±1,53)
96h	5,37 (±0,51)	1,23 (±0,36)	4,14 (±0,20)	45,67 (±1,53)
120h	6,53 (±0,94)	2,66 (±1,32)	3,87 (±0,39)	19,67 (±1,15)
168h	11,63 (±6,70)	4,02 (±1,27)	7,61 (±5,48)	16,67 (±4,93)

A análise dos valores de turbidez e material em suspensão demonstraram aumento de ambos nos tratamentos RNC e RC, demonstrando o efeito da adição do material particulado proveniente do *runoff*. Os valores médios obtidos de material em suspensão total foram de 189,5 $mg.L^{-1}$ e 98,47 $mg.L^{-1}$ para os tratamento RNC e RC respectivamente, sendo a maior fração constituída por material inorgânico (77,6% para o RNC e 68% para RC). Verifica-se, assim, que a adição do *runoff* promoveu um aumento de até 394% (RNC) na concentração de material em suspensão. No entanto, no segundo dia de experimento registrou-se redução acentuada na concentração de material em

suspensão, com valores de 37,73 $mg.L^{-1}$ para RNC e 30,26 $mg.L^{-1}$ para RC. Nos tratamentos Controle e V não foram verificadas diferenças acentuadas no decorrer do experimento. Situação similar foi verificada para turbidez, com valores de 263,33 e de 223,00 NTU para os tratamentos RNC e RC, respectivamente, após adição do *runoff*, com redução para 52,67 e 57,33 NTU nos mesmos tratamentos.

Os resultados obtidos nas análises de nutrientes estão apresentados na Tabela 4 e Apêndice B, verificando-se variações entre 1,74 $mg.L^{-1}$ (RNC) e 0,37 $mg.L^{-1}$ (V) para nitrogênio orgânico total, sendo observado um aumento após a contaminação e acentuada variação temporal no decorrer do experimento, principalmente em RNC. Para cada tratamento os valores mínimos e máximos foram, respectivamente, de 0,58 e 1,74 $mg.L^{-1}$ para C, de 0,53 e 1,22 $mg.L^{-1}$ para RNC, de 0,61 e 1,06 $mg.L^{-1}$ para RC e de 0,37 e 1,59 para V. Acentuado aumento também foi observado para nitrito em RNC e RC (de 2,82 para 8,57 $\mu g.L^{-1}$ e 2,61 para 7,00 $\mu g.L^{-1}$, respectivamente) após a adição do *runoff*. Posterior decréscimo é registrado nesses tratamentos, embora não em concentração similar a inicial. Nos demais tratamentos, os valores mínimos e máximos foram, respectivamente, de 2,06 e 2,96 $\mu g.L^{-1}$ para C e de 2,92 e 3,37 $\mu g.L^{-1}$ para V. Para o nitrato também registrou-se aumento da concentração para os tratamentos que sofreram adição de *runoff* (de 108,25 para 170,44 $\mu g.L^{-1}$ em RNC e de 45,64 para 141,61 $\mu g.L^{-1}$ em RC), com redução acentuada no decorrer do período de estudo (concentrações próximas as iniciais). Entretanto, esse mesmo aumento ainda foi verificado no tratamento C, com redução acentuada após o segundo dia do experimento (de 203,44 para 43,06 $\mu g.L^{-1}$). Os valores para o íon amônio variam para todos os tratamentos no decorrer do experimento, observando-se uma tendência de redução nos primeiros dias e aumento a partir do segundo dia do experimento. Nesta análise é importante ressaltar a acentuada redução do íon amônio para o tratamento V logo após a adição da contaminante (de 107,44 para 12,20 $\mu g.L^{-1}$), que corresponde, respectivamente, a maior e menor concentrações no período experimental nesse tratamento. Os valores máximos e mínimos obtidos para os demais tratamentos foram, respectivamente, de 167,17 e 22,93 $\mu g.L^{-1}$ para C, de 205,55 e 49,49 $\mu g.L^{-1}$ para RNC e de 177,2 e 44,25 $\mu g.L^{-1}$ para RC.

Tabela 4: Valores médios e os respectivos desvios padrão para nutrientes durante o período experimental (C: controle; RNC: *runoff* não contaminado; RC: *runoff* contaminado e V: aplicação direta do Vertimec®18CE).

			NO_2 (µg.L^{-1})			
	0h	3h	48h	96h	120h	168h
Controle	2,92 (±0,24)	2,06 (±0,14)	2,91 (±0,27)	2,48 (±0,22)	2,81 (±0,59)	2,96 (±0,90)
RNC	2,82 (±0,35)	8,57 (± 4,53)	8,31 (±3,75)	7,18 (±2,88)	6,25 (±2,21)	6,26 (±1,51)
RC	2,61 (±0,16)	7,00 (±4,02)	5,71 (±3,27)	5,42 (±2,86)	5,20 (±1,85)	6,36 (±1,33)
V	3,17 (±0,35)	2,89 (±1,45)	3,28 (±1,55)	2,92 (±0,44)	2,97 (±0,41)	3,37 (±1,34)
			NO_3 (µg.L^{-1})			
	0h	3h	48h	96h	120h	168h
Controle	52,45 (±21,26)	203,44 (±103,46)	43,06 (±4,13)	33,68 (±1,60)	61,38 (±28,58)	62,41 (±31,52)
RNC	108,25 (±11,41)	170,44 (±106,96)	78,92 (±14,24)	48,95 (±14,16)	43,66 (±3,59)	39,10 (±15,46)
RC	45,65 (±60,88)	141,61 (±93,98)	57,70 (±13,40)	30,70 (±13,32)	56,83 (±6,19)	48,62 (±6,71)
V	66,89 (±46,64)	86,58 (±27,91)	90,48 (±29,46)	31,95 (±14,01)	85,81 (±9,10)	29,90 (±4,79)
			NH_4 (µg.L^{-1})			
	0h	3h	48h	96h	120h	168h
Controle	167,17 (±3,10)	63,93 (±53,44)	33,93 (±25,53)	19,68 (±2,28)	52,40 (±37,52)	51,79 (±34,48)
RNC	158,90 (±9,62)	93,94 (±19,44)	49,49 (±5,58)	86,21 (±27,58)	181,56 (±62,21)	205,55 (±81,92)
RC	177,2 (±6,63)	66,01 (±59,23)	55,17 (±11,37)	44,25 (±31,61)	65,06 (±75,54)	100,66 (±88,41)
V	107,44 (±7,04)	12,20 (±60,07)	36,63 (±27,41)	25,91 (±24,30)	56,95 (±41,01)	42,04 (±31,20)
			Nitrogênio Total (mg.L^{-1})			
	0h	3h	48h	96h	120h	168h
Controle	0,67 (±0,38)	1,22 (±0,11)	0,53 (±0,21)	0,76 (±0,41)	0,68 (±0,18)	0,80 (±0,30)
RNC	0,97 (±0,16)	1,73 (±0,15)	0,90 (±0,08)	1,74 (±0,28)	0,58 (±0,22)	1,15 (±0,21)
RC	0,80 (±0,21)	1,04 (±0,10)	1,06 (±0,10)	0,95 (±1,19)	0,72 (±0,06)	0,61 (±0,29)
V	0,80 (±0,33)	1,59 (±0,40)	0,81 (±0,40)	0,83 (±0,88)	0,37 (±0,28)	0,87 (±0,27)
			Fósforo Inorgânico (µg.L^{-1})			
	0h	3h	48h	96h	120h	168h
Controle	6,71 (±1,01)	6,03 (±1,42)	8,19 (±2,67)	6,98 (±0,66)	5,54 (±1,30)	7,30 (±3,46)
RNC	4,94 (±1,18)	24,18 (±9,81)	15,7 (±5,46)	14,68 (±3,04)	12,67 (±3,73)	14,44 (±3,58)
RC	3,57 (±1,06)	19,28 (±10,93)	11,96 (±4,76)	11,2 (±5,17)	13,35 (±2,58)	16,49 (±3,46)
V	4,83 (±1,25)	7,85 (±0,90)	7,95 (±4,90)	7,98 (±2,86)	8,34 (±2,50)	7,25 (±4,59)
			Fósforo Orgânico Dissolvido (µg.L^{-1})			
	0h	3h	48h	96h	120h	168h
Controle	15,95 (±1,47)	15,07 (±4,50)	22,15 (±2,84)	16,89 (±2,49)	15,70 (±1,00)	18,47 (±3,59)
RNC	15,55 (±0,68)	50,14 (±12,40)	41,66 (±11,18)	36,87 (±11,68)	32,82 (±9,42)	29,85 (±5,42)
RC	14,50 (±0,88)	52,25 (±24,19)	41,02 (±9,60)	36,72 (±10,46)	36,57 (±7,87)	35,44 (±2,74)
V	17,20 (±0,92)	19,52 (±13,70)	23,35 (±5,72)	20,04 (±0,65)	20,05 (±5,95)	19,33 (±4,38)
			Fósforo Total (µg.L^{-1})			
	0h	3h	48h	96h	120h	168h
Controle	45,15 (±4,48)	66,14 (±10,87)	73,1 (±34,82)	66,19 (±12,70)	71,41 (±7,19)	105,45 (±57,88)
RNC	54,88 (±6,30)	346,00 (±112,00)	166,84 (±54,20)	116,23 (±28,86)	196,84 (±39,04)	144,15 (±56,65)
RC	50,98 (±4,64)	237,83 (±203,97)	138,5 (±59,48)	123,90 (±32,69)	169,46 (±86,31)	109,54 (±34,12)
V	62,90 (±3,28)	73,67 (±116,38)	59,62 (±24,10)	63,08 (±7,89)	114,79 (±53,31)	78,95 (±19,07)
			Silicato reativo (mg.L^{-1})			
	0h	3h	48h	96h	120h	168h
Controle	0,05 (±0,04)	0,10 (±0,07)	0,37 (±0,0)	0,26 (±0,01)	0,36 (±0,0)	2,99 (±0,37)
RNC	0,10 (±0,06)	0,17 (±0,01)	0,39 (±0,01)	0,38 (±0,0)	0,50 (±0,03)	3,22 (±0,12)
RC	0,06 (±0,03)	0,31 (±0,27)	0,39 (±0,01)	0,34 (±0,04)	0,50 (±0,04)	2,87 (±0,13)
V	0,13 (±0,03)	0,15 (±0,01)	0,37 (±0,01)	0,31 (±0,07)	0,40 (±0,07)	2,61 (±0,01)

As concentrações de fósforo total aumentaram nos tratamentos onde foi adicionado *runoff*, com valores mínimos de 54,88 e 50,98 µg.L^{-1} (antes da adição) e máximos de 346,0 e 237,83 µg.L^{-1} (após adição), respectivamente para RNC e RC. Logo após a adição é observada redução na concentração de fósforo total, embora não próximos ao inicial. Os valores encontrados para os outros tratamentos variaram entre 45,15 e 105,45 µg.L^{-1} para C e entre 62,90 e 114,79 µg.L^{-1} para V. Situação similar foi observada para fosfato total dissolvido e fosfato inorgânico em RC e RNC, evidenciando o efeito na adição de *runoff* no aumento da concentração das formas fosfatadas e sua posterior redução nos tratamentos, enquanto que para os demais (C e V) é observada pouca variação no decorrer do experimento. Os valores para fosfato total dissolvido variaram entre 15,07 e 22,15 µg.L^{-1} em C, entre 15,55 e 50,14 µg.L^{-1} em RNC, entre 14,50 e 52,25 µg.L^{-1} em RNC e entre 17,20 e 23,35 µg.L^{-1} em V. Para fosfato inorgânico as concentrações obtidas estiveram compreendidas entre 5,54 e 8,19 µg.L^{-1} em C, entre 4,94 e 24,18 µg.L^{-1} em RNC, entre 3,57 e 19,28 µg.L^{-1} em RC e entre 4,88 e 8,34 µg.L^{-1} em V.

As concentrações de silicato reativo variaram pouco no decorrer do período de estudo, com valores iniciais entre 0,05 e 0,13 mg.L^{-1}, com aumento gradativo até o quinto dia (entre 0,36 e 0,50 mg.L^{-1}). Os resultados de silicato reativo para a última coleta foram considerados inconsistentes, sendo descartados em todos os tratamentos.

Os resultados obtidos para clorofila *a* e feofitina estão apresentados na Figura 8, verificando-se que as maiores concentrações foram registradas nos tratamentos com adição do *runoff* (entre 9,37 e 43,42 µg.L^{-1} em RNC e entre 8,64 e 29,98 µg.L^{-1} em RC), enquanto que para a feofitina essas concentrações foram de 5,02 a 51,17 µg.L^{-1} em RNC e de 2,11 a 26,18 µg.L^{-1} para RC, indicando uma maior biomassa algal nesses tratamentos. Para C e V as concentrações estiveram abaixo das obtidas em RNC e RC em sua maioria, com reduzida variação no período de estudo (entre 5,0 e 20 µg.L^{-1} para clorofila *a* e entre 5,0 e 15 µg.L^{-1} para feofitina).

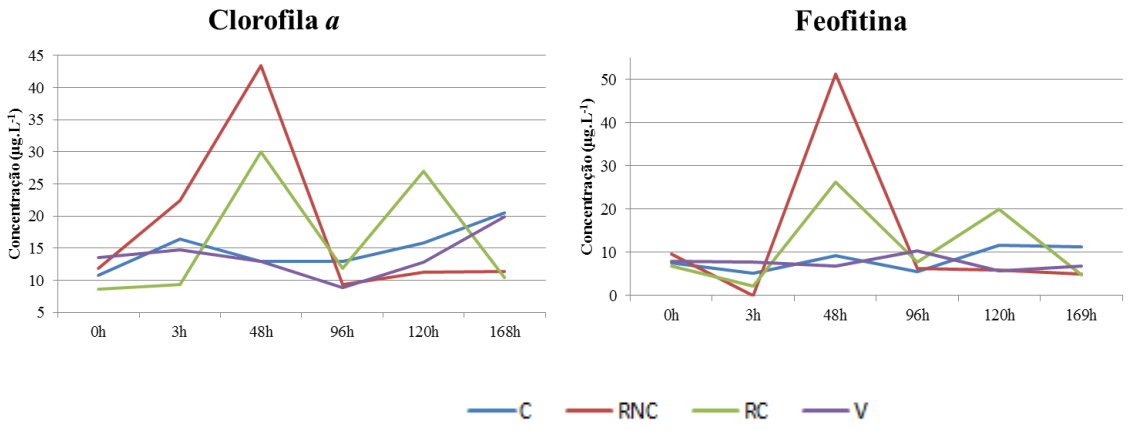


Figura 8: Valores obtidos para clorofila *a* e feofitina durante o período amostral, nos diferentes tratamentos dos mesocosmos (C: controle; RNC: *runoff* não contaminado; RC: *runoff* contaminado e V: aplicação direta do Vertimec®18CE).

3.2. Variáveis físicas e químicas do sedimento, solo e da água de runoff

Os resultados obtidos na análise de sedimentos dos mesocosmos estão apresentados na Figura 9, nas Tabelas 5 e 6 e Apêndice B, verificando-se que a proporção de matéria orgânica nos diferentes tratamentos variou de 1,93 a 2,11%. As frações areia média (entre 36,28 e 36,54%) e fina (entre 33,82 e 39,20%) foram as mais predominantes nos mesocosmos, seguidas de argila (entre 14,59 e 20,49%), silte (6,80 e 11,00%) e areia grossa (0,81 a 1,31%). Pelos dados iniciais e finais verifica-se que não houve diferença entre os tratamentos, caracterizando uma distribuição bem uniforme do sedimento entre os mesmos.

As amostras de solo das parcelas e solo que foram preparadas e que serviram de base para os experimentos *in situ* e laboratoriais apresentaram teor de matéria orgânica de 4,49 e 3,98%, respectivamente para a parcela não contaminada e contaminada. Em relação à granulometria as frações predominantes foram argila (29,97 e 30,10%), areia fina (28,45 e 30,32%) e silte (27,25 e 27,37%), e uma menor porção de areia média (12,04 e 13,95%) e argila (0,16 e 0,37%), respectivamente para as parcelas não contaminada e contaminada.

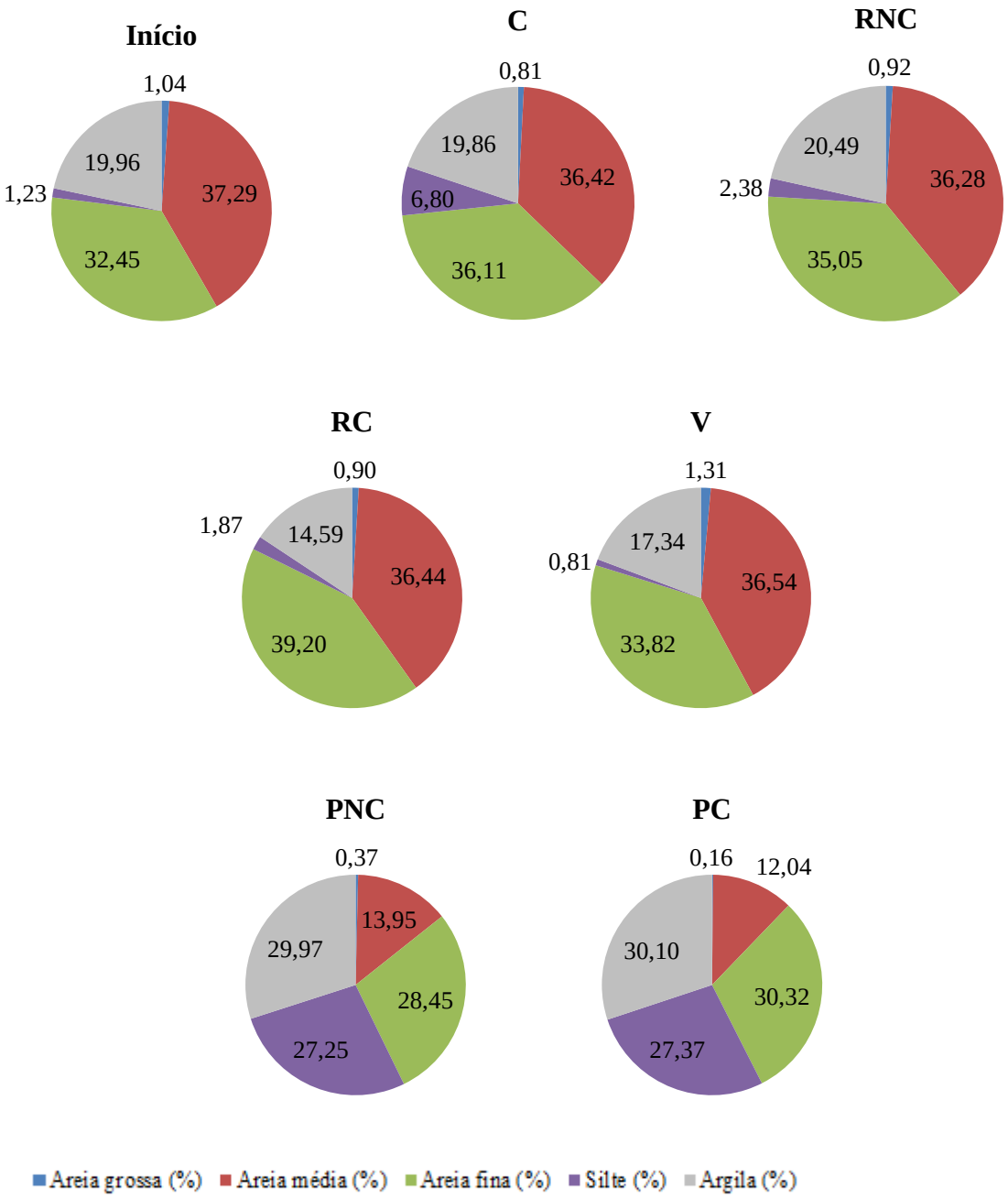


Figura 9: Valores obtidos para a análise granulométrica antes do início do experimento, para os diferentes tratamentos dos mesocosmos e para as parcelas de solo, contaminada e não contaminada (C: controle; RNC: *runoff* não contaminado; RC: *runoff* contaminado e V: direta do Vertimec®18CE; PNC: parcela não contaminada e PC: parcela contaminada).

