

ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA ENGENHARIA
AMBIENTAL**

MARIANA MIGUEL

**Efeito do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol e do
herbicida atrazina em espécies de dois níveis tróficos**

**SÃO CARLOS - SP
2020**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DA ENGENHARIA
AMBIENTAL

MARIANA MIGUEL

Efeito do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol e do herbicida atrazina em espécies de dois níveis tróficos

Versão corrigida

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência da Engenharia Ambiental da Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciência – Programa em Ciências da Engenharia Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Odete Rocha

SÃO CARLOS - SP
2020

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

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

M634e Miguel, Mariana
Efeito do hormônio sintético 17
?-etinilestradiol e do herbicida atrazina em espécies
de dois níveis tróficos / Mariana Miguel; orientadora
Odete Rocha. São Carlos, 2020.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação e
Área de Concentração em Ciências da Engenharia
Ambiental -- Escola de Engenharia de São Carlos da
Universidade de São Paulo, 2020.

1. Fármaco. 2. triazina. 3. cladóceros. 4.
análise bioquímica. 5. microalga. 6. mistura. I.
Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Licenciada **MARIANA MIGUEL**.

Título da tese: " Efeito do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol e do herbicida atrazina em espécies de dois níveis tróficos".

Data da defesa: 13/04/2020.

Comissão Julgadora:

Resultado

Profa. Dra. **Odete Rocha**
(Orientadora)
(Universidade Federal de São Carlos – UFSCar)

APROVADA

Profa. Dra. **Eny Maria Vieira**
(Instituto de Química de São Carlos/IQSC-USP)

APROVADA

Prof. Associado **Juliano José Corbi**
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

APROVADA

Dra. **Adriaine da Silva Mansano**
(Pós-Doutoranda/UFSCar)

APROVADA

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

APROVADA

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental:

Prof. Associado **Frederico Fabio Mauad**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

Ao meu avô Nelson “in memoriam”, que sempre me incentivou e esteve ao meu lado e aos meus pais, Nelson e Glamis, por me ensinarem a lutar pelos meus ideais, pelo incentivo e apoio em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Odete Rocha pelo apoio, estímulo e principalmente pela orientação e valiosos ensinamentos durante o meu doutorado;

Ao CNPq e CAPES, pela bolsa concedida;

Ao professor Dr. Juliano Corbi e professora Dra. Eny Maria Vieira pelas contribuições no Exame de Qualificação;

Aos alunos do laboratório da Prof Eny e do Prof. Juliano pelas conversas e ajuda;

À Cassiana e Bianca, do Instituto de Química da Universidade de Campinas, pela análise química dos compostos;

À Profa Graça, Profa Ana Lombardi e Prof Hugo, por disponibilizarem o laboratório e equipamentos para análises de fitoplâncton, essenciais para este trabalho;

Aos alunos da Profa Graça (DHB), pela ajuda nas análises de fitoplâncton;

Ao DEBE (Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva) pela estrutura oferecida durante a pesquisa;

Aos funcionários e colegas do DEBE, desde as meninas da limpeza, secretário, técnicos, professores e colegas, pela parceria de todos esses anos;

À Profa Carolina, Carla, Rogério, Luizinho e Valdecir, pelos momentos de conversa e descontração no cafezinho;

À secretaria do programa de pós-graduação em ciências da engenharia ambiental, Nelson e José Luiz, por todo apoio concedido e por sempre sanar minhas dúvidas;

Aos docentes do programa de pós-graduação, pela minha formação acadêmica em nível de doutorado e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, pelo apoio;

À Dra Adrislaine da Silva Mansano (Laine), pelo apoio e incentivo; à minha companheira de bancada, Gisele, e à Lays, pela ajuda e parceria; à Raquel, pela ajuda na escrita científica de artigos;

Aos amigos Babi, Greicy, Serena, Dani, Carolzinha, Laine, Lays, Marina, Heidi, Fran, Raquel, Popinho, Mayara, Tainá, Lidianne, Matheus, Karin, Douglas, Henrique, Marcos, Neto, Denise, Gisele, Manu, Fernanda, Ana, Roberta, Alana, Elisa, Diana, Larissa, e meu sol Taynara, pelos momentos de descontração, apoio, risadas e amizade;

Aos amigos da The Four, the Best Group, pelas risadas e amizade, e aos professores, pela alegria e ensinamentos de inglês;

À minha avó Lucilia e meu avô Nelson (*in memoriam*), minha avó Glaucia e meu avô Raul (*in memoriam*), pelo carinho e amor;

Ao meu irmão Pedro, pela paciência e apoio;

Aos meus pais, Glamis e Nelson, pelo apoio, dedicação, palavras de conforto, amor e confiança;

Aos colegas do Centro Cabocla Yara por todas as palavras de incentivo e conforto;

Ao meu pai Oxalá, por cada detalhe, por tudo que me proporcionou e proporciona, e pela força que me concede em cada desafio;

A toda minha família,

A todos os meus amigos;

A todas as pessoas que estiveram comigo durante toda essa trajetória;

A todos que contribuíram, de forma indireta ou direta, para a realização deste trabalho.

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante”

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

MIGUEL, M. **Efeito do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol e do herbicida atrazina em espécies de dois níveis tróficos.** 2020. 173 p. Tese de Doutorado – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

O aumento da população humana trouxe, em consequência, o aumento da produção, consumo e descarte de vários produtos químicos empregados na medicina, agricultura, indústria e uso doméstico, entre outros. Em muitos corpos d'água são frequentemente encontrados fármacos e defensivos agrícolas, como o 17 α -etinilestradiol (EE₂) e da atrazina (ATZ). O EE₂ é um hormônio sintético usado na formulação de contraceptivos orais, enquanto a ATZ é um herbicida amplamente utilizado na agricultura no combate de ervas daninhas. Os objetivos do presente trabalho foram avaliar a sensibilidade do cladócero tropical *Ceriodaphnia silvestrii* e comparativamente do cladócero de região temperada *Daphnia magna* ao hormônio EE₂ em uma abordagem intergeracional; avaliar os efeitos do EE₂ e da ATZ de forma isolada, quanto à toxicidade aguda e crônica em um representante do primeiro nível trófico (produtores primários), a microalga *Raphidocelis subcapitata*, e o efeito destes dois compostos em dois cladóceros, duas espécies nativas tropicais, *Ceriodaphnia silvestrii* e *Ceriodaphnia rigaudi*, como representantes do segundo nível trófico, o de consumidores primários. Foram realizados testes de toxicidade crônica de cada composto de forma isolada, para *R. subcapitata*, testes de toxicidade crônica intergeracional com exposição ao fármaco EE₂ para *C. silvestrii* e *D. magna*, testes de toxicidade aguda e crônica desses compostos de forma isolada e em mistura para *C. rigaudi* e testes de toxicidade aguda e crônica da atrazina ao cladócero nativo endêmico neotropical, *C. silvestrii*, de acordo com os protocolos padronizados da ABNT e OECD. Como respostas foram avaliados parâmetros fotossintéticos e composição lipídica para a microalga, e parâmetros reprodutivos e sensibilidade das espécies (SSD). Os resultados mostraram sob exposição crônica que a atrazina causa diminuição nos parâmetros fotossintéticos e no teor de lipídios totais, mas quando exposta ao EE₂, em baixas concentrações, o crescimento é estimulado (hormesis) e há aumento de carboidratos. No segundo nível trófico, diferentes cladóceros tiveram diferentes respostas ao hormônio EE₂: redução da fecundidade de *C. silvestrii* na segunda geração, mas não na primeira; redução da fecundidade de *D. magna* na primeira geração, mas não na segunda; *C. rigaudi*, quando exposta aos dois compostos individualmente, teve mais de 80% de redução na fecundidade para ambas substâncias e 11,8% de redução do tamanho corporal quando em exposição ao EE₂. Já em mistura, os compostos apresentaram interação dependente do nível da dose, sendo que os efeitos sobre *C. rigaudi* foram de sinergismo em concentrações mais baixas e antagonismo nas mais altas. A exposição crônica intergeracional de *C. silvestrii* ao herbicida resultou em menor fecundidade (de cerca de 27% a 38,5% menor) para ambas gerações. Ambos compostos representam risco ecológico podendo afetar negativamente as comunidades planctônicas. A importância de se incluírem espécies nativas nos estudos ecotoxicológicos de ambientes tropicais é reforçada, visto as diferenças de sensibilidade das espécies.

Palavras-chave: Fármaco; triazina; cladóceros; análise bioquímica; microalga; mistura

ABSTRACT

MIGUEL, M. Effect of the synthetic hormone 17 α -ethinylestradiol and the herbicide atrazine on species in two trophic levels. 2020. 173 p. PhD Thesis – Engineering School of São Carlos, University of São Paulo, São Carlos, 2020.

The increase of human population brought as consequence the increase in the production, consumption and disposal of chemicals used in medicine, agriculture, industry and domestic use among others. In many water bodies, drugs and pesticides are often found, such as 17 α -ethinylestradiol (EE₂) and atrazine (ATZ). EE₂ is a synthetic hormone used in the formulation of oral contraceptives, whereas ATZ is an herbicide widely used in agriculture in the combat of weeds. Thus, the objective of the study was to evaluate the effects of EE₂ and ATZ regarding their acute and chronic toxicity to a representative species of the first trophic level (primary producers) the microalgae *Raphidocelis subcapitata*, and on three species of cladocerans, two tropical native: *Ceriodaphnia silvestrii* e *Ceriodaphnia rigaudi* and one exotic from temperate region, *Daphnia magna*, as representatives of the second trophic level, of primary consumers. Acute and chronic toxicity tests for each compound isolately, for *R. subcapitata*; chronic intergenerational test with exposure to EE₂ for *C. silvestrii* and *D. magna*; acute and chronic toxicity tests of these compounds, isolately and in mixture for *C. rigaudi* and acute and chronic toxicity tests with the herbicide atrazine to the native and Neotropical endemic *C. silvestrii*, according to standard ABNT and OECD protocols. As end-points photosynthetic parameters and lipidic composition were evaluated for the microalgae and reproductive parameters and species sensitivity comparisons (SSD). The results showed that for chronic exposure ATZ can cause decrease on photosynthetic parameters and on total lipids content, but when exposed to EE₂ at low concentrations, growth is stimulated (hormesis) and there is carbohydrate increase. Both substances affected the composition of the lipid classes of the algae. At the second trophic level, different cladocerans had different responses to the hormone EE₂: reduced fecundity of *C. silvestrii* in the second generation but not in the first. Reduced fecundity in t *D. magna* first generation, but not in the second; *C. rigaudi* when exposed to the two compounds individually had a reduction in fertility for both substances and reduction in body size when exposed to EE₂. However, in mixtures, the compounds showed interaction dependent on the dose level, with the effects on *C. rigaudi* being synergistic at lower concentrations and antagonism at higher ones. Acute and chronic intergenerational exposure of *C. silvestrii* to the herbicide resulted on lower fecundity for both generations. Both compounds represent ecological risk due their potential to adversely affect planktonic communities. Importance of including native species in ecotoxicological studies of tropical ecosystems is reinforced based on the differences found for species sensitivities.

Keywords: Drugs; triazine; cladocerans; biochemical analysis; microalgae; mixture

LISTA DE FIGURAS

Contextualização e justificativa

- Figura 1** - Estrutura do herbicida atrazina ----- 27
- Figura 2** - Esquema da ação da atrazina em plantas daninhas, seu organismo-alvo, e a absorção pelas folhas. A atrazina bloqueia o transporte de elétrons do fotossistema II, inibindo a fotossíntese ----- 29
- Figura 3** - Esquema ilustrando a síntese do hormônio 17α -etinilestradiol a partir do hormônio natural 17β -estradiol ----- 30
- Figura 4** - Isoblograma mostrando os diferentes tipos de efeito da combinação dos compostos. Curva 1, aditividade (sem interação); curva 2, antagonismo; curva 3, sinergismo ----- 34
- Figura 5** - Modelo para a avaliação de risco ecológico ----- 36
- Figura 6** - Alga verde *Raphidocelis subcapitata*. Possui formato meia lua. (Microscópio óptico, aumento 40x. Tamanho do organismo: 5 μ m) ----- 38
- Figura 7** - Cladóceros de água doce. Fêmeas adultas (A) *Ceriodaphnia silvestrii* (Tamanho do organismo: 1 mm), (B) *Ceriodaphnia rigaudi* (Tamanho do organismo: 0,92 mm). (Microscópio estereoscópio, aumento de 50x) ----- 39

Capítulo 1 - Efeito do hormônio 17α -etinilestradiol em um cladóceros tropical (*Ceriodaphnia silvestrii*) e um cladóceros de região temperada (*Daphnia magna*): Uma abordagem intergeracional

- Figura 1** - Número de neonatas (média \pm DP) produzidos pelas gerações F₀ e F₁ de *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia silvestrii* expostas ao EE₂ em testes de toxicidade crônica por 12 dias para F₀ e 13 dias para F₁ e após 9 dias de exposição para F₀ e 10 dias para F₁, respectivamente. Asteriscos (*) indicam diferenças significativas entre tratamentos e controle ----- 65
- Figura 2** - Tempo de geração (média \pm DP) (tempo para o neonata crescer e produzir neonatas - dias) para a geração F₀ e F₁: (A) *Daphnia magna* e (B) *Ceriodaphnia silvestrii*, expostas a uma faixa das concentrações do hormônio etinilestradiol (EE₂) e controle (C). Asteriscos (*) indicam diferenças significativas entre tratamentos e controle ----- 66

Figura 3 - Curva de distribuição de sensibilidade das espécies (SSD), plotada com base nos valores de concentrações de efeitos não observados (NOEC) do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol (EE₂) obtidos experimentalmente para *Ceriodaphnia silvestrii* e *Daphnia magna* (em negrito) e valores da literatura para todas as outras espécies e também incluindo dados de literatura para *Daphnia magna* (não negrito) ----- 67

Capítulo 2 - Efeito do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol e do herbicida atrazina na microalga *Raphidocelis subcapitata*

Figura 1 - Taxa de crescimento específica (dia⁻¹) de *Raphidocelis subcapitata* exposta (A) ao hormônio EE₂, (B) e ao herbicida atrazina. Os asteriscos (*) representam valores significativamente diferentes do valor obtido no controle ($p < 0,05$) ----- 88

Figura 2 - Curva de crescimento populacional (10⁵ cel mL⁻¹) de *Raphidocelis subcapitata* após 72 horas de exposição (A) ao EE₂, e (B) ao herbicida atrazina. Os asteriscos (*) representam valores significativamente diferentes do controle ($p < 0,05$) ----- 88

Figura 3 - Parâmetros fotossintéticos (Φ_M e F_0/F_v) da alga *Raphidocelis subcapitata* exposta (A e B) ao hormônio sintético EE₂, (C e D) ao herbicida ATZ. (A e C) rendimento máximo, Φ_M , ao longo de 72 horas de exposição; (B e D) complexo de evolução do oxigênio (F_0/F_v), ao longo de 72 horas de exposição. O asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao controle----- 90

Figura 4 - Teor de clorofila *a* (pg cel⁻¹) na microalga *Raphidocelis subcapitata* após 72 horas de exposição, (A): ao EE₂ e (B): ao herbicida ATZ. Os asteriscos (*) indicam diferença significativa em relação ao controle ----- 91

Figura 5 - Composição bioquímica da alga *Raphidocelis subcapitata* após 72 horas de exposição ao EE₂. (A): Teor de carboidrato (pg cel⁻¹), (B): Teor de lipídios (pg cel⁻¹) e após 72h de exposição à ATZ (C): Teor de carboidrato (pg cel⁻¹) e (D): Teor de lipídios (pg cel⁻¹). Os asteriscos (*) indicam diferenças significativas com relação ao controle --- ----- 92

Figura 6 - Porcentagem da quantidade das classes lipídicas encontradas na microalga *R. subcapitata* após 72 horas de exposição (A) ao EE₂ e (B) a ATZ. As classes lipídicas são: PL (fosfolipídios), AMPL (lipídios polares móveis em acetona), ST (esterol), FFA (ácido graxo livre), TAG (triglicerídeos), WE (éster de cera) e HC (hidrocarboneto alifático). O asterisco (*) indica diferença significativa com relação ao controle----- 93

Capítulo 3 - Efeito do herbicida atrazina e do hormônio 17 α -etinilestradiol, isolados e em mistura, sobre o cladóceros *Ceriodaphnia rigaudi*

Figura 1 - Faixa de sensibilidade de *Ceriodaphnia rigaudi* ao Cloreto de Sódio (NaCl) em 20 testes de toxicidade aguda. Os círculos preenchidos fechados (●) indicam os valores de CE_{50-48h} de cada teste -----118

Figura 2 - Número médio de neonatas produzidos pelo cladóceros *Ceriodaphnia rigaudi* durante os testes de toxicidade crônica com exposição a: (A) herbicida ATZ e (B) hormônio EE₂. As barras representam o número médio de neonatas obtidos, para o controle e para cada concentração testada. As linhas verticais representam o desvio padrão e o asterisco (*) indica diferença significativa entre cada tratamento e o controle ----- 119

Figura 3 - Valores do tamanho médio do corpo dos adultos de *Ceriodaphnia rigaudi* ao final dos testes de toxicidade crônica após exposição aos compostos tóxicos isoladamente: (A): ATZ e (B) EE₂. As barras representam o tamanho médio do corpo (mm) de três adultos para o controle e para cada concentração testada. As linhas verticais representam o desvio padrão e o asterisco (*) indica diferença significativa entre o resultado obtido em cada tratamento e o controle ----- 120

Figura 4 - Isoblograma para os resultados do teste de toxicidade da mistura de atrazina e etinilestradiol sobre a fecundidade (número de neonatas por fêmea) da espécie *Ceriodaphnia rigaudi* para o nível dependente da dose (DL) no modelo de ação independente (IA) ----- 122

Figura 5 - Curva de distribuição da sensibilidade das espécies (SSD) construída com base nos valores da concentração de efeito não observado (NOEC) para o herbicida atrazina obtidos para *Ceriodaphnia rigaudi* (em negrito) e para outros organismos com dados obtidos da literatura ----- 123

Figura 6 - Curva de distribuição da sensibilidade das espécies (SSD) construída com base nos valores da concentração de efeito não observado (NOEC) para o hormônio 17 α -etinilestradiol obtidos experimentalmente para *Ceriodaphnia rigaudi* (em negrito) e para outros organismos com base em dados da literatura ----- 124

Capítulo 4 - Toxicidade aguda e crônica intergeracional do herbicida atrazina ao cladócero *Ceriodaphnia silvestrii*

Figura 1 - Fecundidade (número médio de neonatas produzidos por fêmea) de *Ceriodaphnia silvestrii* exposta ao herbicida atrazina em teste de toxicidade crônica intergeracional. (A) geração F₀; (B) geração F₁. As linhas verticais representam o desvio padrão e o asterisco (*) indica diferença significativa dos tratamentos com o controle ---
-----149

Figura 2 - Tamanho corpóreo dos adultos (mm) de *Ceriodaphnia silvestrii* ao final da exposição ao herbicida atrazina, em teste crônico intergeracional. (A) geração F₀ e (B) geração F₁ ----- 150

LISTA DE TABELAS

Contextualização e justificativa

Tabela 1 - Concentrações (ng L⁻¹) de atrazina encontradas no ambiente em diferentes países ----- 25

Tabela 2 - Concentrações (ng L⁻¹) de 17 α -etinilestradiol encontradas no ambiente em diferentes países ----- 26

Capítulo 1 - Efeito do hormônio 17 α -etinilestradiol em um cladócero tropical (*Ceriodaphnia silvestrii*) e um cladócero de região temperada (*Daphnia magna*): Uma abordagem intergeracional

Tabela 1.1 - Valores médios das concentrações perigosa do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol (EE₂) que afeta 5% (HC₅) e 50% (HC₅₀) de todas as espécies incluídas no SSD (Figura 3) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95 %) ----- 68

Tabela 1.2 - Risco ecológico do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol (EE₂) expresso como Quociente de Risco Ecológico (RQ), com base na concentração perigosa de 5% (HC₅) das espécies na SSD (PNEC - $\mu\text{g L}^{-1}$). MEC1 ($\mu\text{g L}^{-1}$) baseada na concentração ambiental mínima e MEC2 ($\mu\text{g L}^{-1}$) na concentração ambiental máxima; RQ1 (MEC1/PNEC); RQ2 (MEC2/PNEC), medido em rios urbanos brasileiros ----- 68

Capítulo 2 - Efeito do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol e do herbicida atrazina na microalga *Raphidocelis subcapitata*

Tabela 2.1 - Transições precursor-produto e suas respectivas energias de colisão (EC), selecionadas para a quantificação dos compostos, empregando o modo MRM do espectrômetro de massas ----- 82

Tabela 2.2 - Concentração do composto 17 α -etinilestradiol e atrazina determinados nas amostras ----- 87

Capítulo 3 - Efeito do herbicida atrazina e do hormônio 17 α -etinilestradiol, isolados e em mistura, sobre o cladóceros *Ceriodaphnia rigaudi*

Tabela 3.1 - Transições precursor-produto e suas respectivas energias de colisão (EC), selecionadas para a quantificação dos compostos, empregando o modo MRM do espectrômetro de massas ----- 111

Tabela 3.2 - Interpretação dos parâmetros adicionais, “a” e “b”, definindo a forma funcional dos padrões dos desvios da Adição de Concentração (CA) e da Ação Independente (IA) ----- 116

Tabela 3.3 - Concentração do composto 17 α -etinilestradiol determinado na amostra ----
-----118

Tabela 3.4 - Parâmetros e resultados da análise (usando MIXTOX) do teste de toxicidade crônica da exposição do cladóceros *Ceriodaphnia rigaudi* à mistura do 17 α -etinilestradiol e atrazina, usando o Modelo de Adição (CA) e o Modelo de Ação Independente (IA) ----
----- 121

Tabela 3.5 - Valor médio da concentração perigosa para 5% (HC₅) e 50% (HC₅₀) dos indivíduos de *Ceriodaphnia rigaudi* e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) e NOEC para a atrazina e o 17 α -etinilestradiol ----- 125

Tabela 3.6 - Risco ecológico do herbicida atrazina e do hormônio etinilestradiol calculado pelo quociente de risco (RQ), com base nos dados da concentração de efeito não observado (NOEC) (PNEC - $\mu\text{g L}^{-1}$). MEC ($\mu\text{g L}^{-1}$) é baseado na concentração ambiental média medida em rios brasileiros (dados da literatura); RQ (MEC/ PNEC) ----
----- 125

Capítulo 4 - Toxicidade aguda e crônica intergeracional do herbicida atrazina ao cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*

Tabela 4.1 - Transições precursor-produto e suas respectivas energias de colisão (EC), selecionadas para a quantificação do composto, empregando o modo MRM do espectrômetro de massas ----- 145

Tabela 4.2 - Concentração do composto atrazina determinado para a solução-estoque por Espectrometria de Massas (Marca Agilent, Espanha, modelo 6410B) com triplo quadrupolo ----- 147

Tabela 4.3 - Valores da concentração efetiva que afeta 50% da população em 48 horas (CE_{50-48h}) de atrazina e respectivo intervalo de confiança (IC 95%). $\bar{X} \pm DP$: média \pm duas vezes o desvio padrão, LI: limite inferior e LS: limite superior ----- 148

Sumário

Contextualização e justificativa.....	22
1. INTRODUÇÃO.....	22
1.1.Substâncias químicas no ambiente	22
1.2.Atrazina	26
1.3.17 α -etinilestradiol.....	30
1.4.Misturas	32
1.5.Testes ecotoxicológicos.....	35
2. JUSTIFICATIVA	39
3. OBJETIVOS E HIPÓTESES.....	41
3.1.Objetivos específicos.....	42
3.2.Hipóteses	42
Referências	44

Efeito do hormônio 17 α -etinilestradiol em um cladócero tropical (*Ceriodaphnia silvestrii*) e um cladócero de região temperada (*Daphnia magna*): uma abordagem intergeracional

1. INTRODUÇÃO.....	59
2. MATERIAIS E MÉTODOS	60
2.1.Cultivo e manutenção da <i>Daphnia magna</i> e <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	60
2.2.Padrão analítico e solução-teste	61
2.3.Teste de toxicidade crônica	61
2.4.Distribuição da sensibilidade das espécies	62
2.5.Avaliação de risco ecológico.....	63
2.6.Análise estatística	64
3. RESULTADOS	64
3.1.Validação do teste	64
3.2.Fecundidade dos cladóceros	64
3.3.Tempo de geração	66
3.4.Comparação da sensibilidade entre espécies e avaliação de risco ecológico ..	67
4. DISCUSSÃO	69
4.1.Efeitos do EE ₂ na fecundidade	69
4.2.Tempo de geração influenciado pela exposição ao EE ₂	70
4.3.Sensibilidade ao EE ₂ de espécies tropicais versus espécies temperadas.....	71
5. CONCLUSÃO	71
Referências	72

Efeito do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol e do herbicida atrazina na microalga *Raphidocelis subcapitata*

1. INTRODUÇÃO.....	78
2. MATERIAIS E MÉTODOS	80
2.1.Cultivo do organismo-teste	80
2.2.Compostos químicos e soluções-estoque	80
2.3.Análise química.....	81

2.4. Teste de toxicidade crônica	82
2.5. Densidade celular	83
2.5.1 Análise por citometria de fluxo	83
2.6. Parâmetros fotossintéticos	83
2.6.1 Análise por Phytom Pam	83
2.6.2 Análise da Concentração de Clorofila a	84
2.7. Parâmetros bioquímicos	84
2.7.1 Análise da Concentração de Carboidratos	84
2.7.2 Lipídios	85
2.8. Análise de dados	86
3. RESULTADOS	86
3.1. Análise química	86
3.2. Parâmetros fisiológicos	87
3.3. Parâmetros fotossintéticos	89
3.4. Composição bioquímica	91
4. DISCUSSÃO	93
5. CONCLUSÃO	97
Referências	99

Efeito do herbicida atrazina e do hormônio 17 α -etinilestradiol, isolados e em mistura, sobre o cladóceros *Ceriodaphnia rigaudi* **104**

1. INTRODUÇÃO	106
2. MATERIAIS E MÉTODOS	108
2.1. Cultivo e manutenção do organismo	108
2.2. Composto Químico e Solução-Teste	109
2.3. Análise química	110
2.4. Testes de sensibilidade	111
2.5. Toxicidade crônica dos compostos isolados	111
2.6. Teste de toxicidade das misturas	112
2.7. Sensibilidade das espécies – SSD	113
2.8. Avaliação de risco ecológico	114
2.9. Análise estatística	114
3. RESULTADOS	117
3.1. Variáveis abióticas, teste de sensibilidade e análises químicas	117
3.2. Testes de toxicidade dos compostos isoladamente	118
3.3. Teste de toxicidade dos compostos em mistura	120
3.4. Distribuição das espécies e avaliação de risco ecológico	122
4. DISCUSSÃO	125
5. CONCLUSÃO	129
Referências	131

Toxicidade aguda e crônica intergeracional do herbicida atrazina ao cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* **140**

1. INTRODUÇÃO	142
2. MATERIAIS E MÉTODOS	143

2.1. Cultivo e manutenção do organismo	143
2.2. Solução teste e análise química	144
2.3. Teste de toxicidade aguda	145
2.4. Teste de toxicidade crônica intergeracional	145
2.5. Análise estatística	146
3. RESULTADOS	147
3.1. Validação dos testes	147
3.2. Teste de toxicidade aguda	148
3.3. Teste de toxicidade intergeracional	148
4. DISCUSSÃO	150
4.1. Teste de toxicidade aguda	150
4.2. Teste de toxicidade crônica	151
5. CONCLUSÃO	153
Referências	154
Considerações finais	159
APÊNDICE A	162
APÊNDICE B.....	165
APÊNDICE C	170
Apêndice D	172

ESTRUTURAÇÃO DA TESE

Esta tese foi estruturada na forma de capítulos os quais contemplam os itens: Resumo, Abstract, Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusão e Referências. Apêndices foram adicionados quando necessário, para incluir mais informações. Foram elaborados quatro capítulos, além de um capítulo inicial introdutório sobre os compostos utilizados no estudo e os testes realizados. Os capítulos foram ordenados conforme descrito a seguir:

Capítulo 1: Efeito do hormônio 17 α -etinilestradiol em um cladócero tropical (*Ceriodaphnia silvestrii*) e um cladócero de região temperada (*Daphnia magna*): Uma abordagem intergeracional:

Neste capítulo, foi avaliado, através de testes de toxicidade crônica, o efeito intergeracional do hormônio etinilestradiol sobre dois cladóceros, sendo um de região tropical (*Ceriodaphnia silvestrii*) e um de região temperada (*Daphnia magna*), aclimatada a 25 °C. Foram avaliados fecundidade e tempo de geração dos cladóceros expostos, além de ter sido feito uma comparação da sensibilidade dos organismos-teste por meio de curva de distribuição de sensibilidade das espécies (SSD).

Capítulo 2: Efeito do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol e do herbicida atrazina na microalga *Raphidocelis subcapitata*:

Neste capítulo foi avaliado o efeito do hormônio etinilestradiol e do herbicida atrazina sobre a microalga *Raphidocelis subcapitata*, por meio de teste de toxicidade crônica com os compostos individuais. Foram feitas análises por citometria de fluxo, phyto Pam e bioquímica. Foram avaliados parâmetros fisiológicos, fotossintéticos e composição bioquímica.

Capítulo 3: Efeito do herbicida atrazina e do hormônio 17 α -etinilestradiol, isolados e em mistura, sobre o cladóceros *Ceriodaphnia rigaudi*:

Neste capítulo foi avaliado o efeito do hormônio etinilestradiol e do herbicida atrazina sobre o cladóceros nativo *Ceriodaphnia rigaudi*, através de testes de toxicidade crônica com os compostos individuais e em mistura. Além disso, foram feitos testes de sensibilidade com a substância de referência cloreto de sódio para a elaboração de uma carta-controle. Foram avaliados fecundidade e tamanho corpóreo do cladóceros exposto. Além disso, foi feita uma comparação da sensibilidade do organismo-teste para as duas substâncias isoladas, por meio da curva de distribuição de sensibilidade das espécies (SSD).

Capítulo 4: Toxicidade aguda e crônica intergeracional do herbicida atrazina ao cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*:

Neste capítulo foi avaliado o efeito do herbicida atrazina sobre o cladóceros tropical *Ceriodaphnia silvestrii* através de testes de toxicidade aguda e crônica. Os *endpoints* analisados foram imobilidade, fecundidade e tamanho do corpo das fêmeas adultas expostas ao composto.

Contextualização e justificativa

1. Introdução

1.1. Substâncias químicas no ambiente

Muitos produtos químicos com variadas aplicações na medicina, agricultura, indústria e usos domésticos, além de resíduos do descarte ou dos produtos de degradação destes têm contribuído para o aumento na ocorrência de contaminantes emergentes na natureza (Machado *et al.*, 2016; Scognamiglio *et al.*, 2016; Sposito *et al.*, 2018; Aquilino *et al.*, 2019; Griffero *et al.*, 2019). A crescente utilização e numeroso descarte dessas substâncias, mesmo que em baixas concentrações, contribuem para a entrada e dispersão em ambientes aquáticos, levando a efeitos prejudiciais, tanto para a biota aquática, como para a saúde humana (Machado *et al.*, 2016; Griffero *et al.*, 2019).

Muitos compostos descartados no ambiente podem agir sobre organismos não-alvo como desreguladores endócrinos, alterando a estrutura e a função e podendo causar efeitos adversos no organismo, sua progênie e população (Zuo *et al.*, 2013; Huerta *et al.*, 2015; Scognamiglio *et al.*, 2016; Matthiessen *et al.*, 2017; DeCourten *et al.*, 2019). Alguns são persistentes e interferem no sistema endócrino alterando vias metabólicas de hormônios, imitando ou antagonizando os hormônios naturais (Sodré *et al.*, 2010; Scognamiglio *et al.*, 2016).

O sistema endócrino é responsável por diversas funções nos organismos, tendo os hormônios como mensageiros químicos, transportando informações para células e tecidos. As funções desempenhadas por esse sistema incluem a diferenciação e maturação sexual, a reprodução, o crescimento e o metabolismo (Witorsch, 2002).

Os compostos químicos ocorrendo no ambiente podem causar perturbações nas funções do sistema endócrino, podendo afetar a secreção de hormônio, alterar a faixa de eliminação de hormônio no corpo do organismo ou desregular o *feedback* regulatório entre dois órgãos (Witorsch, 2002) podendo interagir com o hormônio receptor, imitando, bloqueando ou interferindo na ação do hormônio natural (Witorsch, 2002; Zuo *et al.*, 2013; Long *et al.*, 2014; Huerta *et al.*, 2015; Huerta *et al.*, 2016).

Em estudo feito com duas espécies de rotíferos (*Plationus patulus* e *Brachionus havanaensis*) expostos ao triclosan, a presença da substância diminuiu a sobrevivência e

fecundidade de ambas as espécies nas gerações F₀ e F₁. O efeito maior ocorreu na geração F₀ de ambas as espécies e mostrou que *P. patulus* é mais sensível ao triclosan que o *B. havanaensis* (González-Peres *et al.*, 2018).

Anway *et al.* (2005) observaram o efeito de dois desreguladores endócrinos, metoxicloro (pesticida) e vinclozolina (fungicida), em diferentes gerações de ratos. As fêmeas adultas grávidas foram expostas ainda no período de determinação do sexo gonadal. Para as fêmeas não foram observados efeitos pronunciados, mas foi observada gravidez anormal nas fêmeas descendentes dos indivíduos tratados com vinclozolina, semelhante a uma pré-eclâmpsia, com morte, anemia severa e defeitos nas células sanguíneas. Contudo, nos machos, ambos compostos induziram defeitos transgeracionais na capacidade espermatogênica e na viabilidade do esperma.

Os efeitos dos desreguladores endócrinos sobre as espécies são variados. Foi observado o aumento na produção de ovos de *Danio rerio*, o peixe-zebra, quando exposto à mifepristona (antiprogestina) e maturação acelerada quando expostos tanto à mifepristona quanto à progesterona (Blüthgen *et al.*, 2013). Já para *Pimephales promelas* exposto a três concentrações deste hormônio (10, 100 e 1000 ng L⁻¹) ocorreu redução na fecundidade e no sucesso de fertilização (DeQuattro *et al.*, 2012).

Com o crescimento exponencial da população humana (Colby e Ortman, 2015; Crist *et al.*, 2017), houve também um aumento de animais criados para consumo alimentar. O aumento da demanda na pecuária, avicultura, suinocultura e outros, acarreta também o aumento da demanda por compostos sintéticos para estimular ou acelerar a maturação sexual e a capacidade reprodutiva das espécies (Christensen, 1998; Medeiros *et al.*, 2014). Também a agricultura, que é cada vez mais solicitada a atender uma demanda mundial por produtos agrícolas, adotou o modelo de produção em larga escala, fazendo uso de compostos químicos para o controle de pragas, muitos dos quais são também desreguladores endócrinos (Carvalho, 2017; Aquilino *et al.*, 2019; Religia *et al.*, 2019).

A grande maioria dos compostos usados na agricultura, pecuária, medicina, veterinária, indústria e uso doméstico, são descartados ou carreados até corpos d'água (Montagner *et al.*, 2019). Este fato tem levado a uma aceleração da degradação dos recursos hídricos, uma tendência na contramão do atual reconhecimento de que a preservação da qualidade da água é de suma importância para ambas, espécie humana e biota em geral (Corbi *et al.*, 2006; Pimentel *et al.*, 2011; Crist *et al.*, 2017).

Os defensivos agrícolas têm sido amplamente usados (Piccoli *et al.*, 2016; Carvalho, 2017; Tian *et al.*, 2018) no mundo todo, e incluem muitos grupos de compostos, como os organoclorados, organofosfatos, carbamatos, piretróides, (Feng *et al.*, 2016; Carvalho, 2017) amidas, anilinas, triazinas (Feng *et al.*, 2016). São usados, muitas vezes, de forma simultânea, dependendo da ação que eles têm e podem ter efeitos em organismos não alvo, tanto terrestres quanto aquáticos (Tian *et al.*, 2018). No Brasil, a comercialização de defensivos agrícolas foi de mais de 500 mil toneladas de ingrediente ativo no ano de 2014 (Brasil, 2017).

A ocorrência de desreguladores endócrinos em fontes de água potável na China foi analisada por Feng *et al.* (2016) em uma área ocupada pela agricultura. Na água foram encontrados 21 compostos, entre eles, herbicidas, acaricidas e fungicidas, que mesmo em concentrações da ordem de ng L^{-1} , foram consideradas de alto risco. A ocorrência de contaminantes em pontos da Laguna de Rocha e Laguna de Castillos (Uruguai) foi avaliada por Griffero *et al.* (2019) que encontraram 82 contaminantes, dentre eles: fármacos, hormônio e defensivos agrícolas. As concentrações registradas variaram de $<0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ até $>10 \mu\text{g L}^{-1}$. As maiores concentrações foram encontradas nos córregos, seguidos pelas lagoas e em menor quantidade, porém em frequência mais alta que o esperado, na costa do mar. Segundo os pesquisadores, os hormônios 17 α -etinilestradiol e 17 β -estradiol e um inseticida, foram os compostos que representaram maiores riscos para o ambiente aquático e cinco daqueles identificados nas águas são produtos não aprovados pela União Europeia (atrazina, carbendazim, clorpirifós, diazinon e etion)

Como mostrado pelos estudos anteriormente citados, outros contaminantes que são continuamente descartados no ambiente através dos esgotos sanitários e industriais, são os fármacos. Devido ao descarte contínuo, os organismos aquáticos ficam expostos de maneira crônica a esses compostos e podem apresentar alterações em processos fisiológicos, mesmo em concentrações sub letais (Fabbri, 2014; Lamichhne *et al.*, 2013; Luna *et al.*, 2013). Grande parte dos fármacos permanecem no corpo do organismo um período de tempo adequado para produzir efeito, e são posteriormente excretados (Fabbri, 2014; Huerta *et al.*, 2016). Como são continuamente descartados, esses compostos podem acumular no ambiente, se tornando um composto persistente no meio aquático (Gilroy *et al.*, 2012; Fabbri, 2014; Huerta *et al.*, 2016).

A ocorrência e distribuição de fármacos em afluentes e efluentes de estação de tratamento de esgoto da cidade de Sevilha, Espanha, foram avaliadas por Martín *et al.*, (2012). Foram encontrados 16 compostos farmacêuticos, com concentrações entre 0,05 a

50,6 $\mu\text{g L}^{-1}$, sendo dois antibióticos, quatro estrogênios, um antiepiléptico, cinco anti-inflamatórios, um β -bloqueador, um estimulante, e dois reguladores lipídicos. Também, 14 fármacos foram verificados ocorrendo nos efluentes de tratamento de esgoto de municípios no Canadá (Metcalf *et al.*, 2003).

Entre os contaminantes encontrados em amostras de água em vários países, a atrazina (Tabela 1) e o 17 α -etinilestradiol (Tabela 2) são frequentemente identificados.

Tabela 1 - Concentrações (ng L^{-1}) de atrazina encontradas no ambiente em diferentes países

Atrazina		
Concentração (ng L^{-1})	Localização	Referência
< 1,58	Portugal	Barbosa <i>et al.</i> , 2018
< 2 – 32	Canadá	Montiel-León <i>et al.</i> , 2019
2 a 42,1	Brasil	Machado <i>et al.</i> , 2016; Sposito <i>et al.</i> , 2018; Montagner <i>et al.</i> , 2019
4,53 e 5,08	Espanha	Masiá <i>et al.</i> , 2015
< 5 - 8	Croácia	Fingler <i>et al.</i> , 2017
5 - 260000	Austrália	Hook <i>et al.</i> , 2017
< 7 - 366	Singapura	Bayen <i>et al.</i> , 2016
33,3 - 2370	E.U.A	Mahler <i>et al.</i> , 2017; Callicott e Hooper-Bùi, 2019
480	Uruguai	Griffero <i>et al.</i> , 2019

Tabela 2 - Concentrações (ng L⁻¹) de 17 α -etinilestradiol encontradas no ambiente em diferentes países

17 α-Etinilestradiol		
Concentração (ng L⁻¹)	Localização	Referência
0,005 – 0,68	Europa Central	<i>Avar et al.</i> , 2016
< 0,1 – 19,6	China	<i>Wang et al.</i> , 2018
0,2 – 10,2	Inglaterra	<i>Desbrow et al.</i> , 1998; <i>Wilkinson et al.</i> , 2017
0,45	Itália	<i>Baronti et al.</i> , 2000
1	Alemanha	<i>Ternes et al.</i> , 1999
1,64 – 19,72	Argentina	<i>Scala-Benuzzi et al.</i> , 2018
6 - 777	Brasil	<i>Sodré et al.</i> , 2007; <i>Torres et al.</i> , 2015; <i>Sposito et al.</i> , 2018; <i>Montagner et al.</i> , 2019
9	Canadá	<i>Ternes et al.</i> , 1999
73	Estados Unidos	<i>Kolpin et al.</i> , 2002
11600	Uruguai	<i>Griffero et al.</i> , 2019

1.2. Atrazina

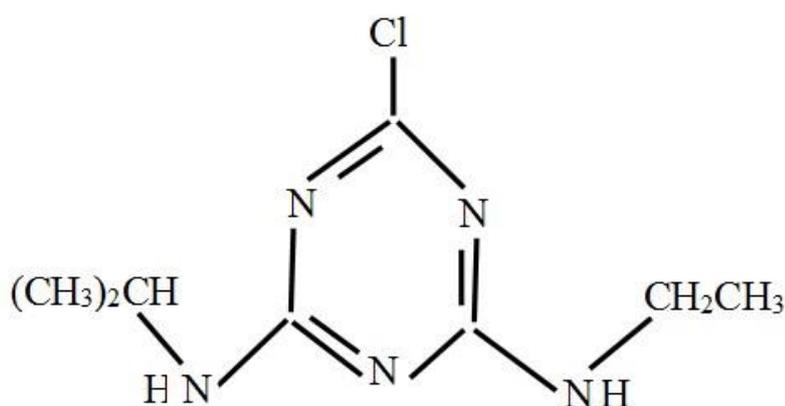
Os herbicidas são muito usados na agricultura (*Tian et al.*, 2018; *Religia et al.*, 2019) e a aplicação massiva pode trazer efeitos adversos para o ecossistema.

O grupo das triazinas, ingrediente ativo de alguns herbicidas, está sendo comumente encontrado nos ecossistemas aquáticos. Fazem parte desse grupo a atrazina, cianazina, prometon e simazina, quem agem no fotossistema II, inibindo o transporte de elétrons (*Faust et al.*, 2001; *Brain et al.*, 2012).

A atrazina (Figura 1) é um herbicida sintético que faz parte da classe Triazina e o segundo mais usado no mundo (*Religia et al.*, 2019). Foi patenteada em 1958 na Suíça e, em 1959, nos Estados Unidos, teve registro de uso comercial. Após seu registro, a substância foi utilizada no mundo, estando ela há mais de 50 anos disponível no mercado (*Albuquerque et al.*, 2020). É um composto de fórmula C₈H₁₄ClN₅, peso molecular 215,69 g mol⁻¹ (*Sanderson et al.*, 2000; *Faust et al.*, 2001; *Brain et al.*, 2012), com solubilidade de 33 mg L⁻¹ a 22 °C, coeficiente octanol-água (log K_{ow}) de 2,75 e coeficiente

de adsorção do solo (K_{oc}) baixo, $100 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$ (Albuquerque *et al.*, 2020). O tempo de meia vida do composto, em solo aluvial e solo úmido coletados na China, foi de 28,18 e 23,74 dias, respectivamente (Huang *et al.*, 2018). O tempo de meia vida do composto pode variar de seis meses a vários anos em água e de 14 dias a quatro anos em solo (Albuquerque *et al.*, 2020).

Figura 1 - Estrutura do herbicida atrazina



Por ser uma substância persistente no ambiente e com certa mobilidade, é detectada tanto em solo, rios, reservatórios e águas subterrâneas como em geleiras de locais remotos (Albuquerque *et al.*, 2020). Devido à contaminação dos ambientes e os riscos que pode causar aos organismos e a saúde humana, o uso da atrazina foi proibido nos países pertencentes à União Europeia (Ackerman, 2007) e está diminuindo no Canadá (Hénault-Ethier, 2016). Porém, este composto é ainda muito usado em vários países (Albuquerque *et al.*, 2020).