Tabela 5: Valores obtidos para matéria orgânica antes do início do experimento, para os diferentes tratamentos dos mesocosmos e para as parcelas de solo contaminada e não contaminada (C: controle; RNC: *runoff* não contaminado; RC: *runoff* contaminado e V: aplicação ação direta do Vertimec®18CE; I: início; PNC: parcela não contaminada e PC: parcela contaminada).

Local	Matéria orgânica (%)
C	2,08
RNC	2,05
RC	1,93
V	2,11
I	2,12
PNC	4,49
PC	3,98

Em relação às características químicas do sedimento (Tabela 6), verifica-se que as concentrações médias de fósforo foram mais homogêneas entre os tratamentos C e RNC (31,81 e 31,42 $\mu g.g^{-1}$, respectivamente) e entre RC e V (35,31 e 39,22 $\mu g.g^{-1}$), sendo as últimas mais próximas às concentrações iniciais (39,64 $\mu g.g^{-1}$). Os maiores valores da concentração de fósforo foram encontrados para as parcelas não contaminada e contaminada (42,66 e 41,55 $\mu g.g^{-1}$, respectivamente). Para nitrogênio orgânico total verificou-se que as concentrações foram maiores para a análise inicial e os tratamentos que receberam o *runoff*, apresentando 0,03% de nitrogênio orgânico, seguidos pelo tratamento de contaminação direta (V), com 0,2% e pelo Controle (C), com 0,01% de nitrogênio. As parcelas utilizadas apresentaram valores de nitrogênio bem acima dos obtidos nos mesocosmos (0,10% e 0,21% para a parcela não contaminada e contaminada, respectivamente).

Tabela 6: Valores obtidos para a análise de Nitrogênio e Fósforo no sedimento inicial e ao final do experimento para os diferentes tratamentos dos mesocosmos (C: controle; RNC: *runoff* não contaminado; RC: *runoff* contaminado e V: aplicação direta do Vertimec®18CE; I: início; PNC: parcela não contaminada e PC: parcela contaminada).

	Nitrogênio orgânico total (%)	Fósforo $\mu g.g^{-1}$
C	0,01	31,81
RNC	0,03	31,42
RC	0,03	35,31
V	0,02	39,22
I	0,03	39,64
PNC	0,10	42,66
PC	0,21	41,55

Os valores obtidos nas análises físicas e químicas da água do *runoff* e das diferentes diluições estão apresentados na Tabela 7. Os valores de pH variaram entre 6,7, para o RNC 100%, e 7,39 para RNC 6,25%. O oxigênio dissolvido esteve entre 7,28 $mg.L^{-1}$ (RC 50%) e 7,58 $mg.L^{-1}$ (RNC 25%). Quanto à condutividade foi observada uma tendência de diminuição de acordo com o

aumento da porcentagem de *runoff* na diluição, onde a mínima foi observada para RNC 100% (20,4 µS.cm^{-1}) e máxima para RNC 6,25% (156,52 µS.cm^{-1}). A análise do material em suspensão revelou valores crescentes de acordo com o aumento da quantidade de *runoff* na diluição. O valor máximo e mínimo para o material em suspensão total foi de 6359,33 mg.L^{-1} (RNC 100%) e 278,75 mg.L^{-1} (RC 6,25%), respectivamente, sendo a maior fração constituída por material inorgânico.

Tabela 7: Valores obtidos para a análise físicas e químicas da água das diferentes diluições do *runoff* (RNC: *runoff* não contaminado e RC: *runoff* contaminado).

Tratamento		pH	OD (mg.L^{-1})	Cond (µS25.cm^{-1})	Mat. Susp. Total (mg.L^{-1})	Mat. Susp. Inorg. (mg.L^{-1})	Mat. Susp. Org. (mg.L^{-1})
RNC	6,25%	7,39	7,55	156,52	-	-	-
	25%	7,20	7,58	129,45	1586	433,2	1152,8
	50%	7,12	7,47	90,57	2271,33	2076,67	194,67
	75%	6,80	7,39	55,12	4338,67	1960,67	2378
	100%	6,7	7,31	20,4	6359,33	3536,67	2822,67
RC	6,25%	7,24	7,31	156,45	278,75	225,5	53,25
	25%	7,18	7,43	130,62	877,6	733,6	144
	50%	7,05	7,28	98,5	1635,33	1396,67	238,67
	75%	6,95	7,34	66,47	2490	2186,67	303,33
	100%	6,87	7,34	33,35	3722,67	2898,67	824

3.3. Testes ecotoxicológicos

Os valores da $CL_{50,}$48h para a solução de cloreto de potássio estiveram compreendidos entre 658,4 mg.L^{-1} e 957,14 mg.L^{-1}, com $CL_{50,}$48h média de 785,88 mg.L^{-1}, limite inferior de 584,21 mg.L^{-1} e limite superior de 987,55 mg.L^{-1}. O coeficiente de variação foi de 12,83%. Pelos resultados obtidos, verifica-se que as premissas para a utilização dos organismos-testes foram atendidas, uma vez que a carta controle do laboratório foi estabelecida entre 554 e 990,0 mg.L^{-1}.

Os resultados obtidos nos testes ecotoxicológicos realizados com *Danio rerio* demonstraram efeitos tóxicos quanto à sobrevivência apenas para a avaliação de exposição crônica de curta duração, não sendo observada toxicidade aguda em nenhum dos experimentos realizados (Tabela 8 e Apêndice A). Os resultados obtidos na análise de variância (ANOVA) do número de organismos mortos ou imóveis nos testes crônicos de curta duração apresentaram diferença significativa ($p<0,05$) apenas no teste *in situ*, não sendo observada diferença significativa entre os diferentes tratamentos nos experimentos com as amostras ambientais provenientes dos mesocosmos assim como no experimento com as diluições de *runoff* (Tabela 8). Desse modo, devido à ausência de

mortalidade, não foi possível o cálculo da CEO, CENO e VC para o ensaio com as diluições de *runoff*. O teste Tukey realizado para identificação do tratamento em que é observada a diferença significativa no experimento *in situ*, demonstraram que está diferença é encontrada apenas na comparação entre o Controle e o tratamento onde foi aplicado diretamente o Vertimec® 18CE na água (Tabela 8).

A avaliação biométrica dos organismos por meio de ANOVA também demonstrou diferença significativa ($p<0,05$) apenas para o experimento *in situ*, não sendo observada diferença significativa entre os diferentes tratamentos do experimento laboratorial com as amostras dos mesocosmos e entre os tratamentos nos experimentos com as diluições do *runoff* (Tabela 8). A diferença encontrada no experimento *in situ* foi observada apenas na avaliação do peso, não sendo observada diferença significativa na avaliação do comprimento dos organismos. Os testes de Tukey e Dunnet identificaram diferença na comparação entre os tratamentos Controle (C) e onde foi aplicado Vertimec® 18CE diretamente na água (V) (Tabela 8). Os resultados das análises de variâncias (ANOVA) para a avaliação da sobrevivência/imobilidade e da biometria dos organismos estão detalhados no Apêndice A.

Tabela 8: Síntese dos resultados dos testes de toxicidade agudos e crônicos de curta duração com *Danio rerio* nos experimentos laboratoriais (com amostras do *runoff* e da água dos mesocosmos) e in situ (C: controle; RNC: *runoff* não contaminado; RC: *runoff* contaminado e V: aplicação direta do Vertimec®18CE), com base na avaliação da mortalidade/sobrevivência e biometria dos organismos-teste. Os parâmetros Sobrevivência, Mortalidade e Biometria são referente às avaliação crônica de curta duração.

Teste de toxicidade *in situ* (mesocosmos)				
	C	**RNC**	**RC**	**V**
Agudo	NT	NT	NT	NT
Crônico de curta duração	NT	NT	NT	**T**
Sobrevivência (%)	100%	88,88%	97,77%	**77,77%**
Imobilidade (%)	0%	0%	0%	**46,66%**
Biometria	NS	NS	NS	**S**

Teste de toxicidade laboratorial com as amostras de água dos mesocosmos				
	C	**RNC**	**RC**	**V**
Agudo	NT	NT	NT	NT
Crônico de curta duração	NT	NT	NT	NT
Sobrevivência (%)	98,33%	100%	100%	100%
Imobilidade (%)	0%	0%	0%	0%
Biometria	NS	NS	NS	NS

Testes de toxicidade com as amostras do *runoff*						
Diluições	**0%**	**6,25%**	**25%**	**50%**	**75%**	**100%**
***Runoff* não contaminado**						
Agudo	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Crônico de curta duração	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Sobrevivência (%)	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Imobilidade (%)	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Biometria	NS	NS	NS	NS	NS	NS
***Runoff* contaminado**						
Agudo	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Crônico de curta duração	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Sobrevivência (%)	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Imobilidade (%)	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Biometria	NS	NS	NS	NS	NS	NS

De acordo com a análise estatística ANOVA, onde NT indica ausência de efeito tóxico, **T** a presença de efeito tóxico, NS nenhuma diferença significativa e **S** diferença significativa, em nível de significância de 5%.

4. DISCUSSÃO

Os estudos ecotoxicológicos buscam avaliar os riscos ou o grau de contaminação de determinado ambiente por meio de testes de toxicidade, os quais podem ser agudos, crônicos, ou crônicos de curta duração, realizados em laboratório ou *in situ*, utilizando diversos parâmetros de avaliação como respostas (mortalidade, sobrevivência, reprodução, crescimento, entre outros).

Entretanto, da mesma forma que as respostas são diferenciadas em relação às condições dos testes, entre as espécies testadas e as suas fases de desenvolvimento, respostas diferentes também podem ser esperadas entre os experimentos que são desenvolvidos em laboratório (com condições controladas) e aqueles *in situ* (nos quais as variações ambientais configuram uma condição mais próxima ao ambiente natural, apesar da interferência do *design* experimental).

Os resultados obtidos no presente estudo confirmaram as diferenças entre os experimentos *in situ* e os laboratoriais, pois verificou-se toxicidade crônica nos experimentos em mesocosmos enquanto que, em condições laboratoriais e com as mesmas amostras provenientes dos mesocosmos, não foram observadas diferenças significativas para os parâmetros avaliados (mortalidade/imobilidade e biometria). O efeito tóxico evidenciado no experimento *in situ* ocorreu em relação ao peso e mortalidade/imobilidade dos organismos no tratamento contaminado diretamente com Vertimec® 18CE (V), embora em situação laboratorial esse resultado não tenha sido registrado. É importante ressaltar que a concentração nominal de Vertimec® 18CE que apresentou toxicidade nos mesocosmos ($2\mu l.L^{-1}$) foi inferior a CEO encontrada na avaliação de toxicidade crônica de curta duração ao Vertimec® 18CE em laboratório ($3\mu l.L^{-1}$, ver capítulo 2), corroborando com a hipótese das diferenças entre o comportamento dos contaminantes em ambientes naturais em comparação às condições controladas dos experimentos laboratoriais. Esse fato demonstra a necessidade de estudos mais amplos que antecedam a regulamentação de agrotóxicos no Brasil, uma vez que são exigidos apenas testes de toxicidade agudos e crônicos em condições controladas e monoespecíficos, o que não permite inferir sobre efeitos deletérios em outras espécies e, como no presente caso, pode subestimar o real efeito do contaminante.

Diversos estudos vêm destacando as diferenças nos resultados obtidos em ensaios *in situ* e laboratoriais. Estudos conduzidos para a avaliação da qualidade da água e do sedimento do reservatório de Salto Grande, Americana-SP, demonstraram a ausência de toxicidade das amostras testadas em laboratório com a espécie *Danio rerio*. Entretanto, a avaliação *in situ* das mesmas estações amostrais revelou toxicidade para a mesma espécie (TONISSI; ESPÍNDOLA, 2002). Dornfeld et al. (2006) também observaram diferenças entre os resultados dos testes laboratoriais e *in situ* conduzidos com a espécie bentônica *Chironomus xanthus*. Os experimentos *in situ* realizados no rio Monjolinho, um sistema hídrico com trechos em áreas urbana e rural do município de São Carlos-SP, demonstraram efeitos subletais na avaliação de deformidade, peso e comprimento, enquanto que as amostras de sedimento, quando avaliadas em laboratório, causaram menor ou mesmo ausência de toxicidade. Esses resultados indicam que os experimentos em laboratório

podem subestimar os reais efeitos deletérios dos contaminantes, uma vez que existe um tempo entre coleta da amostra, preparo e realização dos testes de toxicidade; as condições se tornam mais controladas e os contaminantes podem se tornar indisponíveis ao meio (mecanismos de adsorção), obtendo-se respostas diferentes quando os experimentos são desenvolvidos *in situ*.

Apesar das vantagens dos estudos em campo ou em escala de micro e mesocosmos, existem diversas críticas quanto a sua utilização. Dentre as principais desvantagens estão os altos custos na elaboração dos testes, dificuldades na instalação e manutenção dos sistemas e a baixa replicabilidade dos testes (PETERSEN et al., 1999). Existem registros na literatura sobre as respostas com diferenças significativas entre as réplicas de um mesmo tratamento. Os estudos de Masutti (2004), Vieira (2009) e Novelli (2010), por exemplo, demonstram de forma clara o problema da ausência de respostas semelhantes entre as réplicas de um mesmo tratamento, uma vez que, a partir de um tempo zero (início do experimento), as unidades experimentais apresentam variações internas diferentes entre si, o que tem sido uma dificuldade para a compreensão dos processos que ocorrem mediante a contaminação. Nos estudos dos autores mencionados, as principais diferenças ocorreram em relação à concentração de nutrientes, material em suspensão e clorofila, o que, de forma indireta, interfere na análise das interações entre contaminantes, meio ambiente e biota aquática.

A questão das réplicas nos estudos *in situ* tem sido uma preocupação constante nos estudos ambientais. Petersen et al. (1999), por exemplo, realizaram um minucioso levantamento a respeito dos aspectos estruturais e experimentais dos mesocosmos, concluindo que deste total, 37% não apresentaram réplicas em função da divergência de informações entre cada réplica de um mesmo tratamento. Além disso, foi observada a diminuição da frequência de artigos publicados com o aumento do número de replicatas, reforçando o argumento da dificuldade na obtenção de réplicas que o validem. O alto custo de execução desse tipo de estudo, associado à perda de material experimental devido às dificuldades práticas, muitas vezes também inviabilizam a adoção de réplicas (PETERSEN et al., 1999; GUSMÃO, 2004). A dificuldade na replicabilidade está relacionada ao fato de que os experimentos em micro e mesocosmos obedecem a duas escalas: a temporal e a espacial (CAIRNS, 1995). Quanto maior o sistema maior será semelhança deste com as condições naturais; entretanto, quanto maior a escala temporal maiores serão as variabilidades encontradas entre as réplicas e entre as características experimentais e naturais (CAIRNS, 1995; KEMP el al., 2001). Assim, as divergências entre os sistemas muitas vezes tornam questionáveis o uso de repetições (GRANEY et al., 1995).

Desse modo, os estudos em escala de micro e mesocosmos devem ser realizados com o cuidado de avaliar as variáveis em condições que se adequem aos limites do *design* experimental. O presente *design* experimental se apresentou adequado para as avaliações propostas, pois as premissas para os teste foram validadas, não encontrando efeitos tóxicos no controle, além de não apresentarem divergências nas análises dos parâmetros físicos e químicos entre as diferentes réplicas, o que foi evidenciado pelos reduzidos valores de desvios-padrão obtidos.

As análises das variáveis físicas e químicas dos mesocosmos indicaram um aumento na concentração de nutrientes nos tratamentos onde foi adicionado *runoff* (RNC e RC), como observado para as formas fosfatadas (fósforo total, fósforo dissolvido e fósforo inorgânico) e nitrogenadas (nitrogênio total, nitrito e nitrato), o que foi também foi refletido na concentração de clorofila *a* e feofitina para os tratamentos RNC e RC no período de 96h, o que foi mais evidente no tratamento que não recebeu contaminação (RNC). Esses resultados demonstram que o aporte de nutrientes via *runoff* favoreceu o aumento da clorofila, o que foi menos evidente no tratamento com contaminante (RC), possivelmente devido ao impacto negativo do contaminante sobre a comunidade fitoplanctônica. Vieira (2009), em um estudo com *design* experimental similar também obteve resultados semelhantes, observando maior crescimento algáceo nos tratamentos com aporte de nutrientes provenientes do *runoff* não contaminado (RNC). Os resultados obtidos por Moreira-Santos et al. (2005) também demonstram o mesmo efeito, uma vez que os autores verificaram que a adição de nutrientes proveniente de *runoff* aumentou significativamente o crescimento de *Pseudokirchneriella subcapitata* em praticamente todos os tratamentos.

A evidência dos efeitos apenas em condições crônicas indicam a maior persistência da formulação comercial no ambiente aquático quando comparado com a contaminação apenas com o princípio ativo, a abamectina. A maior duração dos efeitos tóxicos de formulações a base de abamectina também foram encontradas a partir de estudos *in situ* com o AVID® 0.15CE com concentrações próximas às adotadas no presente estudo, variando entre 3,13 e 50µg.L^{-1} de abamectina, evidenciados pela diminuição acentuada da população de Copepoda e Cladocera, e pela tardia recuperação dessas populações, que ocorreram somente após 14 e 53 dias da contaminação, respectivamente (ALI et al., 1997).

Tišler e Eržen (2006) avaliaram o tempo de duração da abamectina na água. As medidas ao início dos testes apontaram para uma concentração superior a 80% da concentração nominal, chegando a diminuir em até 85% da concentração nominal ao final do tempo de exposição. Esses resultados demonstraram a quebra da avermectinas B_{1a}, promovendo a diminuição da concentração

de contaminante na coluna d'água em um curto período de tempo. Dados sobre a taxa de degradação das avermectinas diferem entre os compartimentos aquático e terrestre, sugerindo uma maior persistência em ambientes terrestres. Na água, as avermectinas são rapidamente fotodegradadas, sendo que a meia-vida no verão é de 12h ou menos para ivermectina e de 4 a 6 h para abamectina, enquanto que no solo a meia vida é de 7 a 14 dias para a ivermectina e de 14 a 56 dias para a abamectina (ERŽEN et al., 2005).

Entretanto, a formulação comercial, Vertimec® 18CE, apresenta outros componentes em sua formulação que podem interferir na toxicidade da abamectina, promovendo maior duração dos efeitos tóxicos, justificando a evidência de toxicidade apenas nas avaliações de toxicidade crônica. A maior persistência da fórmula comercial é destacada na bula do produto, onde é encontrada a informação de que este possui alta persistência no ambiente, o que explica as diferenças encontradas no presente trabalho em relação aos resultados com o princípio ativo (abamectina) apresentados por Eržen et al. (2005) e Tišler e Eržen (2006). Essa persistência está relacionada à presença de outras substâncias, como por exemplo, surfactantes, na fórmula comercial, que visam aumentar sua eficiência. Essas substâncias podem potencializar a toxicidade da formulação comercial quando comparada com o ingrediente ativo isoladamente.

Os ingredientes inertes podem aumentar a exposição através da ampliação da absorção cutânea e aumento da mobilidade e persistência ambiental. Entretanto, nem sempre é claro se os ingredientes inertes são diretamente responsáveis por determinados efeitos tóxicos ou se esses efeitos são atribuíveis às interações entre ingredientes ativos e inertes. Isso ocorre porque esses ingredintes raramente são identificados nas bulas dos produtos, impossibilitando o desenvolvimento de estudos que avaliem os efeitos separadamente (COX; SURGAN, 2006). Desse modo, é de suma importância a elaboração de estudos que busquem compreender os processos envolvidos e o potencial tóxico de substâncias puras, misturas e formulações comerciais, por meio de estudos *in situ*, promovendo uma avaliação dos efeitos reais dos contaminantes no ambiente, já que as diferentes misturas apresentadas nas formulações comerciais podem promover uma resposta biológica quanti e qualitativamente diferente daquela observada na presença de um único contaminante (RAND et al., 1995).

A ausência de toxicidade para o organismo teste no tratamento com material proveniente do *runoff* da parcela contaminada (RC) pode ser resultado da adsorção do contaminante à partícula do solo e a baixa concentração de contaminante ($4 \mu g.L^{-1}$), uma vez que a contaminação foi correspondente a 10% do volume total. Assim, a comparação dos resultados dos testes de toxicidade

in situ com os experimentos com as diluições de *runoff* em laboratório confirma que não foi observada toxicidade para *Danio rerio* em relação à presença de contaminante ou ao aumento da turbidez e quantidade de material em suspensão na água proveniente do carreamento superficial, mesmo para os tratamentos sem diluições, sugerindo que o contaminante sofra adsorção às partículas do solo, ficando indisponíveis.

Resultados semelhantes foram obtidos por Novelli (2010), que também não observou mortalidade na exposição de *Danio rerio* às diferentes diluições de *runoff* proveniente de parcelas sem contaminação e contaminadas por Vertimec® 18CE. Entretanto, a autora observou lesões e alterações morfológicas nas brânquias dos organismos expostos ao tratamento contaminado, que se intensificaram de acordo com o aumento da concentração de *runoff* contaminado. As alterações foram, em sua maioria, de grau I e II (POLEKSIC; MITROVIC-TUTUNDIZC, 1994), aumentando a frequência de lesões de grau II nos tratamentos com maior proporção de *runoff* contaminado (NOVELLI, 2010).

Muitos estudos têm demonstrado a diminuição da toxicidade de agrotóxicos devido à sua adsorção ao material em suspensão. O estudo realizado por Moreira et al. (2010) com *Poecilia reticulata* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae) em microcosmos com *runoff* proveniente de parcelas previamente contaminadas com deltamethrin, revelaram efeitos na sobrevivência apenas para o tratamento com 75% de volume de *runoff* contaminado, proveniente de uma parcela onde foi aplicada uma concentração de 20 vezes a dose recomendada para o combate de gafanhoto. Pode-se mencionar também os estudos *in situ* realizados por Moreira-Santos et al. (2005) com fitoplâncton, e Lopes et al. (2007) com *Diaphanosoma brachyurum* (Cladocera), sendo que em ambos foi registrada toxicidade para o *runoff* apenas em tratamentos com contaminação de parcelas com aplicações de doses 20 vezes superior à dose recomendada. Esses resultados foram obtidos a partir de uma concentração de contaminante muito superior à adotada no presente trabalho (volume de 10% de *runoff* e contaminação com a dose recomendada), justificando a não observação de efeitos significativos neste trabalho. Moreira et al. (2010), apesar de não terem encontrado efeitos na mortalidade de *P. reticulata*, observaram efeitos em nível bioquímico, evidenciados pela inibição da acetilcolinesterase e indução da lactato desidrogenase e *glutationa S*-transferase. Esses resultados sugerem que muitas vezes é necessário adotar diferentes tipos de *endpoint* para uma avaliação mais clara dos efeitos dos contaminantes. Por outro lado, questiona-se a validade de testes nos quais as concentrações testadas estão bem acimas das recomendadas e dificilmente serão utilizadas, exceto quando se considera a repetição das aplicação nas diferentes culturas.

A ausência de mortalidade nos tratamentos que apresentaram elevada turbidez e material em suspensão está de acordo com as informações encontradas na literatura. Moreira et al. (2010) também não relataram diferença na sobrevivência nos indivíduos expostos à altas concentrações de material em suspensão e turbidez em estudos laboratoriais e *in situ*. Segundo a revisão de Bash et al. (2001), a concentração de material em suspensão que promoveu a morte de 50% dos indivíduos esteve entre 488 e 1217 $mg.L^{-1}$ para as diferentes espécies de salmonídeos (*Coho salmon* e *Chinook salmon*) nas fases juvenil e adulto, respectivamente. Essas concentrações estão muito acima das encontradas no presente trabalho, que foram de 189,5 $mg.L^{-1}$ nos estudos em mesocosmos. Além disso, Billota; Brazier (2008) ressaltam que as espécies de ciprinídeos são mais tolerantes às altas concentrações de material em suspensão que os salmonídeos, sugerindo que as concentrações que poderiam promover a morte de *Danio rerio* estariam acima daquelas apresentadas por Bash et al. (2001).

Entretanto, a não observação de efeitos tóxicos dos tratamentos com *runoff* sobre *Danio rerio* não indicam a ausência de toxicidade para outros organismos. Vieira (2009) e Novelli (2010), em estudos com delineamento experimental semelhante ao presente trabalho, avaliaram os efeitos do Vertimec® 18CE sobre a comunidade fitoplanctônica e zooplanctônica, respectivamente. Os resultados encontrados evidenciaram a diminuição da densidade fitoplanctônica nos tratamentos onde foi adicionado *runoff* e menor diversidade de taxa para os tratamentos contaminados (VIEIRA, 2009). Em relação ao zooplâncton foi observada diminuição acentuada da densidade de Copepoda e na riqueza de microcrustáceos nos tratamentos com contaminante, enquanto que nos outros tratamentos foi observado um aumento da densidade de Copepoda (NOVELLI, 2010). Esses resultados demonstram que apesar de não serem observados efeitos do *runoff* (contaminado e não contaminado) na sobrevivência de *Danio rerio*, a comunidade de fito e zooplâncton podem ter sido afetadas direta ou indiretamente, promovendo distúrbios no equilíbrio da comunidade, já que é observada alta sensibilidade para o zooplâncton e menor sensibilidade para peixes. Verifica-se, portanto, que efeitos tóxicos ocorrem inicialmente nas espécies menores, com possibilidade de interferência em organismos de maior porte, via direta ou indireta. No presente caso, a redução do zooplâncton levaria a redução na pressão de *grazing* do zooplâncton sobre o fitoplâncton, favorecendo espécies de maior tamanho e o aumento da biomassa fitoplanctônica, que teria implicações nas taxas de produção e consumo do oxigênio dissolvido. Situações de anoxia, frente a elevada taxa de degradação de matéria orgânica produzida, teria ainda efeitos sobre a disponibilidade de fósforo no sedimento, entre outros efeitos, dando início a processos de

autoregulação, buscando-se um estado de equilíbrio. Por fim, alterações físicas e químicas, induzidas direta ou indiretamente pelo aporte do contaminante, teria conseqüências sobre os peixes, o que poderia ocorrer pela ação direta do contaminante ou pelos efeitos indiretos, relacionados com a redução de oxigênio dissolvido ou com a disponibilidade de alimento.

Verifica-se, portanto, que os resultados obtidos na presente pesquisa apontam para a necessidade de se desenvolverem estudos em campo para uma avaliação mais realística dos riscos associados ao uso indiscriminado de agrotóxicos. Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas nos tratamentos com aporte de material proveniente do *runoff* da parcela contaminada para *Danio rerio*, isso não significa que o ambiente esteja isento de contaminação, já que este contaminante pode estar adsorvido às partículas, ficando indisponíveis para os peixes, mas apresentando riscos a outras espécies. Desse modo, apesar das dificuldades na elaboração de estudos mais complexos, como os experimentos *in situ*, estes têm se mostrado essenciais para uma melhor avaliação clara dos efeitos dos contaminantes sobre o ecossistema aquático, sendo sugerida a sua utilização para o processo de regulamentação de agrotóxicos no Brasil, visando garantir a qualidade ambiental.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA); AMERICAN WATER WORK ASSOCIATION; WATER CONTROL FEDERATION. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. New York, 1995. 19 ed.1268 p.

ALI, A.; XUE, R.; ALAN, S. K. Ecotological effects of abamectin on natural population of selected invertebrate in man-made ponds. *Med. Entomol. Zool*., 48 (3), p. 233-241. 1997.

ANDERSEN, J. M. An ignition method for determination of total phosphorus in lake sediments. *Water research*, 10, p. 329 – 331. 1976.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). *Análise granulométrica de solos*. Rio de Janeiro, 1968. 32p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). *NBR 15088*. Ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda – método de ensaio com peixes. 2004. 14p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). *NBR 15499*. Ecotoxicologia aquática: toxicidade crônica de curta duração – método de ensaio com peixes. 2007. 25p.

AYRES M.; AYRES JR., M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.S. *Bio Estat 2.0*: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq, 2000. 272 p.

BARRY, M. J.; LOGAN D. C. The use of temporary pond microcosms for aquatic toxicity testing: direct and indirect effects of endosulfan on community structure. *Aquatic toxicology*, 41, p. 101–124. 1998.

BASH, J.; BERMAN, C.; BOLTON, S. *Effects of turbidity and suspended solids on salmonids.*Universidade de Washington: Center of streamside studies. 2001. 80p.

BEGGEL, S.; WERNER, I.; CONNON, R. E.; GEIST, J. P. Sublethal toxicity of commercial insecticide formulations and their active ingredients to larval fathead minnow (Pimephales promelas). *Science of the Total Environment*, 408, p. 3169–3175. 2010.

BILLOTA, G. S.; BRAZIER, R. R. Understanding the influence of suspended solids on water quality and aquatic biota. *Water Research*, 42, p. 2849-2861. 2008.

BRADY, J. A.; WALLENDER, W. W.; WERNER, I. MOSTAFAZADEH-FARD, B.; ZALOM F. G.; OLIVER, M. N.; WILSON, B. W.; MATA, M. M.; HENDERSON, J. D.; DEANOVIC, L. A. UPADHAYA, S. Pesticide runoff from orchard floors in Davis, California, USA: A comparative analysis of diazinon and esfenvalerate. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 115, p. 56–68. 2006.

BURG, R. W.; MILLER, B. M.; BAKER, E. E.; BIRNBAUM, J.; CURRIE, S. A.; HARTMAN, R.; KONG, Y.; MONAGHAN, R. L.; OLSON, G.; PUTTER, I.; TUNAC, J. B.; WALLIC, H.; STAPLEY, E. O.; OIWA, R.; OMURA, S. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. *Antimicrobial agents and chemotheraphy*, 15 (3), p. 361-367. 1979.

CAIRNS JR, J.; NIEDERLEHNER, B. R.; BIDWELL, J. R. (1998). “Ecological toxicity testing”. In: MEYERS R. A. (eds). *Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation*. Meyers, R. A. (ed). John Wiley & Sons, Inc.1995.

CHANG, K. H.; SAKAMOTO, M.; HAZANATO, T. Impact of pesticide application on zooplankton communities with different densities of invertebrate predators: An experimental analysis using small-scale mesocosmos. *Aquatic Toxicology*, 72, p. 373–382. 2005.

COX, C.; SURGAN, M. Unidentified Inert Ingredients in Pesticides: Implications for Human and Environmental Health. *Environonmental Health Perspective.* 114, p. 1803–1806, 2006.

DORNFELD, C.B.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; FRACÁCIO, R.; RODRIGUES, B. K.; NOVELLI, A. Comparação de bioensaios laboratoriais e *in situ* utilizando *Chironomus xanthus* na avaliação da toxicidade de sedimentos do rio Monjolinho (São Carlos, SP). *Journal Of The Brazilian Society Of Ecotoxicology*, 1, p. 161-166, 2006.

DOWNING, A. L.; DEVANNA, K. M.; RUBECK-SCHURTZ, C. N.; TUHELA, L. GRUNKEMEYER, H. Community and ecosystem responses to a pulsed pesticide disturbance in freshwater ecosystems. *Ecotoxicology*, 17 (6), p. 539-548. 2008.

ERŽEN, N. K. Degradation of abamectin and doramectin n Sheep Grazed Pasture. *Ecotoxicology*, 14, p. 627-635, 2005.

FRACÁCIO, R.; RODRIGUES, B. K.; CAMPAGNA, A. F.; VERANI, N. F.; DORNFELD, C. B.; ESPÍNDOLA, E. L. G. In situ and laboratory evaluation of toxicity with Danio rerio Buchanan (1822) and Poecilia reticulata Peters (1859). *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 21, p. 111-112, 2009.

GAVRILESCU, M. Fate of pesticide in the environment and its bioremediation. *Engineering in life sciences*, 5 (6), p. 497-526. 2005.

GOLTERMAN, H. L.; CLYMO, R. S.; OHNSTAD, M.A.M.: *Methods for physical and chemical analysis of fresh water*. 2 ed. Oxford: Blackweel scientific publications. 1978. 213p.

GRANEY, R. L.; GIESY, J. P.; CLARK, J. R. Field studies. In: RAND, G. M. *Fundamentals of aquatic toxicology*. Effects, environmental fate and risk assessment. Taylor & Francis, Washington, USA. 1995. p.257-305.

GUSMÃO, L.F.M. *Efeitos do cobre e do cromo na comunidade zooplanctônica: um estudo experimental em mesocosmos*. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004. 268p.

HALLEY, B. A.; JACOB, T. A.; LU, A.Y. H. The environmental impact of the use of invermectin: environmental effects and fate. *Chemosphere*, 18 (7-8), p. 1543-1563. 1989.

KEMP, W. M.; PETERSEN, J. E.; GARDNER, R. H. (2001). "Scale dependence and the problem of extrapolation". In: Gardner, R. H.; Kemp, W. M.; Kennedy, V. S. & Petersen, j. E. (eds) *Scalling relations in experimental ecology*. Columbia University Press, New York, p. 3- 57.

KOLAR, L.; ERŽEN, K. N.; LENNY HOGERWERF, L.; VAN GESTEL, C. A. M. Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. *Environmental pollution*, 151, p. 182-189. 2008.

KOROLEFF, F. Determination of Nutrients. In: GRASSOHOF, K. (ed) Methods of seawater analysis. *Verlag chemie weinhein*: New York, 1976. p. 117-181.

LERCH, R. N.; BLANCHARD, P. E. Watershed vulnerability to herbicide transport in northern Missouri and southern Iowa streams. *Environ. Sci. Technol*, 37, p. 5518-5527. 2003.

LIPOK, J.; STUDNIK, H.; GRUYAERT S. The toxicity of Roundup® 360 SL formulation and its main constituents: Glyphosate and isopropylamine towards non-target water photoautotrophs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, p. 1681–1688. 2010.

LOPES, I.; MOREIRA-SANTOS, M.; SILVA, E. M.; SOUSA, J. P.; GUILHERMINO, L.; SOARES, A. M. V. M.; RIBEIRO, R. in situ assays with tropical cladocerans to evaluate edge-of-field pesticide runoff toxicity. *Chemosphere*, 67, p. 2250–2256. 2007.

LÓPEZ-MANCISIDOR, P.; CARBONELL, G.; MARINA, A.; FERNÁNDEZ, C.; TARAZONA, J. V. Zooplankton community responses to chlorpyrifos in mesocosms under Mediterranean conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, p. 16–25. 2008.

MACKERETH, F. J. H.; HERON, J.; TALLING, J. F.: Water analysis: some revised methods for limnologists. *Freshwater biological association scientific publication. Kendall*: Titus Wilson and Sons Ltd., 1978. n.36, 117p.

MASUTTI, M. B. *Distribuição e efeitos de cromo e cobre em ecossistemas aquáticos : uma análise laboratorial e "in situ" (experimentos em micro e mesocosmos)*. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2004. 390p.

MOHR, S.; BERGHAHN, R.; FEIBICKE, M.; MEINECKE, S.; OTTENSTROER, T.; SCHMIEDLING, I.; SCHMIEDICH, R.; SCHMIDT, R. Effects of the herbicide metazachlor on macrophytes and ecosystem function in freshwater pond and stream mesocosmos. *Aquatic Toxicology*, 82, p. 73–84. 2007.

MOREIRA, S. M.; MOREIRA-SANTOS, M.; OSTEN, R.; SILVA, E. M.; RIBEIRO, R.; GUILHERMINO, L.; SOARES, A. M. V. M. Ecotoxicological tools for the tropics Sublethal assays with fish to evaluate edge-of-field pesticide runoff toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, p. 893–899. 2010.

MOREIRA-SANTOS, M.; SILVA, E. M.; SOARES, A. M. V. M.; RIBEIRO, R. *In situ* and laboratory microalgal assays in the tropic: a microcosmo simulation of edge-of-field pesticide *runoff*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol*., 74, p. 48–55. 2005.

NOVELLI, A. *Efeito do Vertimec® 18CE e de seu principio ativo, a abamectina, em ambiente aquático: uma análise laboratorial e in situ.* Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 1. 2010. 167p.

NUSCH, E.A. Comparison of different methods for chlorophyll and phaeopigments determination. *Archiv für Hydrobiologie*, 14, p.14-36, 1980.

ONGLEY, E. D. Control of water pollution from agriculture. *FAO irrigation and drainage paper*, (55), p. 1-101. 1996.

PABLO,, F.; KRASSOI, F. R.; JONES, P. R. F.; COLVILLE, A. E.; HOSE, G. C.; LIM, R. P. Comparison of the fate and toxicity of chlorpyrifos - Laboratory versus a coastal mesocosm system. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, p. 219–229. 2008.

PACHECO, P. *Brasil lidera uso mundial de agrotóxicos*. Estado de São Paulo, São Paulo. 07 ag. 2009. Caderno economia e negócios. Disponível em:

http://www.estadao.com.br/estadaodehoje/20090807/not_imp414820,0.php. Acesso em: 17 out 2009.

PETERSEN, J.E.; CORNWELL, J.C.; KEMP, W.M. Implicit scaling in the design of experimental aquatic ecosystems. *Oikos*, 85, p. 3-18. 1999.

PIMENTEL, D.; LEVITAN, L. Pesticides: Amounts Applied and Amounts Reaching Pests *BioScience*, 36 (2), p. 86-91 1986.