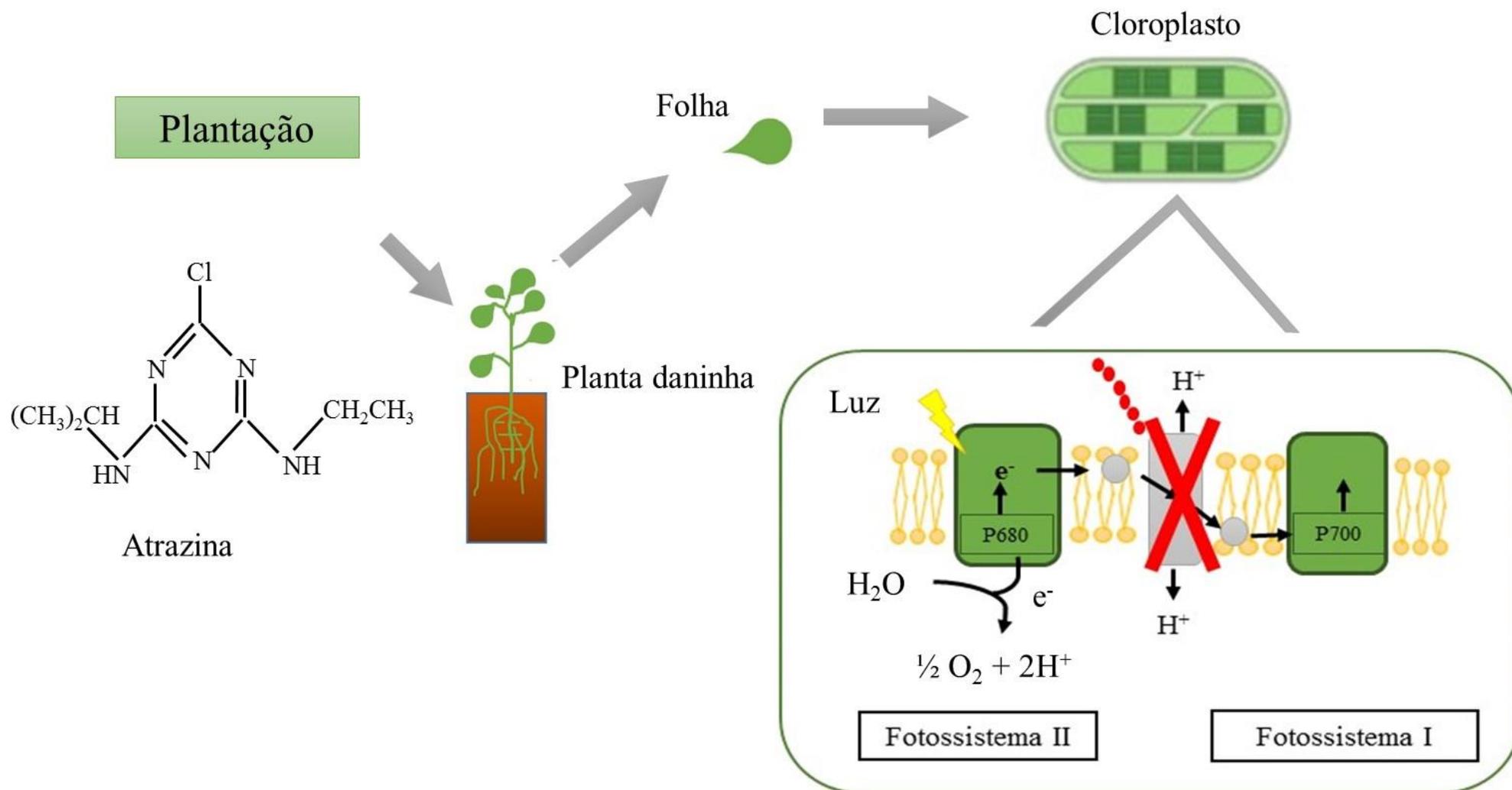
A atrazina é encontrada nos ambientes aquáticos em concentrações de nanogramas por litro (ng L^{-1}) e microgramas por litro ($\mu\text{g L}^{-1}$). No Uruguai foi encontrada $0,48 \mu\text{g L}^{-1}$ em lagoas (Griffero *et al.*, 2019), 2 a 15 ng L^{-1} em água potável de diferentes estados brasileiros (Machado *et al.*, 2016), 4,53 e $5,08 \text{ ng L}^{-1}$ em água superficial na Espanha (Masiá *et al.*, 2015), $42,1 \text{ ng L}^{-1}$ em rios do Mato Grosso do Sul – Brasil (Sposito *et al.*, 2018), no estado de São Paulo – Brasil, foram encontradas concentrações de 30 ng L^{-1} em águas superficiais, 36 ng L^{-1} em água potável e 3 ng L^{-1} em água subterrânea (Montagner *et al.*, 2019), 5 ng L^{-1} em água potável e <5 e 8 ng L^{-1} em rios na Croácia (Fingler *et al.*, 2017), <7 – 366 ng L^{-1} em Singapura (Bayen *et al.*, 2016) (Tabela 1).

A ação tóxica da atrazina ocorre sobre o fotossistema II (PSII) de plantas, onde ela age bloqueando o transporte de elétrons e inibindo a fotossíntese (Religia et al., 2019; Albuquerque et al, 2020) (Figura 2).

A atrazina, no ambiente, pode causar efeitos como inibição do fotossistema II da alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, da cianobactéria *Anabaena flos-aquae* e da diatomácea *Navicula pelliculosa*, redução da densidade celular da *P. subcapitata* (Brain et al., 2012), inibição do crescimento da alga *Raphidocelis subcapitata*, aumento do número de neonatas inviáveis quando alimentadas com a alga contaminada (Religia et al., 2019), diminuição da expressão da vitelogenina no ovário e hepatopâncreas e diminuição dos oócitos no crustáceo *Procambarus clarkii* (Silveyra et al., 2018).

Omran e Salama (2016) avaliaram o efeito da atrazina e do glifosato no caramujo *Biomphalaria alexandrina*. A presença da atrazina na água diminuiu a concentração de testosterona, do 17 β -estradiol e das proteínas deste caramujo, além de causar alterações degenerativas, como a ausência de fases da gametogênese e de formação do oócito. Portanto, a escolha deste pesticida como agente tóxico a ser testado neste estudo baseou-se no fato deste ser reconhecidamente um desregulador endócrino.

Figura 2 - Esquema da ação da atrazina em plantas daninhas, seu organismo-alvo, e a absorção pelas folhas. A atrazina bloqueia o transporte de elétrons do fotossistema II, inibindo a fotossíntese

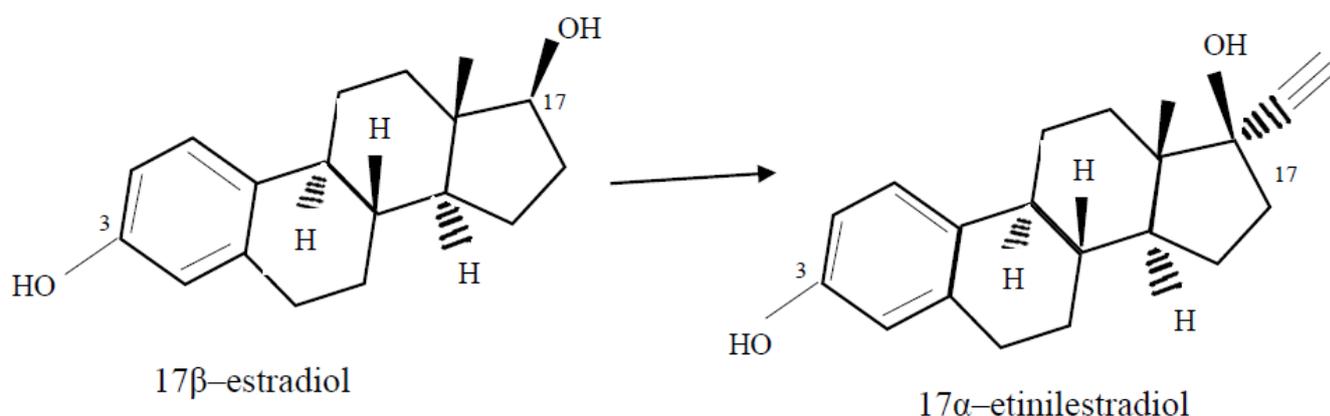


1.3.17 α -etinilestradiol

Os compostos sintéticos mais utilizados atualmente são os hormônios estrogênicos, como o 17α -etinilestradiol, utilizados na formulação de contraceptivos orais (Clouzot *et al.*, 2008; Laurenson *et al.*, 2014; Avar *et al.*, 2016; Kovacevic *et al.*, 2019). Os hormônios são considerados micropoluentes por serem encontrados nos corpos d'água em baixas concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$ ou ng L^{-1}), mas que são suficientes para causar algum efeito adverso à biota aquática, como desregulador endócrino. Pouco se sabe sobre os reais impactos destes compostos a longo prazo, mas a sua importância como contaminante ambiental já é reconhecida, o que faz com que o número de estudos com esses compostos tenha aumentado (Pascoe *et al.*, 2002; Cajthaml *et al.*, 2009; Dussault *et al.*, 2009; Al-Ansari *et al.*, 2010; Contardo-Jara *et al.*, 2011; Zuo *et al.*, 2013; Schwindt *et al.*, 2014; Volkova *et al.*, 2015; Bovier *et al.*, 2018; Kovacevic *et al.*, 2019)

O hormônio sintético 17α -etinilestradiol (Figura 3) é derivado do hormônio natural 17β -estradiol (Clouzot *et al.*, 2008; Avar *et al.*, 2016; Belhaj *et al.*, 2017) pela adição de um grupo etinil no C-17. Possui fórmula $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_2$, peso molecular de $296,4 \text{ g mol}^{-1}$, baixa solubilidade em água (Clouzot *et al.*, 2008; Capolupo *et al.*, 2018) e maior resistência à degradação, se comparado com o hormônio natural (Clouzot *et al.*, 2008).

Figura 3 - Esquema ilustrando a síntese do hormônio 17α -etinilestradiol a partir do hormônio natural 17β -estradiol



Adaptado de Clouzot *et al.*, 2008

O hormônio sintético 17α -etinilestradiol pode ser encontrado em concentrações que variam de nanogramas a microgramas por litro, tendo sido encontrado em uma

concentração média de $0,001 \mu\text{g L}^{-1}$ na Alemanha e $0,009 \mu\text{g L}^{-1}$ no Canadá em efluentes de estação de tratamento de esgoto (Ternes *et al.*, 1999), $0,073 \mu\text{g L}^{-1}$ em água corrente nos Estados Unidos (Kolpin *et al.*, 2002), $11,6 \mu\text{g L}^{-1}$ em água corrente no Uruguai (Griffero *et al.*, 2019), 0,2, 0,6, 0,8, 1,9, 4,3 e $7,0 \text{ ng L}^{-1}$ em efluentes de estação de tratamento de esgoto na Inglaterra (Desbrow *et al.*, 1998), $0,45 \text{ ng L}^{-1}$ em efluentes de tratamento de esgoto na Itália (Baronti *et al.*, 2000), 6 a 310 ng L^{-1} em Campinas, Brasil (Sodré *et al.*, 2007), 24 – 480 ng L^{-1} em Piracicaba, Brasil (Torres *et al.*, 2015) e $38,5 \text{ ng L}^{-1}$ em água corrente no Mato Grosso do Sul, Brasil (Sposito *et al.*, 2018) (Tabela 2).

Os efeitos deletérios do hormônio sintético afetam diferentes espécies, e podem causar danos tanto em animais vertebrados, invertebrados e algas.

Silva *et al.* (2012) avaliaram o efeito do estrogênio etinilestradiol e uma mistura de xenoestrogênios encontrados no Rio Douro, Portugal, em macho e fêmeas de *Danio rerio*. Os resultados evidenciaram que tanto o composto isolado quanto a mistura causaram efeitos negativos aos indivíduos, principalmente relacionados à reprodução. O etinilestradiol desregulou a gametogênese de ambos os sexos, diminuindo o volume das células em estágio de maturação e diminuindo o tamanho do corpo dos indivíduos. Já a mistura dos compostos desregulou a gametogênese apenas dos machos, diminuindo o volume de espermatozoides.

Caspillo *et al.* (2014) estudaram os genes do peixe *Danio rerio* após exposição ao EE₂ e observaram que a regulação negativa de genes envolvidos na manutenção e desenvolvimento dos testículos contribuíam para a esterilidade funcional e que os genes predominantes masculinos tiveram diminuição na transcrição levando a uma desmasculinização das gônadas. Nesse trabalho não foi observado efeito nos genes predominantes femininos. Observou-se aumento da mortalidade e da teratogênese de embriões do peixe *Protosalanx hyalocranius* (Hu *et al.*, 2017), diminuição da fecundidade e do número de ovos em *Pimphales promelas* (Armstrong *et al.*, 2016), e diminuição do crescimento e da fecundidade em *Kryptolebias marmoratus* (Voisin *et al.*, 2016).

O comportamento de roedores (*Peromyscus californicus*) no qual a geração parental recebeu uma dieta que continha o hormônio EE₂ foi monitorado por Johnson *et al.* (2018) os quais observaram a vocalização dos filhotes (geração F₁) e perceberam que eles emitiam maior vocalização quando houve redução do cuidado parental. A geração parental que recebeu a dieta com hormônio teve redução no cuidado parental, e a alta vocalização de seus filhotes era para atrair e aumentar o investimento dos pais (Johnson

et al., 2018). Também, a exposição ao EE₂ causou alterações nos processos neurais de ratos, segundo Ceccarelli *et al.* (2015). Os girinos de *Lithobates catesbeianus* expostos ao EE₂ apresentavam taquicardia, mostrando que esse hormônio afetava diretamente o músculo do coração desses indivíduos (Salla *et al.*, 2016) enquanto no cladóceros *Daphnia magna* foi observada uma diminuição na produção de neonatas e na taxa de crescimento populacional (Luna *et al.*, 2015).

Em testes com algas, concluiu-se que a presença do hormônio inibiu a densidade e diminuiu a atividade fotossintética da espécie *Desmodesmus communis* (Balina *et al.*, 2015). A diminuição da atividade fotossintética também foi observada para a espécie *Dunaliella salina* (Belhaj *et al.*, 2017) e para a cianobactéria *Microcystis aeruginosa* (Czarny *et al.*, 2019b) e inibição do crescimento foi observada para as algas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus armatus* (Czarny *et al.*, 2019a)

Ao expor indivíduos em teste multigeracional, as respostas ao contaminante de uma geração pode diferir da resposta em outras. Vandenberg *et al.* (2003) expuseram duas gerações do anfípoda *Hyalella azteca* ao EE₂ e observaram que a geração parental não apresentou diferença significativa dos parâmetros analisados por eles. Porém, na geração F₁, foi observado efeito no desenvolvimento das características sexuais secundárias. Os machos da geração F₁ tiveram uma redução no gnatópodo secundário (desvantagem reprodutiva), aparecimento de células anormais no trato reprodutivo e indícios de hermafroditismo (Vandenberg *et al.*, 2003). Outro estudo multigeracional foi o de Dietrich *et al.* (2010) com *Daphnia magna*. Nesse estudo, a geração parental teve o tamanho do corpo e o número de neonatas reduzido, efeitos esses que não foram observados em todas as seis gerações subsequentes. Neste estudo observou-se que os organismos desenvolviam resistência ao contaminante por aclimação.

1.4. Misturas

Os compostos, no ambiente, na maioria das vezes, não são encontrados isolados e sim, em mistura. Os organismos estão expostos às misturas de contaminantes cujos compostos podem interagir produzindo efeitos sinérgicos, aditivos ou antagônicos (Barata *et al.*, 2006; Mansano *et al.*, 2017; Rocha *et al.*, 2018). Os testes de toxicidade de mistura são realizados para observar a forma de ação dos compostos, quando agem em conjuntos, nos organismos (Faust *et al.*, 2001; Pérez *et al.*, 2011).

Para explicar o comportamento das misturas, são usados modelos teóricos baseados em dois conceitos de referência que assumem que não existe interação entre os compostos e que preveem a toxicidade da mistura esperada com base na toxicidade individual dos componentes da mistura. Os dois modelos usados são de Adição de Concentração (CA) e o de Ação Independente (IA) (Pérez *et al.*, 2011; Freitas *et al.*, 2014).

O modelo de Adição de Concentração (Concentration Addition – CA) (Loewe e Muischnek, 1926) assume que produtos químicos individuais que tenham o mesmo modo de ação, agem sobre um mesmo alvo molecular e contribuem para uma resposta comum em proporção às suas toxicidades relativas. Para esse modelo, o modo de ação dos compostos é conhecido (Ferreira *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2011; Freitas *et al.*, 2014) e este conceito pode ser definido matematicamente por (Pérez *et al.*, 2011):

$$\sum_n^{i=1} \frac{C_i}{EC_{xi}} = 1$$

Onde, C_i é a concentração do químico i na mistura e EC_{xi} é a concentração de efeito do químico i .

O modelo de Ação Independente (Independent Action – IA) (Bliss, 1939) assume que compostos individuais afetam, por diferentes modos de ação, os organismos, e devido a isso, seus efeitos são independentes um do outro durante a exposição, absorção e ação tóxica. Nesse modelo, pelo menos um dos compostos tem o modo de ação conhecido (Ferreira *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2011; Freitas *et al.*, 2014). Para este modelo, a fórmula matemática é expressa por (Pérez *et al.*, 2011):

$$Y = u_{MAX} \prod_{i=1}^n qi(Ci)$$

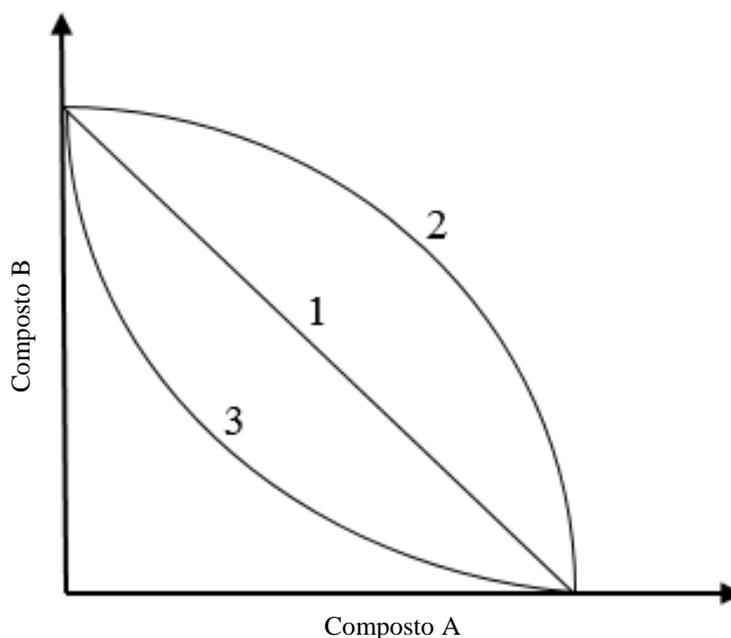
Onde, Y denota a resposta biológica, C_i a concentração do químico i na mistura, $qi(Ci)$ a probabilidade de não-resposta, u_{max} a resposta do controle para *endpoits* e Π a função de multiplicação.

Quando o modo de ação do composto não é conhecido, ambos os modelos citados acima podem ser utilizados, e será escolhido aquele que melhor se ajustar aos dados (Pavlaki *et al.*, 2011).

Os compostos podem interagir uns com os outros e modificar a amplitude e a natureza do efeito tóxico. As diferentes combinações das misturas, quando calculadas pelos modelos de CA e IA, podem causar efeito tóxico de sinergismo (mais severo) ou de antagonismo (menos severo). Os desvios podem ser dependentes do nível da dose (Dose Level – DL), em que se verificam diferentes desvios para baixas e altas concentrações; ou dependentes da proporção da dose (Dose Ratio – DR), em que se observam desvios diferentes a partir da composição da mistura (Jonker *et al.*, 2005).

Isobolograma (Figura 4) é a representação gráfica das doses isoladas e em mistura, que causam um efeito de 50% (ou X%) de duas substâncias. Nas coordenadas cartesianas, os eixos X e Y representam as concentrações dos compostos químicos e cada ponto que conecta os dois compostos representa a concentração que atinge a CE_{50} , formando a linha de aditividade. A sinergia, aditividade e antagonismo são determinados quando o ponto de encontro da CE_{50} dos compostos estiver abaixo, sobre ou acima da linha. Se os pontos se encontrarem abaixo da linha de aditividade, a ação é de sinergismo e ao se encontrarem acima da linha, a ação é de antagonismo. Caso os pontos se encontrem na linha de aditividade, não ocorre interação na combinação dos compostos (Altenburger *et al.*, 1990; Cassee *et al.*, 1998; Kruse *et al.*, 2006; Ryal e Tan, 2015).

Figura 4 - Isobolograma mostrando os diferentes tipos de efeito da combinação dos compostos. Curva 1, aditividade (sem interação); curva 2, antagonismo; curva 3, sinergismo



1.5. Testes ecotoxicológicos

Uma importante ferramenta de monitoramento ambiental são as análises de toxicidade que são utilizadas para o biomonitoramento de contaminantes ambientais, avaliação da qualidade dos recursos hídricos e avaliações de risco ecológico (Figura 5) (Zagatto e Bertoletti, 2006; Magalhães e Ferrão-Filho, 2008; Pal *et al.*, 2010; Connon *et al.*, 2012; Rebelo e Caldas, 2014). Essas análises baseiam-se na avaliação da toxicidade de compostos, substâncias ou amostras ambientais e seus efeitos prejudiciais à biota. Para isso dependem de fatores associados à toxicidade, que podem ser: concentração, propriedades da substância química e tempo de exposição do organismo-teste ao agente tóxico (Costa *et al.*, 2008; Pivato *et al.*, 2014).

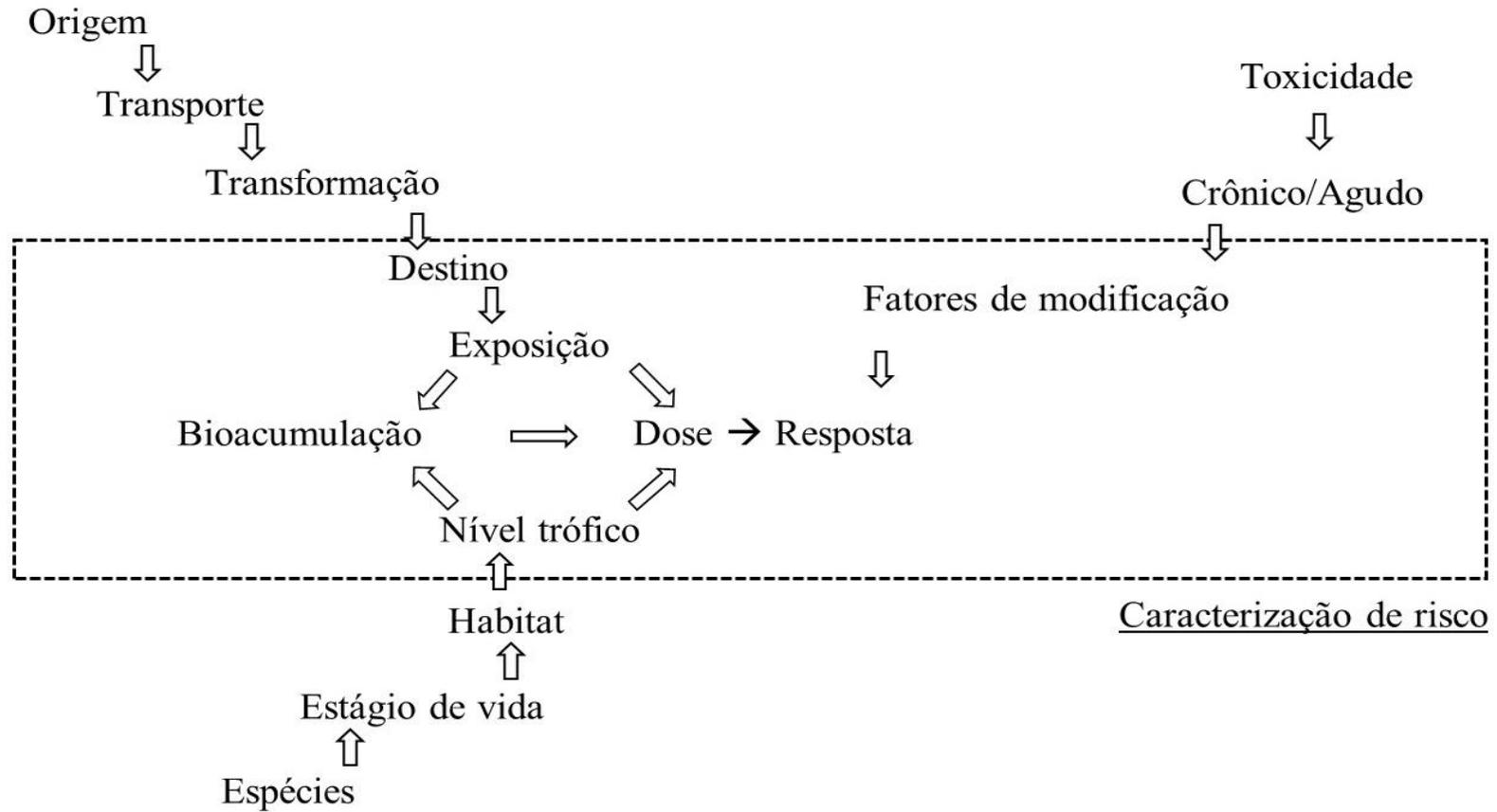
A vantagem das análises ecotoxicológicas, baseadas em organismos vivos utilizados como sensores ambientais, em comparação com o uso de apenas análises físicas e químicas, é que é possível avaliar a totalidade dos efeitos dos contaminantes puros ou de misturas complexas, suas possíveis interações, e efeitos sobre a biota (Ambrozevicius e Brandimarte, 2009).

A importância das análises ecotoxicológicas relaciona-se diretamente com o cenário atual, devido ao aumento e acúmulo de compostos químicos de origem antrópica em ecossistemas aquáticos. Um exemplo são os micropoluentes, que são definidos como compostos presentes em pequenas concentrações e que provocam alterações significativas nos sistemas em que ocorrem (Graciani e Ferreira, 2014). Dentre estes, inúmeros compostos agem como desreguladores endócrinos, apontados como os de efeitos mais danosos à biota, por comprometerem a reprodução das espécies, tendo como exemplos os fármacos e alguns defensivos agrícolas (Reis Filho *et al.*, 2007).

Figura 5 - Modelo para a avaliação de risco ecológico

Avaliação de exposição

Avaliação de risco



Caracterização do receptor

Adaptado de USEPA, 1988

Os testes ecotoxicológicos são comumente realizados com organismos com relevância e representatividade no tipo de ecossistema em estudo. No caso do ecossistema aquático, várias espécies de diferentes níveis tróficos e pertencentes a diferentes comunidades são utilizadas em protocolos experimentais padronizados. Alguns critérios devem ser utilizados na escolha e determinação da espécie: devem ser usadas espécies indicadoras ambientais e que apresentem sensibilidade aos contaminantes. Estas espécies devem ocorrer em elevada abundância, ter uma distribuição geográfica abrangente e ter uma manutenção viável em condições experimentais. Os testes podem ser tanto de toxicidade aguda, que avaliam a exposição em um curto período de tempo, quanto de toxicidade crônica, que testam concentrações subletais e com uma exposição prolongada abrangendo uma parte significativa do ciclo de vida do organismo-teste (Rand, 1995; Costa *et al.*, 2008).

As algas, que são fotossintéticas, convertem luz solar, água e dióxido de carbono para a biomassa algal, tendo uma taxa de crescimento muito grande. Isso faz com que sua biomassa dobre em pouco tempo, atingindo uma alta produtividade, constituindo uma nova fonte de produção de energia. Elas também podem ser cultivadas em águas residuais e contribuir para a remoção de nutrientes (Balina *et al.*, 2015).

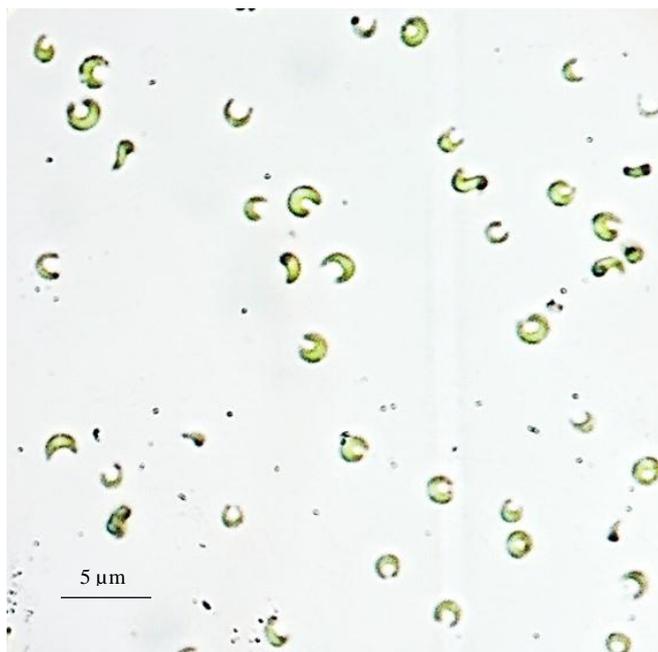
Por serem produtores primários, as microalgas desempenham um papel importante no funcionamento dos ecossistemas aquáticos (Rioboo *et al.*, 2002; Reynolds, 2006; Suman *et al.*, 2015) e qualquer alteração na comunidade fitoplânctônica, refletirá nos demais níveis tróficos da cadeia alimentar, causando impactos na estrutura e no funcionamento do ecossistema (Ribeiro *et al.*, 2014). São predominantes e são bons organismos-modelo aquáticos (Suman *et al.*, 2015) pois são de fácil cultivo em laboratório, os testes são relativamente rápidos e o organismo é sensível ao poluente (Rioboo *et al.*, 2002; Čypaitė *et al.*, 2014; Ribeiro *et al.*, 2014).

Normalmente, o nome das divisões e classes das algas se referem ao pigmento predominante ou que dá cor ao indivíduo, como Cyanophyta (cianobactéria, azulada), Rhodophyta (alga vermelha), Chlorophyta (alga verde) e, os tipos e combinações dos pigmentos fotossintéticos presentes, têm importante função na classificação da alga, assim como a presença ou ausência de outros componentes celulares. As algas verdes, possuem cloroplastos verdes por causa da clorofila que não fica oculta pelos pigmentos acessórios, apresentam clorofila a e b e armazenam amido (van den Hoek *et al.*, 1995).

A espécie *Raphidocelis subcapitata* (anteriormente conhecida como *Pseudokirchneriella subcapitata* ou *Selenastrum capricornutum* Printz) é uma microalga

de água doce (Ribeiro *et al.*, 2014) pertencente à Família Selenastraceae, Classe Chlorophyceae. Este tipo de alga possui forma de meia lua (Figura 6) e é um organismo comumente utilizado como organismo-teste em testes de toxicidade (Krienitz *et al.*, 2011).

Figura 6 - Alga verde *Raphidocelis subcapitata*. Possui formato meia lua. (Microscópio óptico, aumento 40x. Tamanho do organismo: 5µm)



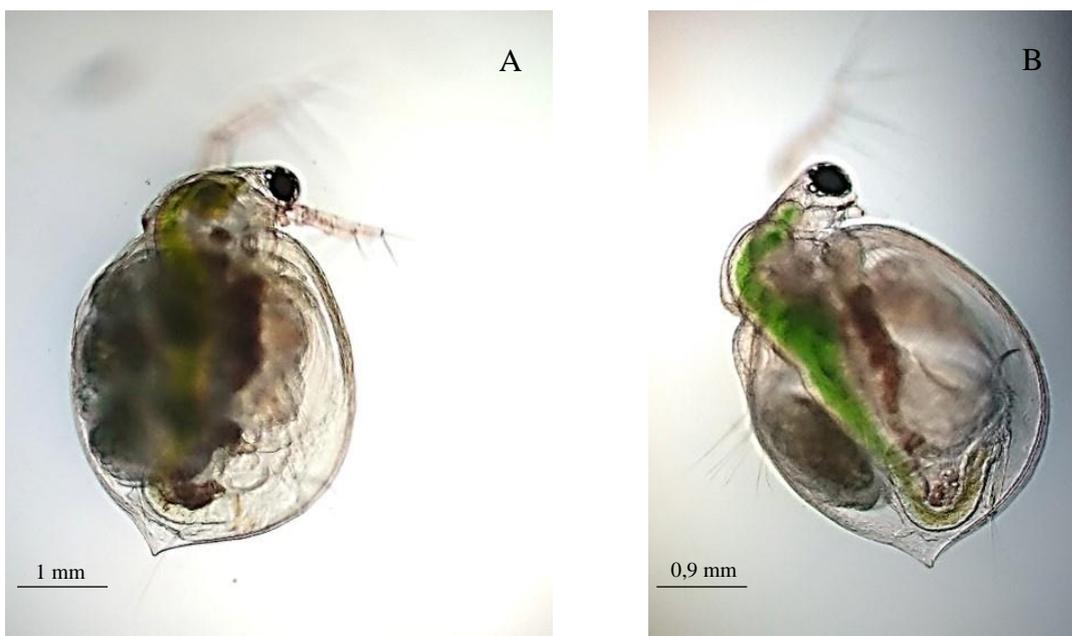
Fonte: Miguel, M., 2019

Os organismos zooplanctônicos fazem parte das comunidades de invertebrados aquáticos que desempenham um papel ecológico fundamental por serem importantes consumidores nas cadeias tróficas, atuando na ciclagem dos nutrientes e no fluxo de energia (Tundisi e Matsumura-Tundisi, 2008). Os microcrustáceos de água doce são bastante utilizados para testes de toxicidade (Rand, 1995; Costa *et al.*, 2008; Abreu *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2018), principalmente os da Ordem Cladocera que possuem um ciclo de vida curto e são partenogéticos, o que facilita e viabiliza o cultivo sob condições controladas (Rand, 1995; Costa *et al.*, 2008).

Ceriodaphnia silvesrii (Figura 7a) é um cladócero pertencente da Família Daphnidae amplamente distribuídas nas águas doce brasileira. É um organismo muito utilizado e recomendado em análises ecotoxicológicas (Abreu *et al.*, 2010; ABNT, 2017). *Ceriodaphnia rigaudi* (Figura 7b), da Família Daphnidae, é uma espécie tropical de

pequeno tamanho corporal ($0,45 \pm 0,003$ mm) com ciclo de vida curto e de fácil cultivo e manutenção em laboratório, sendo um organismo adequado para a realização de testes ecotoxicológicos. (Mohammed, 2004; 2008; 2009).

Figura 7 - Cladóceros de água doce. Fêmeas adultas (A) *Ceriodaphnia silvestrii* (Tamanho do organismo: 1 mm), (B) *Ceriodaphnia rigaudi* (Tamanho do organismo: 0,92 mm). (Microscópio estereoscópio, aumento de 50x)



Fonte: Miguel, M., 2019

2. Justificativa

A produção de compostos químicos vem sendo incrementada há décadas para atender as necessidades humanas (Américo *et al.*, 2012; Graciani e Ferreira, 2014) com variadas aplicações na medicina, agricultura, indústria e uso doméstico (Aquilino *et al.*, 2019; Griffero *et al.*, 2019).

O aumento da população (Cris *et al.*, 2017) faz com que ocorra aumento na produção de alimentos e com isso, a agricultura alcança produção em larga escala. Com o aumento do cultivo, ocorre um aumento no uso de defensivos agrícolas (Aquilino *et al.*, 2019; Religia *et al.*, 2019).

No Brasil, a comercialização de defensivos agrícolas ultrapassou 500 mil toneladas de ingrediente ativo no ano de 2014 (Brasil, 2017). A Portaria Normativa N°

84 de 1996 classifica os agrotóxicos segundo sua periculosidade, sendo: Classe I (produto altamente perigoso ao meio ambiente), Classe II (produto muito perigoso ao meio ambiente), Classe III (produto perigoso ao meio ambiente) e Classe IV (produto pouco perigoso ao meio ambiente) (Brasil, 1996). Segundo dados do IBAMA (Brasil, 2017), em 2014 foram comercializadas mais de 4 mil toneladas de ingrediente ativo de periculosidade Classe I, mais de 165 mil toneladas de Classe II, mais de 307 mil toneladas de Classe III e mais de 31 mil toneladas de Classe IV.

De 2009 a 2014, a comercialização dos agrotóxicos cresceu bastante, de 300 mil toneladas a mais de 500 mil toneladas. Esse crescimento ocorreu em todas as regiões brasileiras, com um aumento do uso dos compostos de Classe II e III (Brasil, 2017).

São utilizados muitos grupos de defensivos agrícolas, incluindo o grupo das triazinas (Feng *et al.*, 2016), que inclui a atrazina, o segundo herbicida sintético mais usado no mundo (Religia *et al.*, 2019).

Além das aplicações na agricultura, o aumento da população faz com que aumente a busca por produtos relacionados a medicina, como os fármacos (Fabbri, 2014). A utilização e descarte de fármacos tem gerado considerável preocupação desde o século passado, pois quando estes são ingeridos, uma parte é excretada, ocorrendo conseqüentemente o aumento da concentração dos mesmos em esgotos sanitários (Bila e Dezotti, 2003).

Dos fármacos, os hormônios estrogênicos são muito utilizados atualmente na formulação de contraceptivos orais (Avar *et al.*, 2016; Kovacevic *et al.*, 2019). Um hormônio sintético muito usado é o 17 α -etinilestradiol (Avar *et al.*, 2016; Belhaj *et al.*, 2017), que é frequentemente encontrado no ambiente aquático. Os hormônios são encontrados nos corpos d'água em baixas concentrações e não se sabe muito sobre seus reais impactos a longo prazo, mas seu risco ecológico já é conhecido (Pascoe *et al.*, 2002; Contardo-Jara *et al.*, 2011; Kovacevic *et al.*, 2019).

A maior produção desses compostos leva a um aumento na contaminação dos recursos hídricos (Sposito *et al.*, 2018) decorrentes de diversas fontes poluidoras. Quando descartados nos corpos d'água, alguns compostos provocam efeitos de perturbação endócrina (Lima *et al.*, 2014; Scognamiglio *et al.*, 2016), porém, não se sabe ao certo os reais impactos no ambiente e na saúde pública, pois os efeitos a longo prazo não são totalmente conhecidos (Lima *et al.*, 2014).

Por causar efeitos adversos na biota aquática (Griffero *et al.*, 2019) mesmo em baixas concentrações (Daughton e Ternes, 1999, Ghiselli e Jardim, 2007), tanto o

hormônio 17 α -etinilestradiol quanto o herbicida atrazina, são poluentes preocupantes, sendo assim importante que sejam realizadas pesquisas que permitam conhecer seus efeitos sobre a biota aquática.

Estudos que avaliem o efeito de compostos químicos no ambiente aquático são frequentemente realizados com vertebrados e em menor quantidade com invertebrados. Os invertebrados são organismos susceptíveis de serem afetados e são mais representativos das condições locais dos ecossistemas aquáticos, sendo considerados bons bioindicadores (Huerta *et al.*, 2015). Outro grupo susceptível de ser afetado é o de produtores primários. Os produtores primários constituem uma parte bastante vulnerável do sistema aquático e muito importante para as cadeias tróficas. O fitoplâncton é muito sensível aos contaminantes e devido a isso, tem papel central na avaliação de risco por contaminantes (Faust *et al.*, 2001).

Os compostos não são encontrados de forma isolada no ambiente e sim em combinação com várias substâncias químicas, que podem interagir e produzir diversos efeitos. Esses efeitos podem ser mais fortes ou não, e os organismos ficam expostos de forma crônica a essas misturas (Mansano *et al.*, 2017; Rocha *et al.*, 2018).

Devido ao grande uso, ambos compostos são encontrados nos corpos d'água de vários países, inclusive no Brasil. Por terem elevada frequência de ocorrência no ambiente, por já terem sido detectados ocorrendo juntos no mesmo corpo d'água, e por ambos atuarem como desreguladores endócrinos no desenvolvimento e reprodução de espécies de diferentes níveis tróficos, os impactos que o estrogênio sintético 17 α -etinilestradiol (EE₂) e o herbicida atrazina (AT) podem causar em componentes da biota aquática foram avaliados no presente estudo.

3. Objetivos e hipóteses

Este trabalho tem como objetivo principal avaliar os efeitos do hormônio 17 α -etinilestradiol e do herbicida atrazina, por meio de testes de toxicidade com a microalga *Raphidocelis subcapitata* e os cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, *Ceriodaphnia rigaudi* e *Daphnia magna*, e também realizar uma avaliação de risco destes poluentes para a biota tropical de águas doces.

3.1. Objetivos específicos

- Realizar testes de toxicidade crônica para avaliar o efeito do 17 α -etinilestradiol e da atrazina, de forma isolada, sobre o crescimento e a reprodução da espécie de *Ceriodaphnia silvestrii* e *Ceriodaphnia rigaudi*, isoladamente;
- Comparar a sensibilidade e o efeito tóxico do etinilestradiol na espécie tropical *Ceriodaphnia silvestrii* com a espécie de região temperada *Daphnia magna*, aclimatada a 25 °C;
- Realizar teste de toxicidade crônica com a mistura do hormônio EE₂ e do herbicida atrazina (ingrediente ativo) utilizando o cladóceros *Ceriodaphnia rigaudi* como organismo-teste;
- Observar o efeito intergeracional (até duas gerações) do hormônio e do herbicida, de forma isolada, sobre a espécie de *Ceriodaphnia silvestrii*;
- Avaliar a ocorrência de possíveis mudanças morfológicas ao longo do desenvolvimento dos organismos-teste;
- Avaliar o risco ecológico do hormônio EE₂ e do herbicida ATZ, de forma isolada, no ambiente aquático;
- Avaliar os efeitos tóxicos do 17 α -etinilestradiol e da atrazina em ação individual (ingrediente ativo) sobre a alga *Raphidocelis subcapitata*;
- Verificar efeitos sobre o teor da clorofila *a* e rendimento fotossintético da alga;
- Avaliar os efeitos tóxicos das substâncias com relação à bioquímica da alga (carboidrato, lipídio total e classes lipídicas).

3.2. Hipóteses

- Há risco ecológico de extinção local das espécies *Ceriodaphnia silvestrii* e *Ceriodaphnia rigaudi* porque, a exposição ao etinilestradiol e a atrazina diminuem a fecundidade destes cladóceros;
- A espécie tropical *Ceriodaphnia silvestrii* é mais sensível ao etinilestradiol do que a espécie de região temperada *Daphnia magna* devido ao seu menor tamanho e responder de maneira diferente ao hormônio EE₂ em relação à fecundidade;
- Os efeitos do etinilestradiol serão intergeracionais para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, devido a sua maior sensibilidade;

- Os efeitos da atrazina na espécie *Ceriodaphnia silvestrii* afetarão a segunda geração em maior intensidade por acumulação de efeitos ao afetarem adversamente o organismo parental;

- A mistura dos compostos, etinilestradiol e atrazina, terá efeito sinérgico e dependente da dose, afetando a fecundidade das espécies de forma mais potencializada porque ambos compostos são desreguladores endócrinos,

- A atrazina afetará mais intensamente a alga *R. subcapitata* que o hormônio, por ter ação específica na fotossíntese.

Referências

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera). **ABNT NBR 13373**. 2017

ABREU, M.J., SANTOS-WISNIEWSKI, M.J., ROCHA, O., ORLANDO, T.C. **The use of PCR-RFLP to genetically distinguish the morphologically close species: *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894 and *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Crustacea Cladocera).** Braz. J. Biol., 70:1, 121-124 p, 2010

ACKERMAN, F. **The economics of atrazine.** Int. J. Occup. Environ. Health, 13:4, 441-449 p, 2007.

AL-ANSARI, A.M., SALEEM, A., KIMPE, L.E., SHERRY, J.P., MCMASTER, M.E., TRUDEAU, V.L., BLAIS, J.M. **Bioaccumulation of the pharmaceutical 17 α -ethinylestradiol in shorthead redhorse suckers (*Moxostoma macrolepidotum*) from the St. Clair River, Canada.** Environmental Pollution, 158, 2566-2571 p, 2010.