POLEKSIC, V.; MITROVIC-TUTUNDIZIC, V. Fish gills as monitor of sublethal and chronic effects of pollution. IN: MULLER, R.; LLOYD, R. (eds). *Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish*. Fishing News Books. 1994.

RAND, G. M.; WELLS, P. G. MCCARTY, S. L. Introduction to aquatic toxicology In: RAND, G.M., PETROCELLI, S.R. *Fundamentals of aquatic toxicology: methods and application*. London, Hemisphere Publishing Corporation. 1995. 666p. p. 01-69.

RELYEA, R. A. The effects of pesticides, pH, and predatory stress n amphibians under mesocosm conditions. *Ecotoxicology*, 15, p. 503-511. 2006.

SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS (AFROFIT). Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons . Acesso em 1 dez 2010.

SANDERSON, H.; LAIRD, B.; POPE, L.; BRAIN, R.; WILSON, C.; JOHNSON, D.; BRYNING, G.; PEREGRINE, A. S.; BOXALL, A.; SOLOMON, K. Assessment of the environmental fate and effects of ivermectin in aquatic mesocosmos. *Aquatic Toxicology*, 85, p. 229-240, 2007.

SCHROER, A. F.; BELGERS, J. D.; BROCK, T. C.; MATSER, A. M.; MAUND, S. J.; VAN DEN BRINK, P. J. Comparison of laboratory single species and field population-level effects of the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin on freshwater invertebrates. *Arch Environ Contam Toxicol*, 46 (3), p. 324-35. 2004.

TEIXEIRA, C., TUNDISI, J. G., KUTNER, M. B. Plankton studies in mangrove environmental. II. The standings stock and some ecological factors. *Boletim do instituto oceanográfico*, 24, p.23-41. 1965.

TIŠLER, T.; ERŽEN, N. K. Abamectin in the aquatic environment. *Ecotoxicology*.15, p. 495-502. 2006.

TONISSI, F.B.; ESPÍNDOLA, E.L.G. Utilização de bioensaios agudos, crônico-parcial e *in situ* com *Danio rerio* para avaliação ecotoxicológica do Reservatório de Salto Grande (Americana, SP). In: ESPÍNDOLA, E.L.G et al. *Ecotoxicologia. Perperctivas para o Século XXI*. São Carlos: RiMa, 2002. p. 483-500.

TRINDADE, M. *Nutrientes em sedimentos da represa do Lobo (Brotas – Itirapina)*. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1980. 219p.

VIEIRA, B. H. *Efeitos do agrotóxico Vertimec® no fitoplâncton: um estudo laboratorial e "in situ"*. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009. 181p.

WISLOCKI, P. G.; GROSSO, L. S.; DYBAS, R. A. Environmental aspects of abamectin use in protection. In: CAMPBELL, W. C. *Invermectin and Abamectin*. Springer Verlag. New Yaork, 1989. 363p.

Considerações Finais

Os resultados obtidos na presente pesquisa permitem concluir, com base nos objetivos gerais e específicos, que:

- A faixa de sensibilidade estabelecida para *D. rerio,* a partir da formulação comercial Vertimec® 18CE, em testes de toxicidade aguda, foi próxima à relatada na literatura para o princípio ativo, a abamectina. Entretanto, foi observada uma maior persistência do produto comercial nas amostras testadas, indicando as diferenças na toxicidade entre o princípio ativo e a fórmula comercial;
- A presença de substâncias inertes nas fórmulas comerciais pode promover o aumento da toxicidade em relação ao princípio ativo isolado. Isso sugere a necessidade de se desenvolverem estudos específicos para cada formulação, visto que os efeitos das misturas encontradas nos diferentes produtos comerciais podem apresentar maior toxicidade do que o principio ativo puro;
- Os resultados dos experimentos *in situ* e laboratorial demonstraram diferenças entre os mesmos, registrando-se toxicidade nos experimentos *in situ* no tratamento com aplicação direta do agrotóxico e ausência desta nos experimentos laboratoriais, o que implica na necessidade de realização de testes de toxicidade *in situ* de forma complementar (ou primordial, dependendo da situação) aos laboratoriais, possibilitando uma análise mais real dos efeitos deletérios do contaminante;
- A avaliação de toxicidade exclusivamente laboratorial muitas vezes se mostra insuficiente, podendo subestimar os reais efeitos dos contaminantes. Assim, o estabelecimento de uma dose de segurança para o Vertimec® 18CE é de difícil determinação, a diferença de sensibilidade para os diversos organismos aquáticos é ampla e os efeitos indiretos no ecossistema muitas vezes não são considerados;
- A entrada de contaminante por meio de *runoff* muitas vezes pode não causar efeitos diretos sobre a biota aquática; entretanto os resultados obtidos evidenciam diferentes efeitos indiretos sobre a comunidade biológica, o que ocorre a partir de alterações nas características físicas e químicas da água, com efeitos primários e secundários sobre a comunidade fito e zooplanctônica e, posteriormente ou de forma incremental, sobre a comunidade de peixes.

APÊNDICE A: *Registros dos testes de toxicidade*

Tabela 1: Valores da CL_{50},48h obtidos nos testes de sensibilidade de *Danio rerio* ao cloreto de potássio (KCl) (DP: desvio padrão, CV: coeficiente de variação).

Sensibilidade *Danio rerio* (mg.L^{-1})			
Data	Limite inferior	Limite superior	CL_{50}
23/06/2009	584,00	795,00	681,60
22/07/2009	573,00	756,00	658,40
31/08/2009	609,93	859,17	723,90
11/11/2009	636,61	814,54	720,10
24/11/2010	572,90	756,50	658,40
24/02/2010	783,17	975,10	873,88
02/03/2010	721,48	859,76	787,58
24/03/2010	783,17	975,10	873,88
08/04/2010	812,59	1007,26	904,70
26/04/2010	711,07	962,24	827,17
16/06/2010	758,17	939,81	844,11
08/11/2010	598,73	831,66	705,64
25/11/2010	813,53	1126,12	957,14
Média	689,10	896,79	785,88
DP	95,72	110,62	100,84
Limite superior			987,56
Limite inferior			584,21
CV			12,83%

Tabela 2: Testes de toxicidade avaliando a CL_{50},48h para *Danio reri*o ao Vertimec® 18CE (DP: desvio padrão, CV: coeficiente de variação).

CL_{50},48h Vertimec® 18CE (µl.L^{-1}): *Danio rerio*			
Data	Limite inferior	Limite superior	CL_{50}
22/06/2010	3,07	5,18	3,99
29/06/2010	5,11	5,87	5,48
29/06/2010	4,72	6,09	5,36
06/07/2010	3,40	4,45	3,89
06/07/2010	4,12	5,06	4,57
10/11/2010	5,75	6,54	6,13
10/11/2010	5,61	6,46	6,02
10/12/2010	3,89	4,74	4,29
10/12/2010	4,39	3,67	4,01
14/12/2010	3,32	4,66	3,93
14/12/2010	2,79	4,30	4,47
Média	4,20	5,18	4,74
DP	1,01	0,94	0,85
Limite superior			6,45
Limite inferior			3,03
CV			17,99%

Tabela 3: Testes de toxicidade avaliando a CL_{50},48h para *Danio rerio* ao Vertimec® 18CE (DP: desvio padrão, CV: coeficiente de variação).

CE_{50},48h Vertimec® 18CE ($\mu l.L^{-1}$): *Danio rerio*			
Data	Limite inferior	Limite superior	CE_{50}
22/06/2010	2,85	4,23	3,47
29/06/2010	3,93	4,32	4,12
29/06/2010	3,73	4,37	4,04
06/07/2010	2,53	3,13	2,81
06/07/2010	2,61	3,25	2,91
10/11/2010	5,19	6,04	5,60
10/11/2010	5,28	6,00	5,63
10/12/2010	2,86	3,57	3,19
10/12/2010	2,82	3,45	3,12
14/12/2010	2,62	3,32	2,99
14/12/2010	2,07	2,93	2,46
Média	3,32	4,05	3,67
DP	1,08	1,09	1,08
Limite superior			5,83
Limite inferior			1,50
CV			29,48%

Tabela 4: Resultados dos testes de toxicidade agudos com *Danio rerio*.

Ensaio nº: 01	VERTIMEC® 18CE	**Nº. indivíduos/replicata:** 10
Data Inicial: 22/06/2010		**Data Final:** 24/06/2010

Água de diluição				
Lote	Dureza ($mg.L^{-1}$ $CaCO_3$)	pH	OD ($mg.L^{-1}$)	Condutividade ($\mu S_{25}.cm^{-1}$)
21/06/2010	42,0	7,42	8,09	161,2

Concentrações	**N° de óbitos / indivíduos imóveis**		**Mortalidade**		**Parâmetros iniciais**			**Finais**	
	1	2	**Total**	**%**	**pH**	**OD ($mg.L^{-1}$)**	**Cond ($\mu S_{25}.cm^{-1}$)**	**pH**	**OD ($mg.L^{-1}$)**
Controle	0	0	0	0	7,42	8,09	161,2	7,31	6,93
1 $\mu l.L^{-1}$	0	0	0	0	7,40	7,82	158	7,35	7,12
2 $\mu l.L^{-1}$	0	0	0	0	7,40	7,86	159,3	7,23	6,71
3 $\mu l.L^{-1}$	1	1 / 2	2	20%	7,42	7,87	157,1	7,41	7,24
4 $\mu l.L^{-1}$	3 / 4	4	7	70%	7,41	7,87	157,3	7,47	7,39
5 $\mu l.L^{-1}$	3 / 4	2 / 3	5	50%	7,42	7,89	156,3	7,47	7,42
6 $\mu l.L^{-1}$	3 / 3	4 / 5	7	70%	7,42	7,90	157,2	7,45	7,43

CL_{50}= 3,99 $\mu l.L^{-1}$	CE_{50}= 3,47 $\mu l.L^{-1}$

Ensaio nº: 02	VERTIMEC® 18CE	**Nº. indivíduos/replicata:** 10
Data Inicial: 29/06/2010		**Data Final:** 01/07/2010

Água de diluição				
Lote	Dureza ($mg.L^{-1}$ $CaCO_3$)	pH	OD ($mg.L^{-1}$)	Condutividade ($\mu S_{25}.cm^{-1}$)
05/07/2010	42,0	7,41	7,84	156

Concentrações	**N° de óbitos / indivíduos imóveis**		**Mortalidade**		**Parâmetros iniciais**			**Finais**	
	1	2	**Total**	**%**	**pH**	**OD ($mg.L^{-1}$)**	**Cond ($\mu S_{25}.cm^{-1}$)**	**pH**	**OD ($mg.L^{-1}$)**
Controle	0	0	0	0	7,41	7,84	156	7,24	6,91
1 $\mu l.L^{-1}$	0	0	0	0	7,35	7,79	155,3	7,15	6,78
2 $\mu l.L^{-1}$	0	0	0	0	7,34	7,76	155,7	7,20	6,82
3 $\mu l.L^{-1}$	0	0	0	0	7,37	7,77	155,6	7,25	6,95
4 $\mu l.L^{-1}$	0 / 2	0 / 1	0	0	7,39	7,85	155,5	7,25	6,98
5 $\mu l.L^{-1}$	0 / 5	0 / 5	0	0	7,55	7,84	157,5	7,32	7,17
6 $\mu l.L^{-1}$	4 / 5	4 / 5	8	80%	7,41	7,74	155,1	7,42	7,41

CL_{50}= 5,47 $\mu l.L^{-1}$	CE_{50}= 4,12 $\mu l.L^{-1}$

Ensaio nº: 03	VERTIMEC® 18CE	**Nº. indivíduos/replicata:** 10
Data Inicial: 29/06/2010		**Data Final:** 01/07/2010

Água de diluição				
Lote	Dureza ($mg.L^{-1}$ $CaCO_3$)	pH	OD ($mg.L^{-1}$)	Condutividade ($\mu S_{25}.cm^{-1}$)
05/07/2010	42,0	7,41	7,84	156

Concentrações	**N° de óbitos / indivíduos imóveis**		**Mortalidade**		**Parâmetros iniciais**			**Finais**	
	1	2	**Total**	**%**	**pH**	**OD ($mg.L^{-1}$)**	**Cond ($\mu S_{25}.cm^{-1}$)**	**pH**	**OD ($mg.L^{-1}$)**
Controle	0	0	0	0	7,41	7,84	156	7,24	6,91
1 $\mu l.L^{-1}$	0	0	0	0	7,35	7,79	155,3	7,17	6,81
2 $\mu l.L^{-1}$	0	0	0	0	7,34	7,76	155,7	7,17	6,75
3 $\mu l.L^{-1}$	0	0	0	0	7,37	7,77	155,6	7,24	7,02
4 $\mu l.L^{-1}$	0 / 5	0 / 5	0	0	7,39	7,85	155,5	7,23	6,88
5 $\mu l.L^{-1}$	2 / 5	2 / 5	4	40%	7,55	7,84	157,5	7,32	7,20
6 $\mu l.L^{-1}$	5 / 5	3 / 5	8	80%	7,41	7,74	155,1	7,40	7,33

CL_{50}= 5,36 $\mu l/l$	CE_{50}= 4,03 $\mu l/l$

Continuação da Tabela 4

Ensaio nº: 04	VERTIMEC® 18CE	**Nº. indivíduos/replicata:** 10
Data Inicial: 06/07/2010		**Data Final:** 08/07/2010

Água de diluição				
Lote	Dureza (mg.L^{-1} $CaCO_3$)	pH	OD (mg.L^{-1})	Condutividade (μS_{25}.cm^{-1})
05/07/2010	42,0	7,34	7,76	154,8

Concentrações	**N° de óbitos / indivíduos imóveis**		**Mortalidade**		**Parâmetros iniciais**			**Finais**	
	1	2	**Total**	**%**	**pH**	**OD (mg.L^{-1})**	**Cond (μS_{25}.cm^{-1})**	**pH**	**OD (mg.L^{-1})**
Controle	0	0	0	0	7,34	7,76	154,8	7,30	7,41
1 µl.L^{-1}	0	0	0	0	7,24	7,69	-	7,23	7,27
2 µl.L^{-1}	0	0	0	0	7,23	7,69	154	7,31	7,33
3 µl.L^{-1}	1 / 3	3	4	40%	7,27	7,72	156,3	7,26	7,22
4 µl.L^{-1}	2 / 5	0 / 5	2	20%	7,23	7,70	155,7	7,31	7,39
5 µl.L^{-1}	3 / 5	5 / 5	8	80%	7,23	7,72	155,1	7,36	7,44
6 µl.L^{-1}	5 / 5	5 / 5	10	100%	7,24	7,73	155	7,38	7,41
7 µl.L^{-1}	5 / 5	5 / 5	10	100%	7,33	7,73	154,8	7,40	7,54
CL_{50}= 3,88 µl.L^{-1}					CE_{50}= 2,81 µl.L^{-1}				

Ensaio nº: 05	VERTIMEC® 18CE	**Nº. indivíduos/replicata:** 10
Data Inicial: 06/07/2010		**Data Final:** 08/07/2010

Água de diluição				
Lote	Dureza (mg.L^{-1} $CaCO_3$)	pH	OD (mg.L^{-1})	Condutividade (μS_{25}.cm^{-1})
05/07/2010	42,0	7,34	7,76	154,8

Concentrações	**N° de óbitos / indivíduos imóveis**		**Mortalidade**		**Parâmetros iniciais**			**Finais**	
	1	2	**Total**	**% pH**	**pH OD (mg.L^{-1})**	**OD (mg.L^{-1}) Cond (μS_{25}.cm^{-1})**	**Cond (μS_{25}.cm^{-1}) pH**	**pH OD (mg.L^{-1})**	**OD (mg.L^{-1})**
Controle	0	0	0	0	7,34	7,76	154,8	7,30	7,41
1 µl.L^{-1}	0	0	0	0	7,24	7,69	-	7,26	7,24
2 µl.L^{-1}	0	0	0	0	7,23	7,69	154	7,34	7,33
3 µl.L^{-1}	0	0 / 5	0	0	7,27	7,72	156,3	7,29	7,17
4 µl.L^{-1}	2 / 5	1 / 5	3	30%	7,23	7,70	155,7	7,34	7,40
5 µl.L^{-1}	4 / 5	2 / 5	6	60%	7,23	7,72	155,1	7,31	7,29
6 µl.L^{-1}	4 / 5	5 / 5	9	90%	7,24	7,73	155	7,37	7,45
7 µl.L^{-1}	5 / 5	5 / 5	10	100%	7,33	7,73	154,8	7,37	7,27
CL_{50}= 4,56 µl.L^{-1}					CE_{50}= 2,91 µl.L^{-1}				

Ensaio nº: 06	VERTIMEC® 18CE	**Nº. indivíduos/replicata:** 10
Data Inicial: 10/11/2010		**Data Final:** 12/11/2010

Água de diluição				
Lote	Dureza (mg.L^{-1} $CaCO_3$)	pH	OD (mg.L^{-1})	Condutividade (μS_{25}.cm^{-1})
05/07/2010	40,0	7,36	7,27	156,3

Concentrações	**N° de óbitos / indivíduos imóveis**		**Mortalidade**		**Parâmetros iniciais**			**Finais**	
	1	2	**Total**	**%**	**pH**	**OD (mg.L^{-1})**	**Cond (μS_{25}.cm^{-1})**	**pH**	**OD (mg.L^{-1})**
Controle	0	0	0	0	7,36	7,27	156,3	7,24	6,37
1 µl.L^{-1}	0	0	0	0	7,18	7,17	150,5	7,26	6,16
2 µl.L^{-1}	0	0	0	0	7,23	7,18	151,3	7,28	6,22
3 µl.L^{-1}	0	0	0	0	7,30	7,21	150,7	7,35	6,35
4 µl.L^{-1}	0	0	0	0	7,26	7,20	149,2	7,26	6,12
5 µl.L^{-1}	0 / 1	0 / 1	0	0	7,30	7,21	148,1	7,30	6,17
6 µl.L^{-1}	3 / 4	2 / 4	5	50%	7,30	7,22	147,3	7,44	6,55
7 µl.L^{-1}	5 / 5	3 / 3	8	80%	7,30	7,20	147,0	7,49	6,79
8 µl.L^{-1}	5 / 5	5 / 5	10	100%	7,28	7,21	147,2	7,28	5,56
CL_{50}= 6,13 µl.L^{-1}					CE_{50}= 5,59 µl.L^{-1}				

Continuação da Tabela 4

Ensaio nº: 07	VERTIMEC® 18CE	**Nº. indivíduos/replicata:** 10
Data Inicial: 10/11/2010		**Data Final:** 12/11/2010

Água de diluição				
Lote	Dureza (mg.L^{-1} $CaCO_3$	pH	OD (mg.L^{-1})	Condutividade (µS_{25}.cm^{-1})
05/07/2010	40,0	7,36	7,27	156,3

Concentrações	**N° de óbitos / indivíduos imóveis**		**Mortalidade**		**Parâmetros iniciais**			**Finais**	
	1	2	**Total**	**%**	**pH**	**OD (mg.L^{-1})**	**Cond (µS_{25}.cm^{-1})**	**pH**	**OD (mg.L^{-1})**
Controle	0	0	0	0	7,36	7,27	156,3	7,24	6,37
1 µl µl.L^{-1}	0	0	0	0	7,18	7,17	150,5	7,24	6,20
2 µl.L^{-1}	0	0	0	0	7,23	7,18	151,3	7,33	6,25
3 µl.L^{-1}	0	0	0	0	7,30	7,21	150,7	7,32	6,06
4 µl.L^{-1}	0	0	0	0	7,26	7,20	149,2	7,40	6,40
5 µl.L^{-1}	1 / 1	0 / 1	1	10%	7,30	7,21	148,1	7,36	6,33
6 µl.L^{-1}	2 / 4	2 / 4	4	40%	7,30	7,22	147,3	7,49	6,60
7 µl.L^{-1}	4 / 4	5 / 5	9	90%	7,30	7,20	147,0	7,64	7,01
8 µl.L^{-1}	5 / 5	5 / 5	10	100%	7,28	7,21	147,2	7,60	6,84
CL_{50}= 6,02 µl.L^{-1}					CE_{50}= 5,63 µl.L^{-1}				

Ensaio nº: 08	VERTIMEC® 18CE	**Nº. indivíduos/replicata:** 10
Data Inicial: 10/12/2010		**Data Final:** 12/12/2010

Água de diluição				
Lote	Dureza (mg.L^{-1} $CaCO_3$)	pH	OD (mg.L^{-1})	Condutividade (µS_{25}.cm^{-1})
09/12/2010	42,0	7,30	7,54	152,6

Concentrações	**N° de óbitos / indivíduos imóveis**		**Mortalidade**		**Parâmetros iniciais**			**Finais**	
	1	2	**Total**	**%**	**pH**	**OD (mg.L^{-1})**	**Cond (µS_{25}.cm^{-1})**	**pH**	**OD (mg.L^{-1})**
Controle	0	0	0	0	7,30	7,54	152,6	7,42	6,37
0,5 µl.L^{-1}	0	0	0	0	-	-	-	7,47	6,29
1 µl.L^{-1}	0	0	0	0	-	-	-	7,46	6,52
2 µl.L^{-1}	0	0	0	0	-	-	-	7,41	6,44
3 µl.L^{-1}	0 / 2	0 / 1	0	0	-	-	-	7,39	6,35
4 µl.L^{-1}	2 / 5	2 / 5	4	40%	-	-	-	7,24	5,68
5 µl.L^{-1}	3 / 4	4 / 5	7	70%	-	-	-	7,34	5,08
6 µl.L^{-1}	5 / 5	5 / 5	10	100%	-	-	-	7,04	5,30
7 µl.L^{-1}	5 / 5	5 / 5	10	100%	-	-	-	7,05	5,18
8 µl.L^{-1}	5 / 5	5 / 5	10	100%	-	-	-	6,97	5,48
CL_{50}= 4,29 µl.L^{-1}					CE_{50}= 3,19 µl.L^{-1}				

Ensaio nº: 09	VERTIMEC® 18CE	**Nº. indivíduos/replicata:** 10
Data Inicial: 10/12/2010		**Data Final:** 12/12/2010

Água de diluição				
Lote	Dureza (mg.L^{-1} $CaCO_3$)	pH	OD (mg.L^{-1})	Condutividade (µS_{25}.cm^{-1})
09/12/2010	42,0	7,30	7,54	152,6

Concentrações	**N° de óbitos / indivíduos imóveis**		**Mortalidade**		**Parâmetros iniciais**			**Finais**	
	1	2	**Total**	**%**	**pH**	**OD (mg.L^{-1})**	**Cond (µS_{25}.cm^{-1})**	**pH**	**OD (mg.L^{-1})**
Controle	0	0	0	0	7,30	7,54	152,6	7,42	6,32
0,5 µl.L^{-1}	0	0	0	0	-	-	-	7,47	6,29
1 µl.L^{-1}	0	0	0	0	-	-	-	7,46	6,52
2 µl.L^{-1}	0	0	0	0	-	-	-	7,41	6,44
3 µl.L^{-1}	0 / 1	0 / 2	0	0	-	-	-	7,39	6,35
4 µl.L^{-1}	2 / 5	3 / 5	5	50%	-	-	-	7,24	5,68
5 µl.L^{-1}	5 / 5	4 / 5	9	90%	-	-	-	7,34	5,08
6 µl.L^{-1}	5 / 5	5 / 5	10	100%	-	-	-	7,04	5,30
7 µl.L^{-1}	5 / 5	5 / 5	10	100%	-	-	-	7,05	5,18
8 µl.L^{-1}	5 / 5	5 / 5	10	100%	-	-	-	6,97	5,48
CL_{50}= 4,01 µl.L^{-1}					CE_{50}= 3,12 µl.L^{-1}				

Continuação da Tabela 4

Ensaio nº: 10	VERTIMEC® 18CE	**Nº. indivíduos/replicata:** 10
Data Inicial: 14/12/2010		**Data Final:** 16/12/2010

Água de diluição				
Lote	Dureza ($mg.L^{-1}$ $CaCO_3$)	pH	OD ($mg.L^{-1}$)	Condutividade ($\mu S_{25}.cm^{-1}$)
09/12/2010	42,0	7,12	7,12	156,8

Concentrações	**N° de óbitos / indivíduos imóveis**		**Mortalidade**		**Parâmetros iniciais**			**Finais**	
	1	2	**Total**	**%**	**pH**	**OD ($mg.L^{-1}$)**	**Cond ($\mu S_{25}.cm^{-1}$)**	**pH**	**OD ($mg.L^{-1}$)**
Controle	0	0	0	0	7,12	7,12	155,8	7,12	5,73
1 $\mu l.L^{-1}$	0	0	0	0	-	-	-	6,98	4,99
2 $\mu l.L^{-1}$	0	1 / 1	1	10%	-	-	-	7,22	5,68
4 $\mu l.L^{-1}$	3 / 5	3 / 5	6	60%	-	-	-	7,29	6,23
6 $\mu l.L^{-1}$	5 / 5	5 / 5	10	100%	-	-	-	7,50	6,76
8 $\mu l.L^{-1}$	5 / 5	5 / 5	10	100%	-	-	-	7,02	4,55
CL_{50}= 3,93 $\mu l.L^{-1}$					CE_{50}= 2,46 $\mu l.L^{-1}$				

Ensaio nº: 11	VERTIMEC® 18CE	**Nº. indivíduos/replicata:** 10
Data Inicial: 14/12/2010		**Data Final:** 16/12/2010

Água de diluição				
Lote	Dureza ($mg.L^{-1}$ $CaCO_3$)	pH	OD ($mg.L^{-1}$)	Condutividade ($\mu S_{25}.cm^{-1}$)
09/12/2010	42,0	7,12	7,12	156,8

Concentrações	**N° de óbitos / indivíduos imóveis**		**Mortalidade**		**Parâmetros iniciais**			**Finais**	
	1	2	**Total**	**%**	**pH**	**OD ($mg.L^{-1}$)**	**Cond ($\mu S_{25}.cm^{-1}$)**	**pH**	**OD ($mg.L^{-1}$)**
Controle	0	0	0	0	7,12	7,12	155,8	7,23	5,73
1 $\mu l.L^{-1}$	0	0	0	0	-	-	-	7,07	4,92
2 $\mu l.L^{-1}$	0	0	0	0	-	-	-	7,20	5,43
4 $\mu l.L^{-1}$	2 / 4	2 / 5	4	40%	-	-	-	7,31	6,09
6 $\mu l.L^{-1}$	5 / 5	5 / 5	10	100%	-	-	-	7,35	6,50
8 $\mu l.L^{-1}$	5 / 5	5 / 5	10	100%	-	-	-	7,11	4,72
CL_{50}= 3,47 $\mu l.L^{-1}$					CE_{50}= 2,98 $\mu l.L^{-1}$				

Tabela 5: Resultados dos testes de toxicidade crônicas de curta duração com *Danio rerio.*

Ensaio: Crônico com Vertimec® 18CE							**Ensaio: in situ Nº indivíduos/replicata: 10**		
Data Inicial: 10/12/2010							**Data Final:** 17/12/2010		
Água de diluição									
Lote	Dureza (mg.L^{-1} $CaCO_3$)		pH				OD (mg.L^{-1})		Condutividade (µS$_{25}$.cm^{-1})
08/12/2010	42,0		7,30				7,54		154,8
Concentrações / Amostra	**Tempo Horas**	**N° de óbitos / indivíduos imóveis**					**Parâmetros físicas e químicas finais**		
		1	**2**	**3**	**4**	**% de sobreviv.**	**pH**	**OD (mg.L^{-1})**	**Cond (µS$_{25}$.cm^{-1})**
Controle 1	**0h**	0	0	0	0	100%	7,30	7,54	152,6
	48h	0	0	0	0	100%	7,14	7,13	146,9
	96h	0	0	0	0	100%	7,12	7,12	156,8
	168h	0	0	0	0	100%	7,45	6,87	200,0
0,05µl,L^{-1}	**0h**	0	0	0	0	100%	7,30	7,54	152,6
	48h	0	0	0	0	100%	7,47	6,29	-
	96h	0	0	0	0	100%	7,32	6,06	158,1
	168h	0	1	0	0	97,5%	7,45	6,77	175
1 µl,L^{-1}	**0h**	0	0	0	0	100%	7,30	7,54	152,6
	48h	0	0	0	0	100%	7,46	6,52	-
	96h	0	0	0	1	97,5%	7,38	6,28	159,4
	168h	0 / 1	0	0 / 2	1 / 2	97,5%	7,42	6,67	175,8
2 µl,L^{-1}	**0h**	0	0	0	0	100%	7,30	7,54	152,6
	48h	0	0	0	0	100%	-	-	-
	96h	0	0	2	1	92,5%	7,32	5,94	162,8
	168h	0 / 4	0 / 6	3 / 9	1 / 10	90%	7,42	6,60	175
3 µl,L^{-1}	**0h**	0	0	0	0	100%	7,30	7,54	152,6
	48h	2	2	2	1	82,5%	-	-	-
	96h	2	3	3	3	72,5%	7,38	6,03	161,8
	168h	2 / 10	5 / 10	3 / 7	5 / 10	62,5%	7,29	6,03	179,5
4 µl,L^{-1}	**0h**	0	0	0	0	100%	7,30	7,54	152,6
	48h	4	4	1	3	70%	-	-	-
	96h	6	5	2	4	57,5%	7,43		162
	168h	7 / 10	5 / 10	4 / 10	4 / 10	50%	7,34		178,5
5 µl,L^{-1}	**0h**	0	0	0	0	100%	7,30	7,54	152,6
	48h	7	9	5	5	35%	7,45	7,12	156,8
	96h	9	10	6	7	20%	7,40	5,92	176,3
	168h	10 / 10	10 / 10	10 / 10	10 / 10	0%	7,44	6,69	181,5

Tabela 6: Resultados dos testes de toxicidade crônica de curta duração com *Danio rerio* com amostras provenientes do campo (RNC: *runoff* não contaminado; RC: *runoff* contaminado; V: aplicação direta de Vertimec® 18CE).

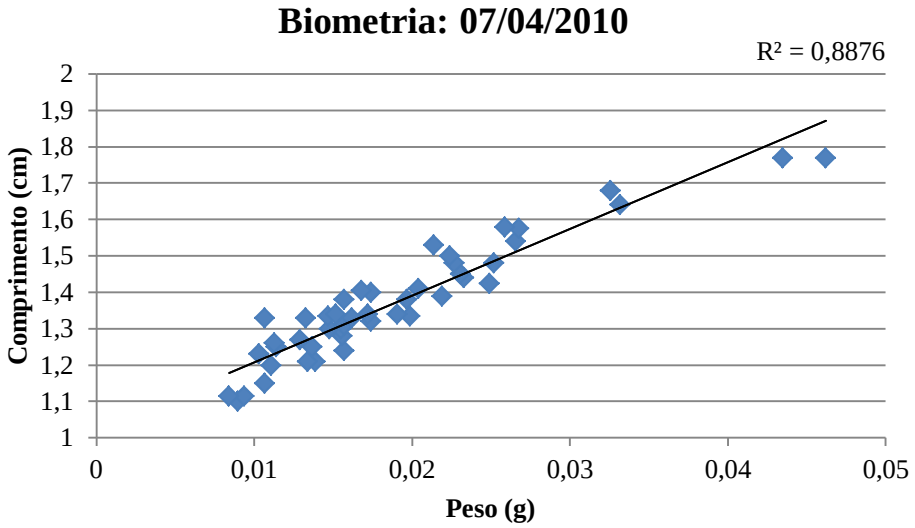
Ensaio: ***Amostra ambiental em laboratório***					**Nº, indivíduos/replicata:** 10					
Data Inicial: 07/04/2010					**Data Final:** 14/04/2010					
Concentrações / Amostra	**Tempo Horas**	**N° de óbitos por réplica**			**Parâmetros Físicos Químicos**					
					Iniciais			**Finais**		
		1	**2**	**% de sobrev.**	**pH**	**OD (mg.L^{-1})**	**Cond (µS$_{25}$.cm^{-1})**	**pH**	**OD (mg.L^{-1})**	**Cond (µS$_{25}$.cm^{-1})**
Controle 1	**0h**	0	0	100%	7,02	7,93	29,9	-		
	48h	0	0	100%	7,14	6,67	39,1	7,57	7,63	33,4
	96h	0	0	100%	7,12	7,42	34,2	7,15	7,45	34,9
	168h	0	0	100%	7,29	7,49	38,5	7,22	7,49	37,9
Controle 2	**0h**	0	0	100%	7,08	7,86	26,1	-	-	-
	48h	0	0	100%	7,11	7,62	31,1	7,12	7,58	31,2
	96h	0	0	100%	7,14	7,45	31,3	7,13	7,43	31,2
	168h	0	1	95%	7,24	7,48	35,1	7,18	7,47	34,6
Controle 3	**0h**	0	0	100%	7,12	7,84	31,9	-	-	-
	48h	0	0	100%	7,23	7,84	35,6	7,19	7,75	34,6
	96h	0	0	100%	7,27	7,47	38	7,19	7,51	36,8
	168h	0	0	100%	7,36	7,62	40	7,36	7,63	40
RNC 1	**0h**	0	0	100%	7,12	7,77	29,9	-	-	-
	48h	0	0	100%	7,11	7,70	33,2	7,09	7,48	33,9
	96h	0	0	100%	7,16	7,45	33,8	7,13	7,25	34,5
	168h	0	0	100%	7,08	7,41	35,7	7,10	7,32	36,9
RNC 2	**0h**	0	0	100%	6,99	7,79	28	-	-	-
	48h	0	0	100%	7,17	7,80	32,5	7,16	7,79	32,3
	96h	0	0	100%	7,13	7,44	33,1	7,13	7,45	32,6
	168h	0	0	100%	7,19	7,48	35,7	7,14	7,38	35,1
RNC 3	**0h**	0	0	100%	6,96	7,78	33	-	-	-
	48h	0	0	100%	7,21	7,75	37,8	7,19	7,69	37,5
	96h	0	0	100%	7,22	7,51	38,7	7,19	7,44	39,4
	168h	0	0	100%	7,25	7,45	43,5	7,28	7,46	35,4
RC 1	**0h**	0	0	100%	6,98	7,80	27,4	-	-	-
	48h	0	0	100%	7,09	7,60	31,1	7,11	7,64	31,5
	96h	0	0	100%	7,08	7,31	31,9	7,15	7,34	32,7
	168h	0	0	100%	7,18	7,38	35,7	7,20	7,44	35,4
RC 2	**0h**	0	0	100%	6,98	7,87	27,4	-	-	-
	48h	0	0	100%	7,08	7,63	31,2	7,13	7,73	32,1
	96h	0	0	100%	7,12	7,31	32,4	7,15	7,39	33,3
	168h	0	0	100%	7,17	7,40	34,3	7,18	7,43	36,2
RC 3	**0h**	0	0	100%	6,98	7,79	29,7	-	-	-
	48h	0	0	100%	7,13	7,61	34,3	7,16	7,63	33,2
	96h	0	0	100%	7,11	7,37	34,8	7,14	7,38	35,1
	168h	0	0	100%	7,17	7,43	37,0	7,22	7,44	37,9
V 1	**0h**	0	0	100%	7,05	7,95	27,2	-	-	-
	48h	0	0	100%	7,09	7,47	33,1	7,12	7,58	31,7
	96h	0	0	100%	7,08	7,31	33,8	7,17	7,38	33,1
	168h	0	0	100%	7,25	7,23	38,3	7,24	7,22	38,3
V 2	**0h**	0	0	100%	6,92	7,85	29,3	-	-	-
	48h	0	0	100%	7,06	7,60	32,8	7,06	7,50	38,4
	96h	0	0	100%	7,09	7,33	33,4	7,09	7,35	34,6
	168h	0	0	100%	7,21	7,29	36,5	7,14	7,16	39,8
V 3	**0h**	0	0	100%	7,09	7,84	26,4	-	-	-
	48h	0	0	100%	7,17	7,71	31,1	7,15	7,68	30,2
	96h	0	0	100%	7,16	7,60	31,1	7,15	7,37	30,7
	168h	0	0	100%	7,24	7,32	35,3	7,21	7,28	35,3

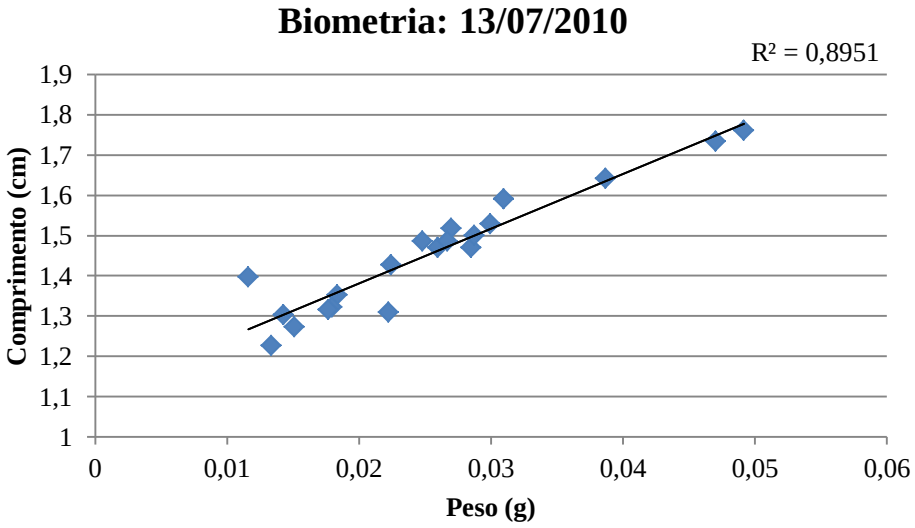
Tabela 7: Resultados dos testes de toxicidade crônica de curta duração com *Danio rerio* no experimento *in situ*/mesocosmos (C: controle; RNC: *runoff* não contaminado; RC: *runoff* contaminado; V: aplicação direta de Vertimec® 18CE).