ALBUQUERQUE, F.P., OLIVEIRA, J.L., MOSCHINI-CARLOS, V., FRACETO, L.F. **An overview of the potential impacts of atrazine in aquatic environments: Perspectives for tailored solutions based on nanotechnology.** Science of the Total Environment, 700, 134868, 2020

ALTENBURGER, R., BÖDEKER, W., FAUST, M., GRIMME, L.H. **Evaluation of the Isobologram Method for the Assessment of Mixtures of Chemicals: Combination Effect Studies with Pesticides in Algal Biotests.** Ecotoxicology and Environmental Safety, 20, 98- 114 p, 1990

AMBROZEVICIUS, A.P., BRANDIMARTE, A.L. **Implicações do uso da Ecotoxicologia na avaliação da qualidade de ambientes aquáticos.** Safety, Health and Environmental World Congress, 179–181 p, 2009

AMÉRICO, J.H.P., MESSIAS, T.G., TORRES, N.H., AMÉRICO, G.H.P. **Desreguladores endócrinos no ambiente e seus efeitos na biota e saúde humana.** Pesticidas: r. Ecotoxicol. e Meio Ambiente, 22, 17-34 p, 2012

ANWAY, M.D., CUPP, A.S., UZUMCU, M., SKINNER, M.K. **Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility.** Science, 308, 1455-1469 p, 2005

AQUILINO, M., SÁNCHEZ-ARQUÉLLO, P., NOVO, M., MARTÍNEZ-GUITARTE, J.L. **Effects on tadpole snail gene expression after exposure to vinclozolin.** Ecotoxicology and Environmental Safety, 170, 568–577 p, 2019

ARMSTRONG, B.M., LAZORCHAK, J.M., JENSEN, K.M., HARING, H.J., SMITH, M.E., FLICK, R.W., BENCIC, D.C., BIALE, A.D. **Reproductive effects in fathead minnows (*Pimphales promelas*) following a 21 d exposure to 17 α -ethinylestradiol.** Chemosphere, 144, 366–373 p, 2016

AVAR, P., ZRÍNY, Z., MAÁSZ, G., TAKÁTSY, A., LOVAS, S., G.-TÓTH, L., PIRGER, Z. **β -estradiol and ethinyl-estradiol contamination in the rivers of the Carpathian Basin.** Environ. Sci. Pollut. Res., 23, 11630–11638 p, 2016

BALINA, K.; BALODE, M.; MUZIKANTE, L.; BLUMBERGA, D. **Impact of synthetic hormone 17 α -ethinylestradiol on growth of microalgae *Desmodesmus communis*.** Agron. Res., 13: 2, 445-454 p, 2015

BARATA, C., BAIRD, D.J., NOGUEIRA, A.J.A., SOARES, A.M.V.M., RIVA, M.C. **Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus.** Implications for multi-substance risks assessment. Aquatic Toxicology, 78, 1–14p, 2006

BARBOSA, M.O., RIBEIRO, A.R., RATOLA, N., HAIN, E., HOMEM, V., PEREIRO, M.F.R., BLANEY, L., SILVA, A.M.T. **Spatial and seasonal occurrence of micropollutants in four Portuguese rivers and a case study for fluorescence excitation-emission matrices.** Science of the Total Environment, 644, 1128–1140 p, 2018

BARONTI, C., CURINI, R., D' ASCENZO, G., DI CORCIA, A., GENTILI, A., SAMPERI, R. **Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water.** Environ Sci. Technol., 34: 24, 5059-5066 p, 2000

BAYEN, S., ESTRADA, E.S., JUHEL, G., KIT, L.W., KELLY, B.C. **Pharmaceutically active compounds and endocrine disrupting chemicals in water, sediments and mollusks in mangrove ecosystems from Singapore.** Marine Pollution Bulletin, 109, 716–722 p, 2016

BELHAJ, D., ATHMOUNI, K., FRIKHA, D., KALLEL, M., FEKI, A.E., MAALEJ, S., ZHOU, J.L., AYADI, H. **Biochemical and physiological responses of halophilic nanophytoplankton (*Dunaliella salina*) from exposure to xeno-estrogen 17 α -ethinylestradiol.** Environ. Sci. Pollut. Res., 24, 7392–7402 p, 2017

BILA, D.M., DEZOTTI, M. **Fármacos no Meio Ambiente.** Quim. Nova, 26:4, 523-530 p, 2003

BLISS, C.I. **The toxicity of poisons applied jointly.** Ann. Appl. Biol., 26, 585-615 p, 1939

BLÜTHGEN, N., CASTIGLIONI, S., SUMPTER, J.P., FENT, K. **Effects of low concentrations of the antiprogestin mifepristone (RU486) in adults and embryos of zebrafish (*Danio rerio*): 1. Reproductive and early developmental effects.** Aquatic Toxicology, 144– 145, 83– 95 p, 2013

BOVIER, T.F., ROSSI, S., MITA, D.G., DIGIIO, F.A. **Effects of the synthetic estrogen 17- α -ethinylestradiol on *Drosophila melanogaster*: Dose and gender dependence.** Ecotoxicology and Environmental Safety, 162, 625–632 p, 2018

BRAIN, R.A., ARNIE, J.R., PORCH, J.R., HOSMER, A.J. **Recovery of photosynthesis and growth rate in green, blue-green, and diatom algae after exposure to atrazine.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31:11, 2572–2581 p, 2012

BRASIL. IBAMA – **Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.** Indicadores Ambientais Nacionais. Quantidade de Agrotóxico Comercializado por Classe de Periculosidade Ambiental. Indicador: O12_M12.4_I03. 2017. Disponível em:
https://www.mma.gov.br/images/arquivos/Informacoes_ambientais/ListaDeIndicadores/Quantidade_de_Agrotoxico/FM_Ibama_QuantidadedeAgrotoxico.pdf (Acessado em 18 de maio de 2020).

BRASIL. MMA/IBAMA – Ministério do Meio Ambiente/ Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Portaria Normativa N° 84, de 15 de outubro de 1996**, que estabelece procedimentos a serem adotados junto ao IBAMA, para efeito de registro e avaliação do potencial de periculosidade ambiental - (ppa), de agrotóxicos, seus componentes e afins, segundo definições dispostas nos incisos XX, XXI, XXII, do artigo 2º, do Decreto n° 98.816. 1996. Disponível em:
http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/mma_ibama/1996/prt0084_15_10_1996.html (Acessado em 18 de maio de 2020).

CAJTHAML, T, KŘESINOVÁ, Z., SVOBODOVÁ, K., SIGLER, K., ŘEZANKA, T. **Microbial transformation of synthetic estrogen 17 α -ethinylestradiol.** *Environmental Pollution*, 157, 3325-3335 p, 2009

CALLICOTT, K., HOOPER-BÛI, L. **An investigation of environmental concentrations of atrazine, chlorothalonil, and fipronil in a Mississippi River-influenced marsh in southern Louisiana.** *Microchemical Journal*, 146, 1241–1248 p, 2019

CAPOLUPO, M., DÍAZ-GARDUÑO, B., MARTÍN-DÍAZ, M.L. **The impact of propranolol, 17 α -ethinylestradiol, and gemfibrozil on early life stages of marine organisms: effects and risk assessment.** *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 32196–32209 p, 2018

CARVALHO, F.P. **Pesticides, environment, and food safety.** *Food and Energy Security*, 6:2, 48–60 p, 2017

CASPILLO, N.R., VOLKOVA, K., HALLGREN, S., OLSSON, P.-E., PORSCH-HÄLLSTRÖM, I. **Short-term treatment of adult male zebrafish (*Danio rerio*) with 17 α -ethinyl estradiol affects the transcription of genes involved in development and male sex differentiation.** *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 164, 35–42 p, 2014

CASSEE, F.R., GROTEN, J.P., BLADEREN, P.J., FERON, V.J. **Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures.** *Crit. Rev. Toxicol.*, 28, 73-101 p, 1998

CECCARELLI, I., FIORENZANI, P., SETA, D.D., ALOISI, A.M. **Perinatal 17 α -ethinylestradiol exposure affects formalin-induced responses in middle-aged male (but not female) rats.** *Hormones and Behavior*, 73, 116–124 p, 2015

CHRISTENSEN, F.M. **Pharmaceuticals n the environment** – A human risk? *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 28, 212-221 p, 1998

CLOUZOT, L., MARROT, B., DOUMENQ, P., ROCHE, N. **17 α -Ethinylestradiol: An endocrine disrupter of great concern.** Analytical methods and removal processes applied to water purification. A review. *Environ. Progress*, 27:3, 383-396 p, 2008

COLBY, S.L., ORTMAN, J.M. **Projections of the Size and Composition of the U.S. Population: 2014 to 2060.** Population Estimates and Projections. Current Population Reports. U.S. Department of Commerce, Economics and Statistics Administration, U.S. CENSUS BUREAU, 1-13 p, 2015

CONNON, R.E., GEIST, J., WERNER, I. **Effect-Based Tools for Monitoring and Predicting the Ecotoxicological Effects of Chemicals in the Aquatic Environment.** *Sensors*, 12, 12741-12771 p, 2012

CONTARDO-JARA, V., LORENZ, C., PFLUGMACHER, S., NÜTZMANN, G., KLOAS, W., WIEGAND, C. **Molecular effects and bioaccumulation of levonorgestrel in the non-target organism *Dreissena polymorpha*.** *Environmental Pollution*, 159, 38-44 p, 2011

CORBI, J. J., STRIXINO, S. T., SANTOS, A., DEL GRANDE, M. **Diagnóstico ambiental de metais organoclorados em córregos adjacentes a áreas de cultivo de Cana-de-açúcar (Estado de São Paulo, Brasil).** *Quim. Nova*, 29:1, 61-65 p, 2006

COSTA, C.R., OLIVI, P., BOTTA, C.M.R., ESPINDOLA, E.L.G. **A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e método de avaliação.** *Quim. Nova*, 31:7, 1820-1830 p, 2008

CRIST, E., MORA, C., ENGELMAN, R. **The interaction of human population, food production, and biodiversity protection.** *Science*, 356, 260–264 p, 2017

ČYPAITĖ, A., ŽALTAUSKAITĖ, J., VENCLOVIENĖ, J. **Assessment of chlorophyll-a, chlorophyll-b and growth rate in freshwater green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to cadmium and copper.** The 9th International Conference “Environmental Engineering”, selected papers, Vilnius, Lithuania, 1-7 p, 2014

CZARNY, K., SZCZUKOCKI, D., KRAWCZYK, B., GADZAŁA-KOPCIUCH, R., SKRZYPEK, S. **Toxicity of single steroid hormones and their mixtures toward the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*.** *Journal of Applied Phycology*, 8 p, 2019b

CZARNY, K., SZCZUKOCKI, D., KRAWCZYK, B., SKRZYPEK, S., ZIELIŃSKI, M., GADZAŁA-KOPCIUCH, R. **Toxic effects of single animal hormones and their mixtures on the growth of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus armatus*.** *Chemosphere*, 224, 93-102 p, 2019a

DAUGHTON, C.G., TERNES, T.A. **Pharmaceutical and personal care products in the Environment: agents of subtle change?** Environ. Health Perspectives, Vol. 107, 907-938 p., Supplement 6, 1999

DeCOURTEN, B., CONNON, R.E., BRANDER, S.M. **Direct and indirect parental exposure to endocrine disruptors and elevated temperature influences gene expression across generations in a euryhaline model fish.** PeerJ, 1-22 p, 2019

DeQUATTRO, Z.A., PEISSIG, E.J., ANTKIEWICZ, D.S., LUNDGREN, E.J., HEDMAN, C.J., HEMMING, J.D.C., BARRY, T.P. **Effects of progesterone on reproduction and embryonic development in the fathead minnow (*Pimephales promelas*).** Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 31, No. 4, 851–856 p, 2012

DESBROW, C., ROUTLEDGE, E.J., BRIGHTY, G.C., SUMPTER, J.P., WALDOCK, M. **Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in Vitro Biological Screening.** Environ. Sci. Technol., Vol. 32, N. 11, 1549-1558 p, 1998

DIETRICH, S., PLOESSL, F., BRACHER, F., LAFORSCH, C. **Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna* – A multigenerational study.** Chemosphere, 79, 60-66, 2010

DUSSAULT, E.B., BALAKRISHNAN, V.K., BORGMANN, U., SOLOMON, K.R., SIBLEY, P.K. **Bioaccumulation of the synthetic hormone 17 α -ethinylestradiol in the benthic invertebrates *Chironomus tentans* and *Hyalella Azteca*.** Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol.72, 1635–1641 p, 2009

FABBRI, E. **Pharmaceuticals in the environment: expected and unexpected effects on aquatic fauna.** Ann. N.Y. Acad. Sci., 1-9 p, 2014

FAUST, M., ALTENBURGER, R., BACKHAUS, T., BLANCK, H., BOEDEKER, W., GRAMATICA, P., HAMER, V., SCHOLZE, M., VIGHI, M., GRIMME, L.H. **Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants.** Aquatic Toxicology, 56, 13–32 p, 2001

FENG, L., YANG, G., ZHU, L., XU, J., XU, X., CHEN, Y. **Distribution and Risk Assessment of Endocrine-Disrupting Pesticides in Drinking Water Sources from Agricultural Watershed.** Water Air Soil Pollut, Vol. 227, No. 23, 2016

FERREIRA, A.L.G., LOUREIRO, S., SOARES, A.M.V.M. **Toxicity prediction of binary combinations of cadmium, carbendazim and low dissolved oxygen on *Daphnia magna*.** Aquatic Toxicology, Vol. 89, 28–39 p, 2008

FINGLER, S., MENDAŠ, G., DVORŠČAK, M., STIPIČEVIĆ, S., VASILIC, Ž., DREVENKAR, V. **Herbicide micropollutants in surface, ground and drinking waters within and near the area of Zagreb, Croatia.** Environ. Sci. Pollut. Res., 24, 11017–11030 p, 2017

FREITAS, E.C., PINHEIRO, C., ROCHA, O., LOUREIRO, S. **Can mixtures of cyanotoxins represent a risk to the zooplankton?** The case study of *Daphnia magna* Straus exposed to hepatotoxic and neurotoxic cyanobacterial extracts. *Harmful Algae*, Vol. 31, 143–152 p, 2014

GHISELLI, G., JARDIM, W.F. **Interferentes endócrinos no ambiente.** *Quim. Nova*, Vol. 30, No. 3, 695-706 p, 2007

GILROY, E.A.M., BALAKRISHNAN, V.K., SOLOMON, K.R., SVERKO, E., SIBLEY, P.K. **Behaviour of pharmaceuticals in spiked lake sediments** – Effects and interactions with benthic invertebrates. *Chemosphere*, vol. 86, 578–584 p, 2012

GONZÁLEZ-PÉREZ, B.K., SARMA, S.S.S., CASTELLANOS-PÁEZ, M.E., NANDINI, S. **Multigenerational effects of triclosan on the demography of *Platyonus patulus* and *Brachionus havanaensis* (Rotifera).** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 147, 275–282 p, 2018

GRACIANI, F.S., FERREIRA, G.L.B. **Descarte de medicamentos:** Panorama da logística reversa no Brasil. *Espacios*, Vol. 35, No 5, 11 p, 2014

GRIFFERO, L., ALCÁNTARA-DURÁN, J., ALONSO, C., RODRÍGUEZ-GALLEGO, L., MORENO-GINZÁLEZ, D., GARCIA-REYES, J.F., MOLINA-DÍAZ, A., PÉREZ-PARADA, A. **Basin-scale monitoring and risk assessment of emerging contaminants in South American Atlantic coastal lagoons.** *Science of the Total Environment*, Vol. 697, No. 134058, 2019

HÉNAULT-ETHIER, L. **Backgrounder:** Atrazine: Banned in Europe, Common in Canada. *Canadian Association of Physicians for the Environment (CAPE)*, 1-11 p, 2016

HOOKE, S.E., KROON, F.J., METCALFE, S., GREENFIELD, P.A., MONCUQUET, P., MCGRATH, A., SMITH, R., WARNE, M.S.T.J. TURNER, R.D., MCKEOWN, A., WESTCOTT, D.A. **Global transcriptomic profiling in Barramundi (*Lates calcarifer*) from rivers impacted by differing agricultural land uses.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 36, No. 1, 103–112 p, 2017

HU, S., ZHANG, H., SHEN, G., YUAN, Z., XU, T., JI, R. **Effects of 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol on the embryonic development of the clearhead icefish (*Protosalanx hyalocranius*).** *Chemosphere*, 176, 18-24 p, 2017

HUERTA, B., JAKIMSKA, A., LIORCA, M., RUHÍ, A., MARGOUTIDIS, G., ACUÑA, V., SABATER, S., RODRIGUEZ-MOZAZ, S., BARCELÒ, D. **Development of an extraction and purification method for the determination of multi-class pharmaceuticals and endocrine disruptors in freshwater invertebrates.** *Talanta*, Vol. 132, 373–381 p, 2015

HUERTA, B., RODRIGUEZ-MOZAZ, S., NANNOU, C., NAKIS, L., RUHÍ, A., ACUÑA, V., SABATER, S., BARCELO, D. **Determination of a broad spectrum of pharmaceuticals and endocrine disruptors in biofilm from a wastewater treatment plant-impacted river.** *Science of the Total Environment*, Vol. 540, 241–249 p, 2016

JOHNSON, S.A., FARRINGTON, M.J., MURPHY, C.R., CALDO, P.D., MCALLISTER, L.A., KAUR, S., CHUN, C., ORTEGA, M.T., MARSHALL, B.L., HOFFMANN, F., ELLERSIECK, M.R., SCHENK, A.K., ROSENFELD, C.S. **Multigenerational effects of bisphenol A or ethinyl estradiol exposure on F2 California mice (*Peromyscus californicus*) pup vocalizations.** PlosOne, 1-18 p, 2018

JONKER, M.J., SVENDSEN, C., BEDAUX, J.J.M., BONGERS, M., KAMMENGA, J.E. **Significance testing of synergistic/antagonistic, Dose Level–dependent, or Dose Ratio–dependent effects in mixture Dose–response analysis.** Environmental Toxicology and Chemistry, 24:10, 2701–2713 p, 2005

KOLPIN, D.W., FURLONG, E.T., MEYER, M.T., THURMAN, E.M., ZAUGG, S.D., BARBER, L.B., BUXTON, H.T. **Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance.** Environ. Sci. Technol., Vol. 36, No. 6, 1202-1211 p, 2002

KOVACEVIC, V., SIMPSON, A.J., SIMPSON, M.J. **The concentration of dissolved organic matter impacts the metabolic response in *Daphnia magna* exposed to 17 α -ethynylestradiol and perfluorooctane sulfonate.** Ecotoxicology and Environmental Safety, 170, 468–478 p, 2019

KRIENITZ, L., BOCK, C., NOZAKI, H., WOLF, M. **SSU rRNA gene phylogeny of morphospecies affiliated to the bioassay alga “*Selenastrum capricornutum*” recovered the polyphyletic origin of crescent-shaped chlorophyte.** J. Phycol., Vol. 47, 880–893 p, 2011

KRUSE, N.D., VIDAL, R.A., TREZZI, M.M. **Curvas de resposta e isoblograma como forma de descrever a associação de herbicidas inibidores do Fotossistema II e da Síntese de Carotenoides.** Planta Daninha, Vol. 24, No. 3, 579-587 p, 2006

LAMICHHANE, K., GARCIA, S.N., HUGGETT, D.B., DEANGELIS, D.L., LA POINT, T.W. **Chronic Effects of Carbamazepine on Life-History Strategies of *Ceriodaphnia dubia* in Three Successive Generations.** Arch. Environ. Contam. Toxicol. Vol. 64, 427–438 p, 2013

LAURENSEN, J.P., BLOOM, R.A., PAGE, S., SADRIEH, N. **Ethinyl Estradiol and Other Human Pharmaceutical Estrogens in the Aquatic Environment: A Review of Recent Risk Assessment Data.** The AAPS Journal, V. 16, No 2, 299-310 p, 2014

LIMA, D.R.S., AFONSO, R.J.C.F., LIBÂNIO, M., AQUINO, S.F. **Avaliação da remoção de fármacos e de desreguladores endócrinos em águas de abastecimento por clarificação em escala de bancada.** Quim. Nova, Vol. 37, No 5, 783-788 p, 2014

LOEWE, S., MUISCHNEK, H. **Combined effects I announcement – implements to the problem.** Naunyn-Schmiedebergs. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. Vol 114, 313-326 p, 1926

- LONG, M., STRAND, J., LASSEN, P., KRÜGER, T., DAHLLÖF, I., BOSSI, R., LARSEN, M.M., WIBERG-LARSEN, P., BONEFELD-JØRGENSEN, E.C. **Endocrine-Disrupting Effects of Compounds in Danish Streams.** Arch. Environ. Contam. Toxicol. Vol. 66, 1–18 p, 2014
- LUNA, T.O., PLAUTZ, S.C., SALICE, C.J. **Effects of 17 α -ethynylestradiol, fluoxetine, and the mixture on life history traits and population growth rates in a freshwater gastropod.** Environ. Toxicol. Chem., Vol. 32, No. 12, 2771-2778 p, 2013
- LUNA, T.O., PLAUTZ, S.C., SALICE, C.J. **Chronic Effects of 17 α -Ethinylestradiol, Fluoxetine, and the Mixture on Individual and Population-Level End Points in *Daphnia magna*.** Arch. Environ. Contam. Toxicol. 68, 603–611 p, 2015
- MACHADO, K.C., GRASSI, M.T., VIDAL, C., PESCARA, I.C., JARDIM, W.F., FERNANDES, A.N., SODRÉ, F.F., ALMEIDA, F.V., SANTANA, J.S., CANELA, M.C., NUNES, C.R.O., BICHINHO, K.M., SEVERO, F.J.R. **A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil.** Science of the Total Environment, Vol. 572, 138–146 p, 2016
- MAGALHÃES, P.D.P., FERRÃO FILHO, A.S.F. **A ecotoxicologia como ferramenta do biomonitoramento de ecossistemas aquáticos.** Oecol. Bras. Vol.ed. 12, N. 3, 355-81 p, 2008
- MAHLER, B.J., VAN METRE, P.C., BURLEY, T.E., LOFTIN, K.A., MEYER, M.T., NOWELL, L.H. **Similarities and differences in occurrence and temporal fluctuations in glyphosate and atrazine in small Midwestern streams (USA) during the 2013 growing season.** Science of the Total Environment, 579, 149–158 p, 2017
- MANSANO, A.S., MOREIRA, R.A., DORNFELD, H.C., FREITAS, E.C., VIEIRA, E.M., SARMENTO, H., ROCHA, O., SELEGHIM, M.H.R. **Effects of diuron and carbofuran and their mixtures on the microalgae *Raphidocelis subcapitata*.** Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 142, 312–321 p, 2017
- MARTÍN, J., CAMACHO-MUÑOZ, D., SANTOS, J.L., APARICIO, I., ALONSO, E. **Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: Removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal.** Journal of Hazardous Materials, 239–240, 40–47 p, 2012
- MASIÁ, A., CAMPO, J., NAVARRO-ORTEGA, A., BARCELÓ, D., PICÓ, Y. **Pesticide monitoring in the basin of Llobregat River (Catalonia, Spain) and comparison with historical data.** Science of the Total Environment, 503–504, 58–68 p, 2015
- MATTHIESSEN, P., WHEELER, J.R., WELTJE, L. **A review of the evidence for endocrine disrupting effects of current-use chemicals on wildlife populations.** Critical Reviews in Toxicology, 1-22 p, 2017
- MEDEIROS, M.S., MOREIRA, L.M.F., LOPES, C.C.G.O. **Descarte de medicamentos: programas de recolhimento e novos desafios.** Rev. Cienc. Farm. Básica Apl. Vol. 35, No 4, 651–662 p, 2014

METCALFE, C.D., KOENIG, B.G., BENNIE, D.T., SERVOS, M., TERNES, T.A., HIRSCH, R. **Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22:12, 2872–2880 p, 2003

MOHAMMED, A. **An approach for assessing the suitability of *Ceriodaphnia rigaudii* as an indigenous tropical toxicity test species.** *Toxicological & Environmental Chemistry*, 91:1, 79–86 p, 2009

MOHAMMED, A. **Determining the suitability of *Ceriodaphnia rigaudii* as a toxicity test species.** *WIT Transactions on Ecology and the Environment*, 110, 219-225 p, 2008

MOHAMMED, A. **New Records of Cladocera (Crustacea) for Trinidad, West Indies.** *Living World, Journal of the Trinidad and Tobago Field Naturalists' Club*, 32-35 p, 2004

MONTAGNER, C.C., SODRÉ, F.F., ACAYABA, D., VIDAL, C., CAMPESTRINI, I., LOCATELLI, M.A., PESCARA, I.C., ALBUQUERQUE, A.F., UMBUZEIRO, G.A., JARDIM, W.F. **Ten Years-Snapshot of the Occurrence of Emerging Contaminants in Drinking, Surface and Ground Waters and Wastewaters from São Paulo State, Brazil.** *J. Braz. Chem. Soc.*, 30:3, 614-632 p, 2019

MONTIEL-LEÓN, J.M., DUY, S.V., MUNOZ, G., BOUCHARD, M.F., AMYOT, M., SAUVÉ, S. **Quality survey and spatiotemporal variations of atrazine and desethylatrazine in drinking water in Quebec, Canada.** *Science of the Total Environment*, 671, 578–585 p, 2019

OLIVEIRA, L.L.D., NUNES, B., ANTUNES, S.C., CAMPITELLI-RAMOS, R., ROCHA, O. **Acute and Chronic Effects of Three Pharmaceutical Drugs on the Tropical Freshwater Cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*.** *Water Air Soil Pollut*, Vol. 229, No. 116, 1-18 p, 2018

OMRAN, N.E., SALAMA, W.M. **The endocrine disruptor effect of the herbicides atrazine and glyphosate on *Biomphalaria alexandrina* snails.** *Toxicology and Industrial Health*, 32:4, 656–665 p, 2016

PAL, A., GIN, K.Y.H., LIN, A.Y.C., REINHARD, M. **Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects.** *Science of the Total Environment*, Vol. 408, 6062-6069 p, 2010

PAVLAKI, M.D., PEREIRA, R., LOUREIRO, S., SOARES, A.M.V.M. **Effects of binary mixtures on the life traits of *Daphnia magna*.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 74, 99–110 p, 2011

PASCOE, D., CARROLL, K., KARNTANUT, W., WATTS, M.M. **Toxicity of 17 α -Ethinylestradiol and Bisphenol A to the Freshwater Cnidarian *Hydra vulgaris*.** *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* Vol. 43, 56-63 p, 2002

PÉREZ, J., DOMINGUES, I., SOARES, A.M.V.M., LOUREIRO, S. **Growth rate of *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to herbicides found in surface waters in the Alqueva reservoir (Portugal): a bottom-up approach using binary mixtures.** *Ecotoxicology*, Vol. 20, No. 6, 1167-1175 p, 2011

PICCOLI, C., CREMONESE, C., KOIFMAN, R.J., KOIFMAN, S., FREIRE, C. **Pesticide exposure and thyroid function in an agricultural population in Brazil.** *Environmental Research*, Vol. 151, 389–398 p, 2016

PIMENTEL, M.P., SILVA-JÚNIOR, F.C.G., SANTAELLA, S.T., LOTUFO, L.V.C. **O Uso de *Artemia* sp. como Organismo-Teste para Avaliação da Toxicidade das Águas Residuárias do Beneficiamento da Castanha de Caju Antes e Após Tratamento em Reator Biológico Experimental.** *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, Vol. 6, No 1, 15–22p, 2011

PIVATO, A., RAGA, R., VANIN, S., ROSSI, M. **Assessment of compost quality for its environmentally safe use by means of an ecotoxicological test on a soil organism.** *J. Mater Cycles Wast Manag.* Vol. 16, 763-774 p, 2014

RAND, G.M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment.** 2^a ed. Boca Raton: CRC Press, 1125 p, 1995

REBELO, R.M., CALDAS, E.D. **Avaliação de risco ambiental de ambientes aquáticos afetados pelo uso de agrotóxicos.** *Quim. Nova*, Vol. 37, No 7, 1199-1208 p, 2014

REIS FILHO, R.W., LUVIZOTTO-SANTOS, R., VIEIRA, E.M. **Poluentes emergentes como desreguladores endócrinos.** *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.* Vol. 2, N. 3, 283-288 p, 2007

RELIGIA, P., KATO, Y., FUKUSHIMA, E.O., MATSUURA, T., MURANAKA, T., WATANABE, H. **Atrazine exposed phytoplankton causes the production of non-viable offspring on *Daphnia magna*.** *Marine Environmental Research*, 145, 177–183 p, 2019

REYNOLDS, C. **Ecology of Phytoplankton.** Cambridge University Press, 535 p, 2006

RIBEIRO, F., GALLEGU-URREA, J.A., GOODHEAD, R.M., VAN GESTEL, C.A.M., MOGER, J., SOARES, A.M.V.M., LOUREIRO, S. **Uptake and elimination kinetics of silver nanoparticles and silver nitrate by *Raphidocelis subcapitata*: The influence of silver behavior in solution.** *Nanotoxicology*, Early Online, 1–10 p, 2014

RIOBOO, C., GONZÁLEZ, O., HERRERO, C., CID, A. **Physiological response of freshwater microalga (*Chlorella vulgaris*) to triazine and phenylurea herbicides.** *Aquatic Toxicology*, Vol. 59, 225–235 p, 2002

ROCHA, O., NETO, A.J.G., LIMA, J.C.S., FREITAS, E.C., MIGUEL, M., MANSANO, A.S., MOREIRA, R.A., DAAM, M.A. **Sensitivities of three tropical indigenous freshwater invertebrates to single and mixture exposures of diuron and carbofuran and their commercial formulations.** *Ecotoxicology*, Vol. 27, 834–844 p, 2018

RYALL, K.A., TAN, A.C. **Systems biology approaches for advancing the discovery of effective drug combinations**. Journal of Cheminformatics, Vol. 7, No. 7, 1-15 p, 2015

SALLA, R.F., GAMERO, F.U., RISSOLI, R.Z., DAL-MEDICO, S.E., CASTANHO, L.M., CARVALHO, C.S., SILVA-ZACARIN, E.C.M., KALININ, A.L., ABDALLA, F.C., COSTA, M.J. **Impact of an environmental relevant concentration of 17 α -ethinylestradiol on the cardiac function of bullfrog tadpoles**. Chemosphere, 144, 1862–1868 p, 2016

SANDERSON, J.T., SEINEN, W., GIESY, J.P., VAN DEN BERG, M. **2-Chloro-s-Triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: a novel mechanism for estrogenicity?** Toxicological Sciences, 54, 121–127 p, 2000

SCALA-BENUZZI, M.L., RABA, J., SOLER-ILLIA, G.J.A.A., SCHNEIDER, R.J., MESSINA, G.A. **Novel Electrochemical Paper-Based Immunocapture Assay for the Quantitative Determination of Ethinylestradiol in Water Samples**. Anal. Chem., 90, 4104–4111 p, 2018

SCHWINDT, M., WINKELMAM, D.L., KETELES, K., MURPHY, M., VAJDA, A.M. **An environmental oestrogen disrupts fish population dynamics through direct and transgenerational effects on survival and fecundity**. J. Appl. Ecol., Vol. 51, 582 – 591 p, 2014

SCOGNAMIGLIO, V., ANTONACCI, A., PATROLECCO, L., LAMBREVA, M.D., LITESCU, S.C., GHUGE, S.A., REA, G. **Analytical tools monitoring endocrine disrupting chemicals**. Trends in Analytical Chemistry, Vol. 80, 555–567 p, 2016

SILVA, P., ROCHA, M.J., CRUZEIRO, C., MALHÃO, F., REIS, B., URBATZKA, R., MONTEIRO, R.A.F., ROCHA, E. **Testing the effects of ethinylestradiol and of an environmentally relevant mixture of xenoestrogens as found in the Douro River (Portugal) on the maturation of fish gonads—A stereological study using the zebrafish (*Danio rerio*) as model**. Aquatic Toxicology, 124–125, 1–10 p, 2012

SILVEYRA, G.R., SILVEYRA, P., VATNICK, I., MEDESANI, D.A., RODRÍGUEZ, E.M. **Effects of atrazine on vitellogenesis, steroid levels and lipid peroxidation, in female red swamp crayfish *Procambarus clarkii***. Aquatic Toxicology, 197, 136–142 p, 2018

SODRÉ, F.F., MONTAGNER, C.C., LOCATELLI, M.A.F., JARDIM, W.F. **Ocorrência de Interferentes Endócrinos e Produtos Farmacêuticos em Águas Superficiais da Região de Campinas (SP, Brasil)**. J. Braz. Soc. Ecotoxicol. Vol. 2, No 2, 187-196 p, 2007

SODRÉ, F.F., PESCARA, I.C., MONTAGNER, C.C., JARDIM, W.F. **Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry**. Microchemical Journal, Vol. 96, 92–98 p, 2010

SPOSITO, J.C.V., MONTAGNER, C.C., CASDO, M., NAVARRO-MARTÍN, L., SOLÓRZANO, J.C.J., PIÑA, B., GRISOLIA, A.B. **Emerging contaminants in Brazilian rivers: Occurrence and effects on gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos.** Chemosphere, 209, 696-704 p, 2018

SUMAN, T.Y., RADHIKA RAJASREE, S.R., KIRUBAGARAN, R. **Evaluation of zinc oxide nanoparticles toxicity on marine algae *Chlorella vulgaris* through flow cytometric, cytotoxicity and oxidative stress analysis.** Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 113, 23–30 p, 2015

TIAN, D., MAO, H., LV, H., ZHENG, Y., PENG, C., HOU, S. **Novel two-tiered approach of ecological risk assessment for pesticide mixtures based on joint effects.** Chemosphere, Vol. 192, 362-371 p, 2018

TERNES, T.A., STUMPF, M., MUELLER, J., HABERER, K., WILKEN, R.D., SERVOS, M. **Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I. Investigations in Germany, Canada and Brazil.** The Science of the Total Environment, Vol. 225, No. 1-2, 81-90 p, 1999

TORRES, N.H., AGUIAR, M.M., FERREIRA, L.F.R., AMÉRICO, J.H.P., MACHADO, A.M., CAVALCANTI, E.B., TORNISIELO, V.L. **Detection of hormones in surface and drinking water in Brazil by LC-ESI-MS/MS and ecotoxicological assessment with *Daphnia magna*.** Environ. Monit. Assess. 187:379, 2-13 p, 2015

TUNDISI, J.G., MATSUMURA-TUNDISI, T. **Biodiversity in the Neotropics: ecological, economic and social values.** Braz. J. Biol., Vol. 68, 913-915 p., suppl. 4, 2008

USEPA – United States Environmental Protection Agency. Review of ecological risk assessment methods. 1988. **EPA/230-10-88-041.**

VANDENBERGH, G.F., ADRIAENS, D., VERSLYCKE, T., JANSSENA, C.R. **Effects of 17 α -ethinylestradiol on sexual development of the amphipod *Hyaella azteca*.** Ecotoxicology and Environmental Safety, 54, 216-222 p, 2003

van den HOEK, C., MANN, D.G., JAHNS, H.M. **Algae.** An introduction to phycology. Cambridge University Press, 623 p, 1995

VOISIN, A.-S., FELLOUS, A., EARLEY, R.L., SILVESTRE, F. **Delayed impacts of developmental exposure to 17- α -ethinylestradiol in the self-fertilizing fish *Kryptolebias marmoratus*.** Aquatic Toxicology, 180, 247–257 p, 2016

VOLKOVA, K.; CASPILLO, N.R.; PORSERYD, T.; HALLGREN, S.; DINNETZ, P.; ÖLSEN, H.; HALLSTROM, I.P. **Developmental exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to 17 α -ethinylestradiol affects non-reproductive behavior and fertility as adults, and increases anxiety in unexposed progeny.** Hormones and Behavior, Vol. 73, 30-80 p, 2015

WANG, S., ZHU, Z., HE, J., YUE, X., PAN, J., WANG, Z. **Steroid and phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) in surface water of Bahe River, China: Distribution, bioaccumulation, risk assessment and estrogenic effect on *Hemiculter leucisculus***. *Environmental Pollution*, 243, 103-114 p, 2018

WILKINSON, J.L., HOODA, P.S., SWINDEN, J., BARKER, J., BARTON, S. **Spatial distribution of organic contaminants in three rivers of Southern England bound to suspended particulate material and dissolved in water**. *Science of the Total Environment*, 593–594, 487–497 p, 2017

WITORSCH, R.J. **Endocrine Disruptors: Can Biological Effects and Environmental Risks Be Predicted?** *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Vol. 36, 118–130 p, 2002

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Eds). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos, Editora Rima, 478 p, 2006

ZUO, Y., ZHANG, K., ZHOU, S. **Determination of estrogenic steroids and microbial and photochemical degradation of 17 α -ethinylestradiol (EE2) in lake surface water, a case study**. *Environ. Sci.: Processes Impacts*, Vol. 15, 1529-1535 p, 2013

Efeito do hormônio 17 α -etinilestradiol em um cladócero tropical (*Ceriodaphnia silvestrii*) e um cladócero de região temperada (*Daphnia magna*): uma abordagem intergeracional

Resumo

Fármacos podem ser encontrados no ecossistema aquático, causando diversos efeitos para a biota. Hormônios sintéticos são amplamente utilizados por mulheres como contraceptivo oral e podem agir como desreguladores endócrinos em espécies não-alvo. Nosso estudo teve como objetivo avaliar o efeito do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol (EE₂) na espécie tropical nativa *Ceriodaphnia silvestrii* e na espécie de região temperada *Daphnia magna*, aclimatada em temperatura mais alta (25 °C). Para isso foram realizados testes de toxicidade crônica intergeracional (F₀ e F₁). Os resultados indicaram que a exposição ao hormônio afeta negativamente o tempo desenvolvimento pós embrionário e a reprodução de ambos os cladóceros. Porém, as espécies foram afetadas de forma diferente: EE₂ reduziu significativamente a fecundidade de *D. magna* na primeira geração, mas não na segunda, sugerindo que os neonatas da primeira geração adquiriram resistência ao hormônio. Efeito contrário foi observado para a *C. silvestrii*, que não apresentou efeito na F₀, mas teve a fecundidade reduzida na geração F₁. Este estudo evidencia que os efeitos do EE₂ em uma espécie, necessariamente não representam os efeitos em outra espécie, mesmo que sejam do mesmo grupo taxonômico. A espécie nativa do cladócero foi mais sensível quando comparada com outras espécies, como indicado pela curva de distribuição de sensibilidade das espécies, gerada para o EE₂. Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que mais espécies tropicais nativas precisam ser avaliadas quanto à sensibilidade a contaminantes emergentes, como os hormônios, fármacos, parabenos. Isto é reforçado pelo fato de que, com base no quociente de risco MEC / PNEC, o EE₂ ter sido classificado como composto de alto risco ecológico para as águas doces tropicais.

Palavras-chave: EE₂; toxicidade crônica; contaminantes de preocupação emergente; risco ecológico; cladóceros tropicais

Abstract

Pharmaceutical drugs can reach natural aquatic ecosystems, causing a variety of adverse problems to the biota. Synthetic hormones are used as oral contraceptives worldwide in large scale by women and may act as endocrine disruptors to non-target species. In this study, we aimed to evaluate the effect of the synthetic hormone 17 α -ethinylestradiol (EE₂) on the native tropical species *Ceriodaphnia silvestrii* and on the temperate species *Daphnia magna* acclimated at high temperature (25 °C). To this end, intergenerational (F₀ and F₁) chronic toxicity tests were conducted. Results indicated that the exposure to the hormone adversely affected post-embryonic development time and reproduction of both cladocerans. However, species were affected differently: EE₂ significantly decreased *D. magna* fertility in the first generation, but not in the second, suggesting that neonates from the first generation acquired resistance to this hormone. An opposite effect was observed for *C. silvestrii* to which no significant effect was found in F₀ but with a reduction of fertility of generation F₁. This study evidenced that effects of EE₂ denoted on one species does not necessarily represent its effect on other species, even when from the same taxonomic group. The native cladoceran species was more sensitive when compared to other species as indicated by the species sensitivity distribution curve generated for EE₂. Based on the results obtained it was concluded that more native species need to be evaluated regarding their sensitivity to emergent concern contaminants as the hormones, pharmaceuticals and parabens. This corroborates previous findings that more native tropical species need to be evaluated for their sensitivity to emerging contaminants such as hormones. Based on the MEC / PNEC risk quotient, EE₂ was considered of high ecological risk for tropical fresh waters.

Keywords: EE₂; chronic toxicity; contaminants of emerging concern; environmental risk; tropical cladocerans

1. Introdução

Uma das consequências do desenvolvimento humano tem sido o aumento significativo de composto químicos antropogênicos que são descartados no ecossistema aquático, causando degradação ambiental e risco para a vida aquática (Campanha *et al.*, 2015; Altenburgh *et al.*, 2019). Por muitas décadas, grandes esforços humanos foram dedicados ao desenvolvimento de produtos químicos para manter sua própria saúde, como os medicamentos, ou para atender a muitas outras necessidades dos seres humanos (Américo *et al.*, 2012). No entanto, a presença dos fármacos no ambiente aquático se tornou uma preocupação mundial, pois a quantidade de químicos encontrados no ambiente está aumentando (Aus der Beek *et al.*, 2016). Um grupo desses fármacos, os hormônios sintéticos, podem causar diversos danos na biota aquática, como desmasculinização das gônadas de peixes machos (Caspillo *et al.*, 2014), efeitos adversos na reprodução de invertebrados (por exemplo no anfípoda de água doce *Hyalella azteca*; Van den Bergh *et al.*, 2003), redução da taxa de crescimento e bioacumulação em *Chironomus tentans* and *Hyalella azteca* (Dussault *et al.*, 2008, 2009) e danos no fotossistema de microalga (Balina *et al.*, 2015).

Hormônios sexuais, como os estrogênios naturais ou sintéticos, são bem conhecidos como desreguladores endócrinos (Aris *et al.*, 2014) e podem afetar negativamente organismos, sua prole e, finalmente, populações, incluindo seres humanos, mesmo que tais substâncias sejam encontradas na ordem de ng L^{-1} ou $\mu\text{g L}^{-1}$ (Volkova *et al.*, 2015a, b; Di Nisio e Foresta, 2019). Estrogênios sintéticos são frequentemente usados na formulação de contraceptivos orais (Torres *et al.*, 2015) e liberados no meio ambiente por meio de efluentes domiciliares. Eles podem afetar todos os tipos de animais, desde pequenos invertebrados até grandes vertebrados (Reis Filho *et al.*, 2006). Os estrogênios sintéticos mais utilizados são o etinilestradiol e o mestranol (Lintelmann *et al.*, 2003). Esses hormônios constituem um problema para os ambientes aquáticos, devido a sua resistência à degradação e tendência a adsorver a matéria orgânica, se acumulando nos sedimentos. Podem afetar populações mudando a determinação do sexo, adiando a maturidade sexual e reduzindo a expressão de características sexuais secundárias, agindo como desreguladores endócrinos (Aris *et al.*, 2014). Assim, é necessário avaliar de forma crônica os impactos desses compostos tóxicos no ambiente.

Nesse sentido, estudos intergeracionais são muito relevantes por avaliar o impacto a longo prazo da exposição ao químico (Pane *et al.*, 2004). Sabe-se que organismos em

que a geração parental é previamente exposta pode aumentar a tolerância, se tornando menos sensíveis ao composto. O contrário também pode ser observado, em que ocorre uma diminuição da tolerância (Pane *et al.*, 2004). Em ensaios intergeracionais as respostas podem diferir ao longo das gerações. Van den Bergh *et al.* (2003), por exemplo, observaram que a geração parental (F₀) do anfípoda *Hyaella azteca*, após exposição ao hormônio sintético 17 α -etinilestradiol (EE₂), não foi afetada significativamente, mas a primeira geração filial (F₁) sofreu efeito no desenvolvimento das características sexuais secundárias com diminuição do tamanho do gnatópodo secundário dos machos e presença de células reprodutivas anormais com indicativos de hermafroditismo. Efeitos na reprodução foram encontrados para *Daphnia magna* com diminuição do tamanho do corpo da primípara e do número de neonatas produzidos na geração parental (Dietrich *et al.*, 2010). Entretanto, esses efeitos não foram observados nas seis gerações subsequentes. Os autores acreditam que os organismos podem adquirir resistência ou tolerância ao EE₂ por aclimação ao químico (Dietrich *et al.*, 2010). O efeito estressante do EE₂ em *D. magna* pode ser demonstrado na reprodução sexual (Paland *et al.* 2005).

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do EE₂ em parte do ciclo de vida do cladóceros de região temperada *Daphnia magna* e no de região tropical *Ceriodaphnia silvestrii*, com ênfase na reprodução. Para isto, foram feitos testes de toxicidade crônica intergeracional para determinar o efeito do hormônio em alterações morfológicas, de crescimento e reprodução para ambas as espécies. Os parâmetros reprodutivos incluíram o tempo de geração (tempo para produzir neonatas) e o número de neonatas produzidos por fêmea até a terceira ninhada. A fim de excluir a influência da temperatura em eventuais diferenças nas respostas entre as duas espécies, os testes de toxicidade com a *D. magna* foram realizados a 25 °C, temperatura maior do que a normalmente usada em experimentos com este cladóceros – 20 a 22 °C (OECD, 2012).

2. Materiais e métodos

2.1. Cultivo e manutenção da *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia silvestrii*

A metodologia de cultivo seguiu os procedimentos descritos nos protocolos padronizados para *Daphnia* (OECD, 2012, modificado pela alteração da temperatura, utilizando uma temperatura mais alta - 25°C – na qual a espécie já está aclimatada em

laboratório há mais de 5 anos) e *Ceriodaphnia* (EPA, 2002; ABNT, 2017). O cultivo de *D. magna* e *C. silvestrii* foram mantidos em câmara de incubação (FANEM[®], mod. 347 CDG) com condições controladas de temperatura 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12h claro:12hescuro. *D. magna* foi alimentada com uma concentração de 3×10^5 cel mL⁻¹ (*ad libitum*) da suspensão da alga verde *Raphidocelis subcapitata* cultivada em meio Chu-12 (ABNT, 2018, modificado pela substituição do meio Oligo recomendado pelo protocolo para o meio Chu-12 onde as culturas de algas já estão adaptadas a longo tempo) e, com 1 mL L⁻¹ de aditivo alimentar que consiste em ração fermentada de peixe (TetraMin[®], Brasil) acrescida de levedura. *C. silvestrii* foi alimentada com a suspensão algal de *R. subcapitata* cultivada em meio Chu-12 (ABNT, 2017, 2018) na concentração de 2×10^5 cel mL⁻¹ (*ad libitum*) mais 1 mL L⁻¹ de aditivo alimentar (usado para *D. magna*). A água do cultivo foi renovada três vezes por semana, momento em que era fornecido alimento aos organismos. Antes dos testes crônicos com o hormônio, a saúde fisiológica dos organismos-teste foi checada através de testes de toxicidade aguda com uma substância de referência (dicromato de potássio para *D. magna* – OECD, 2004; e cloreto de sódio para *C. silvestrii*, ABNT, 2017).

2.2. Padrão analítico e solução-teste

EE₂ (pureza $\geq 98\%$, padrão analítico) foi obtido da Sigma Aldrich (CAS: 57-63-6). Por ter baixa solubilidade em água, o hormônio foi dissolvido em metanol 99,5% (Merck, Brasil) e diluído em água reconstituída, preparando uma solução estoque de 2000 µg L⁻¹ para o teste com a *D. magna* e 2500 µg L⁻¹ para o teste com a *C. silvestrii*.