Ensaio: Teste *in situ*						**Ensaio: in situ Nº, indivíduos/replicata: 10**		
Data Inicial: 07/04/2010						**Data Final:** 14/04/2010		
Amostra	**Tempo Horas**	**N° de óbitos / indivíduos imóveis**				**Parâmetros Físico Químicos**		
		1	**2**	**3**	**% de sobrev.**	**pH**	**OD (mg.L^{-1})**	**Cond (µS$_{25}$.cm^{-1})**
Controle 1	**0h**	0	0	0	100%	6,49	6,74	23
	48h	0	0	0	100%	7,22	5,17	27
	96h	0	0	0	100%	6,44	4,89	33
	168h	0	0	0	100%	6,74	5,29	35
Controle 2	**0h**	0	0	0	100%	6,49	7,34	21
	48h	0	0	0	100%	6,96	6,29	24
	96h	0	0	0	100%	6,34	5,68	27
	168h	0	0	0	100%	6,59	6,3	29
Controle 3	**0h**	0	0	0	100%	6,47	7,36	24
	48h	0	0	0	100%	6,85	5,76	27
	96h	0	0	0	100%	6,27	4,54	30
	168h	0	0	0	100%	6,53	5,42	32
RNC 1	**0h**	0	0	0	100%	6,41	6,6	23
	48h	0	0	0	100%	6,57	5,26	28
	96h	0	0	0	100%	6,15	4,03	34
	168h	0	1	1	93,33%	6,39	4,09	37
RNC 2	**0h**	0	0	0	100%	6,22	6,42	22
	48h	0	0	0	100%	6,48	4,49	29
	96h	0	0	0	100%	6,18	2,01	35
	168h	0	1	7	73,33%	6,09	1,64	39
RNC 3	**0h**	0	0	0	100%	6,09	6,98	27
	48h	0	0	0	100%	6,32	4,2	36
	96h	0	0	0	100%	6,12	2,38	43
	168h	0	0	0	100%	6,05	2,32	47
RC 1	**0h**	0	0	0	100%	5,99	7,03	22
	48h	0	0	0	100%	6,3	4,81	28
	96h	0	0	0	100%	6,35	3,99	32
	168h	0	0	0	100%	6,39	3,89	35
RC 2	**0h**	0	0	0	100%	6,08	7,05	22
	48h	0	0	0	100%	6,29	5,59	26
	96h	0	1	0	96,66%	6,31	4	29
	168h	0	1	1	93,33%	6,29	4,6	30
RC 3	**0h**	0	0	0	100%	6,06	6,79	23
	48h	0	0	0	100%	6,27	5,42	26
	96h	0	0	0	100%	6,28	3,48	31
	168h	0	1	1	100%	6,21	3,55	34
V 1	**0h**	0	0	0	100%	6,17	8,5	22
	48h	0	1	0	96,66%	6,16	7,13	27
	96h	0 / 5	1 / 5	0 / 5	96,66%	6,1	5,96	30
	168h	2 / 5	1 / 4	0 / 3	90%	6,15	6,8	31
V 2	**0h**	0	0	0	100%	6,3	7,6	23
	48h	0	0	1	96,66%	6,18	5,64	28
	96h	1 / 2	1 / 3	3 / 4	83,33%	6,06	4,99	32
	168h	2 / 0	1 / 0	4 / 4	76,66	6,16	5,86	34
V 3	**0h**	0	0	0	100%	6,35	7,24	22
	48h	2	1	1	86,66%	6,21	5,78	25
	96h	5 / 8	1 / 3	1 / 6	76,66%	6,7	5,24	28
	168h	4 / 8	2 / 5	4 / 8	66,66%	6,16	6,24	29

Tabela 8: Resultados dos testes de toxicidade crônicas de curta duração com *Danio rerio* com as diferentes diluições de *runoff* contaminado e não contaminado (RNC: *runoff* não contaminado; RC: *runoff* contaminado).

Ensaio: Diluições do *runoff*					**Ensaio: in situ Nº, indivíduos/replicata: 10**		
Data Inicial: 07/04/2010					**Data Final:** 14/04/2010		
Água de diluição							
Lote		Dureza (mg.L^{-1} $CaCO_3$)	pH		OD (mg.L^{-1})		Condutividade (µS_{25}.cm^{-1})
06/04/2010		42,0	7,12		7,40		162,9
Concentrações / Amostra		**Tempo (Horas)**	**N° de óbitos por réplica**			**Parâmetros Físico Químicos**	
			1	**2**	**% de sobrev.**	**pH**	**OD (mg.L^{-1})**	**Cond (µS_{25}.cm^{-1})**
Controle		**0h**	0	0	100%	7,25	7,45	165,8
		48h	0	0	100%	7,48	7,75	179,1
		96h	0	0	100%	7,30	7,60	235
		168h	0	0	100%	7,43	7,60	193,3
RNC	6,12%	**0h**	0	0	100%	7,12	7,38	150
		48h	0	0	100%	7,38	7,56	153,5
		96h	0	0	100%	7,32	7,69	158,2
		168h	0	0	100%	7,37	7,59	164,4
	25%	**0h**	0	0	100%	7,06	7,19	121,3
		48h	0	0	100%	7,30	7,81	125,0
		96h	0	0	100%	7,14	7,67	132
		168h	0	0	100%	7,27	7,65	139,5
	50%	**0h**	0	0	100%	6,51	6,99	87,2
		48h	0	0	100%	7,06	7,71	89,7
		96h	0	0	100%	7,99	7,60	91,2
		168h	0	0	100%	6,94	7,57	94,2
	75%	**0h**	0	0	100%	6,58	6,85	51,9
		48h	0	0	100%	7,04	7,64	53,7
		96h	0	0	100%	6,79	7,58	54,5
		168h	0	0	100%	6,81	7,51	60,4
	100%	**0h**	0	0	100%	6,49	6,69	18,7
		48h	0	0	100%	7,01	7,66	20,6
		96h	0	0	100%	6,62	7,56	20,4
		168h	0	0	100%	6,68	7,34	21,9
RC	6,12%	**0h**	0	0	100%	7,12	6,21	146,3
		48h	0	0	100%	7,42	7,86	154,3
		96h	0	0	100%	7,21	7,62	159,3
		168h	0	0	100%	7,22	7,56	165,9
	25%	**0h**	0	0	100%	7,15	7,22	125,2
		48h	0	0	100%	7,32	7,51	130,0
		96h	0	0	100%	7,14	7,48	131,6
		168h	0	0	100%	7,13	7,51	135,7
	50%	**0h**	0	0	100%	6,92	6,93	92,8
		48h	0	0	100%	7,08	7,21	96,6
		96h	0	0	100%	7,06	7,55	98,8
		168h	0	0	100%	7,15	7,45	105,8
	75%	**0h**	0	0	100%	6,78	6,72	60,8
		48h	0	0	100%	6,88	7,42	63,0
		96h	0	0	100%	7,03	7,57	66,9
		168h	0	0	100%	7,13	7,64	75,2
	100%	**0h**	0	0	100%	6,75	6,51	29,7
		48h	0	0	100%	6,65	7,70	31,1
		96h	0	0	100%	6,99	7,54	33,1
		168h	0	0	100%	7,09	7,61	39,5





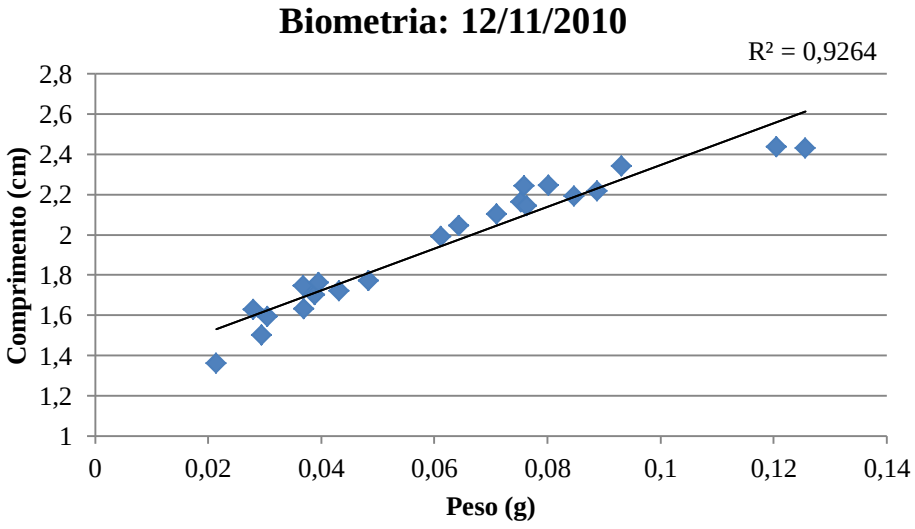


Figura 1: Correlação peso (g) x comprimento (cm) na avaliação biométrica inicial dos juvenis de *Danio rerio.*

Tabela 9: Biometria dos juvenis de *Danio rerio* expostos ao experimento *in situ* (C: controle; RNC: *runoff* não contaminado; RC: *runoff* contaminado; V: aplicação direta de Vertimec® 18CE).

Experimento *in situ*								
Tratamento	**Data início**	**Data fim**	**Tratamento**	**Data início**	**Data fim**	**Tratamento**	**Data início**	**Data fim**
C1	07/04/2010	14/04/2010	**C2**	07/04/2010	14/04/2010	**C3**	07/04/2010	14/04/2010
Indivíduo	**Comprimento total (cm)**	**Peso (g)**	**Indivíduo**	**Comprimento total (cm)**	**Peso (g)**	**Indivíduo**	**Comprimento total (cm)**	**Peso (g)**
1	1,24	0,0126	1	1,115	0,0138	1	1,19	0,0114
2	1,08	0,0085	2	1,1	0,0258	2	1,2	0,0097
3	1,13	0,0093	3	1,1	0,0103	3	1,21	0,0127
4	1,135	0,0116	4	1,11	0,0124	4	1,21	0,0104
5	1,14	0,0112	5	1,11	0,0101	5	1,23	0,0135
6	1,15	0,0124	6	1,12	0,0238	6	1,275	0,0128
7	1,185	0,0132	7	1,17	0,0197	7	1,28	0,0164
8	1,2	0,0146	8	1,175	0,0227	8	1,28	0,0148
9	1,25	0,0084	9	1,185	0,009	9	1,285	0,01
10	1,265	0,0163	10	1,2	0,0129	10	1,385	0,0212
11	1,285	0,0195	11	1,21	0,0071	11	1,4	0,019
12	1,285	0,0139	12	1,33	0,0185	12	1,4	0,024
13	1,305	0,014	13	1,43	0,0203	13	1,455	0,0227
14	1,335	0,0204	14	1,45	0,009	14	1,47	0,0255
15	1,34	0,0203	15	1,48	0,0096	15	1,495	0,0245
16	1,425	0,0258	16	1,49	0,0229	16	1,5	0,0213
17	1,465	0,023	17	1,49	0,0163	17	1,5	0,0238
18	1,52	0,0281	18	1,52	0,0272	18	1,53	0,0292
19	1,535	0,0285	19	1,53	0,0313	19	1,545	0,0293
20	1,58	0,0334	20	1,64	0,0345	20	1,74	0,0363
21	1,59	0,0279	21	1,9	0,0148	21	1,9	0,0421
22	1,64	0,0345	22	1,955	0,075	22	1,95	0,0116
23	1,64	0,0436	23	2,15	0,0259	23	2,14	0,0773
24	1,7	0,0378						
25	1,81	0,0198						
26	2,25	0,0677						
Tratamento	**Data início**	**Data fim**	**Tratamento**	**Data início**	**Data fim**	**Tratamento**	**Data início**	**Data fim**
RNC 1	07/04/2010	14/04/2010	**RNC 2**	07/04/2010	14/04/2010	**RNC 3**	07/04/2010	14/04/2010
Indivíduo	**Comprimento total (cm)**	**Peso (g)**	**Indivíduo**	**Comprimento total (cm)**	**Peso (g)**	**Indivíduo**	**Comprimento total (cm)**	**Peso (g)**
1	1,14	0,09	1	1,27	0,0164	1	1,8	0,0404
2	1,42	0,0183	2	1,3	0,0154	2	1,465	0,0204
3	1,3	0,0112	3	1,305	0,0158	3	1,415	0,0159
4	1,24	0,0131	4	1,155	0,0094	4	1,725	0,0374
5	1,35	0,0141	5	1,23	0,0369	5	1,4	0,02
6	1,22	0,0124	6	1,32	0,0114	6	1,18	0,0101
7	1,46	0,0219	7	1,135	0,0087	7	1,44	0,0199
8	1,145	0,0114	8	1,205	0,0157	8	1,455	0,022
9	1,25	0,0137	9	1,44	0,0229	9	1,17	0,0104
10	1,675	0,0371	10	1,23	0,0161	10	1,675	0,037
11	1,45	0,0208	11	1,16	0,0081	11	1,78	0,0399
12	1,5	0,025	12	1,12	0,0093	12	1,31	0,0136
13	1,65	0,0305	13	1,54	0,0262	13	1,32	0,02
14	1,255	0,0093	14	2,32	0,0915	14	1,31	0,0121
15	1,145	0,0062	15	1,125	0,0058	15	1,07	0,0075
16	1,3	0,0171	16	1,125	0,0102	16	1,415	0,0188
17	1,18	0,0206	17	1,235	0,0102	17	1,195	0,0068
18	1,365	0,0103	18	1,41	0,0162	18	1,11	0,0074
19	1,445	0,0132	19	1,125	0,0091	19	1,475	0,023
20	1,45	0,0217	20	1,265	0,012	20	1,315	0,0138
21	1,23	0,0118				21	1,065	0,0075
22	1,29	0,0146				22	1,32	0,0148
23	1,21	0,0128				23	1,22	0,0142
24	1,2	0,0116				24	1,22	0,0088
						25	1,42	0,0184
						26	1,27	0,0104
						27	1,23	0,0092

Continuação da Tabela 9

Experimento *in situ*								
Tratamento	**Data início**	**Data fim**	**Tratamento**	**Data início**	**Data fim**	**Tratamento**	**Data início**	**Data fim**
RC 1	07/04/2010	14/04/2010	**RC 2**	07/04/2010	14/04/2010	**RC 3**	07/04/2010	14/04/2010
Indivíduo	**Comprimento total (cm)**	**Peso (g)**	**Indivíduo**	**Comprimento total (cm)**	**Peso (g)**	**Indivíduo**	**Comprimento total (cm)**	**Peso (g)**
1	1,22	0,0119	1	1,25	0,014	1	1,06	0,009
2	1,86	0,048	2	1,27	0,0151	2	1,435	0,024
3	1,455	0,0189	3	1,32	0,0159	3	1,95	0,06
4	1,98	0,0575	4	1,78	0,0401	4	1,38	0,0173
5	1,175	0,0089	5	1,55	0,0239	5	1,62	0,0321
6	1,18	0,0369	6	1,49	0,0153	6	1,475	0,0212
7	1,61	0,0309	7	1,52	0,0271	7	1,33	0,0168
8	1,49	0,0224	8	1,22	0,0096	8	1,45	0,027
9	2,12	0,0936	9	1,12	0,0073	9	1,27	0,0151
10	1,775	0,0378	10	1,4	0,0224	10	1,5	0,026
11	1,45	0,0205	11	1,2	0,0101	11	1,405	0,0162
12	2,93	0,0704	12	1,55	0,0276	12	1,19	0,0101
13	1,77	0,0389	13	1,55	0,024	13	2,24	0,089
14	1,68	0,0324	14	1,55	0,032	14	1,16	0,0098
15	1,29	0,014	15	1,405	0,0179	15	1,16	0,0089
16	1,135	0,012	16	1,4	0,0205	16	1,15	0,0105
17	1,56	0,0239	17	1,57	0,0284	17	1,19	0,012
18	1,6	0,0292	18	1,61	0,0316	18	1,19	0,0132
19	1,25	0,0112	19	2,49	0,0986	19	1,34	0,0152
20	1,25	0,0137	20	1,325	0,0157	20	1,115	0,0122
21	1,17	0,0068	21	1,33	0,0182	21	1,305	0,0171
22	1,34	0,0153	22	1,42	0,0201	22	1,43	0,0215
23	1,285	0,0087	23	1,3	0,0129	23	1,23	0,0143
24	1,1	0,0078	24	1,23	0,0119	24	1,23	0,0131
25	1,22	0,0081	25	1,25	0,0117	25	1,42	0,0221
			26	1,2	0,007	26	1,37	0,0159
						27	1,52	0,0311
						28	1,38	0,0155
						29	1,18	0,0096
Tratamento	**Data início**	**Data fim**	**Tratamento**	**Data início**	**Data fim**	**Tratamento**	**Data início**	**Data fim**
Vertimec 1	07/04/2010	14/04/2010	**Vertimec 2**	07/04/2010	14/04/2010	**Vertimec 3**	07/04/2010	14/04/2010
Indivíduo	**Comprimento total (cm)**	**Peso (g)**	**Indivíduo**	**Comprimento total (cm)**	**Peso (g)**	**Indivíduo**	**Comprimento total (cm)**	**Peso (g)**
1	1,46	0,0166	1	1,27	0,0157	1	1,63	0,0398
2	1,8	0,0323	2	1,61	0,0298	2	1,6	0,0279
3	1,44	0,0167	3	1,31	0,0108	3	1,355	0,0155
4	1,67	0,0305	4	1,39	0,0216	4	1,365	0,016
5	1,87	0,0524	5	1,485	0,0273	5	1,23	0,0091
6	1,39	0,0171	6	1,48	0,0197	6	1,51	0,0209
7	1,5	0,0198	7	1,39	0,0165	7	1,19	0,0091
8	1,435	0,0133	8	1,4	0,021	8	1,27	0,0104
9	1,39	0,0141	9	1,1	0,008	9	1,395	0,0185
10	1,4	0,018	10	1,37	0,0199	10	1,29	0,0126
11	1,38	0,0171	11	1,37	0,0173	11	1,5	0,0281
12	1,15	0,0075	12	1,14	0,0081	12	1,29	0,0132
13	1,385	0,015	13	1,18	0,0096	13	1,55	0,0283
14	1,38	0,0145	14	1,18	0,0128	14	1,295	0,0143
15	1,08	0,0062	15	1,13	0,0081	15	1,365	0,015
16	1,25	0,0149	16	1,1	0,0054	16	1,45	0,0179
17	1,26	0,018	17	1,195	0,0093	17	1,53	0,0229
18	1,26	0,0117	18	1,2	0,013	18	1,4	0,0155
19	1,3	0,0155	19	1,1	0,0083	19	1,14	0,0068
20	1,25	0,0116	20	1,455	0,0223			
21	1,22	0,0062	21	1,1	0,0047			
22	1,28	0,013						
23	1,225	0,0085						
24	1,1	0,0061						
25	1,15	0,0077						

Tabela 10: Biometria dos juvenis de *Danio rerio* expostos às amostras provenientes do campo (C: controle; RNC: *runoff* não contaminado; RC: *runoff* contaminado; V: aplicação direta de Vertimec® 18CE).