2.3. Teste de toxicidade crônica

Os testes de toxicidade crônica foram realizados de acordo com os protocolos da OECD (2012), ABNT (2017) e EPA (2002), adaptados em relação ao número de réplicas. Os testes foram semi-estáticos com cinco réplicas para cada concentração do hormônio e controles, com um indivíduo em cada réplica. O controle continha apenas água reconstituída, enquanto as soluções-teste foram feitas com a diluição da solução estoque de EE₂ com água reconstituída. Os organismos foram alimentados com suspensão algal (descrita acima) em toda renovação das soluções do teste, que era feita dia sim e dia não

(EPA, 2002; OECD, 2012; ABNT, 2017). Os testes foram mantidos em incubadoras com as mesmas condições de temperatura e fotoperíodo especificados para o cultivo.

O teste intergeracional foi realizado para avaliar o efeito do EE₂ na reprodução da geração parental (F₀) e da primeira geração filial (F₁). Para isso, as concentrações testadas do hormônio foram: 62,5; 125; 250; 500 e 1000 µg L⁻¹, além do controle com água reconstituída e do controle com o solvente metanol (concentração final: 0,005%). A geração F₀ iniciou-se com neonatas com menos de 24 horas e foi finalizado quando todos os indivíduos do controle produziram a terceira ninhada. Os neonatas da terceira ninhada da primeira geração (F₀) foram utilizados para iniciar o teste da segunda geração (F₁). Para isso, neonatas com menos de 24 horas de cada tratamento (controles e tratamentos com a cinco concentrações do teste anterior) foram transferidos para solução teste nova nas mesmas concentrações que eles nasceram do teste com a geração F₀ (Clubbs e Brooks, 2007).

As variáveis abióticas foram mensuradas no início, uma vez na semana e no fim do teste. As variáveis mensuradas incluem pH (Micronal, B371), oxigênio dissolvido (sonda multiparâmetro Hann, HI 9146), dureza (método de CaCO₃ com EDTA, EPA, 1982) e temperatura (sonda multiparâmetro Hanna, HI 9146) para controle com água reconstituída, controle com metanol, menor, média e maior concentração das soluções com hormônio, como recomendado pela OECD (2012) e ABNT (2017).

2.4.Distribuição da sensibilidade das espécies

Para comparar a sensibilidade das duas espécies de cladóceros para o EE₂ com organismos de outras espécies de invertebrados e vertebrados, uma curva de distribuição de sensibilidade das espécies (SSD – Species Sensitivity Distribution) foi construída usando valores de NOEC obtidos no presente estudo com valores correspondentes para outras espécies. Para a comparação, os dados dos outros organismos foram reunidos a partir do banco de dados USEPA ECOTOX (<http://cfpub.epa.gov/ecotox/>) e suplementado com dados da literatura. Foram considerados dados laboratoriais de toxicidade para organismos de água doce, incluindo fitoplâncton, invertebrados e vertebrados com foco na reprodução, NOEC e CE₁₀. Quando uma espécie apresentava mais de um valor, era calculada a média geométrica.

A curva SSD foi plotada utilizando o software ETX 2.0 (Van Vlaardinger *et al.*, 2004). Usando o mesmo software, foi calculado os valores de HC₅ e HC₅₀ (concentração perigosa para 5% e 50% do conjunto de espécies incluídas na SSD, respectivamente) e seus respectivos limites de confiança, baseado na metodologia desenvolvida por Aldenberg e Jaworska (2000). A log-normalidade foi testada com o teste de Anderson-Darling que está incluso no pacote do software ETX.

2.5. Avaliação de risco ecológico

A avaliação preliminar de risco do EE₂ foi realizada com base no quociente de risco (RQ – *Risk Quotient*), que é calculado pela razão entre concentração ambiental prevista ou medida (PEC ou MEC, respectivamente) e a concentração sem efeito previsto (PNEC): $RQ = PEC \text{ ou } MEC / PNEC$. Os valores de $RQ \geq 1$ indicam alto potencial de risco e $RQ < 1$ indicam baixo potencial de risco (Papadakis *et al.*, 2015).

Nesse estudo, foi utilizado o valor da MEC estimado pela literatura para rios brasileiros (valores de outros países podem ser encontrados na Tabela A1 do Apêndice A), pois trabalhamos com um organismo teste nativo tropical (*C. silvestrii*) e um de região temperada (*D. magna*) que foi aclimatado e cultivado em temperatura de 25 °C, por mais de cinco anos. Foram utilizadas as concentrações mínimas e máximas de EE₂ obtidas dos estudos conduzidos em Campinas (Sodré *et al.*, 2007) e Piracicaba (Torres *et al.*, 2015), ambas localizadas no Estado de São Paulo, Brasil.

Os valores de PNEC foram calculados dividindo a média de HC₅ da curva SSD por um fator de avaliação:

$$PNEC = \frac{5\% \text{ SSD (IC 50\%)}}{AF}$$

Onde, IC 50% = intervalo de confiança e AF = fator de avaliação. O valor de AF foi estabelecido em 5, conforme recomendado por TGD (2003). Nesse caso, considerando os poucos valores disponíveis para a toxicidade crônica de EE₂ para todos os grupos taxonômicos, o AF será 5, devido ao valor de incerteza.

2.6. Análise estatística

Os dados para o parâmetro reprodutivo de *D. magna* e *C. silvestrii* foram analisados usando o software SigmaPlot v11.0 (Systat Software Inc., 2008). A normalidade (Shapiro-Wilk) e a homogeneidade dos dados (Levene), bem como as diferenças entre os tratamentos, foram avaliados por análise de variância (ANOVA). Essa análise foi seguida pelo teste de Dunnett, quando os dados atendiam os critérios de normalidade e homocedasticidade. Para os dados que não atendiam a esses requisitos, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn. Em todos os testes estatísticos, foi adotado um nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$).

3. Resultados

3.1. Validação do teste

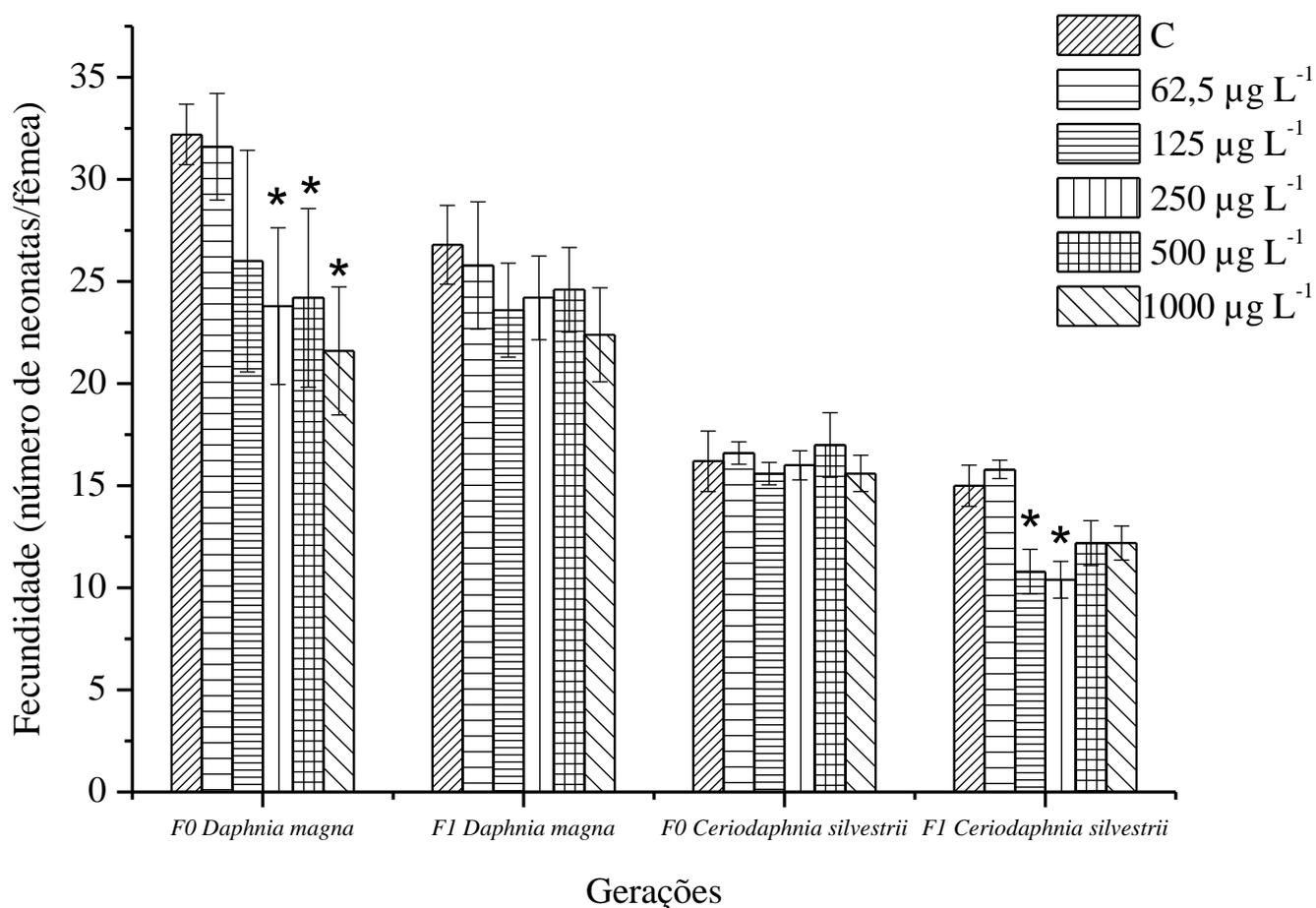
Os valores obtidos para os parâmetros físicos e químicos, medidos durante os testes, permaneceram na faixa recomendada pelas normas técnicas da OCDE (OCDE, 2012), ABNT (ABNT, 2017) e EPA (2002). Nos testes para *D. magna*, o pH variou entre 7,7 e 7,9; oxigênio dissolvido de 4,11 a 8,04 mg L⁻¹; temperatura de 24,0 a 25,6 °C e dureza de 164 a 204 mg de CaCO₃ L⁻¹. Para a *C. silvestrii*, o pH variou de 7,3 a 7,65; oxigênio dissolvido de 7,15 a 8,07 mg L⁻¹; temperatura de 24,4 a 25,5 °C e dureza de 42 a 48 mg de CaCO₃ L⁻¹. No final do teste, a mortalidade de adultos do controle não excedeu 20%, conforme recomendado pelas normas técnicas EPA (2002), OCDE (2012) e ABNT (2017).

3.2. Fecundidade dos cladóceros

O número total de neonatas produzidos até a terceira ninhada pelas fêmeas de *D. magna* e *C. silvestrii*, para ambas gerações, parental (F₀) e segunda geração (F₁), é apresentado na Figura 1. Para *D. magna*, a produção de neonatas da geração F₀ foi significativamente menor em comparação ao controle para populações expostas a 250, 500 e 1000 µg de EE₂ L⁻¹ (One Way ANOVA; $F_{5,24} = 6,957$ $p < 0,001$; teste de Dunnett $p < 0,050$). No entanto, para a geração F₁, não houve diferenças significativas entre *D.*

magna exposta a qualquer um dos tratamentos com os controles EE₂ (Figura 1; One Way ANOVA; $F_{5,24} = 2,266$ $p = 0,080$). Os resultados do teste com a *C. silvestrii* deram resultados diferentes: para a geração F₀, não foram observadas diferenças significativas no número de neonatas produzidos por fêmeas expostas ao EE₂ com as fêmeas do grupo controle (One Way ANOVA; $F_{5,24} = 1,412$ $p = 0,256$). Para a geração F₁, foram encontradas diferenças significativas apenas nas concentrações intermediárias de EE₂ (125 e 250 $\mu\text{g L}^{-1}$), em que o número de neonatas produzidos foi menor que no controle (Figura 1; Kruskal-Wallis; $H = 23,969$ $p < 0,001$; teste de Dunn $p < 0,05$).

Figura 1 - Número de neonatas (média \pm DP) produzidos pelas gerações F₀ e F₁ de *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia silvestrii* expostas ao EE₂ em testes de toxicidade crônica por 12 dias para F₀ e 13 dias para F₁ e após 9 dias de exposição para F₀ e 10 dias para F₁, respectivamente. Asteriscos (*) indicam diferenças significativas entre tratamentos e controle

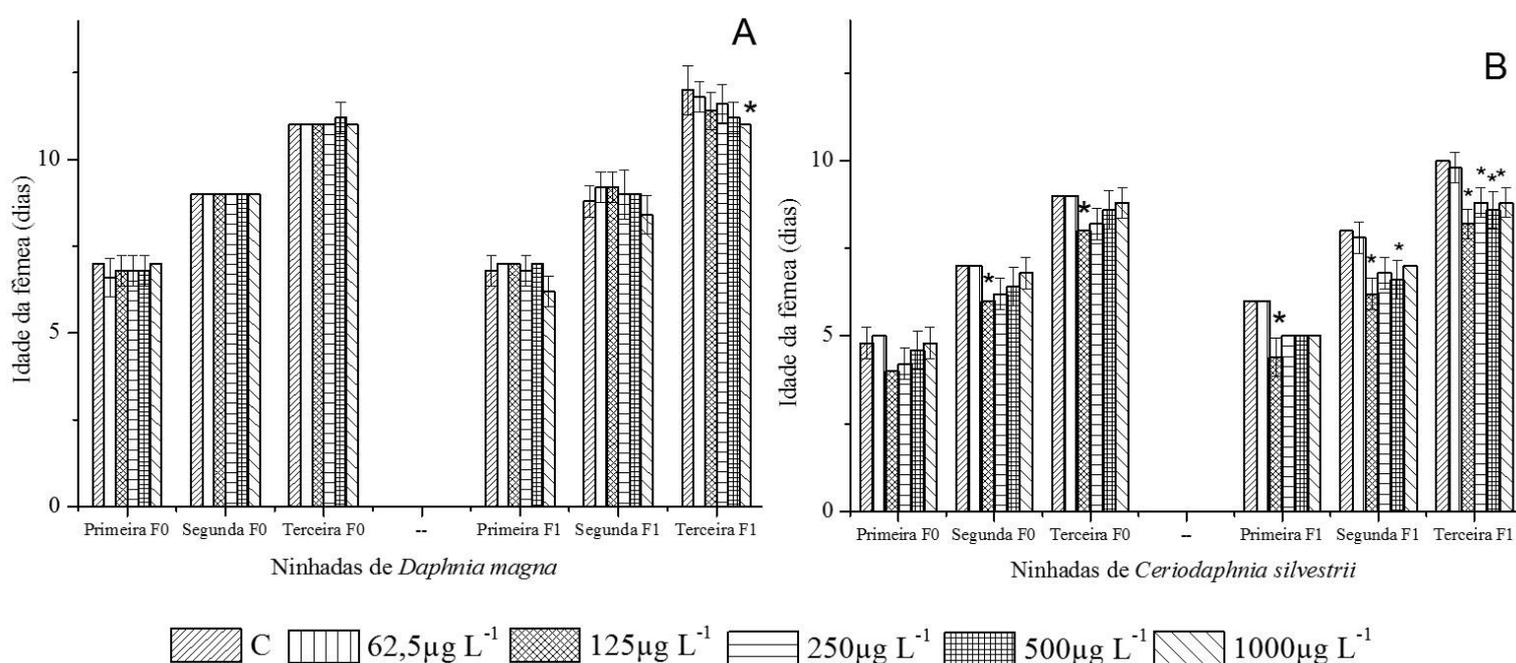


3.3. Tempo de geração

O tempo de geração (de neonata até neonata) da *D. magna* para as três ninhadas das gerações F₀ e F₁ são apresentadas na Figura 2. Exceto para a maior concentração da terceira ninhada da geração F₁ (1000 µg L⁻¹; One Way ANOVA; F_{5,24} = 2,800 *p* = 0,040; teste de Dunnett *p* < 0,050), não foi observado diferença significativa (Figura 2a).

Para a *C. silvestrii*, a F₀ apresentou diferença significativa para a segunda e terceira ninhada, ambos em 125 µg L⁻¹, produzindo neonatas mais rápido que o controle (Kruskal-Wallis, H = 17,977 *p* = 0,003; teste de Dunn *p* < 0,05; Kruskal-Wallis, H = 17,722 *p* = 0,003; teste de Dunn *p* < 0,05). Na geração F₁, diferenças foram observadas para a primeira ninhada em 125 µg L⁻¹ (Kruskal-Wallis, H = 27,017 *p* < 0,001; teste de Dunn *p* < 0,05), para a segunda ninhada em 125 e 500 µg L⁻¹ (Kruskal-Wallis, H = 22,778 *p* < 0,001; teste de Dunn *p* < 0,05) e para a terceira ninhada em 125, 250, 500 e 1000 µg L⁻¹ (Kruskal-Wallis, H = 44,165 *p* < 0,001; teste de Dunn *p* < 0,05) (Figura 2b).

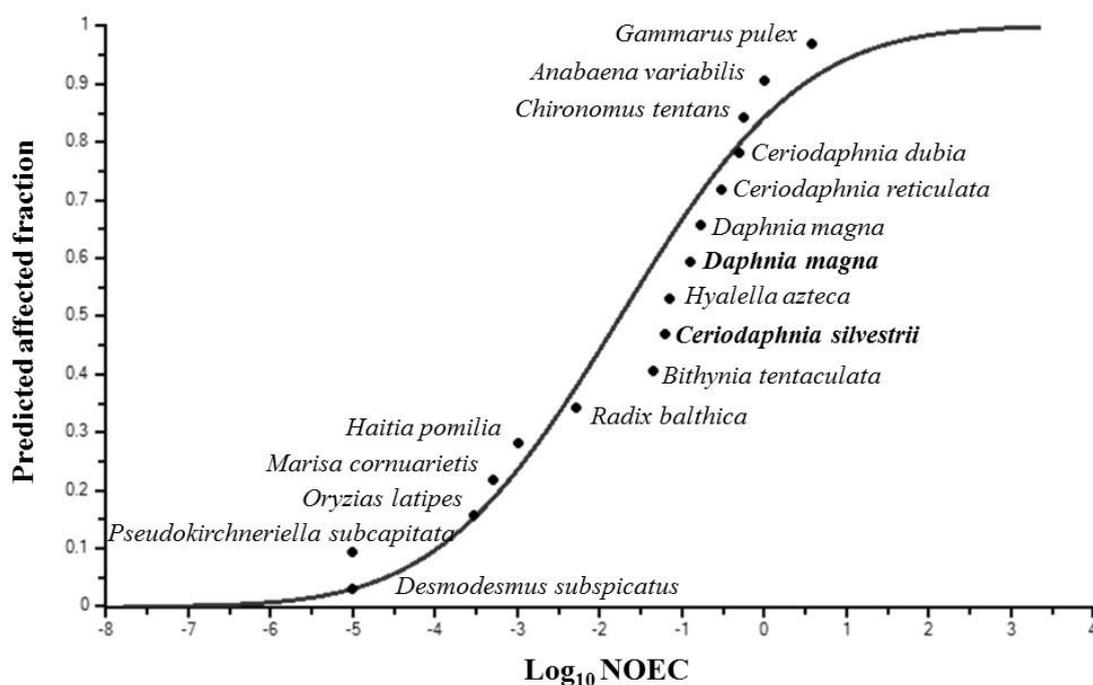
Figura 2 - Tempo de geração (média ± DP) (tempo para o neonata crescer e produzir neonatas - dias) para a geração F₀ e F₁: (A) *Daphnia magna* e (B) *Ceriodaphnia silvestrii*, expostas a uma faixa das concentrações do hormônio etinilestradiol (EE₂) e controle (C). Asteriscos (*) indicam diferenças significativas entre tratamentos e controle



3.4. Comparação da sensibilidade entre espécies e avaliação de risco ecológico

A partir da curva SSD (Figura 3) foi possível deduzir que o cladócer tropical *C. silvestrii* é mais sensível do que todos os outros microcrustáceos, incluindo a *Ceriodaphnia dubia* e *D. magna* (tanto a do nosso estudo – negrito - quanto a de outros estudos – sem negrito), espécies de regiões temperadas e que são amplamente utilizadas como espécies padrão de testes com crustáceos. *C. silvestrii* também foi mais sensível que as larvas aquáticas do inseto *Chironomus tentans*, que é uma espécie comumente utilizada em testes em regiões temperadas. Por outro lado, foi menos sensível que as algas verdes *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Desmodesmus subspicatus*, moluscos e peixes (Figura 3).

Figura 3 - Curva de distribuição de sensibilidade das espécies (SSD), plotada com base nos valores de concentrações de efeitos não observados (NOEC) do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol (EE₂) obtidos experimentalmente para *Ceriodaphnia silvestrii* e *Daphnia magna* (em negrito) e valores da literatura para todas as outras espécies e também incluindo dados de literatura para *Daphnia magna* (não negrito)



Os valores da concentração perigosa de EE₂ que afetam 5% e 50% (HC₅ e HC₅₀, respectivamente) do conjunto de espécies incluídas na SSD são apresentados na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 - Valores médios das concentrações perigosas do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol (EE₂) que afeta 5% (HC₅) e 50% (HC₅₀) de todas as espécies incluídas no SSD (Figura 3) e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95 %)

EE ₂	HC ₅ ($\mu\text{g L}^{-1}$)		HC ₅₀ ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Organismos ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^a	
	HC ₅	IC 95%	HC ₅₀	IC 95%	<i>D. magna</i>	<i>C. silvestrii</i>
NOEC	0,0215	0,000731 – 0,195	17,8	3,1 – 102,7	125	62,5

^a Valores da concentração de efeito não observado (NOEC) para os organismos deste estudo

Os valores de PNEC, MEC e RQ são apresentados na Tabela 1.2. Os valores de PNEC foram obtidos pela divisão do valor de HC₅ por AF (igual a 5) (TGD, 2003). De acordo com os resultados, o EE₂ apresenta um alto risco potencial para a biota de água doce brasileira, porque os valores encontrados de RQ foram superiores a 1, tanto para as concentrações ambientais baixa como para as altas.

Tabela 1.2 - Risco ecológico do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol (EE₂) expresso como Quociente de Risco Ecológico (RQ), com base na concentração perigosa de 5% (HC₅) das espécies na SSD (PNEC - $\mu\text{g L}^{-1}$). MEC1 ($\mu\text{g L}^{-1}$) baseada na concentração ambiental mínima e MEC2 ($\mu\text{g L}^{-1}$) na concentração ambiental máxima; RQ1 (MEC1/PNEC); RQ2 (MEC2/PNEC), medido em rios urbanos brasileiros

Cidades	PNEC	MEC mínima	RQ da MECmin	MEC máxima	RQ da MECmax
Campinas	0,0043	0,006 ^a	1,39	0,31 ^a	72,09
Piracicaba	0,0043	0,024 ^b	5,58	0,48 ^b	111,62

^a Dados de Sodré et al., 2007; ^b Dados de Torres et al., 2015

4. Discussão

4.1. Efeitos do EE₂ na fecundidade

A exposição crônica de *D. magna* ao EE₂ afetou negativamente sua reprodução (fecundidade - número de neonatas por fêmea) na primeira geração (F₀), mas não na segunda (F₁). Por outro lado, a reprodução da espécie tropical *C. silvestrii* não foi afetada em F₀, mas foi afetada em F₁. Clubbs e Brooks (2007) avaliaram a resposta de EE₂, 20-hidroxicdisona, faslodex e testosterona em *D. magna*. Indo de acordo com nosso estudo, eles observaram que o EE₂ diminuiu a fertilidade de F₀ em todas as concentrações testadas (62,5 a 1000 µg L⁻¹) e que houve uma diminuição na fertilidade de F₁ em 1000 µg L⁻¹. Para todos os compostos testados, a geração F₁ não foi afetada tanto quanto a geração F₀, indicando que organismos das gerações seguintes podem adquirir resistência ao contaminante (Clubbs e Brooks, 2007).

Redução no número de neonatas em F₀ e resistência na geração F₁ também foram reportados por Dietrich *et al.* (2010) após a exposição de *D. magna* a quatro medicamentos, entre eles o EE₂. Essa resistência pode ser fisiológica ou genética. Os organismos podem adquirir tolerância a contaminantes por aclimação (evento fisiológico) ou por adaptação genética devido à seleção natural (Klerks e Weis, 1987; Dietrich *et al.*, 2010). A combinação de condições climáticas e contaminantes químicos pode induzir a tolerância das espécies (Moe *et al.*, 2013). No presente estudo, a resistência observada para *D. magna* sugere aclimação ao contaminante. No entanto, é importante notar que nem todos os cladóceros expostos ao EE₂ adquirem resistência nas gerações subsequentes, como verificado em nosso estudo para a *C. silvestrii*.

A reprodução da *C. silvestrii* foi afetada apenas na segunda geração (F₁). Em concordância com isso, Baldwin *et al.* (1995) e Brennan *et al.* (2006) observaram resposta semelhante de *D. magna* após a exposição ao estrogênio dietilsbestrol (DES) (0,2 a 0,5 mg L⁻¹). Nos estudos citados, não houve efeitos na geração F₀, mas houve redução significativa no número de neonatas na segunda geração. Embora os autores não tenham apresentado explicações para esse efeito, eles referenciam Baldwin *et al.* (1995), que verificaram que houve uma diminuição significativa da taxa de eliminação de dois principais metabólitos do hidroxilato de testosterona e um aumento da glicose conjugada, simultaneamente, na *D. magna* exposta ao DES. Portanto, parece possível que a

interrupção endócrina na metabolização da testosterona possa estar ligada à diminuição da fecundidade na segunda geração.

A diminuição da fecundidade nas gerações F₁ (e não na F₀) também foi observada por Borgatta *et al.* (2015), após a exposição de *Daphnia pulex* aos fármacos endoxifeno e 4-hidroxi-tamoxifeno. É possível que a saúde da neonata da geração F₀ tenha sido enfraquecido, nesse caso, tornando-os mais suscetíveis ao EE₂ na geração F₁. Além disso, a maior sensibilidade na F₁ também pode ser explicada pela pré exposição desses organismos ao produto químico nos processos de oogênese e embriogênese (Borgatta *et al.*, 2015). Além da diferença da sensibilidade, outros estudos não observaram diferenças significativas na reprodução de organismos F₀ e F₁ expostos ao EE₂, como é o caso do observado por Luna *et al.* (2013) para o gastrópode *Physa pomilia* e por Hallgren *et al.* (2012) para os gastrópodes *Radix balthica* e *Bithynia tentaculata*. Assim, pode-se concluir que os diferentes efeitos dos produtos químicos entre as gerações F₀ e F₁ são específicos para cada espécie e composto.

4.2. Tempo de geração influenciado pela exposição ao EE₂

O tempo de geração (tempo de neonatas produzirem neonatas – em dia) de *C. silvestrii* foi afetado nas concentrações intermediárias ou maiores de EE₂, nas gerações F₀ e F₁ (Figura 2b). Nas populações afetadas pelo EE₂, as ninhadas foram produzidas em idade mais precoce que o controle, acelerando a maturidade juvenil. O tempo de geração também foi reduzido na terceira ninhada da geração F₁ de *D. magna* após exposição à maior concentração de EE₂ (Figura 2a). Em contraste com o padrão encontrado de aceleração da maturidade no presente estudo, estudos anteriores observaram que o medicamento antiepilético carbamazepina atrasou a maturidade na primeira ninhada de *C. dubia* (Lamichhane *et al.*, 2013) e *D. pulex* (Lürling *et al.*, 2005) O mesmo efeito de atraso foi verificado na geração F₂ de *C. dubia* exposta aos medicamentos prednisolona e dexametasona (Bal *et al.*, 2017).

Quanto à fecundidade, os efeitos do EE₂ no tempo de geração também podem ser bastante variáveis, dependendo da espécie e do composto. Por exemplo, Dietrich *et al.* (2010) observaram que indivíduos de *D. magna* da geração F₀ expostos ao EE₂, atingiram a maturidade mais rapidamente que os do controle, mas que as gerações subsequentes (F₁, F₂, F₃, F₄ e F₅) não foram significativamente afetadas pelo EE₂. Eles também verificaram

que a resposta de *D. magna*, quando exposta a outros compostos (carbamazepina, diclofenaco e metoprolol (isolado e em combinação com EE₂)), diferia da resposta para EE₂, e que as misturas de medicamentos não afetaram o tempo de geração de *D. magna* nas gerações F₃, F₄ e F₅ (Dietrich *et al.*, 2010).

4.3.Sensibilidade ao EE₂ de espécies tropicais versus espécies temperadas

A comparações de sensibilidade entre espécies de regiões temperadas e tropicais demonstraram que não há sensibilidade consistente maior ou menor de espécies de regiões tropicais em comparação com suas contrapartes de regiões temperadas, embora possam ocorrer diferenças dependendo da espécie e do composto avaliado (Daam e Van den Brink, 2010).

Estudos anteriores observaram uma maior sensibilidade da espécie tropical *C. silvestrii* do que algumas espécies de regiões temperadas padronizadas para teste, como *D. magna*. Por exemplo, *C. silvestrii* foi mais sensível que *D. magna* ao acetaminofeno, propranolol e diclofenaco (Oliveira *et al.*, 2018), ao bisfenol e nonilfenol (Spadoto *et al.*, 2017) e ao carbofuran e diuron (Mansano *et al.*, 2016). A partir do presente estudo (ver Figura 3) e dos estudos anteriores citados, pode-se concluir que, devido a aparente alta sensibilidade a vários compostos, a *C. silvestrii* é uma espécie adequada para substituir *D. magna* em avaliações de toxicidade de regiões tropicais. O uso de espécies tropicais (locais) também foi previamente recomendado pelos seguintes motivos: i) faz uma avaliação ecologicamente realista da sensibilidade e do risco potencial da substância; ii) reduz restrições logísticas; e iii) evita o risco de introduzir espécies exóticas (temperadas) no ecossistema (tropical) (Mansano *et al.*, 2016; Rocha, *et al.*, 2018).

5. Conclusão

Nossos resultados demonstraram que as concentrações testadas de EE₂ afetam ambas as espécies, embora de maneiras diferentes, apesar de terem sido cultivadas e aclimatadas às mesmas condições em laboratório.

Os dados de toxicidade obtidos de uma região não podem ser extrapolados para espécies de outra região.

Referências

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera). **ABNT NBR 13373**, 2017

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae). **ABNT NBR 12648**, 2018

ALDENBERG, T, JAWORSKA, JS. **Uncertainty of hazardous concentrations and fraction affected for normal species sensitivity distributions**. Ecotoxicol Environ Saf 46:1-18, 2000

ALTENBURGER, R, BRACK, W, BURGESS, RM, BUSCH, W, ESCHER, BI, FOCKS, A, HEWITT, LM, JABOSEN, BN, ALDA, M., AIT-AISSA, S, BACKHAUS, T, GINEBREDA, A, HILSCHEROVÁ, K, HOLLENDER, J, HOLLERT, H, NEALE, PA, SCHULZE, T, SCHYMANSKI, EL, TEODOROVIC, I, TINDALL, AJ, UMBIZEIRO, GA, VRANA, B, ZONJA, B, KRAUSS, M. **Future water quality monitoring: improving the balance between exposure and toxicity assessments of real-world pollutant mixtures**. Environ Sci Eur 31:1-17, 2019

AMÉRICO, JHP, MESSIAS, TG, TORRES, NH, AMÉRICO, GHP. **Desreguladores endócrinos no ambiente e seus efeitos na biota e saúde humana**. Pesticidas: r Ecotoxicol e Meio Ambiente 22:17-34, 2012

ARIS, AZ, SHAMSUDDIN, AS, PRAVEENA, SM. **Occurrence of 17 α -ethinylestradiol (EE2) in the environment and effect on exposed biota: a review**. Environ Int 69:104–119, 2014

AUS DER BEEK, T, WEBER, FA, BERGMANN, A, HICKMANN, S, EBERT, I, HEIN, A, KÜSTER, A. **Pharmaceuticals in the environment** - Global occurrences and perspectives. Environ Toxicol Chem 35:823–835, 2016

BAL, N, KUMAR, A, DU, J, NUGEGODA, D. **Multigenerational effects of two glucocorticoids (prednisolone and dexamethasone) on life-history parameters of crustacean *Ceriodaphnia dubia* (Cladocera)**. Environ Pollut 225:1-10, 2017

BALDWIN, W, MILAM, DL, LEBLANC, GA. **Physiological and Biochemical perturbations in *Daphnia magna* following exposure to the model environmental estrogen Diethylstilbestrol**. Env Toxicol Chem 14:945-952, 1995

BALINA, K; BALODE, M; MUZIKANTE, L; BLUMBERGA, D. **Impact of synthetic hormone 17 α -ethinylestradiol on growth of microalgae *Desmodesmus communis***. Agron Res 13:445-454, 2015

BORGATTA, M., DECOSTERD, L-A., WARIDEL, P., BUCLIN, T., CHÈVRE, N. **The anticancer drug metabolites endoxifen and 4-hydroxy-tamoxifen induce toxic effects on *Daphnia pulex* in a two-generation study**. Sci Total Environ 520:232–240, 2015

BRENNAN, SJ, BROUGHAM, CA, ROCHE, JJ, FOGARTY, AM. **Multi-generational effects of four selected environmental oestrogens on *Daphnia magna***. Chemosphere 64:49–55, 2006

CAMPANHA, MB, AWAN, AT, SOUSA, DNR, GROSSELI, GM, MOZETO, AA, FADINI, PS. **A 3-year study on occurrence of emerging contaminants in an urban stream of São Paulo State of Southeast Brazil**. Environ Sci Pollut Res 22:7936–7947, 2015

CASPILLO, NR, VOLKOVA, K, HALLGREN, S, OLSSON, PE, PORSCH-HÄLLSTRÖM, I. **Short-term treatment of adult male zebrafish (*Danio Rerio*) with 17 α -ethinyl estradiol affects the transcription of genes involved in development and male sex differentiation**. Comp Biochem Phys Part C 164:35–42, 2014

CLUBBS, RL, BROOKS, BW. ***Daphnia magna* responses to a vertebrate estrogen receptor agonist and an antagonist: A multigenerational study**. Ecotox Environ Safe 67:385–398, 2007

DAAM, MA, VAN DEN BRINK, PJ. **Implications of differences between temperate and tropical freshwater ecosystems for the ecological risk assessment of pesticides**. Ecotoxicology 19:24–37, 2010

DIETRICH, S, PLOESSL, F, BRACHER, F, LAFORSCH, C. **Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna*** – A multigenerational study. Chemosphere 79:60–66, 2010

DI NISIO, A, FORESTA, C. **Water and soil pollution as determinant of water and food quality/contamination and its impact on male fertility**. Reprod Biol Endocrinol 17:1–21, 2019

DUSSAULT, EB, BALAKRISHNAN, VK, BORGMANN, U, SOLOMON, KR, SIBLEY, PK. **Bioaccumulation of the synthetic hormone 17 α -ethinylestradiol in the benthic invertebrates *Chironomus tentans* and *Hyaella Azteca***. Ecotoxi Environ Safe 72:1635–1641, 2009

DUSSAULT, EB, BALAKRISHNAN, VK, SVERKO, E, SOLOMON, KR, SIBLEY, PK. **Toxicity of human pharmaceuticals and personal care products to benthic invertebrates**. Environ Toxicol Chem 27:425–432, 2008

EPA – United States Environmental Protection Agency. **Method 130.2: Hardness, Total (mg/L as CaCO₃) (Titrimetric, EDTA)**, 1982

EPA – United States Environmental Protection Agency. **Method 1002.0: Daphnid, *Ceriodaphnia dubia*, survival and reproduction test; chronic toxicity**. 4th edition (2002) **EPA-821-R-02-013**, 2002

FREITAS, EC, ROCHA, O, ESPÍNDOLA, ELG. **Effects of florfenicol and oxytetracycline on the tropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii***: A mixture toxicity approach to predict the potential risks of antimicrobials for zooplankton. Ecotox Environ Safe 162:663–672, 2018

HALLGREN, P, SORITA, Z, BERGLUND, O, PERSSON, A. **Effects of 17 α -ethynylestradiol on individual life-history parameters and estimated population growth rates of the freshwater gastropods *Radix balthica* and *Bithynia tentaculata*.** *Ecotoxicology* 21:803–810, 2012

KLERKS, PL, WEIS, JS. **Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review.** *Environ Pollut* 45:173-205, 1987

LAMICHHANE, K, GARCIA, SN, HUGGETT, DB, DEANGELIS, DL, LA POINT, TW. **Chronic Effects of Carbamazepine on Life-History Strategies of *Ceriodaphnia dubia* in Three Successive Generations.** *Arch Environ Contam Toxicol* 64:427–438, 2013

LINTELMANN, J, KATAYAMA, A, KURIHARA, N, SHORE, L, WENZEL, A. **Endocrine disruptors in the environment (IUPAC Technical Report).** *Pure Appl Chem* 75:631-681, 2003

LUNA, TO, PLAUTZ, SC, SALICE, CJ. **Effects of 17 α -ethynylestradiol, fluoxetine, and the mixture on life history traits and population growth rates in a freshwater gastropod.** *Environ Toxicol Chem* 32:2771-2778, 2013

LÜRLING, M, SARGANT, E, ROESSINK, I. **Life-History Consequences for *Daphnia pulex* exposed to Pharmaceutical Carbamazepine.** *Environ Toxicol* 21:172-180, 2005

MANSANO, AS, MOREIRA, RA, DORNFELD, HC, DINIZ, LGR, VIEIRA, EM, DAAM, MA, ROCHA, O, SELEGHIM, MHR. **Acute and chronic toxicity of diuron and carbofuran to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*.** *Environ Sci Pollut Res* 25:13335–13346, 2016

MOE, SJ, SCHAMPHELAERE, K, CLEMENTS, WH, SORENSEN, MT, VAN DEN BRINK, PJ, LIESS, M. **Combined and interactive effects of global climate change and toxicants on populations and communities.** *Environ Toxicol Chem* 32:49-61, 2013

OECD Guideline for testing of chemicals (2004) **Guideline 202:** *Daphnia* sp, Acute Immobilisation Test. Adopted April 2004

OECD Guidelines for testing of chemicals (2012) **Guideline 211:** *Daphnia magna* Reproduction Test. Adopted October 2012

OLIVEIRA, LLD, NUNES, B, ANTUNES, SC, CAMPITELLI-RAMOS, R, ROCHA, O. **Acute and Chronic Effects of Three Pharmaceutical Drugs on the Tropical Freshwater Cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*.** *Water Air Soil Pollut* 229:116, 2018

PALAND S, COLBOURNE JK, LYNCH M. **Evolutionary history of contagious asexuality in *Daphnia pulex*.** *Evolution* 59:800-813, 2005

PANE, EF, MCGEER, JC, WOOD, CM. **Effects of chronic waterborne nickel exposure on two successive generations of *Daphnia magna*.** *Environ Toxicol Chem* 23:1051–1056, 2004

PAPADAKIS, EN, TSABOULA, A, KOTOPOULOU, A, KINTZIKOGLU, K, VRYZAS, Z, PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. **Pesticides in the surface waters of Lake Vistonis Basin, Greece: occurrence and environmental risk assessment.** *Sci Total Environ* 536:793-802, 2015

REIS FILHO, RW, ARAÚJO, JC, VIEIRA, EM. **Hormônios sexuais estrógenos: contaminantes bioativos.** *Quim Nova* 29:817-822, 2006

ROCHA, O, NETO, AJG, LIMA, JCS, FREITAS, EC, MIGUEL, M, MANSANO, AS, MOREIRA, RA, DAAM, MA. **Sensitivities of three tropical indigenous freshwater invertebrates to single and mixture exposures of diuron and carbofuran and their commercial formulations.** *Ecotoxicology* 27:834–844, 2018

SODRÉ, FF, MONTAGNER, CC, LOCATELLI, MAF, JARDIM, WF. **Ocorrência de Interferentes Endócrinos e Produtos Farmacêuticos em Águas Superficiais da Região de Campinas (SP, Brasil).** *J Braz Soc Ecotoxicol* 2:187-196, 2007

SPADOTO, M, SUEITT, APE, GALINARO, CA, PINTO, TS, POMPEI, CME, BOTTA, CMR, VIEIRA, EM. **Ecotoxicological effects of bisphenol A and nonylphenol on the freshwater cladocerans *Ceriodaphnia silvestrii* and *Daphnia similis*.** *Drug Chem Toxicol* 41:1-10, 2017

Systat. Systat Software, **Incorporation SigmaPlot for Windows.** Version 11.0, 2008

TGD – **Technical Guidance Document on Risk Assessment.** *In support of:* Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances. Part II European Commission, Joint Research Centre, 2003

TORRES, NH, AGUIAR, MM, FERREIRA, LFR, AMÉRICO, JHP, MACHADO, AM, CAVALCANTI, EB, TORNISIELO, VL. **Detection of hormones in surface and drinking water in Brazil by LC-ESI-MS/MS and ecotoxicological assessment with *Daphnia magna*.** *Environ Monit Assess* 187:2-13, 2015

VAN VLAARDINGEN, P, TRAAS, TP, WINTERSEN, AM, ALDENBERG, T. **ETX 2.0** A program to calculate hazardous concentrations and fraction affected, based on normally distributed toxicity data. RIVM Report No. 601501028/2004. National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, the Netherlands, 2004

VAN DEN BERGH, GF, ADRIAENS, D, VERSLYCKE, T, JANSSENA, CR. **Effects of 17 α -ethinylestradiol on sexual development of the amphipod *Hyaella azteca*.** *Ecotox Environ Safe* 54:216-222, 2003

VOLKOVA, K; CASPILLO, NR; PORSERYD, T; HALLGREN, S; DINNETZ, P; HALLSTROM, IP. **Transgenerational effects of 17 α -ethinylestradiol on anxiety behavior in the guppy, *Poecilia reticulata*.** *Gen Comp Endocrinol* 223:66-72, 2015a

VOLKOVA, K; CASPILLO, NR; PORSERYD, T; HALLGREN, S; DINNETZ, P; ÖLSEN, H; HALLSTROM, IP. **Developmental exposure of zebrafish (*Danio rerio*) to 17 α -ethinylestradiol affects non-reproductive behavior and fertility as adults, and increases anxiety in unexposed progeny.** *Horm Behav* 73:30-80, 2015b

**Efeito do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol e do herbicida atrazina na
microalga *Raphidocelis subcapitata***

Resumo

O uso de compostos químicos vem aumentando com o crescimento populacional e o descarte desses compostos pode causar danos à biota aquática. O herbicida atrazina (ATZ) e o hormônio sintético 17 α -etinilestradiol (EE₂) têm sido encontrados com frequência nos corpos d'água. As microalgas possuem grande importância para o funcionamento dos ecossistemas, constituindo a base da cadeia trófica. Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da ATZ e do EE₂, de forma isolada, na microalga *Raphidocelis subcapitata*, por meio de testes de toxicidade crônica e análises bioquímica. Os resultados mostraram que ambas substâncias afetam a microalga, diminuindo o teor de clorofila *a* (em 1620 e 4860 $\mu\text{g L}^{-1}$ para EE₂ e em 8, 16, 32 e 64 $\mu\text{g L}^{-1}$ para ATZ), diminuindo o rendimento fotossintético da alga na maior concentração do hormônio e em quase todas concentrações da ATZ e afetando a composição das classes lipídicas. A exposição ao EE₂ causou hormesis no crescimento da alga e aumentou o teor de carboidrato nas duas maiores concentrações (1620 e 4860 $\mu\text{g L}^{-1}$) e diminuiu a concentração de lipídios na concentração de 180 $\mu\text{g L}^{-1}$. Já a ATZ, reduziu o crescimento na maior concentração (64 $\mu\text{g L}^{-1}$) e não foi observado efeito significativo quanto ao teor de carboidrato e lipídios totais. Os resultados obtidos neste estudo mostram que mesmo em baixas concentrações, a ATZ e o EE₂ afetam a microalga e esse efeito, a longo prazo, pode alterar afetar negativamente a estrutura e o funcionamento do ecossistema aquático.

Palavras-chave: Fitoplâncton; análise bioquímica; citometria de fluxo; PhytoPam; fármaco; pesticida

Abstract

The use of chemical compounds has been increasing with population growth and its descarte that can cause damage to aquatic biota. The herbicide atrazine (ATZ) and the synthetic hormone 17 α -ethinylestradiol (EE₂) have been found frequently in surface waters. Microalgae is more important to ecosystems, constituting the base of the food chain. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of ATZ and EE₂, in isolated form, on the microalgae *Raphidocelis subcapitata* through chronic toxicity tests and biochemical analysis. The results showed that both compounds affect the microalgae, decreasing the chlorophyll *a* (1620 and 4860 $\mu\text{g L}^{-1}$ for EE₂ and 8, 16, 32 and 64 $\mu\text{g L}^{-1}$ for ATZ), decreasing algal photosynthetic yield in hight EE₂ concentration and in all ATZ concentration and affecting the lipid classes composition. Exposure to EE₂ caused hormesis stimulating growth of algae, increased carbohydrate content in two hight concentration (1620 and 4860 $\mu\text{g L}^{-1}$) and decreased lipid content in 180 $\mu\text{g L}^{-1}$. ATZ, on the other hand, reduced growth in hight concentration (64 $\mu\text{g L}^{-1}$) and there was no significant effect on the content of carbohydrate and total lipids. This study shows that even in low concentrations, ATZ and EE₂ can affect microalgae and this effect, in the long term can alter and damage the structure and functioning of aquatic ecosystems.