Experimento laboratorial								
Tratamento	**Data início**	**Data fim**	**Tratamento**	**Data início**	**Data fim**	**Tratamento**	**Data início**	**Data fim**
C1	07/04/2010	14/04/2010	C2	07/04/2010	14/04/2010	C3	07/04/2010	14/04/2010
Indivíduo	**Comprimento total (cm)**	**Peso (g)**	**Indivíduo**	**Comprimento total (cm)**	**Peso (g)**	**Indivíduo**	**Comprimento total (cm)**	**Peso (g)**
1	0,955	0,0088	1	1,3	0,0139	1	1,08	0,0071
2	1,09	0,0152	2	1,03	0,0083	2	1	0,0052
3	1,17	0,008	3	1,08	0,0089	3	1,27	0,0163
4	1,1	0,0127	4	1,17	0,0106	4	1,29	0,0134
5	0,94	0,0071	5	1,255	0,0165	5	1,2	0,0094
6	1,03	0,0096	6	1	0,0083	6	1,35	0,0167
7	0,98	0,0051	7	1,38	0,0193	7	1	0,0028
8	0,87	0,0051	8	1,26	0,0166	8	0,98	0,004
9	1,25	0,0149	9	1,1	0,0126	9	0,96	0,0105
10	1,3	0,0141	10	1,41	0,0185	10	1,13	0,0082
11	1,25	0,0128	11	1,4	0,0177	11	1,09	0,0096
12	1,45	0,0229	12	1,23	0,0147	12	1,12	0,0123
13	1,08	0,0096	13	1,2	0,0118	13	1,08	0,0111
14	0,98	0,0054	14	1,24	0,0164	14	1,12	0,006
15	1,15	0,0121	15	1,05	0,0088	15	1,2	0,012
16	1,48	0,0251	16	1,17	0,0091	16	1,05	0,0062
17	1,27	0,0139	17	1	0,0077	17	1,04	0,0066
18	1,03	0,0056	18	1,14	0,0084	18	1,26	0,0137
Tratamento	**Data início**	**Data fim**	**Tratamento**	**Data início**	**Data fim**	**Tratamento**	**Data início**	**Data fim**
RNC1	07/04/2010	14/04/2010	RNC2	07/04/2010	14/04/2010	RNC3	07/04/2010	14/04/2010
Indivíduo	**Comprimento total (cm)**	**Peso (g)**	**Indivíduo**	**Comprimento total (cm)**	**Peso (g)**	**Indivíduo**	**Comprimento total (cm)**	**Peso (g)**
1	1,12	0,0136	1	1,14	0,0132	1	1,25	0,0147
2	1,48	0,0251	2	1,29	0,0171	2	1,25	0,0135
3	1,39	0,0209	3	1,17	0,0138	3	1,21	0,0119
4	1,25	0,0177	4	1,18	0,016	4	1,395	0,0201
5	0,98	0,0055	5	1,16	0,0108	5	0,97	0,0053
6	1,05	0,0094	6	1,27	0,0144	6	1,22	0,011
7	1,26	0,0156	7	1,04	0,0062	7	1,415	0,0239
8	1,25	0,0128	8	0,87	0,0044	8	1,24	0,0175
9	1,28	0,0154	9	1,04	0,0076	9	1,14	0,01
10	1,16	0,013	10	1,12	0,0063	10	1,22	0,0108
11	1,13	0,0158	11	1,06	0,0119	11	1,095	0,0117
12	1	0,0063	12	1,39	0,0216	12	1,18	0,0111
13	1,05	0,0053	13	1,15	0,0106	13	1,185	0,0106
14	1,41	0,0176	14	1	0,0075	14	1,2	0,011
15	0,98	0,0042	15	1,05	0,009	15	1,13	0,0108
16	1,09	0,008	16	1,03	0,0086	16	1,365	0,0239
17	1,17	0,0115	17	0,93	0,0084	17	1,14	0,0103
18	1,24	0,0142				18	1,3	0,0122
19	1,3	0,0199				19	1,145	0,0063
20	1,06	0,0084				20	1	0,0081

Continuação da Tabela 10.

Experimento laboratorial								
Tratamento	**Data início**	**Data fim**	**Tratamento**	**Data início**	**Data fim**	**Tratamento**	**Data início**	**Data fim**
RC1	07/04/2010	14/04/2010	RC2	07/04/2010	14/04/2010	RC3	07/04/2010	14/04/2010
Indivíduo	**Comprimento total (cm)**	**Peso (g)**	**Indivíduo**	**Comprimento total (cm)**	**Peso (g)**	**Indivíduo**	**Comprimento total (cm)**	**Peso (g)**
1	1,82	0,0539	1	1,15	0,0091	1	1,14	0,0089
2	1,36	0,0194	2	1,3	0,0209	2	1,285	0,0146
3	1,23	0,0135	3	1,33	0,0162	3	1,3	0,0196
4	1,17	0,0122	4	1,08	0,0081	4	1,29	0,0177
5	1,43	0,0218	5	1,1	0,0104	5	1,15	0,013
6	1,025	0,0088	6	1,12	0,01	6	1,215	0,0136
7	1,16	0,0149	7	1,21	0,0136	7	1,23	0,0145
8	1,07	0,0092	8	0,97	0,0084	8	1,43	0,0196
9	1,185	0,0092	9	1,115	0,014	9	1,43	0,021
10	1,19	0,0105	10	1,125	0,0102	10	1,13	0,0084
11	1,12	0,0079	11	1,095	0,0042	11	1,17	0,0123
12	1,24	0,0162	12	1,49	0,0306	12	1,165	0,0106
13	1,16	0,0115	13	1,4	0,0094	13	1,11	0,0093
14	1,17	0,0105	14	1,25	0,0182	14	1,265	0,0167
15	1,08	0,0078	15	1,19	0,0109	15	1,24	0,0128
16	1,3	0,0158	16	1,115	0,0077	16	1,11	0,0088
17	0,925	0,0072	17	1,27	0,0145	17	1,17	0,0096
18	1,22	0,0137	18	1,2	0,012	18	1,06	0,0044
19	1,225	0,0162	19	1,25	0,0125	19	1,14	0,0096
20	1,05	0,0066						
Tratamento	**Data início**	**Data fim**	**Tratamento**	**Data início**	**Data fim**	**Tratamento**	**Data início**	**Data fim**
V1	07/04/2010	14/04/2010	V2	07/04/2010	14/04/2010	V3	07/04/2010	14/04/2010
Indivíduo	**Comprimento total (cm)**	**Peso (g)**	**Indivíduo**	**Comprimento total (cm)**	**Peso (g)**	**Indivíduo**	**Comprimento total (cm)**	**Peso (g)**
1	1,6	0,0385	1	1,09	0,0074	1	1,31	0,018
2	0,98	0,0053	2	1,22	0,0162	2	1,32	0,0163
3	1,25	0,0148	3	1,18	0,0096	3	1,12	0,0089
4	1,51	0,0245	4	1,32	0,0167	4	1,12	0,0078
5	1,445	0,0188	5	1,52	0,0253	5	1,6	0,0293
6	1,3	0,0135	6	1,33	0,0157	6	1,115	0,0087
7	1,4	0,017	7	1	0,0057	7	1,115	0,0089
8	1,16	0,0146	8	1,05	0,0062	8	1,07	0,0064
9	1,35	0,0162	9	1,25	0,0162	9	1,08	0,0094
10	1,37	0,0119	10	1,25	0,0098	10	1,035	0,006
11	1,3	0,0179	11	1,04	0,008	11	1,2	0,0162
12	1	0,0081	12	1,29	0,0171	12	1,19	0,0158
13	1,07	0,0116	13	1,24	0,0132	13	1,1	0,008
14	1,13	0,0106	14	1,29	0,0158	14	1,25	0,0155
15	1,175	0,0124	15	1,15	0,01	15	1,19	0,013
16	1,28	0,0127	16	1,2	0,0103	16	1,03	0,0102
17	1,28	0,0159	17	1,2	0,01	17	1,08	0,0083
18	1,24	0,0133	18	1,36	0,0194			
19	1,145	0,0092	19	1,12	0,0108			

Tabela 11: Anova da análise do teste crônico de curta duração com Vertimec® 18CE

Teste Crônico

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	6	326.429	54.405	56.420*
Within (Error)	21	20.250	0.964	
Total	27	346.679		

Since critical value F = 2.57 (0.05,6,21)
Since F > Critical F REJECT Ho:All groups equal

TUKEY method of multiple comparisons

Group ID	Mean	Mean	7	6	5	4	3	2	1
7	5	0.000	-	-	-	-	-	-	-
6	4	5.000	*	-	-	-	-	-	-
5	3	6.250	*	.	-	-	-	-	-
4	2	9.000	*	*	*	-	-	-	-
3	1	9.750	*	*	*	.	-	-	-
2	0.5	9.750	*	*	*	.	-	-	-
1	C	10.000	*	*	*	.	.	.	-

* = significant difference (p=0.05) . = no significant difference
Tukey value (7,21) = 4.62 s = 0.964

Tabela 12: Anova da análise do experimento em *in situ*/mesocosmos.

Teste *in situ*

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	3	482.917	160.972	23.273*
Within (Error)	8	55.333	6.917	
Total	11	538.250		

Since critical value F = 4.07 (0.05,3,8)
Since F > Critical F REJECT Ho:All groups equal

TUKEY method of multiple comparisons

Group ID	Mean	Mean	4	3	2	1
4	V	14.333	-	-	-	-
2	RNC	28.000	*	-	-	-
3	RC	28.667	*	.	-	-
1	C	30.000	*	.	.	-

* = significant difference (p=0.05) . = no significant difference
Tukey value (4,8) = 4.53 s = 6.917

Tabela 13: Anova da análise do ensaio realizado em laboratório com as amostra do campo (mesocosmos).

Teste amostra *in situ*

ANOVA TABLE

SOURCE	DF	SS	MS	F
Between	3	1.000	0.333	1.000
Within (Error)	8	2.667	0.333	
Total	11	3.667		

Critical F value = 4.07 (0.05,3,8)
Since F < Critical F FAIL TO REJECT Ho:All groups equal

Tabela 14: Anova para análise biométrica dos organismos submetidos aos testes de sensibilidade Vertimec® 18CE.

ANOVA

COMPRIMENTO

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,415	5	,083	1,438	,213
Within Groups	10,919	189	,058		
Total	11,335	194			

PESO

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,002	5	,000	1,086	,369
Within Groups	,070	189	,000		
Total	,072	194			

Tabela 15: Anova para análise biométrica dos organismos submetidos ao experimento *in situ*.

ANOVA

COMPRIMENTO

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,215	3	,072	1,851	,138
Within Groups	10,638	275	,039		
Total	10,853	278			

PESO

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,001	3	,000	3,614	,014*
Within Groups	,029	275	,000		
Total	,030	278			

Tabela 16: Anova para análise biométrica dos organismos submetidos ao teste laboratorial com as amostras do experimento *in situ*.

ANOVA

COMPRIMENTO

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,053	3	,018	1,019	,385
Within Groups	3,572	205	,017		
Total	3,625	208			

PESO

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,000	3	,000	,549	,649
Within Groups	,007	205	,000		
Total	,007	208			

Tabela 17: Anova para análise biométrica dos organismos submetidos aos testes com diluições da água proveniente de *runoff*.

ANOVA

COMPRIMENTO

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,358	10	,036	1,376	,196
Within Groups	3,976	153	,026		
Total	4,334	163			

PESO

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	,000	10	,000	,919	,517
Within Groups	,007	153	,000		
Total	,007	163			

APÊNDICE B: ***Parâmetros físicos e químicos do experimento in situ***

Tabela 1: Resultados das variáveis físicas e químicas da água obtidos durante o período experimental (C: controle; RNC: *runoff* não contaminado; RC: *runoff* contaminado e V: aplicação direta do Vertimec®18CE), sendo Temp: temperatura em °C; Cond: Condutividade em $\mu S.cm^{-1}$; e OD: concentração de oxigênio dissolvido em $mg.L^{-1}$.

Tempo (horas)	**C1**				**C2**				**C3**			
	Temp	pH	Cond	OD	Temp	pH	Cond	OD	Temp	pH	Cond	OD
0h	20,0	4,98	21	5,46	20,1	4,97	21	6,75	20,1	4,98	23	6,11
3h	21,5	6,49	23	6,74	21,5	6,49	21	7,34	21,6	6,47	24	7,36
24h	20,9	6,91	26	5,73	21,1	6,64	26	6,00	21,1	6,62	26	6,00
48h	19,9	7,22	27	5,17	19,8	6,96	24	6,29	19,9	6,85	27	5,76
72h	19,7	6,66	30	5,33	19,8	6,52	25	6,18	19,9	6,44	28	5,56
96h	20,0	6,81	30	5,31	19,9	6,65	25	5,98	20,0	6,58	29	5,03
120h	20,6	6,44	33	4,89	20,5	6,34	27	5,68	20,5	6,27	30	4,54
144h	20,7	6,71	44	5,10	20,6	6,57	32	5,84	20,6	6,48	32	4,16
168h	21,1	6,73	39	5,05	21,0	6,59	29	5,70	20,9	6,50	32	5,04
220h	21,3	6,74	35	5,29	21,2	6,59	29	6,30	21,1	6,53	32	5,42
	RNC1				**RNC2**				**RNC3**			
0h	20,0	4,91	22	6,32	20,0	4,86	22	5,89	20,1	4,85	24	6,05
3h	21,6	6,41	23	6,60	21,7	6,22	22	6,42	21,8	6,09	27	6,98
24h	21,0	6,25	27	6,88	21,2	6,22	28	4,71	21,4	6,07	34	5,39
48h	19,9	6,57	28	5,26	20,0	6,48	29	4,49	20,1	6,32	36	4,20
72h	19,8	6,51	31	4,18	19,9	6,37	32	3,63	19,9	6,21	39	3,23
96h	20,1	6,56	32	4,10	20,1	6,44	33	2,96	20,1	6,34	40	3,32
120h	20,4	6,15	34	4,03	20,6	6,18	35	2,01	20,6	6,12	43	2,38
144h	20,6	6,27	36	4,19	20,7	6,27	36	2,21	20,7	6,15	44	2,46
168h	21,1	6,41	38	3,53	21,1	6,31	38	1,78	21,1	6,18	46	2,36
220h	21,2	6,39	37	4,09	21,2	6,09	39	1,64	21,2	6,05	47	2,32
	RC1				**RC2**				**RC3**			
0h	20,0	5,06	22	6,76	20,1	4,90	23	5,88	20,0	4,96	27	5,58
3h	21,5	5,99	22	7,03	21,5	6,08	22	7,05	21,6	6,06	23	6,79
24h	21,0	6,45	27	5,79	21,1	6,39	24	6,00	21,3	6,33	25	5,82
48h	19,9	6,30	28	4,81	19,8	6,29	26	5,59	19,9	6,27	26	5,42
72h	19,9	6,55	30	4,05	19,9	6,43	27	4,72	20,0	6,37	28	4,58
96h	20,1	6,58	31	4,45	20,1	6,46	28	4,92	20,2	6,42	29	4,68
120h	20,5	6,35	32	3,99	20,6	6,31	29	4,00	20,5	6,28	31	3,48
144h	20,6	6,30	34	4,06	20,7	6,23	29	4,23	20,7	6,17	32	3,97
168h	21,1	6,30	35	4,00	21,0	6,21	30	4,02	21,0	6,09	35	3,37
220h	21,1	6,39	35	3,89	21,2	6,29	30	4,60	21,1	6,21	34	3,55
	V1				**V2**				**V3**			
0h	19,8	5,41	21	6,57	20,0	5,08	23	6,08	20,1	5,05	22	6,50
3h	21,3	6,17	22	8,50	21,5	6,30	23	7,60	21,6	6,35	22	7,24
24h	20,9	6,17	26	7,43	21,4	6,19	27	5,78	21,4	6,10	24	7,22
48h	19,8	6,16	27	7,13	20,0	6,18	28	5,64	20,2	6,21	25	5,78
72h	19,9	6,42	28	6,75	20,1	6,38	30	4,97	20,1	6,26	27	5,80
96h	20,2	7,45	30	6,90	20,5	6,35	32	4,52	20,8	6,27	27	5,30
120h	20,6	6,10	30	5,96	20,6	6,06	32	4,99	20,7	6,70	28	5,24
144h	20,7	6,06	30	6,56	20,8	6,08	33	5,28	20,9	6,07	28	5,77
168h	21,1	6,11	32	6,04	21,2	6,07	34	5,59	21,2	6,08	30	5,99
220h	21,1	6,15	31	6,80	21,2	6,16	34	5,86	21,2	6,16	29	6,24

Tabela 2: Valores médios para a análise de nutrientes durante o período experimental (C: controle; RNC: *runoff* não contaminado; RC: *runoff* contaminado e V: aplicação direta do Vertimec®18 CE; EXT: ponto externo; PID: fosfato inorgânico dissolvido; POD: fosfato orgânico dissolvido).

Nutrientes Dissolvidos: NO_2 (µg.L^{-1})						
	0h	3h	48h	96h	120h	168h
C1	2,76	2,18	2,6	2,7	3,34	3,36
C2	3,19	2,09	3,1	2,27	2,18	1,93
C3	2,8	1,91	3,03	2,47	2,9	3,58
RNC1	2,5	9,84	9,56	7,36	6,32	4,94
RNC2	2,76	6,99	6,58	7,5	5,81	6,23
RNC3	3,19	8,89	8,78	6,68	6,62	7,62
RC1	2,64	5,64	7,54	6,62	6,6	5,8
RC2	2,34	10,53	4,75	4,33	4,67	7,46
RC3	2,85	4,82	4,85	5,3	4,34	5,83
V1	2,92	2,96	3,24	2,57	3,28	3,11
V2	3,24	2,93	3,6	3,39	2,72	3,27
V3	3,36	2,77	3,01	2,79	2,91	3,72
EXT	4,47	4,44	3,46	2,81	3,95	2,36

Nutrientes Dissolvidos: NO_3 (µg.L^{-1})						
	0h	3h	48h	96h	120h	168h
C1	76,86	152,89	39,29	35,1	94,13	94,15
C2	42,45	134,97	47,47	31,95	48,56	61,96
C3	38,03	322,46	42,41	33,98	41,46	31,12
RNC1	59,63	139,49	69,21	57,43	45,88	44,53
RNC2	152,61	193,7	55,54	56,64	33,66	37,25
RNC3	112,51	178,14	112	32,78	51,45	35,5
RC1	33,59	151	78,52	36,47	41,49	68,2
RC2	49,93	121,2	56,98	22,05	67,72	38,84
RC3	53,42	152,63	37,61	33,56	61,29	38,81
V1	92,84	57,17	57,36	27,53	193,77	23,99
V2	66,9	91,19	77,38	34,75	27,64	32,39
V3	40,92	111,37	136,69	33,56	36,03	33,33
EXT	175	192,11	288,01	35,69	57,59	24

Nutrientes Dissolvidos: NH_4 (µg.L^{-1})						
	0h	3h	48h	96h	120h	168h
C1	168,16	121,8	63,31	22,19	94,84	90,63
C2	163,7	53,53	21,36	17,74	23,65	24,79
C3	169,65	16,45	17,13	19,12	38,7	39,95
RNC1	150,83	24,87	28,19	66,19	138,13	173,65
RNC2	163,76	122,99	39,86	79,2	186,92	207
RNC3	162,1	133,96	80,42	113,25	219,63	236
RC1	151,83	146,38	87,19	66,41	73,74	138,78
RC2	189,6	30,1	38,56	27	57,03	60,85
RC3	190,17	21,55	39,75	39,34	64,41	102,35
V1	92,66	11,38	21,49	17,57	72,36	30,78
V2	68,35	18,23	60,61	47,7	71,7	86,2
V3	161,31	7	27,8	12,46	26,79	9,13
EXT	172,23	15,51	27,08	17,04	26,6	20,1

Nutrientes Dissolvidos: SiO_2 (mg.L^{-1})						
	0h	3h	48h	96h	120h	168h
C1	0,02	0,02	0,37	0,25	0,36	3,36
C2	0,03	0,14	0,37	0,27	0,36	2,63
C3	0,1	0,14	0,37	0,25	0,36	2,98
RNC1	0,03	0,16	0,39	0,38	0,48	3,22
RNC2	0,14	0,17	0,38	0,38	0,48	3,11
RNC3	0,14	0,17	0,4	0,38	0,54	3,34
RC1	0,08	0,16	0,39	0,38	0,54	2,97
RC2	0,03	0,62	0,39	0,3	0,48	2,92
RC3	0,08	0,15	0,38	0,34	0,47	2,73
V1	0,15	0,15	0,37	0,29	0,48	2,61
V2	0,09	0,14	0,38	0,33	0,36	2,6
V3	0,14	0,15	0,37	0,32	0,36	2,61
EXT	0,14	0,14	0,37	0,24	0,37	2,98

Nutrientes Dissolvidos: PID (µg.L^{-1})						
	0h	3h	48h	96h	120h	168h
C1	7,18	5,46	5,54	7,37	5,61	6,81
C2	7,41	7,65	8,16	6,22	4,21	4,11
C3	5,55	4,98	10,87	7,34	6,8	10,97
RNC1	5,23	23,15	18,67	11,96	11,56	9,29
RNC2	3,58	24,58	10,04	17,66	10,91	15,95
RNC3	6,02	24,82	18,39	14,41	15,53	18,08
RC1	3,55	12,89	14,88	13,01	15,28	13,79
RC2	2,2	31,18	10,81	8,96	13,22	18,27
RC3	4,95	13,78	10,19	11,63	11,55	17,4
V1	4,93	9,67	7,99	9,35	10,04	7,06
V2	3,45	6,75	6,52	8,7	5,75	7,14
V3	6,12	7,13	9,33	5,88	9,23	7,56
EXT	2,57	7	5,27	7	10,57	6,12

Nutrientes Dissolvidos: POD (µg.L-1)						
	0h	3h	48h	96h	120h	168h
C1	17,47	9,91	18,89	17,76	15,01	16,54
C2	14,53	18,15	23,51	14,07	15,25	16,27
C3	15,84	17,16	24,06	18,82	16,85	22,61
RNC1	14,84	39,11	43,15	36,26	32,3	27,05
RNC2	16,59	65,47	35,34	37,56	27,15	27,61
RNC3	15,23	45,83	46,48	36,78	39,02	34,9
RC1	13,94	37,64	43,87	38,68	38,42	31,12
RC2	13,48	79,13	39,58	35,53	37,05	40,36
RC3	16,06	39,99	39,62	35,94	34,25	34,83
V1	16,38	20,08	24,8	24,11	23,94	19,58
V2	17,36	19,86	20,41	18,59	15,61	19,47
V3	17,88	18,63	24,83	17,43	20,61	18,93
EXT	15,5	22,27	20,51	19,74	28,04	19,17

Nutrientes Totais: Nitrogênio Total (mg.L^{-1})						
	0h	3h	48h	96h	120h	168h
C1	0,23	1,16	0,28	1,21	0,79	1,07
C2	0,89	1,16	0,65	0,65	0,79	0,47
C3	0,89	1,35	0,65	0,42	0,47	0,84
RNC1	0,61	1,45	0,51	0,98	0,37	0,84
RNC2	1,03	1,54	0,61	2,71	0,47	1,35
RNC3	1,26	2,19	1,59	1,54	0,89	1,26
RC1	0,47	0,98	0,93	1,17	0,93	0,75
RC2	0,89	1,03	1,12	0,93	0,47	0,98
RC3	1,03	1,12	1,12	0,75	0,75	0,09
V1	0,7	1,96	0,98	0,65	0,51	0,61
V2	0,75	1,12	0,84	0,84	0,51	0,75
V3	0,93	1,68	0,61	0,98	0,09	1,26
EXT	1,45	1,16	1,58	0,98	0,47	0,89

Nutrientes Totais: Fósforo Total (µg.L^{-1})						
	0h	3h	48h	96h	120h	168h
C1	45,38	74,67	55,42	80,34	63,91	166,96
C2	40,55	53,9	113,21	62,45	72,07	52,05
C3	49,51	69,84	50,67	55,77	78,24	97,35
RNC1	52,69	255,36	158,61	108,76	142,56	164,63
RNC2	58,65	477,24	147,93	115,44	249,12	140,91
RNC3	53,28	305,38	193,97	124,49	198,85	126,91
RC1	48,12	226,05	138,91	127,9	163,77	110,96
RC2	51,29	230,2	132,02	119,15	142,27	103,77
RC3	53,52	257,23	144,57	124,64	202,35	113,88
V1	75,15	92,92	61,88	63,78	109,99	77,91
V2	58,59	62,03	62,3	64,05	101,44	75,38
V3	54,94	66,07	54,67	61,41	132,94	83,55
EXT	80,22	65,77	278,86	65,47	119,32	78,3

Tabela 3: Valores de material em suspensão total, material em suspensão inorgânico, material em suspensão orgânico do experimento *in situ* (C: controle; RNC: *runoff* não contaminado; RC: *runoff* contaminado e V: aplicação direta do Vertimec® 18CE).

Tempo (horas)	Tratamento	Mat. Susp. Total ($mg.L^{-1}$)	Mat. Susp. Inorg. ($mg.L^{-1}$)	Mat. Susp. Org. ($mg.L^{-1}$)
0h	C1	6,91	1,59	5,33
0h	C2	11,16	2,99	8,18
0h	C3	2,90	0,48	2,43
0h	RC1	37,60	6,10	31,50
0h	RC2	59,10	16,50	42,60
0h	RC3	55,30	13,90	41,40
0h	RNC1	54,10	14,80	39,30
0h	RNC2	48,60	11,10	37,50
0h	RNC3	41,50	9,10	32,40
0h	V1	6,49	1,34	5,15
0h	V2	5,20	1,03	4,17
0h	V3	5,70	1,08	4,63
0h	Externo	7,98	2,45	5,53
3h	C1	8,73	2,94	5,79
3h	C2	10,20	4,65	5,55
3h	C3	7,99	3,15	4,84
3h	RC1	112,10	63,70	48,40
3h	RC2	105,50	85,30	20,20
3h	RC3	77,80	51,70	26,10
3h	RNC1	177,80	131,10	46,70
3h	RNC2	186,00	146,80	39,20
3h	RNC3	204,70	163,60	41,10
3h	V1	11,36	4,16	7,20
3h	V2	7,55	2,48	5,07
3h	V3	7,35	2,30	5,05
3h	Externo	6,69	1,93	4,76
48h	C1	7,03	1,08	5,95
48h	C2	5,84	1,33	4,51
48h	C3	10,44	4,16	6,28
48h	RC1	43,78	32,08	11,70
48h	RC2	36,58	28,55	8,03
48h	RC3	71,88	50,88	21,00
48h	RNC1	58,93	27,35	31,58
48h	RNC2	25,15	19,23	5,92
48h	RNC3	29,13	20,05	9,07
48h	V1	10,00	3,33	6,68
48h	V2	8,19	2,50	5,69
48h	V3	6,56	1,69	4,88
48h	Externo	6,44	1,40	5,04
96h	C1	5,50	0,83	4,67
96h	C2	5,22	0,81	4,41
96h	C3	3,99	-0,60	4,59
96h	RC1	25,13	15,93	9,20
96h	RC2	23,05	14,35	8,70
96h	RC3	24,35	15,88	8,47
96h	RNC1	22,25	13,60	8,65
96h	RNC2	33,40	19,35	14,05
96h	RNC3	26,65	16,15	10,50
96h	V1	5,67	1,32	4,35
96h	V2	5,65	1,53	4,13
96h	V3	4,78	0,83	3,95
96h	Externo	8,43	3,87	4,55
120h	C1	10,55	4,70	5,85
120h	C2	5,87	1,30	4,58
120h	C3	6,03	0,93	5,10
120h	RC1	67,90	45,60	22,30
120h	RC2	18,05	10,53	7,52
120h	RC3	83,65	50,65	33,00
120h	RNC1	21,78	12,83	8,95
120h	RNC2	20,05	12,65	7,40
120h	RNC3	19,80	12,00	7,80
120h	V1	6,16	2,29	3,88
120h	V2	5,84	1,58	4,26
120h	V3	7,60	4,13	3,48
120h	Externo	14,64	5,98	8,66

Continuação da Tabela 3

Data	**Tratamento**	**Mat. Susp. Total (mg.L^{-1})**	**Mat. Susp. Inorg. (mg.L^{-1})**	**Mat. Susp. Org. (mg.L^{-1})**
168h	C1	32,41	18,93	13,49
168h	C2	4,69	0,79	3,90
168h	C3	7,93	3,37	4,57
168h	RC1	13,93	6,31	7,61
168h	RC2	17,08	11,43	5,65
168h	RC3	29,01	19,46	9,55
168h	RNC1	11,09	6,66	4,43
168h	RNC2	15,49	6,85	8,64
168h	RNC3	16,43	9,76	6,66
168h	V1	19,13	5,30	13,83
168h	V2	9,58	4,00	5,58
168h	V3	6,20	2,76	3,44
168h	Externo	9,29	3,10	6,19

Tabela 4: Valores de material em suspensão total, material em suspensão inorgânico, material em suspensão orgânico do *runoff* e das diluições testadas.

Tempo (horas)	Tratamento	Mat. Susp. Total (mg.L^{-1})	Mat. Susp. Inorg. (mg.L^{-1})	Mat. Susp. Org. (mg.L^{-1})
***Runoff* não Contaminado**	100%	6359,33	3536,67	2822,67
	75%	4338,67	1960,67	2378,00
	50%	2271,33	2076,67	194,67
	25%	1586,00	433,20	1152,80
	6,25%	-	-	-
***Runoff* Contaminado**	100%	3722,67	2898,67	824,00
	75%	2490	2186,67	303,33
	50%	1635,33	1396,67	238,67
	25%	877,6	733,60	144,00
	6,25%	278,75	225,50	53,25

Tabela 5: Valores obtidos para clorofila *a* e feofitina durante o período amostral, nos diferentes tratamentos dos mesocosmos (C: controle; RNC: *runoff* não contaminado; RC: *runoff* contaminado e V: aplicação direta do Vertimec®18CE).

Clorofila *a* (µg.L^{-1})				
	Controle	RNC	RC	V
0h	10,76	11,85	8,64	13,49
3h	16,41	22,47	9,35	14,74
48h	12,90	43,42	29,98	12,98
96h	12,90	9,37	11,86	8,85
120h	15,85	11,28	26,96	12,82
168h	20,51	11,35	10,38	19,88
Feofitina (µg.L^{-1})				
	Controle	RNC	RC	V
0h	7,61	9,63	6,86	7,89
3h	5,07	0	2,11	7,84
48h	9,30	51,17	26,18	6,81
96h	5,61	6,25	7,84	10,42
120h	11,69	5,93	19,99	5,70
168h	11,30	5,02	4,77	6,76

Tabela 6: Valores médios e os respectivos desvios padrão obtidos para a análise granulométrica e conteúdo de matéria orgânica inicial e final para os diferentes tratamentos dos mesocosmos e das parcelas de terreno (C: controle; RNC: *runoff* não contaminado; RC: *runoff* contaminado; V: aplicação direta do Vertimec® 18CE, I: Início; PNC: parcela não contaminada; e PC: parcela contaminada).

	Matatéria orgânica (%)	**Areia grossa (%)**	**Areia média (%)**	**Areia fina (%)**	**Silte (%)**	**Argila (%)**
Início	2,12 (±0,06)	1,04 (±0,26)	37,29 (±1,16)	32,45 (±2,20)	9,27 (±1,23)	19,96 (±3,19)
C	2,08 (±0,19)	0,81 (±0,12)	36,42 (±2,18)	36,11 (±2,85)	6,8 (±2,15)	19,86 (±2,50)
RNC	2,05 (±0,18)	0,92 (±0,24)	36,28 (±0,83)	35,05 (±1,22)	7,27 (±2,38)	20,49 (±2,53)
RC	1,93 (±0,15)	0,9 (±011)	36,44 (±2,08)	39,12 (±3,33)	8,88 (±1,87)	14,6 (±3,00)
V	2,11 (±0,40)	1,31 (±0,17)	36,54 (±0,46)	33,82 (±1,40)	11 (±0,81)	17,34 (±1,20)

Tabela 7: Valores médios para a análise granulométrica e conteúdo de matéria orgânica das parcelas de solo não contaminada (PNC) e contaminada (PC).

	Mat. Org. (%)	**Areia grossa (%)**	**Areia média (%)**	**Areia fina (%)**	**Silte (%)**	**Argila (%)**
PNC	4,49	0,37	13,95	28,45	27,25	29,97
PC	3,98	0,16	12,04	30,32	27,37	30,1

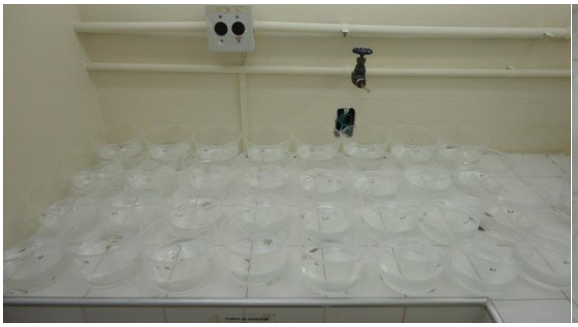
Tabela 8: Valores e desvios padrão obtidos para a análise de Nitrogênio e Fósforo no sedimento para o início e ao final do experimento para os diferentes tratamentos dos mesocosmos (C: controle; RNC: *runoff* não contaminado; RC: *runoff* contaminado e V: aplicação direta do Vertimec®18CE).

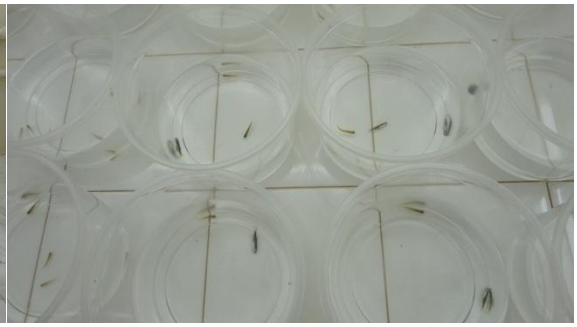
Nitrogênio Total ($\mu g.g^{-1}$)				
Inicial	**C**	**RNC**	**RC**	**V**
135,33 (±47,36)	81,67(±11,67)	177,33 (±56,77)	164,89 (±23,49)	96,44 (±47,36)
Fósforo ($\mu g.g^{-1}$)				
Inicial	**C**	**RNC**	**RC**	**V**
394,15 (±39,67)	316,26 (±58,83)	312,43 (±36,06)	351,05 (±18,81)	389,94 (±20,53)

APÊNDICE C: ***Fotos dos experimentos***

A B

C D





E F

Figura 1: Área experimental e simulação da chuva (A); Contaminação dos mesocosmos (B); Área experimental dos experimentos *in situ* (mesocosmos) após a contaminação (C); Experimentos com as diluições do *runoff* contaminado e não contaminado (D); Experimentos em laboratório para avaliação da sensibilidade ao Vertimec® 18CE (E e F).

ANEXO

VERTIMEC® 18CE

Registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA sob nº:

COMPOSIÇÃO
Ingrediente ativo: (10E,14E,16E,22Z)-(1R,4S,5'S,6S,6'R,8R,12S, 13S,20R,21R,24S)-6'-[(S)-secbutyl]- 21,24-dihydroxy-5',11,13,22-tetramethyl-2-oxo-(3,7,19-trioxatetracyclo[15.6.1.14,8.020,24]pentacosa-10,14,16, 22-tetraene-6-spiro-2'-(5',6'-dihydro-2'Hpyran)- 12-yl 2,6-dideoxy-4-O-(2,6-dideoxy-3-O-methyl-a-L-arabino-hexopyranosyl)-3-O-methyl-a-Larabino- hexopyranoside (i) mixture with (10E,14E,16E,22Z)-(1R,4S,5'S,6S, 6'R,8R,12S,13S,20R,21R,24S)-21,24-dihydroxy-6'-isopropyl-5',11,13,22-tetramethyl-2-oxo-3,7,19- trioxatetra cyclo[15.6.1.14,8.020,24]pentacosa-10,14,16,22-tetraene-6-spiro-2'-(5',6'-dihydro-2'Hpyran)- 12-yl 2,6-dideoxy-4-O-(2,6- dideoxy-3-O-methyl-a-L-arabino-hexopyranosyl)-3-O-methyl-a-Larabino- hexo pyranoside (ii) (4:1) (Abamectina).....……..18 g/L (1,8% m/v)
Outros Ingredientes: .....……..942 g/L (94,2% m/v)

CONTEÚDO: vide rótulo
CLASSE: Acaricida/Inseticida/Nematicida
GRUPO QUÍMICO: Avermectina
TIPO DE FORMULAÇÃO: concentrado emulsionável (EC)

TITULAR DO REGISTRO:
Syngenta Proteção de Cultivos Ltda - Av. Nações Unidas 18001, CEP 04795-900, São Paulo - SP, CNPJ 60.744.463/0001-90 - Tel: (11) 5643-2322 - Fax.: (11) 5643-2353 - Registro Secretaria de Agricultura sob nº 001.

FABRICANTES DO PRODUTO TÉCNICO:
Merck & Co Inc. – 100 Avenue C, Riverside, PA, 17868.
Merck & Co Inc. – PO Box 600 Danville, PA 17821-0600.

FORMULADOR:
Syngenta Proteção de Cultivos Ltda. – Rod. SP 332, Km 130, CEP 13140-000, Paulínia, SP, CNPJ 60.744.463 / 0010-80, Registro Secretaria da Agricultura sob nº 453;
Bayer CropScience Ltda – Rua Boa Esperança, 650 - Belfort Roxo, RJ, CNPJ. 14.372.981/0014-27, Registro FEEMA/RJ sob nº 014/2000;

"O nome do produto e o logotipo Syngenta são marcas de uma companhia do grupo Syngenta".

Nº do lote ou partida:	VIDE EMBALAGEM
Data de fabricação:	
Data de vencimento:	

ANTES DE USAR O PRODUTO, LEIA O RÓTULO, A BULA E A RECEITA E CONSERVE-OS EM SEU PODER. É OBRIGATÓRIO O USO DE EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL. PROTEJA-SE. É OBRIGATÓRIA A DEVOLUÇÃO DA EMBALAGEM VAZIA.

Indústria Brasileira
PRODUTO COMBUSTÍVEL
CLASSE TOXICOLÓGICA - III - MEDIANAMENTE TÓXICO
POTENCIAL DE PERICULOSIDADE AMBIENTAL II – PRODUTO MUITO PERIGOSO AO MEIO AMBIENTE