Keywords: Phytoplankton; biochemical analysis; flow cytometry; PhytoPam; pharmaceuticals; pesticide

1. Introdução

O uso e descarte de muitos produtos químicos empregados na medicina, agricultura, indústria e em usos domésticos estão levando à percepção de problemas relacionados aos efeitos dos chamados contaminantes de preocupação emergente (fármacos, hormônios e produtos de higiene pessoal) em diferentes níveis de organização do ambiente (Sposito *et al.*, 2018; Aquilino *et al.*, 2019; Griffero *et al.*, 2019). Mesmo em baixas concentrações, o elevado descarte dessas substâncias contribui para a dispersão e acúmulo desses compostos em ambientes aquáticos, ocasionando efeitos prejudiciais nos ecossistemas aquáticos e sobre a saúde humana (Machado *et al.*, 2016; Griffero *et al.*, 2019).

Com o aumento exponencial da população humana e de animais criados para a sua alimentação, a produção agrícola tem tido obrigatoriamente de crescer em escala proporcional, requerendo cada vez mais o uso de compostos para o controle de pragas ou para o crescimento e maturação mais rápida dos produtos agrícolas (Carvalho, 2017; Aquilino *et al.*, 2019; Religia *et al.*, 2019). Os pesticidas ou defensivos agrícolas têm sido amplamente usados (Piccoli *et al.*, 2016; Carvalho, 2017; Tian *et al.*, 2018). Estes incluem muitos grupos de compostos, como os organoclorados, carbamatos, organofosfatos, piretróides, (Feng *et al.*, 2016; Carvalho, 2017) anilinas, amidas e triazinas (Feng *et al.*, 2016).

Griffero *et al.* (2019) registraram 82 contaminantes ocorrendo em concentrações variando de $<0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ até $>10 \mu\text{g L}^{-1}$ na Laguna de Rocha e Laguna de Castillos (Uruguai) e dentre eles, fármacos, hormônio e defensivos agrícolas. Feng *et al.* (2016), reportaram 21 substâncias na água potável na China, entre elas, herbicidas, acaricidas e fungicidas que, mesmo na concentração de ng L^{-1} , foram consideradas sendo de alto risco ecológico.

Os fármacos são continuamente descartados no ambiente através dos esgotos domésticos e industriais e, devido ao descarte contínuo, os organismos aquáticos ficam expostos de maneira crônica a esses compostos podendo apresentar diversas alterações em processos fisiológicos (Lamichhne *et al.*, 2013; Luna *et al.*, 2013; Fabbri, 2014).

Entre os contaminantes registrados em amostras de água, a atrazina (ATZ) e o 17 α -etinilestradiol (EE₂) são identificados com frequência. A atrazina é um herbicida da classe Triazina, sendo o segundo herbicida mais usado no mundo e age inibindo o

transporte de elétrons no fotossistema II, prejudicando a fotossíntese (Religia *et al.*, 2019). Possui a fórmula estrutural $C_8H_{14}ClN_5$, peso molecular de $215,69 \text{ g mol}^{-1}$ (Faust *et al.*, 2001; Brain *et al.*, 2012). O hormônio sintético 17 α -etinilestradiol é derivado do hormônio natural 17 β -estradiol (Avar *et al.*, 2016; Belhaj *et al.*, 2017) e possui fórmula $C_{20}H_{24}O_2$, peso molecular de $296,4 \text{ g mol}^{-1}$ e baixa solubilidade em água (Capolupo *et al.*, 2018).

As análises ou testes ecotoxicológicos são importantes ferramentas desenvolvidas para se avaliar de forma eficiente e rápida os efeitos de diferentes contaminantes sobre os organismos vivos a eles expostos permitindo relacioná-los diretamente com o cenário atual, por conta do aumento e acúmulo de compostos químicos de origem antrópica em ecossistemas aquáticos. (Graciani e Ferreira, 2014). Inúmeros compostos agem como desreguladores endócrinos e são apontados como os de efeitos mais danosos à biota, por comprometerem a reprodução das espécies dentre eles os fármacos e alguns defensivos agrícolas (Reis Filho *et al.*, 2007).

Várias espécies de diferentes níveis tróficos e pertencentes a diferentes comunidades são utilizadas em protocolos experimentais padronizados (Rand, 1995; Costa *et al.*, 2008). Os organismos usados em testes ecotoxicológicos devem possuir relevância e representatividade no tipo de ecossistema a ser estudado. As microalgas, por serem produtores primários, desempenham um papel importante no funcionamento dos ecossistemas aquáticos tanto marinhos como de água doce (Reynolds, 2006; Suman *et al.*, 2015) constituindo a base principal das cadeias tróficas. Alterações na comunidade fitoplanctônica têm reflexos importantes nos demais níveis tróficos afetando tanto a estrutura como o funcionamento dos ecossistemas (Ribeiro *et al.*, 2014).

As algas verdes são assim chamadas por possuírem cloroplastos verdes por causa da clorofila não oculta pelos pigmentos acessórios. Apresentam clorofila *a* e *b* e armazenam amido (van den Hoek *et al.*, 1995). O fotossistema I (PSI) e o fotossistema II (PSII) são componentes do aparelho fotossintético, sendo que o PSII catalisa a transferência de elétrons induzida pela luz através de um complexo pigmento-proteína. Esse fotossistema é composto por polipeptídios que compõem um complexo formado pela clorofila, um sistema de separação de água (complexo de evolução de oxigênio - CEO) e por um centro de reação. Mudanças nesse sistema podem ser ocasionadas pelos efeitos de poluentes (Lombardi e Maldonado, 2011).

Sob condições de estresse, além de impactos no sistema fotossintético, a composição bioquímica das algas pode sofrer mudanças, por meio de alterações na via

metabólica de produção de lipídios e carboidratos, e assim alterando a quantidade destes, e/ou modificando a composição das classes lipídicas. As análises bioquímicas podem complementar os estudos ecotoxicológicos fornecendo informações sobre as respostas bioquímicas e fisiológicas, permitindo também avaliar os mecanismos, locais e formas de ação de contaminantes nas algas (Alho *et al.*, 2019).

Neste contexto o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos do hormônio 17 α -etinilestradiol e do herbicida atrazina sobre a microalga *Raphidocelis subcapitata* usando como *endpoints* alterações na composição bioquímica e na fisiologia desta espécie. Foram analisados efeitos tóxicos no teor de carboidratos, lipídios e clorofila *a*, na composição das classes lipídicas, bem como no crescimento e eficiência fotossintética.

2. Materiais e métodos

2.1. Cultivo do organismo-teste

O inóculo inicial da alga foi obtido de culturas-estoque existentes no Laboratório de Ecotoxicologia localizado no Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos. As culturas de *Raphidocelis subcapitata* foram mantidas em meio CHU-12 (B1, Apêndice B), fotoperíodo 12h claro:12h escuro (período claro sob iluminação de 4000 Lux), temperatura controlada de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e agitação manual (ABNT, 2018), três vezes ao dia. Para os testes de toxicidade, foram utilizadas somente células algais em fase exponencial de crescimento, com 72 horas após terem sido inoculadas o cultivo.

2.2. Compostos químicos e soluções-estoque

O hormônio 17 α -etinilestradiol (pureza $\geq 98\%$) foi da marca Sigma Aldrich (CAS 57-63-6). Por ser pouco solúvel em água, este hormônio foi dissolvido em metanol 99,5% (Merck, Brasil) e diluído em meio de cultivo CHU-12, para uma concentração de $5000 \mu\text{g L}^{-1}$ (solução-estoque).

O herbicida atrazina (pureza $\geq 98\%$) da marca Sigma Aldrich (CAS 1912-24-9). Por ser moderadamente solúvel em água foi também dissolvido em metanol 99,5%

(Merck, Brasil), para uma concentração de 500 mg L⁻¹ (solução-estoque), e, a partir de nova diluição em meio CHU-12, uma segunda solução na concentração de 200 µg L⁻¹.

2.3. Análise química

A análise química das substâncias-teste (ATZ e EE₂) foi feita pelo Instituto de Química na Universidade Estadual de Campinas.

Para o preparo das amostras, as soluções de atrazina e EE₂ foram diluídas na mistura H₂O/MeOH 70:30 v/v, filtradas em filtro de seringa (PTFE 0,22 µm) e transferidas para vials, para posterior análise em Cromatógrafo a Líquido acoplado à Espectrômetro de Massas em tandem (LC-MS/MS). Para a análise e quantificação, foi utilizado um cromatógrafo Agilent (modelo 1200), equipado com injetor automático, bomba binária e comprimento de coluna termostaticado, e a separação cromatográfica foi realizada usando uma coluna Zorbax SB-C18 (2,1x30 mm, tamanho de partícula de 3,5 µm) a 30 °C. A fase móvel constituía de água ultrapura (A) e metanol (B), que foram previamente filtrados em membranas com porosidade de 0,2 µm, contendo, para os compostos que ionizam no modo negativo, 0,01% (v/v) de NH₄OH e, para os compostos que ionizam no modo positivo, 0,01% (v/v) de HCOOH, aditivos esses que favorecem a formação de íons.

Em função da proporção da fase móvel B para o modo negativo, a composição do gradiente foi a seguinte: início com 30% e aumento para 80% em 13 minutos, mantendo essa condição por 1 minuto; para o modo positivo, seguiu-se: início com 30% e aumento para 42% em 3,5 minutos, seguido de aumento para 70% em 8 minutos e, por fim, 80% em 12,5 minutos. Em ambos os modos de ionização, entre cada corrida cromatográfica, o sistema foi mantido a 30% de B por 5 minutos para recondicionamento da coluna.

A identificação e quantificação do composto foi realizada por Espectrometria de Massas em um equipamento Agilent com triplo quadrupolo (modelo 6410B) e o composto foi ionizado, no modo positivo e negativo, em uma fonte de *electrospray* e monitorados pelo modo *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), seguindo os parâmetros da Tabela 2.1. Com a área obtida do composto em função da sua concentração na coluna, foram construídas as curvas analíticas.

Tabela 2.1 - Transições precursor-produto e suas respectivas energias de colisão (EC), selecionadas para a quantificação dos compostos, empregando o modo MRM do espectrômetro de massas

Compostos	Polaridade	Fragmentador (V)	Precursor r (m/z)	Quantificação		Confirmação 1		Confirmação 2	
				m/z	EC (v)	m/z	EC (v)	m/z	EC (v)
ATZ	+	100	216,2	174,1	15	103,9	15	-	-
EE ₂	-	100	295	158,9	30	144,9	30	143	40

2.4. Teste de toxicidade crônica

Os testes seguiram o protocolo padronizado pela Associação Brasileira de Normas Técnicas, ABNT NBR 12648 (ABNT, 2018).

Para os testes de toxicidade crônica foram utilizados Erlenmeyers de vidro com capacidade de 500 mL, os quais continham 300 mL de solução-teste ou meio de cultura sem o contaminante (controle). Foram inoculados, em cada recipiente-teste, uma concentração inicial de alga de 10^5 células mL⁻¹, em triplicata para cada concentração, além de um controle apenas com o meio e um controle com o meio mais o solvente metanol. O teste teve a duração de 72 horas, e foram coletadas amostras diariamente, após agitação manual, em 0, 24, 48 e 72 horas. Alíquotas diárias foram retiradas para análise dos parâmetros fotossintéticos da alga e para contagem da densidade, análise do tamanho celular e de granulosidade. Após 72 horas foram retiradas alíquotas para análise da clorofila *a* e também para análise bioquímica de compostos de reserva de energia (carboidratos, lipídios totais e classes lipídicas).

O teste de toxicidade foi realizado sob as mesmas condições de iluminação, temperatura, agitação e meio de cultivo descrito anteriormente (no item cultivo de organismos-teste). As concentrações utilizadas para o teste de toxicidade do hormônio EE₂ foram: 60, 180, 540, 1620 e 4860 µg L⁻¹ e para o herbicida atrazina foram: 4, 8, 16, 32 e 64 µg L⁻¹.

Antes do teste definitivo, foram feitos testes preliminares com a substância-teste, para se determinar a faixa de concentrações adequadas. Nos testes preliminares, a densidade da alga foi calculada por contagem celular sob microscópio óptico utilizando-

se uma câmara de Neubauer. As amostras foram fixadas com solução de lugol ácido (concentração final 1%) e assim contadas, para determinar o número total de células mL⁻¹ (ABNT, 2018). Para o ensaio definitivo, a contagem das células foi feita por citometria de fluxo.

2.5.Densidade celular

2.5.1 Análise por citometria de fluxo

Para a contagem das células algais por citometria de fluxo, alíquotas das diferentes concentrações do composto tóxico e dos controles, foram recolhidas em criotubos e fixadas imediatamente com formaldeído 10% tamponado com bórax (concentração final de 1%). Os criotubos foram deixados no escuro por um tempo determinado (aproximadamente 10 minutos) em temperatura ambiente e foram armazenados em nitrogênio líquido a -80°C, até a análise. As células algais foram contadas em um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson) equipado com laser de íon-argônio de 15 mW (emissão em 488 nm). Para a análise, foram adicionadas como padrões internos microesferas de carboxilato (Fluoresbrite[®], Polysciences Inc., EUA). A obtenção dos dados foi realizada através do software CellQuest BD e a análise dos citogramas foi obtida utilizando-se o software FlowJo V10. Foram obtidos os valores médios de fluorescência da clorofila *a* (FL3-H), a granulidade celular (SSC-H) e o tamanho celular (FSC-H). Os valores relativos destas variáveis foram calculados dividindo-se os valores médios obtidos para a alga pelo valor médio obtido para as esferas. Esses valores foram expressos em unidade arbitrárias.

2.6.Parâmetros fotossintéticos

2.6.1 Análise por Phytom Pam

Para se analisar a eficiência fotossintética foram retiradas alíquotas do cultivo algal (3 mL) de cada réplica experimental em cada uma das diferentes concentrações e dos controles, nos tempos de 0, 24, 48 e 72 horas. Essas alíquotas foram mantidas no escuro por 15 minutos (para permitir a completa oxidação dos centros de reação do

fotossistema II – PSII) antes de serem analisadas em fluorômetro de pulso de amplitude modulada (Phyto PAM, Walz). A fluorescência inicial (F_0) foi medida com a emissão de luz de baixa intensidade, enquanto que a fluorescência máxima (F_m) foi medida com a emissão de luz saturante. Com esses valores foram calculadas a fluorescência variável (F_v), o rendimento máximo (Φ_M) e a eficiência do CEO, segundo as equações 1, 2 e 3 (Kriedemann *et al.*, 1985; Schreiber, 2004), a seguir:

$$(1) F_v = F_m - F_0$$

$$(2) \Phi_M = F_v/F_m$$

$$(3) \text{Eficiência do CEO} = F_0/F_v.$$

2.6.2 Análise da Concentração de Clorofila *a*

A determinação do teor de clorofila *a* (Chl *a*) seguiu a metodologia descrita por Shoaf e Lium (1976) com a extração baseada na reação do pigmento com dimetilsulfóxido (DMSO). As amostras (tratamentos e controles) foram filtradas (10 mL) em membrana de éster de celulose com tamanho de poro de 0,45 μm . Após 45 minutos no escuro com agitação periódica, a absorbância da amostra foi lida em espectrofotômetro HACH DR500 (HACH Company, Loveland, CO, USA) em 664, 647 e 630 nm e o conteúdo de Chl *a* foi calculado com base na equação descrita em Jeffrey e Humphrey (1975):

Clorofila *a* = [(11,93 x $A_{664\text{nm}}$ - 1,93 x $A_{647\text{nm}}$) x vol. solvente (5 mL)] /volume filtrado (10 mL), Sendo: A = absorbância em cada comprimento de onda; 11,93 = coeficiente de absorção da clorofila *a* no comprimento de onda de 664 nm; 1,93= coeficiente de absorção da clorofila *a* no comprimento de onda de 647 nm.

2.7.Parâmetros bioquímicos

2.7.1 Análise da Concentração de Carboidratos

O teor de carboidratos seguiu a metodologia descrita por Liu et al (1973) baseada na reação de fenol com ácido sulfúrico. Para esse método, 10 mL de amostra do cultivo de algas (tratamento e controles) foram coletados e centrifugados (Eppendorf 5702R,

Alemanha) por 10 minutos a 1500 rpm. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o sedimentado (*pellet* formado) foi ressuspendido em 0,5 mL de água destilada e a ele adicionou-se 1 mL de solução de fenol 10%. Após agitação manual, foram adicionados às amostras 5 mL de ácido sulfúrico concentrado. Decorrido o tempo de 10 minutos em que as amostras ficaram em repouso (em gelo), estas foram centrifugadas a 4400 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para cubetas de vidro para leitura da absorbância em espectrofotômetro, a 485 nm (HACH DR 5000; HACH Company, USA).

Antes de se analisar as amostras, foi feita uma curva de calibração utilizando-se glicose (dextrose anidra) como padrão, preparando-se uma solução estoque de 1 g L^{-1} e soluções diluídas em concentrações variando de 5 a 200 μL (Figura B2, Apêndice B). As soluções de glicose utilizadas para obtenção da curva passaram pelo mesmo processo de reação e centrifugação das amostras.

2.7.2 Lipídios

O método utilizado para a extração de lipídios foi modificado de Folch (1957) descrito em Parrish (1999), no qual foram usados como solventes o clorofórmio e o metanol. De acordo com o método, 200 mL de amostra (tratamentos e controles) foram filtrados a vácuo em filtros de fibra de vidro (previamente calcinados a 400°C por 8 horas) e transferidos para tubos de centrífuga de teflon contendo 4 mL de clorofórmio, 2 mL de metanol e 1 mL de água lavada com clorofórmio (B3, Apêndice B). Os filtros foram macerados e sonicados por 5 minutos utilizando-se um ultrassom de ponta (sonicador UNIQUE, Brasil) sob potência de 99% para rompimento das células algais. Durante todo o processo de extração, para evitar a oxidação e perda de lipídios, as amostras permaneceram no gelo. Após extração, as amostras passaram por centrifugação a 4400 rpm a 0°C por 5 minutos e o sobrenadante foi retirado e transferido para flaconetes de vidro. As amostras passaram três vezes pelo processo de extração e, após todo o processo foram armazenadas a -20°C para posterior análise.

As amostras foram concentradas em rotaevaporador (volume final de 0,5 mL) para a análise. Usando o IatroscanTM, as classes lipídicas e os lipídios totais foram identificados e quantificados por cromatografia de camada delgada com detecção por ionização em chama (TLC/FID) segundo as seguintes condições analíticas: fluxo de ar 2 L min^{-1} , fluxo de hidrogênio de 174 mL min^{-1} e velocidade de leitura de 4 mm s^{-1} . Para otimizar a separação cromatográfica das diversas classes lipídicas, foi feita a combinação de várias

varreduras parciais, fazendo-se uso de diversos solventes. Foram utilizados padrões (Sigma-Aldrich, USA) e as seguintes classes lipídicas foram identificadas e quantificadas: Hidrocarboneto alifático (HC), ácido graxo livre (FFA), triglicerídeos (TAG), éster de cera (WE), álcool alifático livre (ALC), lipídios polares móveis em acetona (AMPL), esterol (ST) e fosfolipídios (PL). Os tempos de retenção das classes foram relacionados à interação entre as fases móvel e estacionária do sistema (Parrish, 1999).

2.8. Análise de dados

Para as análises estatísticas utilizou-se o software SigmaPlot 11.0. Para se testar a normalidade dos dados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk e para se testar a homogeneidade de variâncias, o teste de Levene. Para dados com distribuição normal, foi aplicada uma análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Dunnett. Para distribuição não normal dos dados foi utilizada uma análise de variância não-paramétrica e aplicação do teste de Kruskal-Wallis. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

A CI_{10} e a CI_{20} foram calculadas para os resultados do teste de toxicidade crônica por meio do Software Statistica 7.0 (Statsoft, 2004) utilizando regressão não linear e a curva logística de três parâmetros para hormesis.

3. Resultados

3.1. Análise química

As análises da solução-teste em LC-MS/MS (Tabela 2.2) nos mostra que nos testes de toxicidade crônica com EE_2 e ATZ, a concentração real do composto diferiu em até 20% da concentração nominal, sendo estas utilizadas no teste (ABNT, 2018). O limite de quantificação instrumental para o EE_2 foi de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ e para a ATZ foi de $1 \mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 2.2 - Concentração do composto 17 α -etinilestradiol e atrazina determinados nas amostras

Amostras	Concentração
EE ₂ (5000 $\mu\text{g L}^{-1}$)	4412 $\mu\text{g L}^{-1}$
ATZ (500 mg L ⁻¹)	517,7 mg L ⁻¹
ATZ (200 $\mu\text{g L}^{-1}$)	188,2 $\mu\text{g L}^{-1}$

3.2. Parâmetros fisiológicos

A IC_{10-72h} do EE₂ foi 4855,6 $\mu\text{g L}^{-1}$, e após 72h o hormônio inibiu o crescimento da alga na maior concentração testada, de 4860 $\mu\text{g L}^{-1}$. Porém, foi observada estimulação do crescimento (hormesis) nas concentrações de 60 e 540 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 1a) (ANOVA; $F_{6,14} = 24,904$ $p < 0,001$; teste de Dunnett $p < 0,050$). A densidade da população algal (Figura 2a) foi significativamente diferente estatisticamente da densidade dos controles após 72h, evidenciando os efeitos descritos anteriormente, estimulação do crescimento nas concentrações mais baixas e inibição na concentração mais elevada.

Para a atrazina, a IC₁₀ e a IC_{20-72h} foram respectivamente: $38,26 \pm 10,35$ $\mu\text{g L}^{-1}$ e $54,15 \pm 7,04$ $\mu\text{g L}^{-1}$. Após 72h, a atrazina inibiu o crescimento da alga na maior concentração, 64 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 1b) (ANOVA; $F_{6,14} = 5,392$ $p = 0,004$; teste de Dunnett $p < 0,050$). A densidade da população algal diminuiu significativamente após 48h nas duas concentrações mais altas (32,0 e 64,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) (ANOVA; $F_{6,14} = 15,771$ $p < 0,001$; teste de Dunnett $p < 0,050$) mas após 72h, apenas na mais alta concentração do herbicida (ANOVA; $F_{6,14} = 5,157$ $p = 0,005$; teste de Dunnett $p < 0,050$) (Figura 2b).

Figura 1 - Taxa de crescimento específica (dia^{-1}) de *Raphidocelis subcapitata* exposta (A) ao hormônio EE_2 , (B) e ao herbicida atrazina. Os asteriscos (*) representam valores significativamente diferentes do valor obtido no controle ($p < 0,05$)

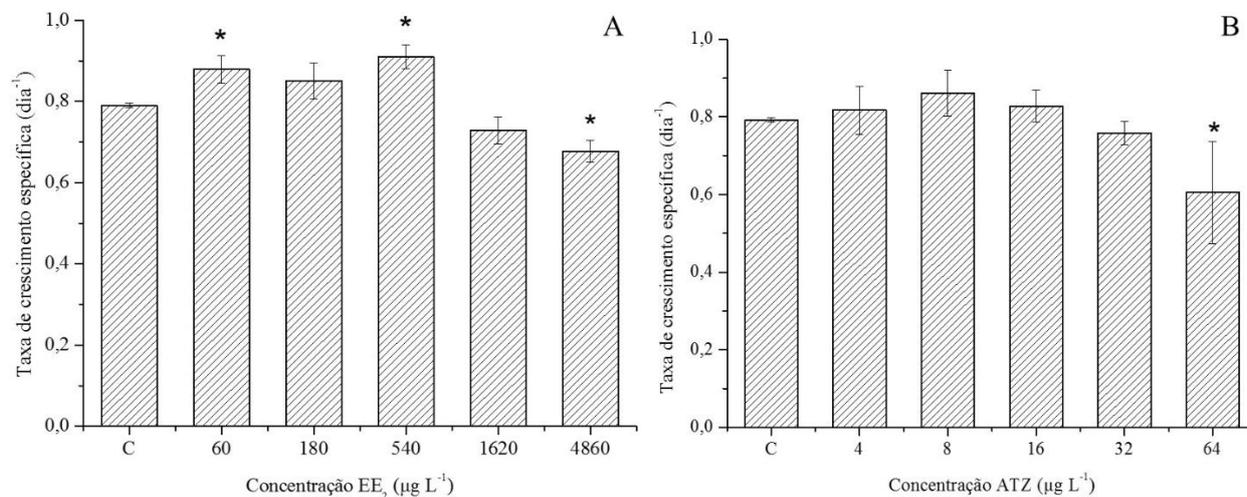
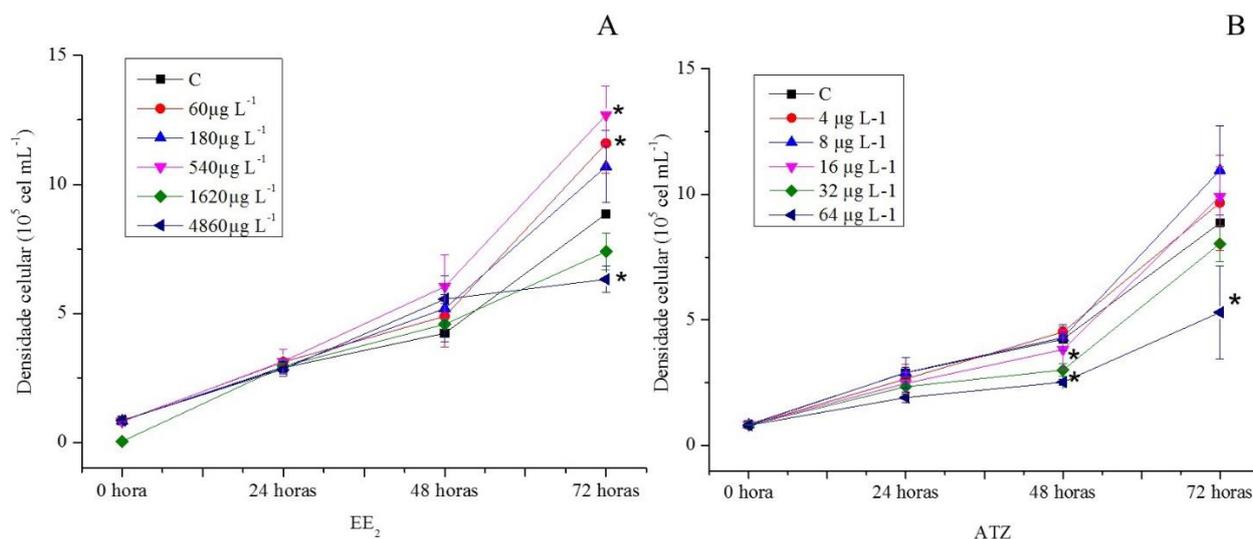


Figura 2 - Curva de crescimento populacional (10^5 cel mL^{-1}) de *Raphidocelis subcapitata* após 72 horas de exposição (A) ao EE_2 , e (B) ao herbicida atrazina. Os asteriscos (*) representam valores significativamente diferentes do controle ($p < 0,05$)



Após 72 horas de exposição ao EE_2 foram observadas alterações nas células de *R. subcapitata*, com redução da granulosidade celular (SSC-H) e da fluorescência da clorofila *a* (FL3-H). A exposição ao hormônio na concentração de $540 \mu\text{g L}^{-1}$ causou a

diminuição significativa da granulosidade celular (ANOVA; $F_{6,14} = 14,908$ $p < 0,001$; teste de Dunnett $p < 0,050$) e redução na fluorescência da clorofila *a* nas células expostas às concentrações de 60 e 540 $\mu\text{g L}^{-1}$ de EE₂ (ANOVA; $F_{6,14} = 9,748$ $p < 0,001$; teste de Dunnett $p < 0,050$). Para o tamanho celular (FSC-H) não ocorreram diferenças significativas (Figura B4, Apêndice B).

Quanto ao efeito da atrazina, não foram observadas diferenças significativas no tamanho celular após 72 horas de exposição. Porém, observou-se diminuição da complexidade na maior concentração testada (64 $\mu\text{g L}^{-1}$ de atrazina) após 48 horas (ANOVA; $F_{6,14} = 4,048$ $p = 0,015$; teste de Dunnett $p < 0,050$) e diminuição da fluorescência da clorofila *a* após 72 horas de exposição na concentração de 8 $\mu\text{g L}^{-1}$ deste herbicida (Kruskal-Wallis; $H = 14,906$ $p = 0,021$) (Figura B5, Apêndice B).

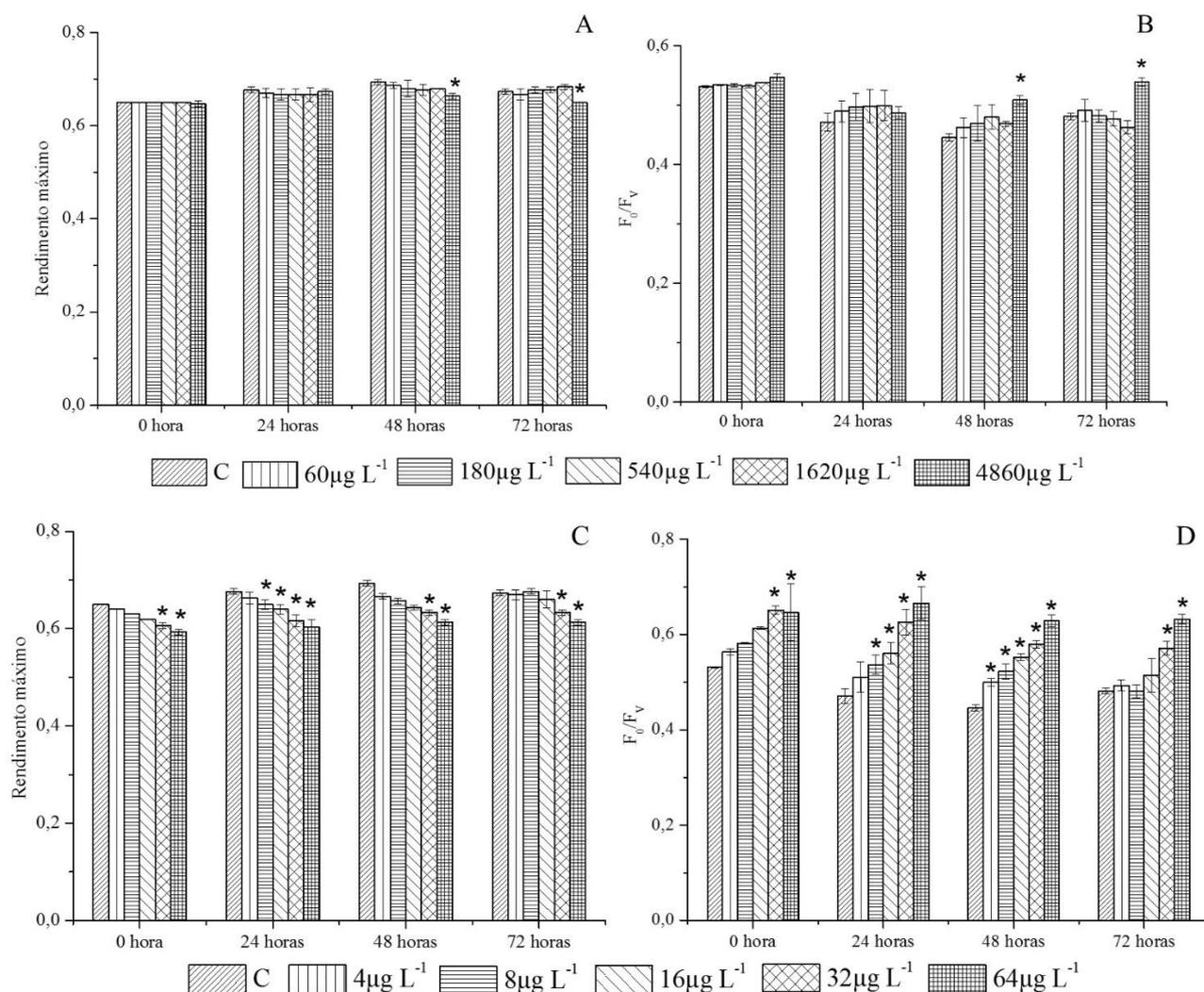
3.3. Parâmetros fotossintéticos

Quando *R. subcapitata* foi exposta ao EE₂ na maior concentração, de (4860,0 $\mu\text{g L}^{-1}$) observou-se efeito negativo sobre o Φ_M , tanto em 48 horas (ANOVA; $F_{6,14} = 3,392$ $p = 0,028$; teste de Dunnett $p < 0,050$) quanto em 72 horas (ANOVA; $F_{6,14} = 12,889$ $p < 0,001$; teste de Dunnett $p < 0,050$), causando, portanto, diminuição do rendimento da alga em comparação com o controle (Figura 3a). Com relação à eficiência do CEO (F_0/F_v), pode-se observar na Figura 3b que o EE₂ afetou o complexo de quebra da molécula de água após 48 horas (ANOVA; $F_{6,14} = 4,694$ $p = 0,008$; teste de Dunnett $p < 0,050$) e também após 72 horas (ANOVA; $F_{6,14} = 18,787$ $p < 0,001$; teste de Dunnett $p < 0,050$). Este efeito pode ser o responsável pelo menor rendimento no crescimento algal nessa concentração. Quanto maior o valor de F_0/F_v , maior a alteração causada pelo composto (Herlory *et al.*, 2013; Alho *et al.*, 2019).

Para o parâmetro Φ_M (Figura 3c), durante todo o período de exposição da alga à ATZ, houve diminuição do rendimento nas maiores concentrações, de 32 e 64 $\mu\text{g L}^{-1}$, desde o início da exposição (0 horas) (Kruskal-Wallis; $H = 19,857$ $p = 0,003$), enquanto em 24 horas este efeito foi significativo em todas as concentrações testadas, de 8, 16, 32 e 64 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ANOVA; $F_{6,14} = 19,107$ $p < 0,001$; teste de Dunnett $p < 0,050$) Contudo, em 48 e 72 horas o efeito significativo só foi mantido nas duas maiores concentrações, de 32 e 64 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Kruskal-Wallis; $H = 18,917$ $p = 0,004$; ANOVA; $F_{6,14} = 25,627$ $p < 0,001$; teste de Dunnett $p < 0,050$).

Com relação à CEO (F_0/F_v), a exposição à ATZ levou a alterações neste parâmetro ao longo das 72 horas de experimento, o que foi acompanhado por valores reduzidos de rendimento máximo (Φ_M) nas mesmas concentrações, com exceção do tempo de 48 horas, no qual nas concentrações de 4, 8 e 16 $\mu\text{g L}^{-1}$ houve alterações no CEO, mas que não causaram redução do rendimento máximo da alga (Figura 3d).

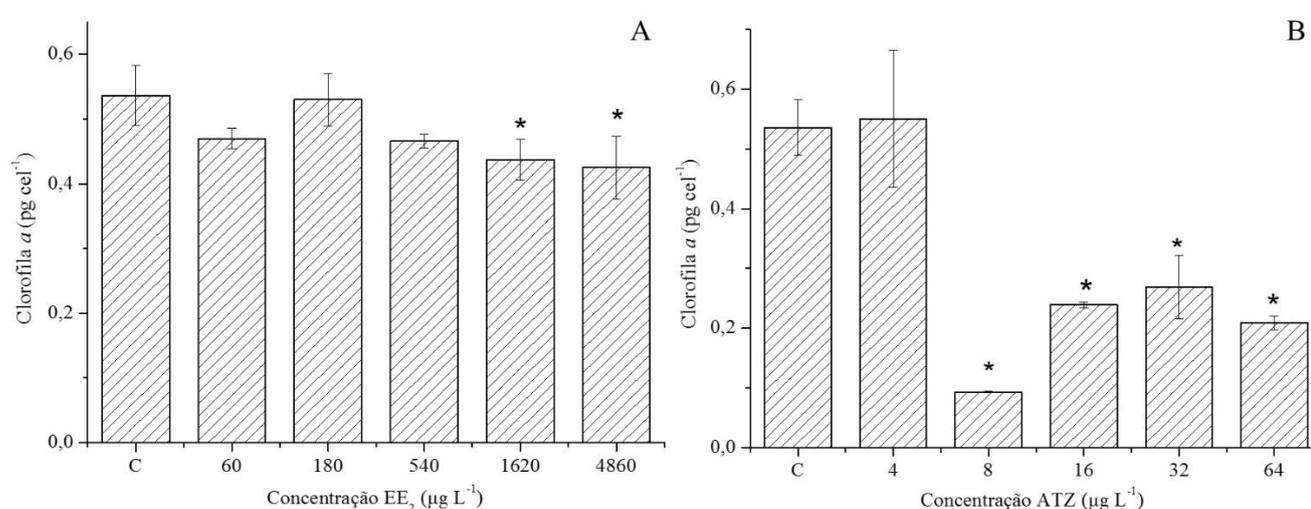
Figura 3 - Parâmetros fotossintéticos (Φ_M e F_0/F_v) da alga *Raphidocelis subcapitata* exposta (A e B) ao hormônio sintético EE₂, (C e D) ao herbicida ATZ. (A e C) rendimento máximo, Φ_M , ao longo de 72 horas de exposição; (B e D) complexo de evolução do oxigênio (F_0/F_v), ao longo de 72 horas de exposição. O asterisco (*) indica diferença significativa em relação ao controle



Com relação à clorofila *a*, foi observada uma diminuição no teor desse pigmento nas duas concentrações mais altas do hormônio EE₂, 1620 e 4860 $\mu\text{g L}^{-1}$

(ANOVA; $F_{6,14} = 4,760$ $p = 0,008$; teste de Dunnett $p < 0,050$) após 72 horas de exposição (Figura 4a). Com a ATZ foi observada uma diminuição da clorofila a em praticamente todas as concentrações (8, 16, 32 e 64 $\mu\text{g L}^{-1}$), com exceção da mais baixa, 4 $\mu\text{g L}^{-1}$, onde não houve diferença significativa quando comparada com o controle (ANOVA; $F_{6,14} = 28,652$ $p < 0,001$; teste de Dunnett $p < 0,050$) (Figura 4b).

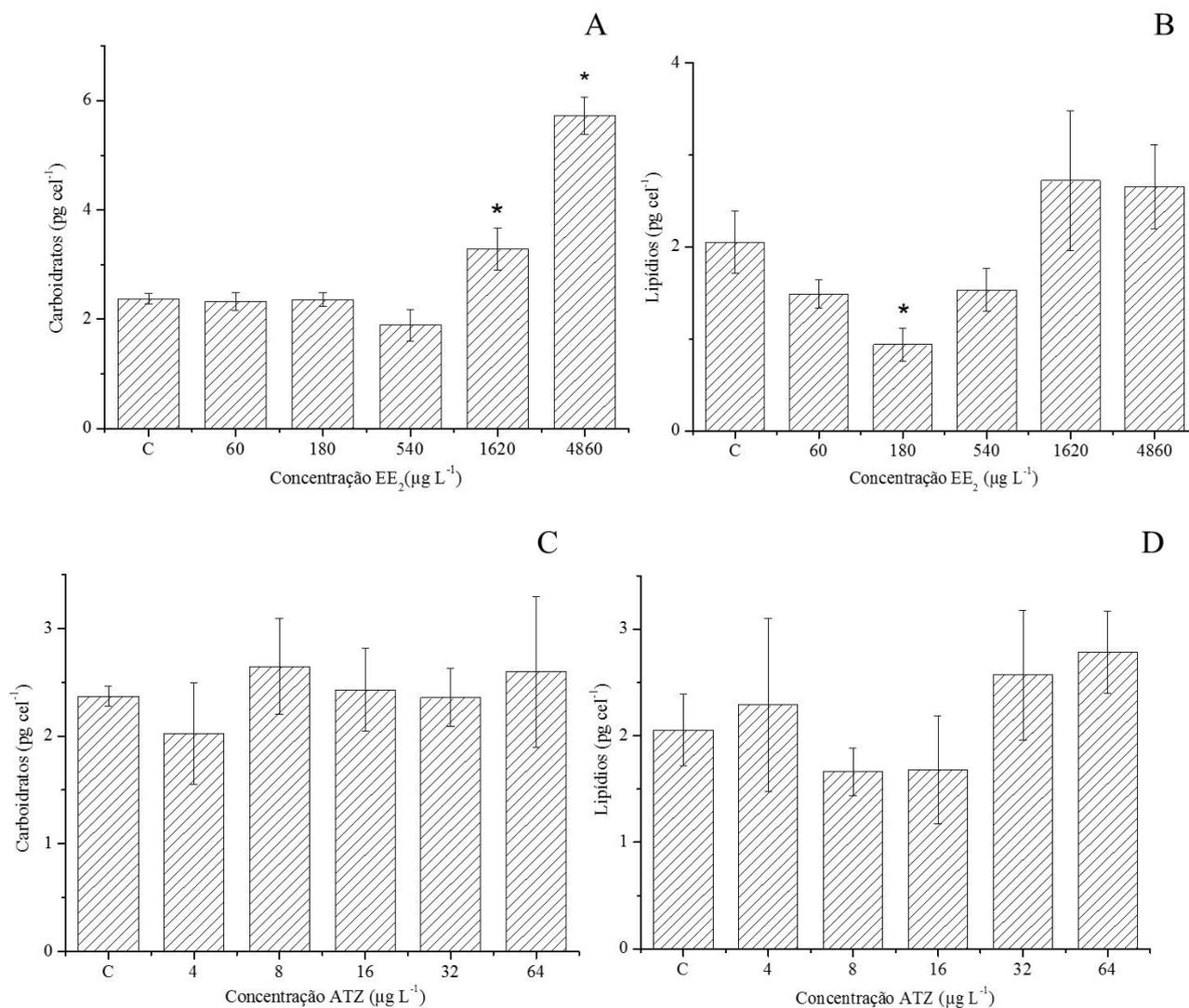
Figura 4 - Teor de clorofila a (pg cel^{-1}) na microalga *Raphidocelis subcapitata* após 72 horas de exposição, (A): ao EE₂ e (B): ao herbicida ATZ. Os asteriscos (*) indicam diferença significativa em relação ao controle



3.4. Composição bioquímica

Após 72 horas, a exposição ao EE₂ levou a um aumento na produção de carboidratos que foram 1,39 e 2,4 vezes respectivamente maiores que a do controle, na alga exposta a 1620 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 4860 $\mu\text{g L}^{-1}$, correspondentes às duas concentrações mais altas (ANOVA; $F_{6,14} = 62,362$ $p < 0,001$; teste de Dunnett $p < 0,050$) (Figura 5a). Em contrapartida, com relação ao teor de lipídios totais foi observada uma diminuição na alga exposta à concentração de 180 $\mu\text{g L}^{-1}$ de EE₂ (ANOVA; $F_{6,14} = 8,551$ $p < 0,001$; teste de Dunnett $p < 0,050$) (Figura 5b). Já para a exposição à ATZ não se verificou nenhuma diferença significativa no teor de carboidratos (Figura 5c) nem de lipídios totais (Figura 5d), quando comparado com o controle.

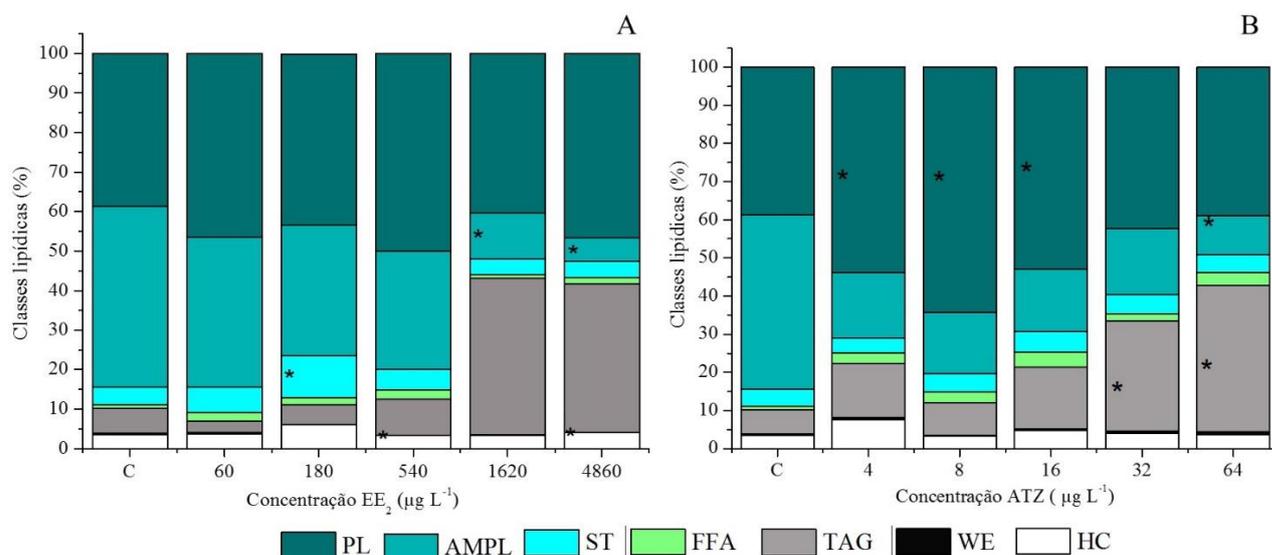
Figura 5 - Composição bioquímica da alga *Raphidocelis subcapitata* após 72 horas de exposição ao EE₂. (A): Teor de carboidrato (pg cel⁻¹), (B): Teor de lipídios (pg cel⁻¹) e após 72h de exposição à ATZ (C): Teor de carboidrato (pg cel⁻¹) e (D): Teor de lipídios (pg cel⁻¹). Os asteriscos (*) indicam diferenças significativas com relação ao controle



A exposição ao hormônio EE₂ afetou a composição das classes lipídicas, levando a uma diminuição nos níveis de WE nas concentrações de 540 e 4860 μg L⁻¹ (ANOVA; $F_{5,12} = 9,992$ $p < 0,001$; teste de Dunnett $p < 0,050$), de AMPL em 1620 e 4860 μg L⁻¹ (Kruskal-Wallis; $H = 18,130$ $p = 0,006$) e ao aumento nos níveis de ST na concentração de 180 μg L⁻¹ (ANOVA; $F_{6,14} = 4,639$ $p = 0,008$; teste de Dunnett $p < 0,050$) (Figura 6a). A exposição ao herbicida também afetou a composição lipídica, induzindo aumento nos níveis de TAG nas concentrações de 32 e 64 μg L⁻¹ (ANOVA; $F_{6,14} = 6,561$ $p = 0,002$;

teste de Dunnett $p < 0,050$), de PL em 4, 8 e 16 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ANOVA; $F_{6,14} = 8,359$ $p < 0,001$; teste de Dunnett $p < 0,050$) e diminuição nos níveis de AMPL na concentração de 64 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Kruskal-Wallis; $H = 14,320$ $p = 0,026$) (Figura 6b).

Figura 6 - Porcentagem da quantidade das classes lipídicas encontradas na microalga *R. subcapitata* após 72 horas de exposição (A) ao EE₂ e (B) a ATZ. As classes lipídicas são: PL (fosfolipídios), AMPL (lipídios polares móveis em acetona), ST (esterol), FFA (ácido graxo livre), TAG (triglicerídeos), WE (éster de cera) e HC (hidrocarboneto alifático). O asterisco (*) indica diferença significativa com relação ao controle



4. Discussão

Em nosso estudo, foi observada a inibição da taxa de crescimento de *R. subcapitata* na maior concentração do hormônio, porém, na primeira e terceira concentração se observa um aumento da taxa de crescimento, indicando um efeito de hormesis. Resultado semelhante também foi encontrado para a alga *Dunaliella salina* também exposta ao etinilestradiol (Belhaj *et al.*, 2017). Nesse caso, foram testadas três concentrações, sendo que nas duas maiores houve inibição do crescimento e na menor concentração foi observado um aumento no crescimento da alga (Belhaj *et al.*, 2017).

Em experimentos sobre o efeito de fitormônios sobre a microclorofíceia *Chlorella vulgaris*, Liu *et al.* (2017) observaram inibição do crescimento nas maiores concentrações e um estímulo de crescimento nas menores, que também corresponderia ao efeito de hormesis. Uma resposta semelhante também foi encontrada por Czarny *et al.* (2019a) para

a cianobactéria *Microcystis aeruginosa* exposta aos hormônios estrona, estriol, etinilestradiol e progesterona.

Resultado diferente foi obtido por Wang *et al.* (2013) com a exposição por sete dias das algas *Selenastrum capricornutum* e *Chlorella* sp aos hormônios estradiol e etinilestradiol, em que não foi observada diferença significativa na densidade celular. Balina *et al.* (2015) observaram que com o aumento da concentração de EE₂ a inibição no crescimento da alga *Desmodesmus communis* era maior, e que em altas concentrações a divisão celular pode cessar, e pode ocorrer dano celular.

A hormesis, que se caracteriza por um aumento no número de organismos nas baixas concentrações e inibição nas altas, pode ocorrer devido ao aumento de algumas enzimas que fazem parte das reações fisiológicas e bioquímicas (Fong e Ford, 2013). Uma outra hipótese seria que a microalga possa degradar o hormônio e absorvê-lo de forma parcial, como um nutriente, e não como um tóxico (Belhaj *et al.*, 2017). Segundo Czarny *et al.* (2019a), no caso das cianobactérias, em baixas concentrações, o hormônio pode ativar funções de reparo e manutenção, fazendo com que as proteínas envolvidas na proteção da célula aumentem sua atividade. Já em altas concentrações, as funções de manutenção e reparo podem ser danificadas, o que explicaria a inibição do crescimento.

Com a atrazina, a inibição na densidade celular também ocorreu na maior concentração, tanto em 48 quanto em 72 horas. A inibição do crescimento foi também observada por Esperanza *et al.* (2015) e por Fernandez-Naveira *et al.* (2016), ambos após a exposição de *Chlamydomonas reinhardtii* à atrazina e, similarmente por Sun *et al.* (2020) para a alga *Chlorella* sp exposta à atrazina, além de Mansano *et al.* (2017) após exposição da cloroficea *Raphidocelis subcapitata* ao herbicida diuron.

Os efeitos causados pelo diuron, no trabalho de Mansano *et al.* (2017), além de fisiológico, foram também morfológicos, aumentando a fluorescência da clorofila *a*, bem como o tamanho e a granulosidade celular. O oposto foi encontrado em nosso trabalho com a atrazina, que não teve o tamanho celular alterado, mas apresentou diminuição da granulosidade celular na concentração mais alta após 48 horas de exposição e diminuição da fluorescência da clorofila *a* em 8 µg L⁻¹ após 72 horas de experimento (Figura B5, Apêndice B). A exposição ao hormônio também não levou à alteração de tamanho celular da alga, e induziu poucas mudanças na granulosidade celular e fluorescência da clorofila *a* (Figura B4, Apêndice B).

A clorofila, que desempenha um papel fundamental na fotossíntese, é um importante indicativo da atividade das algas (Czarny *et al.*, 2019a). Em nosso estudo, o

teor de clorofila *a* diminuiu nas duas concentrações mais altas do hormônio e em praticamente todas as concentrações (exceção da mais baixa) do herbicida. Resultado semelhante foi encontrado no estudo de Belhaj *et al.* (2017), em que expôs uma espécie de alga, *D. salina*, de águas salinas ao EE₂ e relacionou a diminuição desse pigmento ao estresse da alga ao contaminante. Czarny *et al.* (2019a) também observou diminuição do teor de clorofila *a* na cianobactéria *M. aeruginosa* exposta a diferentes hormônios, assim como Fernandez-Naveira *et al.* (2016), ao expor *Chlamydomonas reinhardtii* a atrazina, e Chin *et al.* (2019) que expôs várias espécies de alga a atrazina e endosulfan.

Por não ter um sistema endócrino, o hormônio pode afetar crescimento e sistema fotossintético dos organismos fitoplanctônicos. Componentes com grande potencial de bioacumulação e com alta lipofilia, possuem uma partição octanol/água maior que três (Czarny *et al.*, 2019a; Czarny *et al.*, 2019c). No caso do etinilestradiol, essa partição é $K_{ow} = 3, 67$, caracterizando-o como lipofílico (Adeel *et al.*, 2017). Compostos com essa partição mais alta, podem facilmente se misturar na membrana celular, causando danos na célula (Czarny *et al.*, 2019a; Czarny *et al.*, 2019b). O etinilestradiol, segundo Perron e Juneau (2011) pode afetar negativamente o fluxo de energia do fotossistema II, diminuindo sua eficiência máxima e afetando a atividade fotossintética. A redução da eficiência máxima para o transporte de elétrons é explicada através do envolvimento das anidrases carbônicas, localizada no lúmen do tilacóide, que atuam na atividade da enzima de separação de água e na transferência de elétrons para o PSII (Belhaj *et al.*, 2017; Pocock e Falk, 2014).

Alterações na atividade fotossintética foram observadas por Balina *et al.* (2015) para a alga *Desmodesmus communis*, os quais relacionaram a atividade fotossintética com a produção de carbono. Nas maiores concentrações do hormônio EE₂, estes autores observaram diminuição e mesmo interrupção na produção de carbono, com a diminuição da atividade de fotossíntese (Balina *et al.*, 2015). No nosso estudo, *R. subcapitata* exposta ao EE₂ apresentou diminuição do rendimento máximo fotossintético na maior concentração, bem como diminuição no teor de clorofila *a*, evidenciando o efeito negativo deste composto na atividade fotossintética algal.

A redução da clorofila *a* das algas expostas ao herbicida atrazina pode ser explicada pelo modo de ação deste composto. Nesse caso, o principal alvo bioquímico da atrazina é o fotossistema II (PSII), afetando assim a atividade fotossintética (Fernandez-Naveira *et al.*, 2016). A atrazina inibe o transporte fotossintético de elétrons, deslocando a plastoquinona de sua ligação com a proteína D1 do PSII (Fernandez-Naveira *et al.*,

2016; Chin *et al.*, 2019). A inibição da cadeia transportadora de elétrons reduz a conversão de energia luminosa para energia química, diminuindo, portanto, a capacidade fotossintética e podendo, também, inibir o crescimento da alga (Sun *et al.*, 2020). Esse foi o provável modo de ação da ATZ sobre *R. subcapitata* diminuindo o teor de clorofila, o rendimento fotossintético e alterando grandemente a eficiência do CEO.

Em nosso estudo, o teor de carboidrato aumentou nas duas maiores concentrações do hormônio e não apresentou diferença na alga exposta à atrazina. O aumento no teor de carboidratos foi também observado por Belhaj *et al.* (2017) em *D. salina* sob condições desfavoráveis que induziram a degradação de proteínas para fornecimento de aminoácidos a serem utilizados na síntese de proteínas de estresse (reserva de energia) para sustentação do crescimento. A maior síntese de carboidrato pode então ser interpretada como mecanismo de defesa garantindo a sobrevivência e crescimento algal.

Em *Chrorella vulgaris* exposta a fitormônios, houve indução da biossíntese lipídica nas concentrações mais baixas, enquanto nas concentrações mais altas, o conteúdo lipídico não era proeminente (Liu *et al.*, 2017). Nesse caso, alguns fitormônios favorecem o armazenamento de energia na forma de amido ou na forma de lipídio. A indução do teor de lipídio em resposta a um composto tóxico foi observada para *Chrorella sorokiniana* exposta ao ácido indolacético (IAA, pertencente às auxinas) e ao hexanoato de dietil aminietilo (DA-6) por Babu *et al.* (2017); e também para duas algas *Scenedesmus* SDEC-8 e *Chlorella* SDEC-18 expostas ao ácido indol-3-butírico (IBA) e ácido naftilanoacético (NAA) (Yu *et al.*, 2017) Uma resposta diferente foi observada em nosso estudo com EE₂, em que houve diminuição do teor de lipídios totais na segunda menor concentração testada, e ausência de alteração no teor total dessa biomolécula. Já com o herbicida ATZ, não foi observado efeito significativo em nenhuma concentração testada.

Diferente do que foi obtido por Alho *et al.* (2019), que testou o efeito de metais sobre *R. subcapitata*, em nosso estudo o aumento do teor de carboidratos durante a exposição ao hormônio não foi acompanhado pelo aumento da produção de lipídios, sugerindo que a ligação entre a produção de carboidrato com a produção de outros componentes bioquímicos como os lipídios não seja direta.

Em *R. subcapitata*, geralmente AMPL e PL juntos somam mais de 80% dos lipídios totais, sendo elas as classes lipídicas mais abundantes no controle. Em ambas as substâncias estudadas, o AMPL diminuiu mais de 30% em relação ao controle. Essa classe lipídica está relacionada com pigmentos fotossintéticos, e pode conter até 50% de clorofila (Chia *et al.*, 2013; Alho *et al.*, 2019), o que pode explicar a diminuição dessa

classe lipídica, em nosso estudo, relacionada às concentrações em que ocorreu decréscimo do teor de clorofila.

A exposição ao EE₂, além de mudanças no AMPL, diminuiu o WE e aumentou a porcentagem de ST, duas classes lipídicas com baixa representatividade na alga em estudo. A exposição à ATZ, causou aumento nos TAG e no PL. O éster de cera (WE) pode atuar como reserva de energia e o esterol (ST) está relacionado com o mecanismo de proteção e associado à membrana. Os triglicerídeos (TAG) são considerados bons indicadores para avaliação de estresse causado por compostos químicos (Chia *et al.*, 2013) e fosfolipídios (PL) são lipídios polares que estão ligados à integridade da membrana (Chia *et al.*, 2013; Alho *et al.*, 2019).

O aumento de PL e de ST podem aumentar a espessura ou fluidez da membrana, diminuindo o impacto da toxicidade e a internalização do composto (Alho *et al.*, 2019), o TAG geralmente tem sua produção aumentada quando a alga está sob estresse e age como mecanismo de defesa, reorganizando a membrana para a proteção da célula e reparando os danos causados pelo agente estressor (Chia *et al.*, 2013; Alho *et al.*, 2019). Estas podem ter sido as respostas da alga quando exposta tanto ao hormônio quanto ao herbicida. Sendo ambos lipossolúveis, a ligação com a membrana é maior e sua passagem e entrada na célula pode ser mais fácil. Sendo assim, as mudanças nessas classes lipídicas podem indicar uma mudança na conformação da membrana para evitar a internalização do agente tóxico e servir como um mecanismo de desintoxicação, fazendo com que a célula se proteja de maiores danos, sendo esta relação feita também por Rocha *et al.* (2016), em relação a *Selenastrum gracile* exposta ao cobre.

5. Conclusão

Nosso estudo demonstrou que, tanto o EE₂ quanto a ATZ, causam danos na alga *R. subcapitata*. O hormônio causou efeito de hormesis nesta alga, estimulando o crescimento em baixas concentrações e inibindo-o na maior concentração. Já o herbicida, causou diminuição do crescimento algal na maior concentração. Estas respostas também foram reportadas em outros estudos. Em ambas as substâncias testadas, houve diminuição da eficiência da clorofila *a* e, em contrapartida, aumento do complexo de evolução do oxigênio, indicando danos no aparato fotossintético. O hormônio levou a alga a sintetizar mais carboidrato, efeito não observado na alga exposta ao herbicida. Ambos compostos modificaram a composição das classes lipídicas, alterando classes associadas à

membrana, reserva de energia, pigmentos fotossintéticos e estresse da alga. Os compostos ATZ e EE₂, frequentemente encontrados nos corpos d'água, mesmo em baixas concentrações, comprometem a produtividade primária dos sistemas aquáticos. Sendo base de cadeia alimentar, o comprometimento da produtividade do fitoplâncton pode gerar danos futuros para a comunidade aquática, pois gera um desequilíbrio trófico. Com isso, o efeito a longo prazo em microalgas pode afetar adversamente o nível trófico dos produtores primários e alterar a estrutura e o funcionamento do ecossistema aquático contaminado por estes compostos.

Referências

- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (*Chlophyceae*). **ABNT NBR 12648**, 2018
- ADEEL, M., SONG, X., WANG, Y., FRANCIS, D., YANG, Y. **Environmental impact of estrogens on human, animal, and plant life: A critical review**. Environment International, Vol. 99, 107–119 p, 2017
- ALHO, L.O.G., GEBARA, R.C., PAINA, K.A., SARMENTO, H., MELÃO, M.G.G. **Responses of *Raphidocelis subcapitata* exposed to Cd and Pb: Mechanisms of toxicity assessed by multiple endpoints**. Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 169, 950–959 p, 2019
- AQUILINO, M., SÁNCHEZ-ARQUËLLO, P., NOVO, M., MARTÍNEZ-GUITARTE, J.L. **Effects on tadpole snail gene expression after exposure to vinclozolin**. Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 170, 568–577 p, 2019
- AVAR, P., ZRÍNY, Z., MAÁSZ, G., TAKÁTSY, A., LOVAS, S., G.TÓTH, L., PIRGER, Z. **β -estradiol and ethinyl-estradiol contamination in the rivers of the Carpathian Basin**. Environ. Sci. Pollut. Res., Vol. 23, 11630–11638 p, 2016
- BABU, A.G., WU, X., KABRA, A.N., KIM, D.P. **Cultivation of an indigenous *Chlorella sorokiniana* with phytohormones for biomass and lipid production under N-limitation**. Algal Research, Vol. 23, 178–185p, 2017
- BALINA, K.; BALODE, M.; MUZIKANTE, L.; BLUMBERGA, D. **Impact of synthetic hormone 17 α -ethinylestradiol on growth of microalgae *Desmodesmus communis***. Agron. Res. Vol. 13, No. 2, 445-454, 2015
- BELHAJ, D., ATHMOUNI, K., FRIKHA, D., KALLEL, M., FEKI, A.E., MAALEJ, S., ZHOU, J.L., AYADI, H. **Biochemical and physiological responses of halophilic nanophytoplankton (*Dunaliella salina*) from exposure to xeno-estrogen 17 α -ethinylestradiol**. Environ. Sci. Pollut. Res., Vol. 24, 7392–7402 p, 2017
- BRAIN, R.A., ARNIE, J.R., PORCH, J.R., HOSMER, A.J. **Recovery of photosynthesis and growth rate in green, blue–green, and diatom algae after exposure to atrazine**. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 31, No. 11, 2572–2581 p, 2012
- CAPOLUPO, M., DÍAZ-GARDUÑO, B., MARTÍN-DÍAZ, M.L. **The impact of propranolol, 17 α -ethinylestradiol, and gemfibrozil on early life stages of marine organisms: effects and risk assessment**. Environmental Science and Pollution Research, Vol. 25, 32196–32209 p, 2018
- CARVALHO, F.P. **Pesticides, environment, and food safety**. Food and Energy Security, Vol. 6, No. 2, 48–60 p, 2017

CHIA, M.A., LOMBARDI, A.T., MELÃO, M.G.G., PARRISH, C.C. **Lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) as a function of different cadmium and phosphate concentrations.** Aquatic Toxicology, Vol. 128– 129, 171– 182p, 2013

CHIN, Y.Y., CHU, W.L., KOKKK, Y.Y., PHANG, S.M., WONG, C.Y., TAN, B.K., MUSTAFA, E.M. **Sensitivity of selected tropical microalgae isolated from a farmland and a eutrophic lake to atrazine and endosulfan.** Journal of Applied Phycology, Vol. 31, 2981–2998p, 2019

COSTA, C.R, OLIVI, P., BOTTA, C.M.R., ESPINDOLA, E.L.G. **A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e método de avaliação.** Quim. Nova, Vol. 31, N. 7, 1820-1830 p, 2008

CZARNY, K., SZCZUKOCKI, D., KRAWCZYK, B., GADZAŁA-KOPCIUCH, R., SKRZYPEK, S. **Toxicity of single steroid hormones and their mixtures toward the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*.** Journal of Applied Phycology, 8 p, 2019a

CZARNY, K., SZCZUKOCKI, D., KRAWCZYK, B., SKRZYPEK, S., ZIELIŃSKI, M., GADZAŁA-KOPCIUCH, R. **Toxic effects of single animal hormones and their mixtures on the growth of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus armatus*.** Chemosphere, Vol. 224, 93-102 p, 2019b

CZARNY, K., SZCZUKOCKI, D., KRAWCZYK, B., SKRZYPEK, S., MIĘKOŚ, E., GADZAŁA-KOPCIUCH, R. **Inhibition of growth of *Anabaena variabilis* population by single and mixed steroid hormones.** Journal of Applied Phycology, Vol. 31, 389–398p, 2019c

ESPERANZA, M., SEOANE, M., RIOBOO, C., HERRERO, C., CID, A. ***Chlamydomonas reinhardtii* cells adjust the metabolism to maintain viability in response to atrazine stress.** Aquatic Toxicology, 2015

FABBRI, E. **Pharmaceuticals in the environment: expected and unexpected effects on aquatic fauna.** Ann. N.Y. Acad. Sci., 1-9 p, 2014

FAUST, M., ALTENBURGER, R., BACKHAUS, T., BLANCK, H., BOEDEKER, W., GRAMATICA, P., HAMER, V., SCHOLZE, M., VIGHI, M., GRIMME, L.H. **Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants.** Aquatic Toxicology, Vol. 56, 13–32 p, 2001

FENG, L., YANG, G., ZHU, L., XU, J., XU, X., CHEN, Y. **Distribution and Risk Assessment of Endocrine-Disrupting Pesticides in Drinking Water Sources from Agricultural Watershed.** Water Air Soil Pollut, Vol. 227, No. 23, 2016

FERNÁNDEZ-NAVEIRA, A., RIOBOO, C., CID, A., HERRERO, C. **Atrazine induced changes in elemental and biochemical composition and nitrate reductase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*.** European Journal of Phycology, Vol. 51, 338-345 p, 2016

FONG, P.P., FORD, A.T. **The biological effects of antidepressants on the molluscs and crustaceans: A review.** Aquatic Toxicology, 1-10 p, 2013

GRACIANI, F.S., FERREIRA, G.L.B. **Descarte de medicamentos: Panorama da logística reversa no Brasil.** Espacios, Vol. 35, No 5, 11 p,2014

GRIFFERO, L., ALCÁNTARA-DURÁN, J., ALONSO, C., RODRÍGUEZ-GALLEGO, L., MORENO-GINZÁLEZ, D., GARCIA-REYES, J.F., MOLINA-DÍAZ, A., PÉREZ-PARADA, A. **Basin-scale monitoring and risk assessment of emerging contaminants in South American Atlantic coastal lagoons.** Science of the Total Environment, Vol. 697, No. 134058, 2019

HERLORY, O., BONZOM, J.-M., GILBIN, R. **Sensitivity evaluation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* to uranium by pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry.** Aquatic Toxicology, Vol. 140–141, 288–294p, 2013

JEFFREYS, W., HUMPHREY, G.F. **New Spectrophotometric Equations for Determining Chlorophylls a, b, c1 and c2 in Higher Plants, Algae and Natural Phytoplankton.** Biochem. Physiol. Pflanzen (BPP), Bd. 167, S. 191-194, 1975

KRIEDEMANN, P.E., GRAHAM, R.D., WISKICH, J.T. **Photosynthetic Dysfunction and *in vivo* Changes in Chlorophyll a Fluorescence from Manganese-deficient Wheat Leaves.** Aust. J. Agric. Res, 36, 157-69, 1985

LAMICHHANE, K., GARCIA, S.N., HUGGETT, D.B., DeANGELIS, D.L., LA POINT, T.W. **Chronic Effects of Carbamazepine on Life-History Strategies of *Ceriodaphnia dubia* in Three Successive Generations.** Arch. Environ. Contam. Toxicol. Vol. 64, 427–438 p, 2013

LIU, D. WONG, P.T.S., DUTKA, B.J. **Determination of carbohydrate in lake sediment by a modified phenol-sulfuric method.** Water Research, 7, 741-746, 1973

LIU, T., LIU, F., WANG, C., WANG, Z., LI, Y. **The boosted biomass and lipid accumulation in *Chlorella vulgaris* by supplementation of synthetic phytohormone analogs.** Bioresource Technology, 232, 44–52, 2017

LOMBARDI, A.T., MALDONADO, M.T. **The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*.** Photosynth Res, 108, 77–87, 2011

LUNA, T.O., PLAUTZ, S.C., SALICE, C.J. **Effects of 17 α -ethynylestradiol, fluoxetine, and the mixture on life history traits and population growth rates in a freshwater gastropod.** Environ. Toxicol. Chem., Vol. 32, No. 12, 2771-2778 p, 2013

MACHADO, K.C., GRASSI, M.T., VIDAL, C., PESCARA, I.C., JARDIM, W.F., FERNANDES, A.N., SODRÉ, F.F., ALMEIDA, F.V., SANTANA, J.S., CANELA, M.C., NUNES, C.R.O., BICHINHO, K.M., SEVERO, F.J.R. **A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil.** Science of the Total Environment, Vol. 572, 138–146 p, 2016

MANSANO, A.S., MOREIRA, R.A., DORNFELD, H.C., FREITAS, E.C., VIEIRA, E.M., SARMENTO, H., ROCHA, O., SELEGHIM, M.H.R. **Effects of diuron and carbofuran and their mixtures on the microalgae *Raphidocelis subcapitata*.** Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 142, 312–321 p, 2017

PARRISH, C.C. **Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples.** In Lipids in freshwater ecosystems (ed. M. T. Arts and B. C. Wainman), New York: Springer-Verlag, 4-20 p, 1999

PERRON, M.-C., JUNEAU, P. **Effect of endocrine disrupters on photosystem II energy fluxes of green algae and cyanobacteria.** Environmental Research, 111, 520–529, 2011

PICCOLI, C., CREMONESE, C., KOIFMAN, R.J., KOIFMAN, S., FREIRE, C. **Pesticide exposure and thyroid function in an agricultural population in Brazil.** Environmental Research, Vol. 151, 389–398 p, 2016

POCOCK, T., FALK, S. **Negative Impact on Growth and Photosynthesis in the Green Alga *Chlamydomonas reinhardtii* in the Presence of the Estrogen 17 α -Ethinylestradiol.** Plos one, Vol. 9, Issue 10, e109289, 2014

RAND, G.M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment.** 2^a ed. Boca Raton: CRC Press, 1125 p, 1995

REIS FILHO, R.W., LUVIZOTTO-SANTOS, R., VIEIRA, E.M. **Poluentes emergentes como desreguladores endócrinos.** J. Braz. Soc. Ecotoxicol. Vol. 2, N. 3, 283-288 p, 2007

RELIGIA, P., KATO, Y., FUKUSHIMA, E.O., MATSUURA, T., MURANAKA, T., WATANABE, H. **Atrazine exposed phytoplankton causes the production of non-viable offspring on *Daphnia magna*.** Marine Environmental Research, Vol. 145, 177–183 p, 2019

REYNOLDS, C. **Ecology of Phytoplankton.** Cambridge University Press, 535 p, 2006

RIBEIRO, F., GALLEGU-URREA, J.A., GOODHEAD, R.M., VAN GESTEL, C.A.M., MOGER, J., SOARES, A.M.V.M., LOUREIRO, S. **Uptake and elimination kinetics of silver nanoparticles and silver nitrate by *Raphidocelis subcapitata*: The influence of silver behavior in solution.** Nanotoxicology, Early Online, 1–10 p, 2014

ROCHA, G., PARRISH, C.C., LOMBARDI, A.T., MELÃO, M.G.G. **Copper affects biochemical and physiological responses of *Selenastrum gracile* (Reinsch).** Ecotoxicology, 2016

SCHREIBER, U. **Pulse-amplitude-modulation (PAM) fluorometry and saturation pulse method: an overview.** In: Papageorgiou, G.C., Govindjee (Eds.), Chlorophyll *a* Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 279–319, 2004

SHOAF, W.T., LIUM, B.W. **Improved extraction of chlorophyll *a* and *b* from algae using dimethylsulfoxide.** Limnol. Oceanogr. 21, 926–928, 1976

SPOSITO, J.C.V., MONTAGNER, C.C., CASDO, M., NAVARRO-MARTÍN, L., SOLÓRZANO, J.C.J., PIÑA, B., GRISOLIA, A.B. **Emerging contaminants in Brazilian rivers: Occurrence and effects on gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos.** Chemosphere, Vol. 209, 696-704 p, 2018

SUMAN, T.Y., RADHIKA RAJASREE, S.R., KIRUBAGARAN, R. **Evaluation of zinc oxide nanoparticles toxicity on marine algae *Chlorella vulgaris* through flow cytometric, cytotoxicity and oxidative stress analysis.** Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 113, 23–30 p, 2015

SUN, C., XU, Y., HU, N., MA, J., SUN, S., CAO, W., GLOBUČAR, G., HU, C., ZHAO, Y. **To evaluate the toxicity of atrazine on the freshwater microalgae *Chlorella* sp. using sensitive indices indicated by photosynthetic Parameters.** Chemosphere, 244, 125514, 2020

TIAN, D., MAO, H., LV, H., ZHENG, Y., PENG, C., HOU, S. **Novel two-tiered approach of ecological risk assessment for pesticide mixtures based on joint effects.** Chemosphere, Vol. 192, 362-371 p, 2018

van den HOEK, C., MANN, D.G., JAHNS, H.M. **Algae.** An introduction to phycology. Cambridge University Press, 623 p, 1995

WANG, P., WONG, M.H., TAM, N.F.Y. **Antioxidant responses of two microalgae, *Selenastrum capricornutum* and *Chlorella* sp., to estradiol and ethinylestradiol.** J Appl Phycol, 25, 891–903, 2013

YU, Z., SONG, M., PEI, H., JIANG, L., HOU, Q., NIE, C., ZHANG, L. **The effects of combined agricultural phytohormones on the growth, carbon partitioning and cell morphology of two screened algae.** Bioresource Technology, 2017

Efeito do herbicida atrazina e do hormônio 17 α -etinilestradiol, isolados e em mistura, sobre o cladóceros *Ceriodaphnia rigaudi*

Resumo

No ambiente, o mais comumente encontrado, são misturas de compostos, às quais os organismos ficam expostos de maneira crônica. A combinação desses compostos em misturas pode causar danos devido a interações entre eles, podendo resultar em efeitos antagônicos, sinérgicos ou aditivos. O herbicida atrazina (ATZ) e o hormônio sintético 17 α -etinilestradiol (EE₂) são frequentemente encontrados no ambiente e agem como desreguladores endócrinos em vários organismos não-alvo. Com isso, o objetivo do nosso trabalho foi investigar o efeito da ATZ e do EE₂, de forma isolada e em mistura, sobre o cladóceros neotropical *Ceriodaphnia rigaudi*, por meio de testes de toxicidade crônica. Os resultados mostraram que ambas substâncias afetam negativamente a reprodução do cladóceros, diminuindo a fecundidade em todas as concentrações da ATZ (10, 20, 40, 80, 160; 320 e 640 $\mu\text{g L}^{-1}$) e nas quatro maiores do EE₂ (68,5, 96, 135,5 e 188 $\mu\text{g L}^{-1}$). Foi observada diminuição do tamanho corpóreo das fêmeas adultas quando em exposição ao EE₂ nas mesmas concentrações em que houve alteração da fecundidade. Em relação à toxicidade da mistura, houve interação dos compostos dependente do nível da dose, com sinergismo nas baixas concentrações e antagonismo nas altas. Além disso, através da construção da curva de distribuição da sensibilidade das espécies, a *C. rigaudi* é uma espécie sensível, apresentando uma sensibilidade maior à ATZ. Este estudo evidencia que ambos compostos representam alto risco ecológico, podendo afetar negativamente a biota aquática. Além disso, a *C. rigaudi* exibiu respostas à toxicidade dos compostos, indicando possibilidade de ser um organismo-teste adequado, o que reforça a importância do uso de espécies nativas nos testes ecotoxicológicos de ambientes tropicais.

Palavras-chave: EE₂; ATZ; neotropical; interação compostos; curva SSD

Abstract

In natural environments, mixtures of compounds are commonly found, and organisms are frequently chronically exposed. The combination of compounds can cause greater damage through the interaction between them, which can result in antagonistic, synergistic or additive effects. The herbicide atrazine (ATZ) and the synthetic hormone 17 α -ethinylestradiol (EE₂) are often found together in the environment and act as endocrine disruptors on various non-target organisms. Thus, the aim of this study was to investigate the effect of ATZ and EE₂, isolated and combined, on the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia rigaudi*, through chronic toxicity tests. The results showed that both substances negatively affect the reproduction of the cladoceran, decreasing its fecundity in all ATZ concentrations (10, 20, 40, 80, 160; 320 and 640 $\mu\text{g L}^{-1}$) and in the four highest concentrations of EE₂ (68.5, 96, 135.5 and 188 $\mu\text{g L}^{-1}$). Decrease in body size of adult females was observed when exposed to EE₂ at the same concentrations in which there was a change in fecundity. The results from the mixture test showed that there was interaction in the compounds was dependent on the dose level, with synergism in the low concentrations and antagonism in the high. In addition, through the construction of the species sensitivity distribution curve, *C. rigaudi* was a sensitive species and presenting a greater sensitivity to ATZ. This study shows that both compounds represent a high ecological risk and can negatively affect aquatic biota. In addition, *C. rigaudi* exhibited responses to the toxicity of the compounds, being an adequate test-organism. This reinforces the importance of using native species in ecotoxicological tests for tropical environments risk assessments.

Keywords: EE₂; ATZ; neotropical species; compound interaction; SSD curve

1. Introdução

O aumento qualitativo e quantitativo de compostos químicos fabricados e utilizados na agricultura, medicina, indústria e usos domésticos, aliado ao descarte por diferentes vias, após tratados ou não, contribuem para a entrada e dispersão destes em ecossistemas aquáticos ocasionando efeitos diversos, alguns prejudiciais tanto para a biota aquática, como para a saúde humana (Machado *et al.*, 2016; Griffero *et al.*, 2019). No ambiente, mesmo que em baixas concentrações, podem agir no sistema endócrino de diferentes espécies, alterando sua estrutura ou função e causando efeitos adversos tanto no organismo e sua progênie, como em populações inteiras (Scognamiglio *et al.*, 2016; Matthiessen *et al.*, 2017; DeCourten *et al.*, 2019).

Os pesticidas e fármacos são substâncias persistentes no ambiente, que afetam o sistema endócrino, podendo alterar vias metabólicas dos hormônios, ou até imitar ou antagonizar os hormônios naturais (Sodré *et al.*, 2010; Scognamiglio *et al.*, 2016).

No ambiente, é muito comum encontrar misturas de muitos compostos, nos quais os organismos estão expostos (Bizarro *et al.*, 2016; Shao *et al.*, 2019). A combinação de diferentes poluentes pode causar efeitos por meio de interações inesperadas, capazes de modificar a amplitude e a natureza do efeito tóxico. As interações podem ocorrer em diferentes fases: toxicodinâmica, em que os produtos químicos têm efeitos no receptor, órgão ou alvo celular; e toxicocinética, em que ocorrem processos de captação, metabolismo, distribuição e excreção. (Bizarro *et al.*, 2016; Mansano *et al.*, 2017). Subsequentemente, podem resultar em efeitos antagônicos, sinérgicos ou aditivos (Bizarro *et al.*, 2016; Mansano *et al.*, 2017; Rocha *et al.*, 2018).

O comportamento das misturas nos testes de toxicidade é explicado através do uso de modelos teóricos, como: modelos de Adição de Concentração (CA) e de Ação Independente (IA) (Pérez *et al.*, 2011; Freitas *et al.*, 2014). Para o modelo CA, os compostos individuais têm o mesmo modo de ação e atuam sobre o mesmo alvo biológico, e isso gera uma resposta proporcional as respectivas toxicidades. O modelo IA é a multiplicação de probabilidades de cada toxicidade química individual na mistura, ou seja, os compostos individuais diferem em seus modos de ação e não tem interferência entre eles durante suas ações nos locais de destino (Freitas *et al.*, 2018).

Em uma avaliação sobre a ocorrência de contaminantes em corpos de água do Uruguai foram encontrados 82 contaminantes incluindo fármacos, hormônios e defensivos agrícolas (Griffero *et al.*, 2019). Na China foi verificada a ocorrência de

desreguladores endócrinos em fontes de água potável tendo sido encontradas 21 substâncias, entre elas, herbicidas, acaricidas e fungicidas (Feng *et al.*, 2016). Na Espanha foram identificados 16 compostos farmacêuticos em afluentes e efluentes de uma estação de tratamento de esgoto (Martín *et al.*, 2012) enquanto em uma avaliação similar realizada nos efluentes de estação de tratamento de esgoto no Canadá foram identificados 14 fármacos (Metcalf *et al.*, 2003). Esses estudos evidenciam a presença de diversos compostos em efluentes já tratados, na forma de misturas complexas.

A atrazina (ATZ) é um herbicida sintético disponível no mercado há mais de 50 anos e amplamente utilizado na agricultura em todo mundo, embora tenha sido recentemente banido em alguns países (Religia *et al.*, 2019; Albuquerque *et al.*, 2020). Esse herbicida faz parte das triazinas (Religia *et al.*, 2019), possui fórmula $C_8H_{14}ClN_5$ e peso molecular $215,69 \text{ g mol}^{-1}$ (Sanderson *et al.*, 2000; Faust *et al.*, 2001; Brain *et al.*, 2012). Ele age no fotossistema II, bloqueando o transporte de elétrons e inibindo a fotossíntese (Brain *et al.*, 2012; Religia *et al.*, 2019; Albuquerque *et al.*, 2020).

A ATZ é encontrada em baixas concentrações (ng L^{-1} e $\mu\text{g L}^{-1}$) em muitos corpos d'água em diferentes países, como Uruguai (Griffero *et al.*, 2019), Brasil (Sposito *et al.*, 2018; Montagner *et al.*, 2019), Espanha (Masiá *et al.*, 2015), Portugal (Barbosa *et al.*, 2018), E.U.A (Callicott e Hooper-Bùi, 2019; Mahler *et al.*, 2017), Croácia (Fingler *et al.*, 2017) e Singapura (Bayen *et al.*, 2016). É considerado ser um desregulador endócrino (Stayner *et al.*, 2017) atuando como inibidor do fotossistema II da alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, da cianobactéria *Anabaena flos-aquae* e da diatomácea *Navicula pelicullosa* (Brain *et al.*, 2012), inibindo o crescimento da alga *Raphidocelis subcapitata* (Religia *et al.*, 2019), aumentando o número de neonatas inviáveis de *Daphnia magna* (Religia *et al.*, 2019) diminuindo a expressão de vitelogenina no crustáceo *Procambarus clarkii* (Silveyra *et al.*, 2018) e diminuindo hormônios e proteínas, bem como causando alterações nas fases de gametogênese do caramujo *Biomphalaria alexandrina* (Omran e Salama, 2016).

O 17 α -etinilestradiol (EE₂) é um hormônio sintético muito utilizado na formulação de contraceptivos orais (Avar *et al.*, 2016; Kovacevic *et al.*, 2019). Este composto possui fórmula $C_{20}H_{24}O_2$, peso molecular de $296,4 \text{ g mol}^{-1}$ e baixa solubilidade em água (Capolupo *et al.*, 2018). É um micropoluente encontrado com frequência nos ambientes aquáticos de diferentes países, como Uruguai (Griffero *et al.*, 2019), Itália (Baronti *et al.*, 2000), Brasil (Sposito *et al.*, 2018; Montagner *et al.*, 2019; França *et al.*,

2020), Europa central (Avar *et al.*, 2016), Argentina (Scala-Benuzzi *et al.*, 2018), Inglaterra (Wilkinson *et al.*, 2017) e China (Wang *et al.*, 2018).

O EE₂ é um desregulador endócrino que em peixes atua desregulando a gametogênese e diminuindo o tamanho do corpo, como verificado em *Danio rerio* (Silva *et al.*, 2012), alterando o sucesso reprodutivo (Van den Belt *et al.*, 2003), a fecundidade e viabilidade de ovos (Xu *et al.*, 2008). Verificou-se ainda que este hormônio pode alterar processos neurais de ratos (Ceccarelli *et al.*, 2015), diminuir o gnatópodo secundário de machos do anfípodo *Hyaella azteca* (Vandenbergh *et al.*, 2003), aumentar a incidência de deformações em neonatas dos moluscos gastrópodos *Nassarius burchardi* e *Nassarius jonassi* (Borysko e Ross, 2014), diminuir o sucesso reprodutivo de *Lampsilis fasciola* (Leonard *et al.*, 2014), influenciar negativamente na fixação do carbono da alga *Desmodesmus communis* (Balina *et al.*, 2015), diminuir a clorofila da alga *Dualiella salina* (Belhaj *et al.*, 2017) e inibir o crescimento das algas *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus armatus* (Czarny *et al.*, 2019).

Com isso, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito dos compostos ATZ e EE₂, de forma isolada e em mistura, sobre o cladócero nativo Neotropical *Ceriodaphnia rigaudi*, por meio de testes de toxicidade crônica, visando verificar se em concentrações normalmente encontradas nos ecossistemas aquáticos (ambientalmente relevantes) em diferentes países e continentes, mas especialmente no Brasil, poderiam causar efeitos de toxicidade crônica sobre indivíduos e populações desta espécie. *Ceriodaphnia rigaudi* é um cladócero tropical de pequeno tamanho (0,45±0,003 mm de comprimento) com um ciclo de vida curto, fácil cultivo e manutenção em laboratório, já tendo sido anteriormente investigada (Mohammed, 2009; 2008), quanto à possível adequação como organismo-teste.

2. Materiais e métodos

2.1. Cultivo e manutenção do organismo

Espécimes de *Ceriodaphnia rigaudi* foram coletados no reservatório do Lobo-Broa, Itirapina, SP, Brasil, e mantidos em cultivo em laboratório, por diversas gerações. Para o cultivo foi utilizada como meio a água reconstituída com as seguintes características: pH entre 7,0 e 7,6 e dureza total entre 40 e 48 mg CaCO₃ L⁻¹ (ABNT,

2017). Os organismos foram mantidos em béqueres de 1 L com cerca de 110 indivíduos de *C. rigaudi* em sala com temperatura controlada de 25 ± 1 °C e fotoperíodo de 12h claro:12h escuro. Para a manutenção das culturas, semanalmente foram realizadas três renovações totais do meio de cultivo com o fornecimento de novo alimento.

Os indivíduos foram alimentados com suspensão da microalga clorofícea *Raphidocelis subcapitata* cultivada em meio CHU-12 (ABNT, 2018, com modificação do meio Oligo para Chu-12, no qual as algas já estavam adaptadas há mais tempo). Os cladóceros foram cultivados numa suspensão contendo a microalga na concentração de 10^5 células mL⁻¹ e também um aditivo alimentar consistindo de uma mistura de ração fermentada de peixe (TetraMin[®]) e fermento biológico, na proporção de 1 mL/L.

Para monitorar as condições fisiológicas dos indivíduos e verificar a sensibilidade da espécie em cultivo, foram realizados 20 testes de toxicidade aguda com a substância de referência cloreto de sódio - NaCl (ABNT, 2017), e plotada a curva de sensibilidade para a espécie *C. rigaudi*, nas condições de laboratório.

2.2. Composto Químico e Solução-Teste

O hormônio 17 α -etinilestradiol (EE₂) (pureza $\geq 98\%$; CAS: 57-63-6) e o padrão do herbicida atrazina (ATZ) (pureza $\geq 98\%$; CAS: 1912-24-9), foram adquiridos da Sigma Aldrich. Por apresentar baixa solubilidade em água, o hormônio foi dissolvido com o solvente metanol, com grau de pureza 99,5% (Merck, EUA), e depois diluído em água reconstituída para o preparo da solução estoque. Para o teste definitivo de toxicidade crônica, foi preparada uma solução estoque de 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Para isto, 10 mg de EE₂ foram inicialmente dissolvidos em 0,2 mL de metanol e então diluídos em 2 L de água reconstituída, atingindo uma concentração final de solvente de 0,01%. A partir desta solução-estoque foram preparadas as soluções-teste em diferentes concentrações por meio de diluições em série, em água reconstituída.

O herbicida atrazina foi diluído em metanol com grau de pureza 99,5% (Merck). Para preparação de uma solução estoque de 200 mg L⁻¹, 2 mg de ATZ foram dissolvidos em 10 mL de metanol e, a partir desta solução, foram então preparadas as soluções-teste por meio de diluições em série, em água reconstituída, nas diferentes concentrações estabelecidas para o teste definitivo, após testes preliminares.

2.3. Análise química

A análise química para determinação da concentração real do hormônio EE₂ na solução estoque inicial foi realizada no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

Para o preparo das amostras, a solução de EE₂ foi diluída na mistura H₂O/MeOH 70:30 v/v, filtrada em filtro de seringa (PTFE 0,22 µm) e transferida para vials, para posterior análise em Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em tandem (LC-MS/MS). Para a análise de quantificação, foi utilizado um cromatógrafo Agilent (modelo 1200), equipado com injetor automático, bomba binária e comprimento de coluna termostatizada. A separação cromatográfica foi realizada usando uma coluna Zorbax SB-C18 (2,1x30 mm, tamanho de partícula de 3,5 µm) a 30 °C. A fase móvel consistiu de água ultrapura (A) e metanol (B), que foram previamente filtrados em membranas com porosidade de 0,2 µm contendo, para os compostos que ionizam no modo negativo, 0,01% (v/v) de NH₄OH e, para os compostos que ionizam no modo positivo, 0,01% (v/v) de HCOOH, aditivos esses que favorecem a formação de íons.

Em função da concentração do solvente B para o modo negativo, a composição do gradiente foi a seguinte: início com 30% e aumento para 80% em 13 minutos, mantendo essa condição por 1 minuto. Para o modo positivo, seguiram-se: início com 30% e aumento para 42% em 3,5 minutos, seguido de aumento para 70% em 8 minutos e, por fim, 80% em 12,5 minutos. Em ambos os modos de ionização, entre cada corrida cromatográfica, o sistema foi mantido a 30% de B por 5 minutos para condicionamento da coluna.

A identificação e quantificação do composto foi realizada por Espectrometria de Massas em um equipamento Agilent com triplo quadrupolo (modelo 6410B) e o composto foi ionizado, no modo positivo e negativo, em uma fonte de *electrospray* e monitorados pelo modo *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), seguindo os parâmetros da Tabela 3.1. Com a área obtida para o composto em função da sua concentração na coluna, foram construídas as curvas analíticas.

Tabela 3.1 - Transições precursor-produto e suas respectivas energias de colisão (EC), selecionadas para a quantificação dos compostos, empregando o modo MRM do espectrômetro de massas

Compostos	Polaridade	Fragmentador (V)	Precursor (m/z)	Quantificação		Confirmação 1		Confirmação 2	
				m/z	EC (v)	m/z	EC (v)	m/z	EC (v)
EE ₂	-	100	295	158,9	30	144,9	30	143	40

2.4. Testes de sensibilidade

Para o teste de sensibilidade, foi utilizado como substância de referência o NaCl (Dinâmica[®] Brasil) com solução estoque preparada na concentração de 100 g L⁻¹, e a partir desta, foram feitas diluições para preparação das soluções-teste nas seguintes concentrações: 0,3; 0,6; 1,0; 1,3; 1,6 e 2,2 g L⁻¹, além do controle. Foram realizados 20 testes para determinação da faixa de sensibilidade da espécie (carta-controle) (Casali-Pereira *et al.*, 2015; Mansano *et al.*, 2018). O teste foi estático, sem iluminação e sem alimentação dos organismos, e foram mantidos na mesma temperatura do cultivo, de 25 ± 1 °C, em sala climatizada. Para o teste, foram utilizados 5 organismos por réplica e estabelecidas 4 réplicas por concentração (além do controle) em recipientes-teste com 10 mL de solução-teste (ABNT, 2017). O ensaio teve duração de 48h e foram observados e contabilizados os organismos imóveis. As variáveis abióticas foram medidas no início e ao final dos testes (ABNT, 2017).

2.5. Toxicidade crônica dos compostos isolados

O teste de toxicidade crônica foi realizado segundo o protocolo NBR 13373 da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).

O teste foi semi – estático, sendo a renovação do meio feita a cada 2 dias (dia sim, dia não). Em cada recipiente-teste foram colocados 15 mL de solução-teste, tendo sido estabelecidas 10 réplicas por concentração e para os controles (controle com água reconstituída e controle com solvente metanol) contendo um indivíduo neonata em cada recipiente-teste. Os recipientes-teste não receberam aeração e os indivíduos foram

alimentados de acordo com os procedimentos já descritos anteriormente para o cultivo estoque deste cladóceros. O teste foi mantido em sala com temperatura controlada de 25 ± 1 °C e fotoperíodo 12h:12h claro/escuro.

Foram estabelecidas sete concentrações-teste tanto para a ATZ (10; 20; 40; 80; 160; 320 e 640 $\mu\text{g L}^{-1}$) como para o EE₂ (25; 35; 49; 68,5; 96; 134,5 e 188 $\mu\text{g L}^{-1}$), além dos controles com água reconstituída e com o solvente metanol, para ambos os testes. O teste foi iniciado com neonatas com menos de 24 horas de idade, nascidos da terceira ninhada de indivíduos reprodutivos mantidos isolados a partir dos cultivos pré-teste. A duração do teste foi estabelecida como sendo o tempo desde a montagem do teste com neonatas com menos de 24 horas de idade até, no máximo, 8 dias, com o estabelecido pelo protocolo NBR 13373 da ABNT (ABNT, 2017).

Durante o teste, foram observados e contados o número de neonatas em cada réplica. Foram feitas medidas do comprimento do corpo dos neonatas no início dos testes e medidas dos adultos ao final dos testes. As variáveis abióticas nas soluções-teste (pH, oxigênio dissolvido, condutividade e temperatura) foram medidas no início, uma outra vez no decorrer da semana e no final do teste para: controles (com água reconstituída e com o solvente metanol) e nas soluções com a mais baixa e a mais alta concentração do hormônio EE₂ e do herbicida ATZ (ABNT, 2017).

2.6. Teste de toxicidade das misturas

Os testes de toxicidade da mistura do hormônio EE₂ com o herbicida ATZ foram também realizados utilizando-se o cladóceros nativo *C. rigaudi*. Os testes foram semi-estáticos, com as soluções-teste renovadas a cada dois dias, com seis réplicas contendo 15 mL de solução-teste e um neonata, com menos de 24 horas de idade, em cada em cada recipiente-teste. O teste teve duração de, no máximo, oito dias, e foi mantido sob as mesmas condições de temperatura e fotoperíodo descritas no cultivo. Durante o ensaio, os organismos foram observados sob microscópio estereoscópico (Zeiss, Modelo C2000, Alemanha), foram registrados o número de neonatas e de fêmeas sobreviventes.

Para o ensaio com misturas foram utilizados os dados dos testes de toxicidade crônica obtidos dos ensaios de exposição individual de cada composto, para o estabelecimento das concentrações de cada composto a ser utilizado nas combinações para preparação das misturas. O delineamento experimental incluiu, simultaneamente, um teste individual para cada composto e um conjunto de 23 combinações, sendo um

delineamento de razão fixa parcial (Cassee *et al.*, 1998), usado para as misturas para se evitar a inclusão de tratamentos com altas concentrações, que poderiam levar à mortalidade dos organismos.

Com base nas forças tóxicas, foram calculadas as concentrações nominais das misturas: 0,375 (0,125 + 0,25; 0,25 + 0,125); 0,5 (0,125 + 0,375; 0,25 + 0,25; 0,375 + 0,125); 0,75 (0,125 + 0,625; 0,25 + 0,5; 0,375 + 0,375; 0,5 + 0,25; 0,625 + 0,125); 1 (0,125 + 0,875; 0,25 + 0,75; 0,375 + 0,625; 0,5 + 0,5; 0,625 + 0,375; 0,75 + 0,25; 0,875 + 0,125); 1,5 (0,5 + 1; 0,75 + 0,75; 1 + 0,5); 1,75 (0,75 + 1; 1 + 0,75) e 2 (1 + 1) unidades tóxicas (UT). Para os cladóceros, uma unidade tóxica correspondeu à CE₅₀, obtida dos testes de toxicidade crônica individual (para cada composto utilizado).

2.7.Sensibilidade das espécies – SSD

Para comparar a sensibilidade de vários organismos, são construídas curvas de distribuição de sensibilidade das espécies (SSD – Species Sensitivity Distribution). Para a curva de sensibilidade foram comparados os valores da concentração de efeito não observado (NOEC) nos testes de toxicidade crônica para o cladóceros *C. rigaudi* exposto ao hormônio etinilestradiol e ao herbicida atrazina com os valores obtidos para outras espécies deste e de outros grupos taxonômicos. Para a comparação, os dados dos outros organismos foram obtidos, principalmente, no Banco de Dados da USEPA ECOTOX (<http://cfpub.epa.gov/ecotox/>) e complementado com outros dados da literatura. Foram considerados os dados de toxicidade obtidos em laboratório para organismos de água doce, incluindo espécies de algas fitoplanctônicas e animais invertebrados e vertebrados, com foco nos parâmetros reprodutivos, NOEC e CE₅₀. Para espécies com mais de um valor disponível, foram calculadas as respectivas médias geométricas.

Para a construção das curvas de sensibilidade foi utilizado o software ETX 2.0 (Van Vlaardinger *et al.*, 2004) que traz no eixo Y os percentuais da fração potencialmente afetada (*Potentially Affected Fraction* – PAF) referindo-se à concentração perigosa (*Hazardous Concentration* – HCp) sendo: p = porcentagem de espécies ameaçadas pelo contaminante. O software permite também calcular os valores de HC₅ e HC₅₀ (sendo, 5% e 50% as porcentagens mais utilizadas) e seus respectivos limites de confiança, com base na metodologia de Aldenberg e Jaworska (2000). A log-normalidade foi testada com o teste de Anderson-Darling que está incluso no pacote do software ETX.

2.8. Avaliação de risco ecológico

A avaliação preliminar de risco ecológico é analisada com base no quociente de risco (RQ – *Risk Quotient*), que dividindo a concentração ambiental prevista ou medida (PEC ou MEC) pela concentração sem efeito previsto (PNEC) ($RQ = PEC \text{ ou } MEC / PNEC$).

Nesse trabalho foi utilizado o valor da MEC, estimados pelos dados disponíveis na literatura para rios brasileiros, por ser o organismo-teste uma espécie tropical. Foi utilizado o valor médio das concentrações medidas em rios do Estado de São Paulo (Montagner *et al.*, 2019), nos quais foram identificadas as duas substâncias aqui estudadas.

O valor da PNEC foi obtido dividindo o valor da NOEC pelo fator de avaliação, seguindo as recomendações do Documento de orientação técnica sobre avaliação de riscos (*Technical Guidance Document on Risk Assessment*) (TGD, 2003):

$$PNEC = \frac{NOEC}{AF}$$

Sendo: AF o fator de avaliação igual a 100, por ser utilizado o valor da NOEC de um teste crônico para a espécie. Os valores de AF são os recomendados pela TGD (2003). Para interpretação dos dados, os valores de $RQ \geq 1$ indicam alto potencial de risco e $RQ < 1$ indicam baixo potencial de risco (Papadakis *et al.*, 2015).

2.9. Análise estatística

Os valores da CE_{50-48h} dos testes de sensibilidade ao cloreto de sódio e seu intervalo de 95% de confiança, foram calculados por regressão não linear, com ajuste pela equação logística utilizando o programa Statistica 7.0 (Statsoft, 2004).

Para a análise dos resultados do teste de toxicidade crônica, foi utilizado o programa de software SigmaPlot v11.0 (Systat Software Inc., 2008). A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando os dados apresentaram distribuição normal, foi feita uma ANOVA paramétrica seguida do teste de Tukey (que compara cada tratamento com todos os outros) e do teste de Dunnet (que compara os tratamentos com o controle) (Demšar, 2006; Zar, 2010). Quando os dados não

apresentaram distribuição normal, foi feita uma ANOVA não paramétrica seguida do teste de Kruskal-Wallis, que compara cada tratamento com todos os demais e o teste de Dunn, que compara com o controle (Theodorsson-Norheim, 1986; ZaR, 2010). Nos testes estatísticos, o nível de significância foi de 95% ($p \leq 0,05$).

Para a análise do teste de toxicidade crônica em mistura, os dados foram analisados pelos modelos conceituais de Ação Independente (IA) e de Adição de Concentração (CA). Utilizando a ferramenta MIXTOX (Jonquer *et al.*, 2005), o efeito combinado esperado, calculado a partir das exposições individuais, foi comparado com os dados observados. As análises comparadas foram estendidas e os três modelos de referência (Interações sinérgicas/antagônicas (S/A), desvio dependente da proporção da dose (DR) (*Dose Ration-dependent*) e dependente do nível da dose (DL) (*Dose Level-dependent*)) foram modelados pela adição dos parâmetros a e b. Em desvios sinérgicos e antagônicos, o parâmetro “a” se torna respectivamente negativo ou positivo.

Para o DR, além do parâmetro “a”, está incluso um segundo parâmetro, o “b_{DR}”, que permite a identificação do papel de cada composto na mistura. Um segundo parâmetro, além do parâmetro “a” (que indica o desvio em baixas e altas doses), também está incluso para o DL, o “b_{DL}”, que indica em qual nível da dose o desvio muda. Na Tabela 3.2 e em Jonker *et al.* (2005) encontram-se maiores detalhes dessas funções de desvio. Após ajustar os dados aos desvios e modelos conceituais, foi escolhido o melhor ajuste por método de máxima verossimilhança e após identificado o modelo mais adequado, o padrão de efeitos foi deduzido dos valores dos parâmetros e o desvio máximo foi calculado em termos de nível de efeito, (Jonker *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2014; Mansano *et al.*, 2017).

Tabela 3.2 - Interpretação dos parâmetros adicionais, “a” e “b”, definindo a forma funcional dos padrões dos desvios da Adição de Concentração (CA) e da Ação Independente (IA)

Desvio Padrão	Parâmetro "a" (CA e IA)	Parâmetro "b" (CA)	Parâmetro "b" (IA)
Sinergismo / Antagonismo (S/A)	$a > 0$ - antagonismo $a < 0$ - sinergismo		
Dependente da proporção da dose (DR)	$a > 0$ - antagonismo, exceto para aquelas proporções de misturas onde um valor de b negativo significativo indica sinergismo $a < 0$ - sinergismo, exceto para aquelas proporções de misturas onde um valor de b positivo significativo indica antagonismo	$b_i > 0$ - antagonismo onde a toxicidade da mistura é causada principalmente pelo toxicante <i>i</i> $b_i < 0$ - sinergismo onde a toxicidade da mistura é causada principalmente pelo toxicante <i>i</i>	
Dependente do nível da dose (DL)	$a > 0$ - antagonismo em nível da dose baixo e sinergismo em nível da dose alto $a < 0$ - sinergismo em nível da dose baixo e antagonismo em nível da dose alto	$b_{DL} > 1$ - mudança em nível da dose menor do que CE_{50} $b_{DL} = 1$ - mudança em CE_{50} $0 < b_{DL} < 1$ - mudança em nível da dose maior do que CE_{50} $b_{DL} < 0$ - sem mudança, mas a magnitude do S/A é dependente do nível da dose	$b_{DL} > 2$ - mudança em nível da dose menor do que CE_{50} $b_{DL} = 2$ - mudança em CE_{50} $1 < b_{DL} < 2$ - mudança em nível da dose maior do que CE_{50} $b_{DL} < 1$ - sem mudança, mas a magnitude do S/A é dependente do nível de efeito

Adaptado de Jonker *et al.*, 2005

3. Resultados

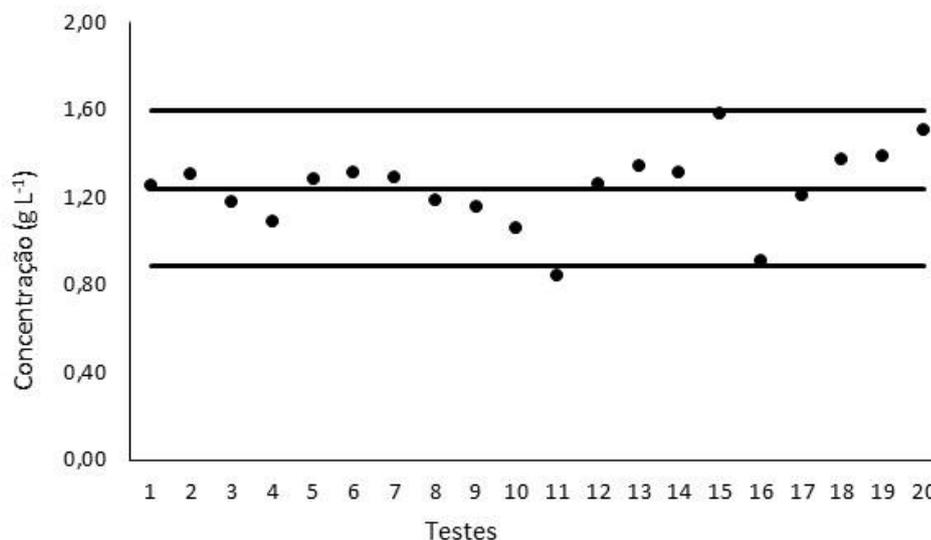
3.1. Variáveis abióticas, teste de sensibilidade e análises químicas

Nos testes de toxicidade com os compostos individuais de ambas substâncias, o pH variou entre 7,3 a 8,0, a condutividade elétrica de 216 $\mu\text{S cm}^{-1}$ a 303 $\mu\text{S cm}^{-1}$, o oxigênio dissolvido entre 4,73 a 5,74 mg L^{-1} , a temperatura da água entre 24,7 a 26,3 °C e a dureza entre 42 e 43 $\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$. Na mistura dos compostos, as variáveis apresentaram as seguintes faixas: pH entre 7,3 a 7,9, condutividade elétrica de 213 a 273 $\mu\text{S cm}^{-1}$, oxigênio dissolvido de 4,65 a 7,0 mg L^{-1} , temperatura da água 24,2 a 25,0 °C e dureza da água de 40 a 42 $\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$. Sendo assim, durante a realização dos testes a faixa de variação das variáveis atendeu os critérios estabelecidos pela ABNT (2017).

Os valores da $\text{CE}_{50-48\text{h}}$ do cloreto de sódio para *C. rigaudi*, resultantes de 20 testes de toxicidade aguda variaram de 0,84 a 1,5 g L^{-1} . Os valores da $\text{CE}_{50-48\text{h}}$ dos 20 testes, seus respectivos desvios-padrão, variância e coeficiente de variação, são apresentados na Tabela C1 no Apêndice C. As variáveis abióticas atenderam os critérios estabelecidos pela ABNT (2017), com: pH entre 7,1 a 7,8, oxigênio dissolvido entre 4,54 a 7,5 mg L^{-1} e condutividade entre 208 $\mu\text{S cm}^{-1}$ a 5,85 mS cm^{-1} .

A faixa de sensibilidade de *C. rigaudi* à substância de referência cloreto de sódio, variou entre 0,88 a 1,60 g L^{-1} , com o valor médio de $\text{CE}_{50-48\text{h}}$ de 1,24 g L^{-1} . A faixa de sensibilidade do organismo-teste pode ser observada na Figura 1.

Figura 1 - Faixa de sensibilidade de *Ceriodaphnia rigaudi* ao Cloreto de Sódio (NaCl) em 20 testes de toxicidade aguda. Os círculos preenchidos fechados (●) indicam os valores de CE_{50-48h} de cada teste



As análises da solução-teste em LC-MS/MS (Tabela 3.3) mostram que nos testes de toxicidade crônica dos compostos isolados, para o EE₂ a diferença entre a concentração real do composto (medida) não atingiu 20% da concentração nominal. Devido a isso, na apresentação dos resultados foram mantidas as concentrações nominais como sugerido pela ABNT (2017). O limite de quantificação instrumental para o EE₂ foi de 50 µg L⁻¹.

Tabela 3.3 - Concentração do composto 17 α -etinilestradiol determinado na amostra

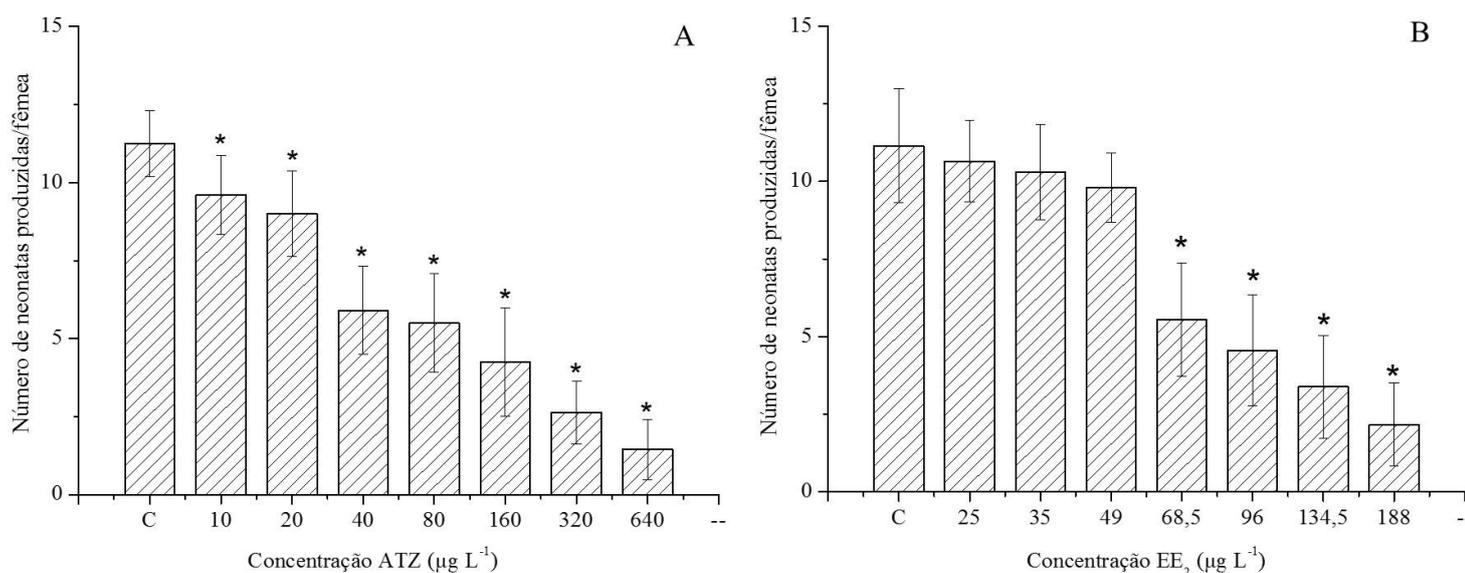
Amostra (concentração nominal)	Concentração real
EE ₂ (5000 µg L ⁻¹)	4412 µg L ⁻¹

3.2. Testes de toxicidade dos compostos isoladamente

O número de neonatas produzidos por fêmea de *C. rigaudi* exposta ao herbicida atrazina (ATZ) e ao hormônio 17 α - ethinilestradiol (EE₂), são apresentados na Figura 2, respectivamente. A CE_{50-7dias} dos compostos isolados para EE₂ e ATZ são 82,94 ± 4,63 µg L⁻¹ e 79,52 ± 9,25 µg L⁻¹, respectivamente.

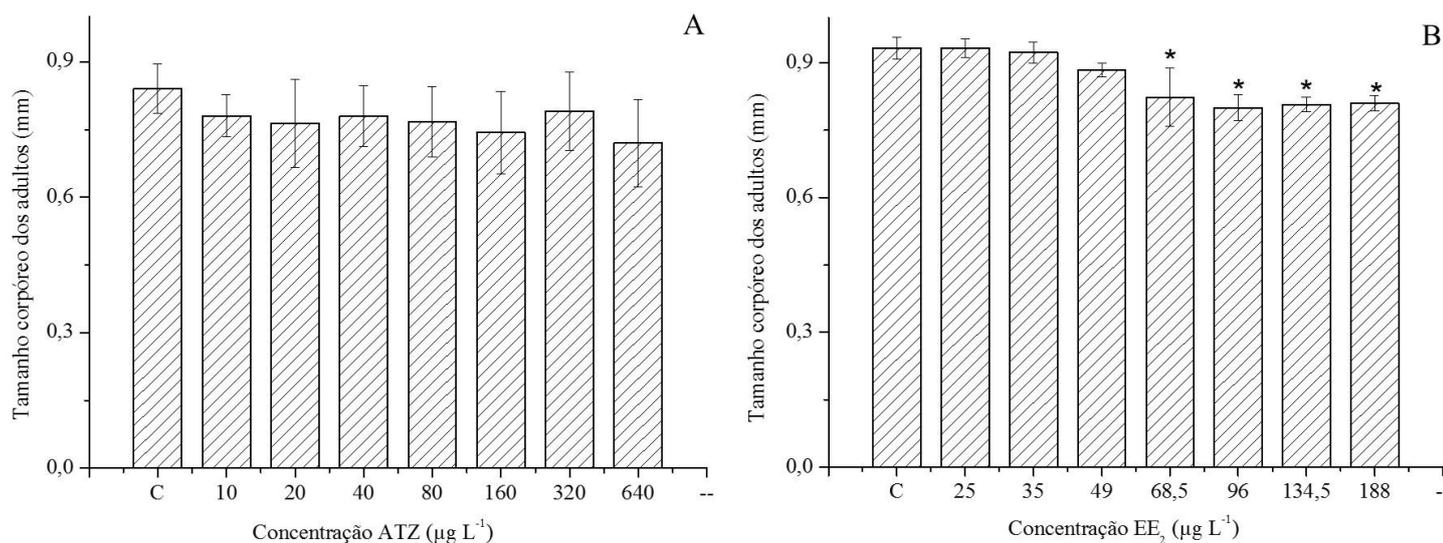
Para a ATZ, todas as concentrações testadas (10; 20; 40; 80; 160; 320 e 640 $\mu\text{g L}^{-1}$) apresentaram diferença significativa quando comparadas ao controle, com menor produção de neonatas (One Way ANOVA; $F_{8,166} = 139,999$ $p < 0,001$; Teste de Dunnett $p < 0,050$) (Figura 2a). Para o experimento com exposição ao EE₂, nas quatro maiores concentrações (68,5; 96; 134,5 e 188 $\mu\text{g L}^{-1}$) a produção de neonatas por fêmea de *C. rigaudi* foi menor do que a produção no controle (Kruskal-Wallis $H = 137,181$ $p < 0,001$; Teste de Dunn $p < 0,05$) (Figura 2b).

Figura 2 - Número médio de neonatas produzidos pelo cladócer *Ceriodaphnia rigaudi* durante os testes de toxicidade crônica com exposição a: (A) herbicida ATZ e (B) hormônio EE₂. As barras representam o número médio de neonatas obtidos, para o controle e para cada concentração testada. As linhas verticais representam o desvio padrão e o asterisco (*) indica diferença significativa entre cada tratamento e o controle



Ao se compararem os tamanhos dos indivíduos adultos (Figura 3) ao final do teste, não foram observadas diferenças significativas entre o tamanho dos indivíduos expostos à atrazina e aqueles dos controles (One Way ANOVA; $F_{8,43} = 1,321$ $p = 0,259$) (Figura 3a). Para a exposição ao EE₂, ocorreram diferenças significativas no tamanho dos indivíduos adultos nas quatro maiores concentrações (68,5; 96,0; 134,5 e 188,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), sendo que nestas concentrações os organismos apresentaram tamanho do corpo (expresso em mm) menor do que os indivíduos no controle (Kruskal-Wallis $H = 43,166$ $p \leq 0,001$; Teste de Dunn $p < 0,05$) (Figura 3b).

Figura 3 - Valores do tamanho médio do corpo dos adultos de *Ceriodaphnia rigaudi* ao final dos testes de toxicidade crônica após exposição aos compostos tóxicos isoladamente: (A): ATZ e (B) EE₂. As barras representam o tamanho médio do corpo (mm) de três adultos para o controle e para cada concentração testada. As linhas verticais representam o desvio padrão e o asterisco (*) indica diferença significativa entre o resultado obtido em cada tratamento e o controle



3.3. Teste de toxicidade dos compostos em mistura

Como o modo de ação dos compostos ATZ e EE₂ não é ainda conhecido para *C. rigaudi*, optou-se por testar os modelos de referência CA e IA e ver qual descreveria melhor os resultados obtidos. O valor da CE_{50-7dias} (teste de toxicidade crônica), para cada um dos compostos testados de forma individual simultaneamente ao teste de misturas foi de $46,84 \pm 7,14 \mu\text{g L}^{-1}$ para o EE₂ e de $40,32 \pm 21,74 \mu\text{g L}^{-1}$ para a ATZ.

Para os dois modelos de referência testados, CA e IA, o melhor ajuste e resultados mais significativos foram obtidos com o modelo IA. Todos os dados e parâmetros do teste de significância obtidos pela ferramenta MIXTOX são apresentados na Tabela 3.4 (para ambos modelos). O ajuste dos dados ao modelo IA produziu uma soma dos quadrados dos resíduos (SS) de 179,19 com $p < 0,05$ e r^2 de 0,65. Após adicionar o parâmetro “a” no modelo IA para descrever o desvio S/A, o valor de SS diminuiu para 174,55, porém não foi estatisticamente significativo ($p = 0,331$). Para a análise do desvio dependente da dose (DR) e desvio dependente do nível da dose (DL), foram utilizados os parâmetros e

desvios calculados em IA. Ao se adicionarem os parâmetros “a” e “b_{DR}”, para o DR, foi observada uma diminuição de SS para 165,41, que não foi estatisticamente significativo ($p = 0,236$). Já a adição dos parâmetros “a” e “b_{DL}” para o DL, foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$ e r^2 de 0,768) com SS diminuindo para 118,71.

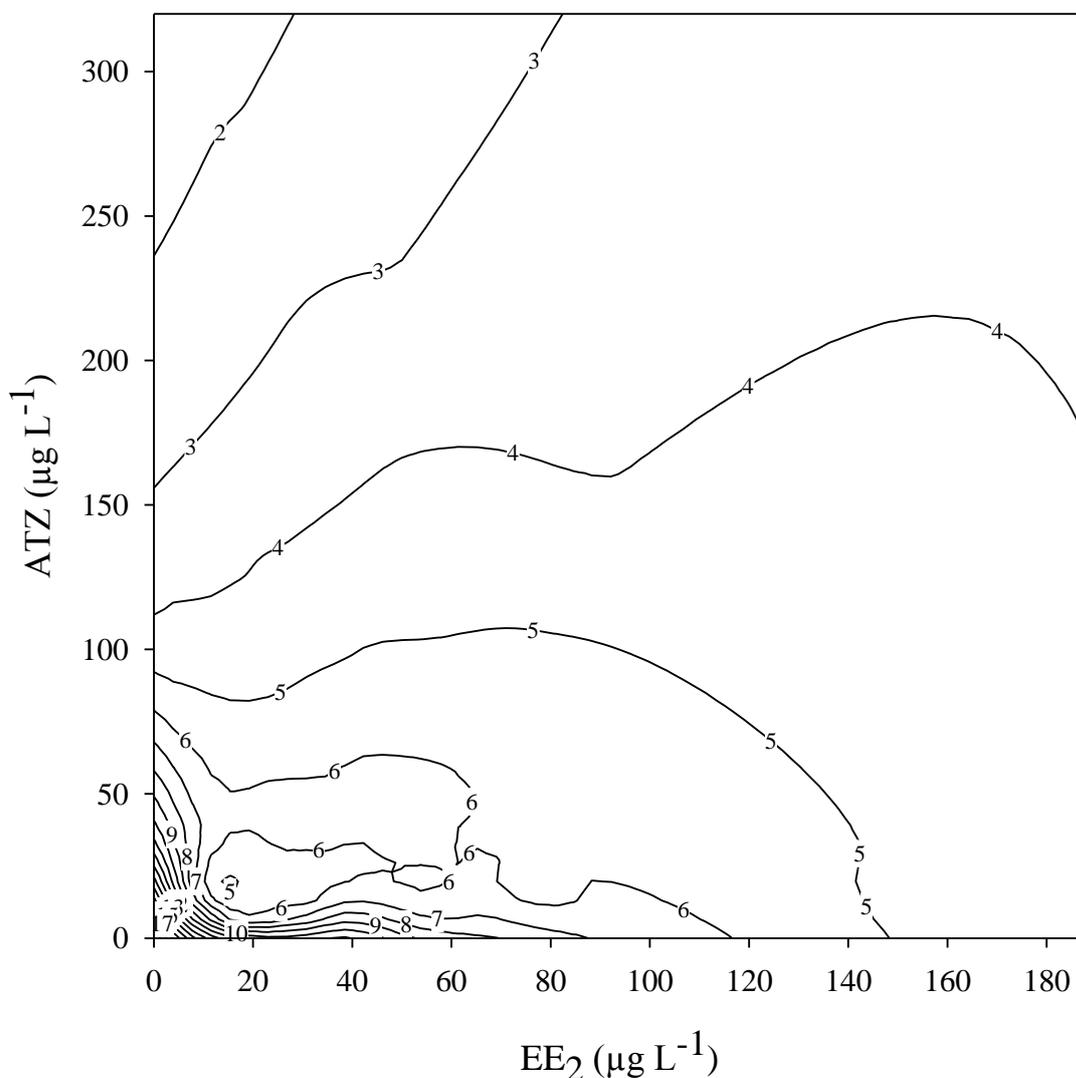
Com esses resultados, pode se observar que houve interação entre os compostos analisados e essa interação na mistura foi dependente do nível da dose (DL). Houve sinergismo em nível de dose baixo, ou seja, nas menores concentrações, e o antagonismo pode ser observado nas concentrações maiores com a mudança da interação ocorrendo maior que a CE₅₀ (Figura 4).

Tabela 3.4 - Parâmetros e resultados da análise (usando MIXTOX) do teste de toxicidade crônica da exposição do cladóceros *Ceriodaphnia rigaudi* à mistura do 17 α -etinilestradiol e atrazina, usando o Modelo de Adição (CA) e o Modelo de Ação Independente (IA)

	Modelo CA				Modelo IA			
	CA	S/A	DR	DL	IA	S/A	DR	DL
max	19,17	20,18	20,19	20,29	18,64	19,04	19,39	20,16
β_{EE2}	0,95	0,095	0,090	0,100	0,209	0,169	0,047	0,890
β_{ATZ}	1,09	1,079	1,081	1,070	0,928	0,918	0,938	1,275
CE ₅₀ EE2	46,84	0,033	0,021	0,047	20,53	10,65	0,011	43,27
CE ₅₀ ATZ	40,32	41,34	41,36	39,52	62,84	52,84	51,01	39,98
“a”	-	-159,11	-132,02	0,032	-	0,717	-688102	-8,937
b _{DR} /DL	-	-	-113,35	6,089	-	-	689115	1,434
SS	260,17	154,44	154,44	162,47	179,19	174,55	165,41	118,71
r^2	0,492	0,698	0,698	0,683	0,650	0,659	0,677	0,768
Teste χ^2 ou F	7,52	18,77	0,00059	-1,825	14,422	0,944	2,882	14,824
df	-	1	1	1	-	1	2	2
p (χ^2 ou F)	0,00023	0,000014	0,980	-	0,0000009305	0,331	0,236	0,0006

CA: modelo de Adição de concentração; IA: modelo de Ação Independente; S/A: desvio Sinergismo ou antagonismo; DR: desvio Dependente da Proporção da Dose; DL: desvio Dependente do Nível da Dose; max: valor máximo da resposta; β slope da curva de resposta á dose individual; CE₅₀: concentração média efetiva; “a”, b_{DR} e b_{DL}: parâmetros da função; SS: soma dos quadrados dos resíduos; r^2 : coeficiente de regressão; Teste χ^2 ou F: teste estatístico; df: grau de liberdade; p (χ^2 ou F): nível de significância do teste estatístico.

Figura 4 - Isoblograma para os resultados do teste de toxicidade da mistura de atrazina e etinilestradiol sobre a fecundidade (número de neonatas por fêmea) da espécie *Ceriodaphnia rigaudi* para o nível dependente da dose (DL) no modelo de ação independente (IA)

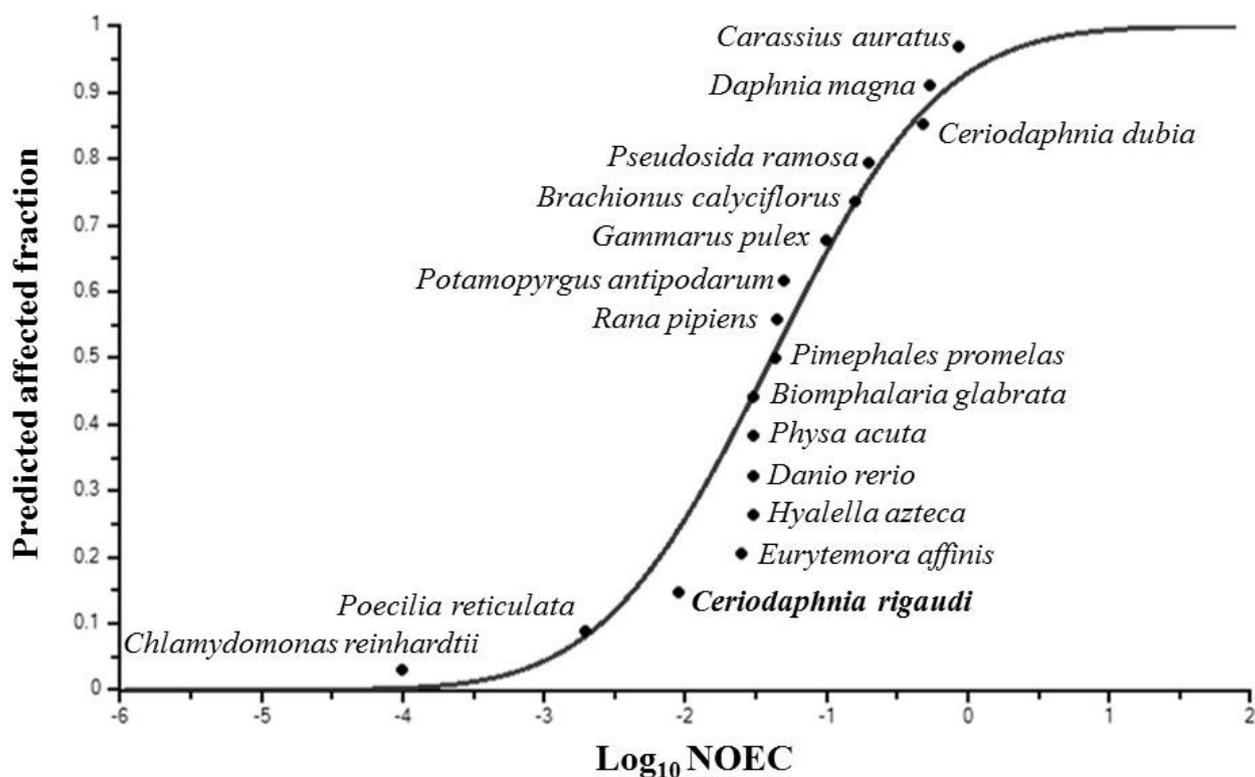


3.4. Distribuição das espécies e avaliação de risco ecológico

A análise da curva SSD obtida para a ATZ (Figura 5) e o EE₂ (Figura 6) indica que a espécie *C. rigaudi* é uma espécie sensível. Porém, ela é mais sensível à ATZ do que ao EE₂. Com relação ao herbicida, a espécie *C. rigaudi* foi mais sensível que a grande maioria dos organismos, tanto invertebrados quanto vertebrados. Sua sensibilidade foi maior que a de todos os outros crustáceos representados na curva, como *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*, *Pseudosida ramosa* e também maior que a do rotífero *Brachionus*

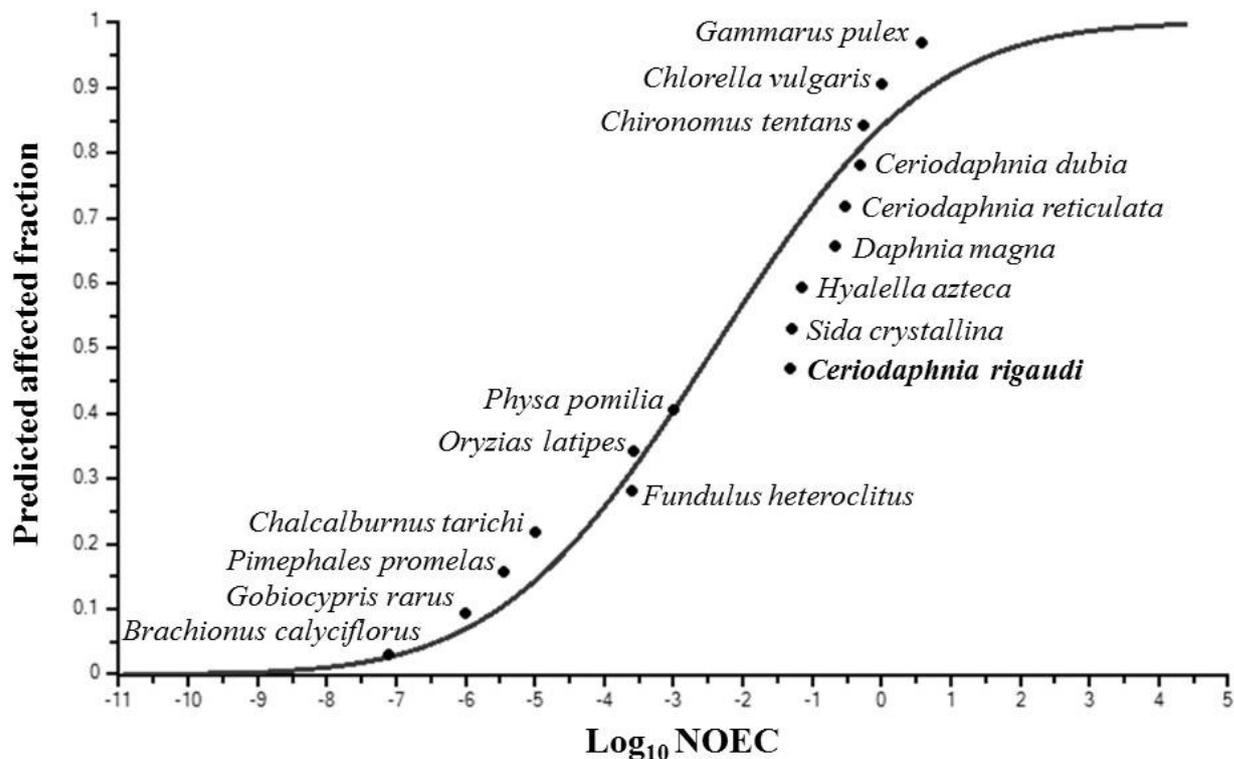
calyciflorus. *C. rigaudi* só foi menos sensível que a alga *Chlamydomonas reinhardtii* e o peixe *Poecilia reticulata*.

Figura 5 - Curva de distribuição da sensibilidade das espécies (SSD) construída com base nos valores da concentração de efeito não observado (NOEC) para o herbicida atrazina obtidos para *Ceriodaphnia rigaudi* (em negrito) e para outros organismos com dados obtidos da literatura



Com relação ao hormônio, a espécie *C. rigaudi* foi mais sensível que todos os crustáceos representados na curva SSD, como *D. magna*, *C. dubia*, *C. reticulata*, e também mais sensível que a larva do inseto *Chironomus tentans* e a alga *Chlorella vulgaris*. Esta espécie foi menos sensível o rotífero *Brachionus calyciflorus*, que o molusco *Physa pomilia* e que todos os peixes da curva, como *Oryzias latipes* e *Pimephales promelas*.

Figura 6 - Curva de distribuição da sensibilidade das espécies (SSD) construída com base nos valores da concentração de efeito não observado (NOEC) para o hormônio 17 α -etinilestradiol obtidos experimentalmente para *Ceriodaphnia rigaudi* (em negrito) e para outros organismos com base em dados da literatura



Os valores de concentração perigosa para 5% e 50% (HC₅ e HC₅₀) (Tabela 3.5), obtidos na curva, revela que para a HC₅ a espécie *C. rigaudi* estaria protegida contra os efeitos tóxicos de ambos os compostos. De acordo com os valores de HC₅₀, a espécie estaria protegida dos efeitos do hormônio, porém, não estaria protegida dos efeitos da atrazina.

Tabela 3.5 - Valor médio da concentração perigosa para 5% (HC₅) e 50% (HC₅₀) dos indivíduos de *Ceriodaphnia rigaudi* e seus respectivos intervalos de confiança de 95% (IC 95%) e NOEC para a atrazina e o 17 α -etinilestradiol

Toxicidade crônica (NOEC)	HC ₅ ($\mu\text{g L}^{-1}$)		HC ₅₀ ($\mu\text{g L}^{-1}$)		Organismo ($\mu\text{g L}^{-1}$)
	HC ₅	IC 95%	HC ₅₀	IC 95%	<i>C. rigaudi</i>
Atrazina	1,07	0,18-3,43	40,83	16,29-102,34	9
17α-etinilestradiol	0,000324	0,00000288-0,00702	3,83	0,331-44,34	49

Para avaliação preliminar do risco ecológico dessas substâncias, o quociente de risco foi calculado utilizando a NOEC. Os dados de RQ, PNEC e PEC podem ser observados na Tabela 3.6. Para a obtenção dos dados de PNEC, a NOEC é dividida pelo AF (TGD, 2003), que, nesse caso será igual a 100. Os resultados mostram que, tanto o herbicida como o hormônio apresentam alto potencial de risco ecológico para a biota das águas brasileiras, pois os valores de RQ foram superiores a 1.

Tabela 3.6 - Risco ecológico do herbicida atrazina e do hormônio etinilestradiol calculado pelo quociente de risco (RQ), com base nos dados da concentração de efeito não observado (NOEC) (PNEC - $\mu\text{g L}^{-1}$). MEC ($\mu\text{g L}^{-1}$) é baseado na concentração ambiental média medida em rios brasileiros (dados da literatura); RQ (MEC/ PNEC)

Compostos	MEC	PNEC	RQ	Nível de risco
ATZ	0,611 ^a	0,09	6,79	Alto
EE₂	0,777 ^a	0,49	1,58	Alto

^a Concentração ambiental média determinada por Montagner *et al.*, 2019

4. Discussão

O valor médio da CE_{50-48h} do cloreto de sódio da faixa de sensibilidade de *C. rigaudi*, obtido experimentalmente pelos testes de sensibilidade foi comparado com o valor do CE_{50-48h} médio também do cloreto de sódio da faixa de sensibilidade de *C.*

silvestrii, por serem espécies do mesmo gênero e muito parecidas quanto ao tamanho. *C. rigaudi* apresentou um valor do limite inferior da faixa de sensibilidade menor do que o das faixas de referência de *C. silvestrii*, porém, o valor de variação dos testes ficou próximo daquele das faixas de sensibilidade de: 1,0 - 1,83 g L⁻¹ obtido por Casali-Pereira *et al.* (2015) e de 1,0 – 1,32 g L⁻¹, obtido por Mansano *et al.* (2016).

Por meio dos testes de toxicidade crônica das substâncias testadas isoladamente o valor da CE₅₀₋₇ dias obtido foi de 82,94 ± 4,63 µg L⁻¹ para o EE₂ e de 79,52 ± 9,25 µg L⁻¹ para a ATZ. Ambos os compostos afetaram negativamente a fecundidade de *C. rigaudi*, porém, o efeito da ATZ reduziu o número de neonatas deste cladóceros em todas as concentrações, enquanto que, com a exposição ao EE₂, a diminuição ocorreu apenas nas quatro maiores concentrações do composto, evidenciando, desta forma, que a atrazina tem efeitos adversos em concentrações bem abaixo do EC₅₀, em comparação com o EE₂.

Diversos estudos ecotoxicológicos tem mostrado que a exposição ao EE₂ causa alterações nos parâmetros reprodutivos tanto de vertebrados como de invertebrados. Alterações de fecundidade foram observadas no peixe *Pimephales promelas* (Armstrong *et al.* 2016) após exposição a este hormônio. Capolupo *et al.* (2018) expuseram diferentes espécies (ouriço do mar, mexilhão e peixe) ao EE₂ e observaram diminuição na fertilização do ouriço do mar *Paracentrotus lividus* e do mexilhão *Mytilus galloprovincialis*, bem como o desenvolvimento anormal das larvas destas espécies Leonard *et al.* (2017) observaram atraso na maturação dos ovos e no desenvolvimento embrionário do molusco *Elliptio complanata* e constataram que a fisiologia dos machos ao contaminante foi mais sensível e afetada que a das fêmeas.

Desregulação endócrina foi observada por Voisin *et al.* (2016) para o peixe *Kryptolebias marmoratus* quando exposto ao EE₂. Eles observaram diminuição no número de ovos dos indivíduos em concentração baixa e ambientalmente relevante deste hormônio (4 ng L⁻¹) e, em uma concentração mais alta (120 ng L⁻¹), verificaram um aumento tardio no nível de andrógenos. Estes autores concluíram que o aumento tardio de hormônio no indivíduo poderia ser devido ao efeito do EE₂ e que a exposição a este hormônio pode levar a impactos duradouros no sistema endócrino destes peixes (Voisin *et al.*, 2016).

A atrazina é um herbicida que age no fotossistema II de plantas, inibindo o transporte de elétrons e afetando a fotossíntese (Silveyra *et al.*, 2018; Religia *et al.*, 2019). Também pode ocorrer em algas como *Chlamydomonas reinhardtii* (Esperanza *et al.*, 2015; Fernandez-Naveira *et al.*, 2016) e *Chlorella* sp (Sun *et al.*, 2020), que quando

expostas ao herbicida ATZ, apresentaram inibição de crescimento. Além de inibir o crescimento, a exposição ao ATZ pode diminuir o teor de clorofila *a* (Fernandez-Naveira *et al.*, 2016; Chin *et al.*, 2019), o que pode ser explicado pelo modo de ação deste herbicida.

Quando indivíduos não fotossintéticos foram expostos ao herbicida, foram observados efeitos endócrinos com ocorrência de alterações morfológicas e em parâmetros reprodutivos. Redução da fertilidade foi observada por Freitas e Rocha (2012) para o cladóceros *Pseudosida ramosa* exposta à atrazina. Fêmeas de *Daphnia magna* alimentada com alga previamente exposta à ATZ, produziram uma quantidade maior de neonatas, comparado ao controle, porém houve aumento no número de neonatas inviáveis, que apresentaram anormalidades no corpo e na segunda antena (Religia *et al.* (2019).

Silveyra *et al.* (2018) ao exporem a espécie de lagostim *Procambarus clarkii* à ATZ observaram que houve inibição do crescimento ovariano e concluíram que a atrazina inibe a produção de vitelogenina nas fêmeas, em decorrência da inibição da sua expressão nos ovários e hepatopâncreas. Yoon *et al.* (2019) observaram atraso no tempo de desenvolvimento das fases de náuplio para copepodito e de copepodito para adulto ao expor o copépodo marinho *Tigriopus japonicus* à ATZ.

Em nosso estudo foi observado que a exposição de *C. rigaudi* ao EE₂ causou a diminuição do tamanho do corpo dos organismos adultos nas maiores concentrações, sendo estas as mesmas concentrações em que a fertilidade foi também afetada. A exposição à ATZ não afetou o tamanho do corpo dos adultos.

Levando em consideração o modo de ação de cada composto, ambos agem nos organismos como desreguladores endócrinos. Em invertebrados, o EE₂ pode agir inibindo a expressão de genes que estão envolvidos na via de sinalização não genômica do estrogênio, interrompendo as vias de regulação hormonal (Cuvillier-Hot e Lenoir, 2020), podendo causar efeitos na reprodução e tamanho dos organismos. Já a ATZ pode agir diminuindo o metabolismo celular e alterando a maturação ovariana (Albuquerque *et al.*, 2020).

Sendo a atrazina um herbicida amplamente utilizado na agricultura (Religia *et al.*, 2019; Albuquerque *et al.*, 2020) e o 17 α -etinilestradiol muito usado pelas mulheres por estar presente na formulação de anticoncepcionais (Kovacevic *et al.*, 2019), ambas substâncias são frequentemente encontradas ocorrendo juntas nos corpos d'água. Em águas superficiais, potável e subterrânea, do Estado de São Paulo (Brasil), dentre os

compostos identificados, ambos, a atrazina e o 17 α -etinilestradiol estavam presentes. Em águas superficiais, concentrações de até 611 ng L⁻¹ de ATZ e 777 ng L⁻¹ de EE₂ foram registradas. Em água potável o valor médio encontrado para ATZ e EE₂ foi de 36 e 32 ng L⁻¹, respectivamente (Montagner *et al.*, 2019). Ambas as substâncias são consideradas de preocupação prioritária e de risco para os organismos aquáticos, de acordo com a avaliação de risco preliminar (Montagner *et al.*, 2019).

Esses dois compostos também foram identificados por Sposito *et al.* (2018) nos Rios Dourado e Brilhante no Mato Grosso do Sul (Brasil) nas concentrações de 42,1 e 38,5 ng L⁻¹ para ATZ e EE₂, respectivamente e por Griffero *et al.* (2019) em lagoas no Uruguai, com 11,6 μ g L⁻¹ de EE₂ e 0,48 μ g L⁻¹ de ATZ.

No ambiente, os organismos ficam expostos às misturas dos contaminantes que podem interagir produzindo efeitos sinérgicos, aditivos ou antagônicos (Rocha *et al.*, 2018; Mansano *et al.*, 2017; Barata *et al.*, 2006). A mistura do herbicida ATZ e do hormônio EE₂ na espécie *C. rigaudi* foi analisada seguindo os parâmetros e ajustes do modelo IA. As CE₅₀-7dias obtidas para os compostos isolados tiveram valores muito semelhantes, de 46,84 \pm 7,14 μ g L⁻¹ para o EE₂ e 40,32 \pm 21,74 μ g L⁻¹ para a ATZ. A análise pelo software MIXTOX mostrou que os compostos em estudo interagem entre si e essa interação é dependente do nível da dose, apresentando sinergismo nas concentrações mais baixas e antagonismo nas maiores concentrações.

A ocorrência de interação em nível da dose também foi observada por Freitas *et al.* (2018), para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* exposto a dois antibióticos (florfenicol e oxitetraciclina). Nesse caso, o antagonismo foi observado em baixas doses e o sinergismo nas doses mais altas, diferente do que ocorreu no presente estudo.

É difícil prever os efeitos das misturas das substâncias pelo seu modo de ação, pois, mesmo que compostos tenham um alvo similar, quando em combinação, seus efeitos podem ser diferentes (Zhao *et al.*, 2018). Um resultado de Zhao *et al.* (2018) mostrou a ocorrência de antagonismo nas concentrações mais baixas da mistura de ATZ com mesotriona (herbicida) para a microalga *Selenastrum capricornutum*; e sinergismo nas baixas concentrações e antagonismo nas altas concentrações na mistura de Halossulfurom-metílico e butacloro, foram observadas por Zhao *et al.* (2018.) Nesse segundo caso, o antagonismo nas altas concentrações foi relacionado aos locais de ligação de proteínas, que foram preenchidos pelos produtos químicos que competem de maneira individual para ocupar os locais sobrepostos. Uma das explicações para o sinergismo seria

a alteração de enzimas que modificam o metabolismo do composto tóxico (Zhao *et al.*, 2018).

No presente estudo, o modelo que mais se adequou foi o de Ação Independente (IA), ou seja, os compostos agem de formas diferentes. Nesse caso, cada composto irá ocupar seu sítio, e a ATZ, ao ativar enzimas de desintoxicação, irá influenciar a metabolização dos compostos e diminuir o hormônio.

A ATZ e o EE₂, podem ser consideradas substâncias com um potencial de alto risco ecológico para o ambiente aquático. Segundo Montagner *et al.* (2019), esses compostos estão entre aqueles considerados preocupantes, por apresentarem risco ecológico para a vida aquática. A preocupação com o etinilestradiol, por apresentar alto risco ambiental, também foi considerado por Griffero *et al.* (2019), Capolupo *et al.* (2018), Torres *et al.* (2015) e Wang *et al.* (2018). O risco da ATZ também é reportado por Montiel-León *et al.* (2019), Zheng *et al.* (2017) e Sousa *et al.* (2016).

Dependendo da substância e do ambiente em que estão, os organismos apresentam sensibilidades diferentes. Organismos de regiões temperadas podem ser menos sensíveis do que organismos de regiões tropicais (ou o inverso), dependendo da substância (Wang *et al.*, 2014). Cada região possui características próprias físico-químicas, de espécies e funcionais. Devido a essas características, a toxicidade de uma substância em determinada região pode diferir da toxicidade em outra região, mesmo que em organismos monofiléticos. Sendo assim, dados obtidos para organismos em uma região não podem proteger as espécies de outra região, por que a resposta à toxicidade pode ser diferente (Raymundo *et al.*, 2019).

A sensibilidade entre espécies de outras regiões nem sempre difere grandemente, porém, o uso de espécies tropicais (no caso do Brasil) é recomendado. O uso de espécies nativas tropicais torna a sensibilidade e a avaliação do risco potencial do composto na água ecologicamente mais relevantes (Rocha *et al.*, 2018; Mansano *et al.*, 2016).

Devido à sua elevada sensibilidade, ao fácil cultivo e manutenção no laboratório, além da sua reprodução partenogênica e rápida, a *Ceriodaphnia rigaudi* se mostrou um organismo-teste adequado para análises ecotoxicológicas.

5. Conclusão

Nosso estudo demonstrou que, tanto o EE₂ quanto a ATZ de forma isolada, afetam a reprodução do cladóceros *Ceriodaphnia rigaudi*. A ATZ diminui a fertilidade deste

cladóceros em todas as concentrações testadas, mas não afeta o tamanho corpóreo dos adultos. Já o EE₂ diminuiu a fertilidade da *C. rigaudi* nas maiores concentrações testadas, nas quais foi observada a diminuição do tamanho corporal das fêmeas adultas. Quando em mistura, os compostos ATZ e EE₂, os compostos interagem causando sinergismo nas baixas concentrações e antagonismo nas altas concentrações, evidenciando que em concentrações próximas das ambientalmente relevantes, os compostos podem ter um efeito potencializador, afetando os indivíduos de forma mais severa. Além disso, ambos os compostos apresentaram alto risco ecológico para o ambiente aquático. *Ceriodaphnia rigaudi* é um organismo-teste adequado por apresentar sensibilidade e exibir respostas à toxicidade dos compostos. Além disso, são organismos nativos de fácil cultivo e manutenção em laboratório, sendo importante o seu uso em análises ecotoxicológicas para estudos em ambientes tropicais.

Referências

- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae). **ABNT NBR 12648**, 2018
- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera). **ABNT NBR 13373**, 2017
- ALBUQUERQUE, F.P., OLIVEIRA, J.L., MOSCHINI-CARLOS, V., FRACETO, L.F. **An overview of the potential impacts of atrazine in aquatic environments: Perspectives for tailored solutions based on nanotechnology.** Science of the Total Environment, 700, 134868, 2020
- ALDENBERG, T., JAWORSKA, J.S. **Uncertainty of hazardous concentrations and fraction affected for normal species sensitivity distributions.** Ecotoxicol. Environ. Saf. 46, 1-18, 2000
- ARMSTRONG, B.M., LAZORCHAK, J.M., JENSEN, K.M., HARING, H.J., SMITH, M.E., FLICK, R.W., BENCIC, D.C., BIALE, A.D. **Reproductive effects in fathead minnows (*Pimphales promelas*) following a 21 d exposure to 17 α -ethinylestradiol.** Chemosphere, 144, 366–373 p, 2016
- AVAR, P., ZRÍNY, Z., MAÁSZ, G., TAKÁTSY, A., LOVAS, S., G.TÓTH, L., PIRGER, Z. **β -estradiol and ethinyl-estradiol contamination in the rivers of the Carpathian Basin.** Environ. Sci. Pollut. Res., 23, 11630–11638 p, 2016
- BALINA, K.; BALODE, M.; MUZIKANTE, L.; BLUMBERGA, D. **Impact of synthetic hormone 17 α -ethinylestradiol on growth of microalgae *Desmodesmus communis*.** Agron. Res., 13: 2, 445-454 p, 2015
- BARATA, C., BAIRD, D.J., NOGUEIRA, A.J.A., SOARES, A.M.V.M., RIVA, M.C. **Toxicity of binary mixtures of metals and pyrethroid insecticides to *Daphnia magna* Straus.** Implications for multi-substance risks assessment. Aquatic Toxicology, 78, 1–14p, 2006
- BARBOSA, M.O., RIBEIRO, A.R., RATOLA, N., HAIN, E., HOMEM, V., PEREIRO, M.F.R., BLANEY, L., SILVA, A.M.T. **Spatial and seasonal occurrence of micropollutants in four Portuguese rivers and a case study for fluorescence excitation-emission matrices.** Science of the Total Environment, 644, 1128–1140 p, 2018
- BARONTI, C., CURINI, R., D' ASCENZO, G., DI CORCIA, A., GENTILI, A., SAMPERI, R. **Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water.** Environ Sci. Technol., 34: 24, 5059-5066 p, 2000

- BAYEN, S., ESTRADA, E.S., JUHEL, G., KIT, L.W., KELLY, B.C. **Pharmaceutically active compounds and endocrine disrupting chemicals in water, sediments and mollusks in mangrove ecosystems from Singapore.** *Marine Pollution Bulletin*, 109, 716–722 p, 2016
- BELHAJ, D., ATHMOUNI, K., FRIKHA, D., KALLEL, M., FEKI, A.E., MAALEJ, S., ZHOU, J.L., AYADI, H. **Biochemical and physiological responses of halophilic nanophytoplankton (*Dunaliella salina*) from exposure to xeno-estrogen 17 α -ethinylestradiol.** *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 24, 7392–7402 p, 2017
- BIZARRO, C., EIDE, M., HITCHCOCK, D.J., GOKSØYR, A., ORTIZ-ZARRAGOITIA, M. **Single and mixture effects of aquatic micropollutants studied in precision-cut liver slices of Atlantic cod (*Gadus morhua*).** *Aquatic Toxicology*, 177, 395–404 p, 2016
- BORYSCO, L., ROSS, P.M. **Adult exposure to the synthetic hormone 17 α -ethinylestradiol affects offspring of the gastropods *Nassarius burchardi* and *Nassarius jonassii*.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 103, 91–100 p, 2014
- BRAIN, R.A., ARNIE, J.R., PORCH, J.R., HOSMER, A.J. **Recovery of photosynthesis and growth rate in green, blue-green, and diatom algae after exposure to atrazine.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31:11, 2572–2581 p, 2012
- CALLICOTT, K., HOOPER-BÙI, L. **An investigation of environmental concentrations of atrazine, chlorothalonil, and fipronil in a Mississippi River-influenced marsh in southern Louisiana.** *Microchemical Journal*, 146, 1241–1248 p, 2019
- CAPOLUPO, M., DÍAZ-GARDUÑO, B., MARTÍN-DÍAZ, M.L. **The impact of propranolol, 17 α -ethinylestradiol, and gemfibrozil on early life stages of marine organisms: effects and risk assessment.** *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 32196–32209 p, 2018
- CASALI-PEREIRA, M.P., DAAM, M.A., RESENDE, J.C., VASCONCELOS, A.M., ESPÍNDOLA, E.L.G., BOTTA, C.M.R. **Toxicity of Vertimec® 18 EC (active ingredient abamectin) to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*.** *Chemosphere*, 139, 558–564 p, 2015
- CASSEE, F.R., GROTEN, J.P., BLADEREN, P.J., FERON, V.J. **Toxicological evaluation and risk assessment of chemical mixtures.** *Crit. Rev. Toxicol.*, 28, 73-101 p, 1998
- CECCARELLI, I., FIORENZANI, P., SETA, D.D., ALOISI, A.M. **Perinatal 17 α -ethinylestradiol exposure affects formalin-induced responses in middle-aged male (but not female) rats.** *Hormones and Behavior*, 73, 116–124 p, 2015
- CHIN, Y.Y., CHU, W.L., KOK, Y.Y., PHANG, S.M., WONG, C.Y., TAN, B.K., MUSTAFA, E.M. **Sensitivity of selected tropical microalgae isolated from a farmland and a eutrophic lake to atrazine and endosulfan.** *Journal of Applied Phycology*, 31, 2981–2998p, 2019

CUVILLIER-HOT, V., LENOIR, A. **Invertebrates facing environmental contamination by endocrine disruptors: Novel evidences and recent insights.** *Molecular and Cellular Endocrinology*, 504, 110712, 2020

CZARNY, K., SZCZUKOCKI, D., KRAWCZYK, B., SKRZYPEK, S., ZIELIŃSKI, M., GADZAŁA-KOPCIUCH, R. **Toxic effects of single animal hormones and their mixtures on the growth of *Chlorella vulgaris* and *Scenedesmus armatus*.** *Chemosphere*, 224, 93-102 p, 2019

DECOURTEN, B., CONNON, R.E., BRANDER, S.M. **Direct and indirect parental exposure to endocrine disruptors and elevated temperature influences gene expression across generations in a euryhaline model fish.** *PeerJ*, 1-22 p, 2019

DEMŠAR, J. **Statistical Comparisons of classifier over multiple data sets.** *Journal of Machine Learning Research*, 7, 1-30 p, 2006

ESPERANZA, M., SEOANE, M., RIOBOO, C., HERRERO, C., CID, A. ***Chlamydomonas reinhardtii* cells adjust the metabolism to maintain viability in response to atrazine stress.** *Aquatic Toxicology*, 2015

FAUST, M., ALTENBURGER, R., BACKHAUS, T., BLANCK, H., BOEDEKER, W., GRAMATICA, P., HAMER, V., SCHOLZE, M., VIGHI, M., GRIMME, L.H. **Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants.** *Aquatic Toxicology*, 56, 13–32 p, 2001

FENG, L., YANG, G., ZHU, L., XU, J., XU, X., CHEN, Y. **Distribution and Risk Assessment of Endocrine-Disrupting Pesticides in Drinking Water Sources from Agricultural Watershed.** *Water Air Soil Pollut*, 227: 23, 2016

FERNÁNDEZ-NAVEIRA, A., RIOBOO, C., CID, A., HERRERO, C. **Atrazine induced changes in elemental and biochemical composition and nitrate reductase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*.** *European Journal of Phycology*, 51, 338-345 p, 2016

FINGLER, S., MENDAŠ, G., DVORŠČAK, M., STIPIČEVIĆ, S., VASILIC, Ž., DREVENKAR, V. **Herbicide micropollutants in surface, ground and drinking waters within and near the area of Zagreb, Croatia.** *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 24, 11017–11030 p, 2017

FRANÇA, J.F., PICKLER, T.B., JOZALA, A.F., SANTOS, C.A., BATISTA, B.L., PEDRON, T., VIEIRA, R.A.L., GROTO, D. **Determination of 17 α -ethinylestradiol and toxic metals in surface waters, and estimation of daily intake.** *Environ. Monit. Assess.* 192: 21, 1-10 p, 2020

FREITAS, E.C., ROCHA, O. **Acute and chronic effects of atrazine and sodium dodecyl sulfate on the tropical freshwater cladoceran *Pseudosida ramosa*.** *Ecotoxicology* 21:1347–1357, 2012

FREITAS, E.C., ROCHA, O., ESPÍNDOLA, E.L.G. **Effects of florfenicol and oxytetracycline on the tropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii***: A mixture toxicity approach to predict the potential risks of antimicrobials for zooplankton. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 162, 663–672, 2018

FREITAS, E.C., PINHEIRO, C., ROCHA, O., LOUREIRO, S. **Can mixtures of cyanotoxins represent a risk to the zooplankton?** The case study of *Daphnia magna* Straus exposed to hepatotoxic and neurotoxic cyanobacterial extracts. *Harmful Algae*, Vol. 31, 143–152 p, 2014

GRIFFERO, L., ALCÂNTARA-DURÁN, J., ALONSO, C., RODRÍGUEZ-GALLEGO, L., MORENO-GINZÁLEZ, D., GARCIA-REYES, J.F., MOLINA-DÍAZ, A., PÉREZ-PARADA, A. **Basin-scale monitoring and risk assessment of emerging contaminants in South American Atlantic coastal lagoons**. *Science of the Total Environment* Vol. 697, No. 134058, 2019

JONKER, M.J., SVENDSEN, C., BEDAUX, J.J.M., BONGERS, M., KAMMENGA, J.E. **Significance testing of synergistic/antagonistic, Dose Level–dependent, or Dose Ratio–dependent effects in mixture Dose–response analysis**. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24:10, 2701–2713 p, 2005

KOVACEVIC, V., SIMPSON, A.J., SIMPSON, M.J. **The concentration of dissolved organic matter impacts the metabolic response in *Daphnia magna* exposed to 17 α -ethynylestradiol and perfluorooctane sulfonate**. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 170, 468–478 p, 2019

LEONARD, J.A., COPE, W.G., BARNHART, M.C., BRINGOLF, R.B. **Metabolomic, behavioral, and reproductive effects of the synthetic estrogen 17 α -ethynylestradiol on the unionid mussel *Lampsilis fasciola***. *Aquatic Toxicology* 150, 103–116 p, 2014

LEONARD, J.A., COPE, W.G., HAMMER, E.J., BARNHART, M.C., BRINGOLF, R.B. **Extending the toxicity-testing paradigm for freshwater mussels: Assessing chronic reproductive effects of the synthetic estrogen 17 α -ethynylestradiol on the unionid mussel *Elliptio complanata***. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 191, 14–25 p, 2017

MACHADO, K.C., GRASSI, M.T., VIDAL, C., PESCARA, I.C., JARDIM, W.F., FERNANDES, A.N., SODRÉ, F.F., ALMEIDA, F.V., SANTANA, J.S., CANELA, M.C., NUNES, C.R.O., BICHINHO, K.M., SEVERO, F.J.R. **A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil**. *Science of the Total Environment*, Vol. 572, 138–146 p, 2016

MAHLER, B.J., VAN METRE, P.C., BURLEY, T.E., LOFTIN, K.A., MEYER, M.T., NOWELL, L.H. **Similarities and differences in occurrence and temporal fluctuations in glyphosate and atrazine in small Midwestern streams (USA) during the 2013 growing season**. *Science of the Total Environment*, 579, 149–158 p, 2017

MANSANO, A.S., MOREIRA, R.A., DORNFELD, H.C., DINIZ, L.G.R., VIEIRA, E.M., DAAM, M.A., ROCHA, O., SELEGHIM, M.H.R. **Acute and chronic toxicity of diuron and carbofuran to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii***. Environ. Sci. Pollut. Res. 25, 13335–13346, 2016

MANSANO, A.S., MOREIRA, R.A., DORNFELD, H.C., FREITAS, E.C., VIEIRA, E.M., SARMENTO, H., ROCHA, O., SELEGHIM, M.H.R. **Effects of diuron and carbofuran and their mixtures on the microalgae *Raphidocelis subcapitata***. Ecotoxicology and Environmental Safety, Vol. 142, 312–321 p, 2017

MARTÍN, J., CAMACHO-MUÑOZ, D., SANTOS, J.L., APARICIO, I., ALONSO, E. **Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: Removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal**. Journal of Hazardous Materials, 239–240, 40–47 p, 2012

MASIÁ, A., CAMPO, J., NAVARRO-ORTEGA, A., BARCELÓ, D., PICÓ, Y. **Pesticide monitoring in the basin of Llobregat River (Catalonia, Spain) and comparison with historical data**. Science of the Total Environment, 503–504, 58–68 p, 2015

MATTHIESSEN, P., WHEELER, J.R., WELTJE, L. **A review of the evidence for endocrine disrupting effects of current-use chemicals on wildlife populations**. Critical Reviews in Toxicology, 1–22 p, 2017

METCALFE, C.D., KOENIG, B.G., BENNIE, D.T., SERVOS, M., TERNES, T.A., HIRSCH, R. **Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants**. Environmental Toxicology and Chemistry, 22:12, 2872–2880 p, 2003

MOHAMMED, A. **Determining the suitability of *Ceriodaphnia rigaudii* as a toxicity test species**. WIT Transactions on Ecology and the Environment, 110, 219–225 p, 2008

MOHAMMED, A. **An approach for assessing the suitability of *Ceriodaphnia rigaudii* as an indigenous tropical toxicity test species**. Toxicological & Environmental Chemistry, 91:1, 79–86 p, 2009

MONTAGNER, C.C., SODRÉ, F.F., ACAYABA, D., VIDAL, C., CAMPESTRINI, I., LOCATELLI, M.A., PESCARA, I.C., ALBUQUERQUE, A.F., UMBUZEIRO, G.A., JARDIM, W.F. **Ten Years-Snapshot of the Occurrence of Emerging Contaminants in Drinking, Surface and Ground Waters and Wastewaters from São Paulo State, Brazil**. J. Braz. Chem. Soc., 30:3, 614–632 p, 2019

MONTIEL-LEÓN, J.M., DUY, S.V., MUNOZ, G., BOUCHARD, M.F., AMYOT, M., SAUVÉ, S. **Quality survey and spatiotemporal variations of atrazine and desethylatrazine in drinking water in Quebec, Canada**. Science of the Total Environment, 671, 578–585 p, 2019

OMRAN, N.E., SALAMA, W.M. **The endocrine disruptor effect of the herbicides atrazine and glyphosate on *Biomphalaria alexandrina* snails**. Toxicology and Industrial Health, 32:4, 656–665 p, 2016

PAPADAKIS, EN, TSABOULA, A, KOTOPOULOU, A, KINTZIKOGLU, K, VRYZAS, Z, PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. **Pesticides in the surface waters of Lake Vistonis Basin, Greece: occurrence and environmental risk assessment.** *Sci Total Environ* 536:793-802, 2015

PÉREZ, J., DOMINGUES, I., SOARES, A.M.V.M., LOUREIRO, S. **Growth rate of *Pseudokirchneriella subcapitata* exposed to herbicides found in surface waters in the Alqueva reservoir (Portugal): a bottom-up approach using binary mixtures.** *Ecotoxicology*, Vol. 20, No. 6, 1167-1175 p, 2011

RAYMUNDO, L.B., ROCHA, O., MOREIRA, R.A., MIGUEL, M., DAAM, M.A. **Sensitivity of tropical cladocerans to chlorpyrifos and other insecticides as compared to their temperate counterparts.** *Chemosphere*, 220, 937-942, 2019

RELIGIA, P., KATO, Y., FUKUSHIMA, E.O., MATSUURA, T., MURANAKA, T., WATANABE, H. **Atrazine exposed phytoplankton causes the production of non-viable offspring on *Daphnia magna*.** *Marine Environmental Research*, 145, 177–183 p, 2019

ROCHA, O., NETO, A.J.G., LIMA, J.C.S., FREITAS, E.C., MIGUEL, M., MANSANO, A.S., MOREIRA, R.A., DAAM, M.A. **Sensitivities of three tropical indigenous freshwater invertebrates to single and mixture exposures of diuron and carbofuran and their commercial formulations.** *Ecotoxicology*, Vol. 27, 834–844 p, 2018

SANDERSON, J.T., SEINEN, W., GIESY, J.P., VAN DEN BERG, M. **2-Chloro-s-Triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: a novel mechanism for estrogenicity?** *Toxicological Sciences*, 54, 121–127 p, 2000

SCALA-BENUZZI, M.L., RABA, J., SOLER-ILLIA, G.J.A.A., SCHNEIDER, R.J., MESSINA, G.A. **Novel Electrochemical Paper-Based Immunocapture Assay for the Quantitative Determination of Ethinylestradiol in Water Samples.** *Anal. Chem.*, 90, 4104–4111 p, 2018

SCOGNAMIGLIO, V., ANTONACCI, A., PATROLECCO, L., LAMBREVA, M.D., LITESCU, S.C., GHUGE, S.A., REA, G. **Analytical tools monitoring endocrine disrupting chemicals.** *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 80, 555–567 p, 2016

SHAO, Y., CHEN, Z., HOLLERT, H., ZHOU, S., DEUTSCHMANN, B., SEILER, T.B. **Toxicity of 10 organic micropollutants and their mixture: Implications for aquatic risk assessment.** *Science of the Total Environment*, 666, 1273–1282 p, 2019

SILVA, P., ROCHA, M.J., CRUZEIRO, C., MALHÃO, F., REIS, B., URBATZKA, R., MONTEIRO, R.A.F., ROCHA, E. **Testing the effects of ethinylestradiol and of an environmentally relevant mixture of xenoestrogens as found in the Douro River (Portugal) on the maturation of fish gonads—A stereological study using the zebrafish (*Danio rerio*) as model.** *Aquatic Toxicology*, 124–125, 1–10 p, 2012

SILVEYRA, G.R., SILVEYRA, P., VATNICK, I., MEDESANI, D.A., RODRÍGUEZ, E.M. **Effects of atrazine on vitellogenesis, steroid levels and lipid peroxidation, in female red swamp crayfish *Procambarus clarkii***. *Aquatic Toxicology*, 197, 136–142 p, 2018

SODRÉ, F.F., PESCARA, I.C., MONTAGNER, C.C., JARDIM, W.F. **Assessing selected estrogens and xenoestrogens in Brazilian surface waters by liquid chromatography–tandem mass spectrometry**. *Microchemical Journal*, Vol. 96, 92–98 p, 2010

SOUSA, A.S., DUAVI, W.C., CAVALCANTE, R.M., MILHOME, M.A.L., NASCIMENTO, R.F. **Estimated Levels of Environmental Contamination and Health Risk Assessment for Herbicides and Insecticides in Surface Water of Ceará, Brazil**. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 96:90–95, 2016

SPOSITO, J.C.V., MONTAGNER, C.C., CASDO, M., NAVARRO-MARTÍN, L., SOLÓRZANO, J.C.J., PIÑA, B., GRISOLIA, A.B. **Emerging contaminants in Brazilian rivers: Occurrence and effects on gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos**. *Chemosphere*, 209, 696-704 p, 2018

STATSOFT, INC. **Statistica (data analysis software system)**, version 07, 2004

STAYNER, L.T., ALMBERG, K., JONES, R., GRABER, J., PEDERSEN, M., TURYK, M. **Atrazine and nitrate in drinking water and the risk of preterm delivery and low birth weight in four Midwestern states**. *Environmental Research*, 152, 294–303 p, 2017

SUN, C., XU, Y., HU, N., MA, J., SUN, S., CAO, W., GLOBUČAR, G., HU, C., ZHAO, Y. **To evaluate the toxicity of atrazine on the freshwater microalgae *Chlorella* sp. using sensitive indices indicated by photosynthetic Parameters**. *Chemosphere*, 244, 125514, 2020

SYSTAT. **Systat Software, Incorporation SigmaPlot for Windows** version 11.0, 2008

TGD – **Technical Guidance Document on Risk Assessment**. *In support of*: Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances. Part II. European Commission, Joint Research Centre, 2003

THEODORSSON-NORHEIM, E. **Kruskal-Wallis test**: BASIC computer program to perform nonparametric one-way analysis of variance and multiple comparisons on ranks of several independent samples. **Computer Methods and Programs in Biomedicine**, Vol 23, 57-62 p, 1986

TORRES, N.H., AGUIAR, M.M., FERREIRA, L.F.R., AMÉRICO, J.H.P., MACHADO, A.M., CAVALCANTI, E.B., TORNISIELO, V.L. **Detection of hormones in surface and drinking water in Brazil by LC-ESI-MS/MS and ecotoxicological assessment with *Daphnia magna***. *Environ. Monit. Assess.* 187:379, 2-13 p, 2015

VAN DEN BELT, K., VERHEYEN, R., WITTERS, H. **Effects of 17 α -ethynylestradiol in a partial life-cycle test with zebrafish (*Danio rerio*): effects on growth, gonads and female reproductive success.** *The Science of the Total Environment*, 309:1–3, 127–137 p, 2003

VAN VLAARDINGEN, P., TRAAS, T.P., WINTERSEN, A.M., ALDENBERG, T. **ETX 2.0.** A program to calculate hazardous concentrations and fraction affected, based on normally distributed toxicity data. RIVM Report No. 601501028/2004. National Institute of Public Health and the Environment (RIVM), Bilthoven, the Netherlands, 2004

VANDENBERGH, G.F., ADRIAENS, D., VERSLYCKE, T., JANSSENA, C.R. **Effects of 17 α -ethynylestradiol on sexual development of the amphipod *Hyalella azteca*.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54, 216–222 p, 2003

VOISIN, A.S., FELLOUS, A., EARLEY, R.L., SILVESTRE, F. **Delayed impacts of developmental exposure to 17- α -ethynylestradiol in the self-fertilizing fish *Kryptolebias marmoratus*.** *Aquatic Toxicology*, 180, 247–257 p, 2016

WANG, S., ZHU, Z., HE, J., YUE, X., PAN, J., WANG, Z. **Steroid and phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) in surface water of Bahe River, China: Distribution, bioaccumulation, risk assessment and estrogenic effect on *Hemiculter leucisculus*.** *Environmental Pollution*, 243, 103–114 p, 2018

WANG, Z., KWOK, K.W.H., LUI, G.C.S., ZHOU, G.J., LEE, J.S., LAM, M.H.W., LEUNG, K.M.Y. **The difference between temperate and tropical saltwater species' acute sensitivity to chemicals is relatively small.** *Chemosphere*, 105, 31–43 p, 2014

WILKINSON, J.L., HOODA, P.S., SWINDEN, J., BARKER, J., BARTON, S. **Spatial distribution of organic contaminants in three rivers of Southern England bound to suspended particulate material and dissolved in water.** *Science of the Total Environment*, 593–594, 487–497 p, 2017

XU, H., YANG, J., WANG, Y., JIANG, Q., CHEN, H., SONG, H. **Exposure to 17 α -ethynylestradiol impairs reproductive functions of both male and female zebrafish (*Danio rerio*).** *Aquatic Toxicology*, 88: 1, 1–8 p, 2008

YOON, D.-S., PARK, J.C., PARK, H.G., LEE, J.-S., HAN, J. **Effects of atrazine on life parameters, oxidative stress, and ecdysteroid biosynthetic pathway in the marine copepod *Tigriopus japonicus*.** *Aquatic Toxicology*, 213, 105213, 2019

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis.** Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, 5 ed., 944 p, 2010

ZHAO, F., LI, Y., HUANG, L., GU, Y., ZHANG, H., ZENG, D., TAN, H. **Individual and combined toxicity of atrazine, butachlor, halosulfuronmethyl and mesotrione on the microalga *Selenastrum capricornutum*.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 148, 969–975 p, 2018

ZHENG, L., ZHANG, Y., YAN, Z., ZHANG, J., LI, L., ZHU, Y., ZHANG, Y., ZHENG, X., WU, J., LIU, Z. **Derivation of predicted no-effect concentration and ecological risk for atrazine better based on reproductive fitness.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 142, 464–470 p, 2017

**Toxicidade aguda e crônica intergeracional do herbicida atrazina ao
cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii***

Resumo

A atrazina (ATZ) é um herbicida amplamente utilizado na agricultura para combater ervas daninhas e que age no fotossistema II dos vegetais, diminuindo a capacidade fotossintética. A presença do herbicida nos corpos d'água está sendo frequentemente constatada em diferentes países, mesmo sabendo-se dos riscos que este composto representa para a biota aquática e para a saúde humana. A exposição em sucessivas gerações de um organismo a um composto químico permite observar se o efeito é transmitido no decorrer das gerações e, se esse efeito vai agir da mesma forma que a geração parental. Com isso, o objetivo do nosso estudo foi avaliar o efeito da ATZ na espécie tropical *Ceriodaphnia silvestrii* através de testes de toxicidade aguda e teste de toxicidade crônica intergeracional. Os *endpoints* observados foram imobilidade para o teste agudo e fecundidade e tamanho corporal para o teste intergeracional. Por meio do teste agudo foi obtida a CE_{50-48h} com valor igual a $35,2 \pm 3,8 \text{ mg L}^{-1}$. Através do teste crônico, foi observado diminuição da fecundidade em ambas gerações (F_0 e F_1). Na geração F_0 , a diminuição da fecundidade ocorreu apenas na penúltima concentração ($0,8 \text{ mg L}^{-1}$) e na geração F_1 , a diminuição da fecundidade ocorreu nas duas últimas concentrações ($0,8 \text{ mg L}^{-1}$ e $1,6 \text{ mg L}^{-1}$). O tamanho corporal das fêmeas adultas não apresentou diferença significativa em ambas as gerações. A ação da ATZ foi maior na segunda geração de *C. silvestrii*, mostrando que os danos desse composto podem ser transgeracionais. Com isso, pode-se concluir que a ATZ é um composto tóxico de elevado risco para a biota aquática e que afeta os organismos em concentrações ambientalmente relevantes.

Palavras-chave: Triazina; efeito transgeracional; organismo tropical; desregulador endócrino; risco ambiental

Abstract

Atrazine (ATZ) is an herbicide, widely used in agriculture to combat weeds, and acts on photosystem II of plants, decreasing photosynthetic capacity. The presence of the herbicide in water bodies is frequently observed in different countries, although it is well known the risk that this compound represents to aquatic biota and to human health. Exposure in successive generations of an organism to a chemical compound allows observing if the effect is transmitted over the generations and, if this effect will act in the same way as the parent generation. Thus, the aim of our study was to evaluate the effect of ATZ on tropical species *Ceriodaphnia silvestrii* through acute toxicity tests and chronic intergenerational toxicity tests. The observed endpoints were immobility for the acute test and fertility and body size for the intergenerational test. Through the acute test, the EC_{50-48h} was obtained with a value equal to $35.2 \pm 3.8 \text{ mg L}^{-1}$. Through the chronic test was observed a decrease in fecundity in both generations (F₀ and F₁). In F₀ generation, the decrease in fecundity occurred only at the penultimate concentration (0.8 mg L^{-1}), and in F₁ concentration, the fecundity decrease occurred in the last two concentrations (0.8 mg L^{-1} and 1.6 mg L^{-1}). There was no significant difference of size adult female body in both generations. ATZ's action was greater in the second generation of *C. silvestrii*, showing that the damage of this compound can be transgenerational. Thus, it can be concluded that ATZ is a high-risk toxic compound for aquatic biota and affects organisms in environmentally relevant concentrations.

Keywords: Triazine; transgenerational effect; tropical organisms; endocrine disruptor; environmental risk

1. Introdução

A atrazina (ATZ) é um herbicida amplamente utilizado na agricultura no combate às ervas daninhas. Ele atua inibindo a cadeia transportadora de elétrons reduzindo a conversão da energia luminosa para energia química, diminuindo desta forma a capacidade fotossintética de vegetais (Albuquerque *et al.*, 2020). É um composto químico persistente no ambiente, com alto potencial de contaminação e risco aos organismos em geral, e também à saúde humana. Comprovados cientificamente os riscos da ATZ, seu uso foi proibido em países da União Europeia (Ackerman, 2007) e diminuído no Canadá (Hénault-Ethier, 2016). Porém, mesmo assim, continua sendo um composto muito utilizado, particularmente nos países em desenvolvimento das regiões tropicais.

Devido à sua utilização em grandes quantidades na agricultura de grande porte, a atrazina é transportada aos ecossistemas aquáticos pelo escoamento superficial que é carregado até os corpos de água e também indiretamente pelo *spray* aéreo nas aplicações de pesticidas por aviões, que são dispersados pelo vento podendo atingir corpos de água mesmo distantes (Albuquerque *et al.*, 2020)

A ocorrência da atrazina tem sido frequentemente constatada em corpos de água de diferentes continentes e países, como o Uruguai (480 ng L⁻¹, Griffero *et al.*, 2019), Brasil (3 a 36 ng L⁻¹, Montagner *et al.*, 2019), Canadá (< 2 a 32 ng L⁻¹, Montiel-León *et al.*, 2019), EUA (33,3 ng L⁻¹, Callicott e Hooper-Bùi, 2019), Espanha (4,53 e 5,08 ng L⁻¹, Masiá *et al.*, 2015) e Portugal (< 1,58 ng L⁻¹, Barbosa *et al.*, 2018). A frequência de ocorrência é preocupante, por ser um pesticida de alto risco ecológico para a biota e por já se ter conhecimento sobre alguns efeitos deletérios em organismos não-alvo (Montagner *et al.*, 2019). Entre os modos de ação da atrazina é conhecida sua atuação como desregulador endócrino (Stayner *et al.*, 2017)

Nos ambientes aquáticos, os alvos dos efeitos deste composto são ampliados para invertebrados e vertebrados. Em algas expostas à ATZ, os efeitos ocorrem no fotossistema II, com redução da densidade celular (Brain *et al.*, 2012), inibição do crescimento (Esperanza *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2017; Religia *et al.*, 2019) e diminuição do teor de clorofila *a* (Fernández-Naveira *et al.*, 2016; Chin *et al.*, 2019). Pode causar diminuição da fertilidade em cladóceros (Freitas e Rocha, 2012), diminuição da motilidade espermática, em molusco, esperma de touro e peixe (Feng *et al.*, 2017; Cleary *et al.*, 2019), atraso no tempo de desenvolvimento em copépodo (Yoon *et al.*, 2019) e malformações em sapos (Rutkoski *et al.*, 2018).

A exposição dos organismos em testes com sucessivas gerações permite a observação da ação de um composto no decorrer do ciclo de vida de um organismo-teste e verificar se o efeito do composto é transmitido através das gerações. As respostas em cada geração podem diferir, mostrando que os organismos podem adquirir resistência aos contaminantes, ou ao contrário, podem se tornar mais sensíveis (Dietrich *et al.*, 2010; Cleary *et al.*, 2019). Para isso, testes de toxicidade aguda e crônica são importantes ferramentas para a avaliação do comportamento do agente tóxico no organismo e fornecer subsídios para prever efeitos em níveis hierárquicos maiores (Pivato *et al.*, 2014).

Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do herbicida atrazina a um organismo não-alvo, o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* por meio de testes de toxicidade aguda e testes de toxicidade crônica intergeracional. *Ceriodaphnia silvestrii* é amplamente distribuída em águas doces brasileiras e é uma espécie-modelo adequada para análises ecotoxicológicas devido sua elevada sensibilidade (Abreu *et al.*, 2010, Raymundo *et al.*, 2019).

2. Materiais e métodos

2.1. Cultivo e manutenção do organismo

A espécie *Ceriodaphnia silvestrii* foi inicialmente isolada do reservatório do Lobo (Broa) Itirapina/Brotas, SP, Brasil. A espécie é mantida em cultivo no Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade Federal de São Carlos. Para o cultivo desta espécie foi o meio utilizado foi água reconstituída, com as seguintes características: pH variando entre 7,0 e 7,6 e dureza total entre 40 e 48 mg CaCO₃ L⁻¹ (ABNT, 2017). Os organismos foram mantidos em béqueres de 1 L com 100 indivíduos de *C. silvestrii* em cada e mantidos em sala com temperatura controlada de 25 ± 1° C e fotoperíodo de 12h claro:12h escuro. Para a manutenção das culturas, semanalmente foram realizadas três renovações totais do meio de cultivo com fornecimento simultâneo de alimento.

Os indivíduos foram alimentados com suspensão da microalga clorofícea *Raphidocelis subcapitata* cultivada em meio CHU-12 (ABNT, 2018 com substituição do meio Oligo pelo Meio Chu-12 no qual a alga se encontrava adaptada há longo tempo). A concentração das algas no meio de cultivo foi de 10⁵ células mL⁻¹, com um aditivo

alimentar constituído de uma mistura de ração fermentada de peixe (TetraMin[®]) e fermento biológico (ABNT, 2017), na proporção de 1 mL L⁻¹.

Para monitorar as condições fisiológicas dos indivíduos e verificar a sensibilidade dos mesmos, foram previamente realizados testes de toxicidade aguda com o cloreto de sódio como substância de referência (ABNT, 2017).

2.2.Solução teste e análise química

O padrão do herbicida atrazina (ATZ) (pureza \geq 98%; CAS: 1912-24-9) foi adquirido da Sigma Aldrich, Brasil. Dada sua moderada solubilidade em água (Albuquerque et al., 2020), a atrazina foi diluída no solvente metanol com grau de pureza 99,5% (Merck, EUA). Para preparação de uma solução estoque de 500 mg L⁻¹, 5 mg de ATZ foram dissolvidos em 10 mL de metanol.

A concentração real da atrazina nesta solução estoque foi analisada no Instituto de Química na Universidade Estadual de Campinas. No preparo da amostra, a solução de atrazina foi diluída na mistura H₂O/MeOH 70:30 v/v, filtrada em filtro de seringa (PTFE 0,22 μ m) e transferida para vials para análise em Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas em tandem (LC-MS/MS). A quantificação foi feita em cromatógrafo Agilent (modelo 1200) equipado com injetor automático, bomba binária e comprimento de coluna termostatizado. A separação cromatográfica foi realizada em coluna Zorbax SB-C18 (2,1x30 mm, tamanho de partícula de 3,5 μ m) a 30 °C. A fase móvel consistiu de água ultrapura (A) e metanol (B), que foram previamente filtrados em membranas com porosidade de 0,2 μ m, contendo, para os compostos que ionizam no modo negativo, 0,01% (v/v) de NH₄OH e, para os compostos que ionizam no modo positivo, 0,01% (v/v) de HCOOH, aditivos esses que favorecem a formação de íons.

Em função da concentração do solvente B para o modo negativo, a composição do gradiente teve um início com 30% e aumento para 80% em 13 minutos, mantendo essa condição por 1 minuto; para o modo positivo, teve início com 30% e aumento para 42% em 3,5 minutos, seguido de aumento para 70% em 8 minutos e, por fim, 80% em 12,5 minutos. Em ambos os modos de ionização, entre cada corrida cromatográfica, o sistema foi mantido a 30% de B por 5 minutos para condicionamento da coluna.

A identificação e quantificação do composto foi realizada por Espectrometria de Massas em equipamento Agilent com triplo quadrupolo (modelo 6410B) e o composto

foi ionizado, no modo positivo e negativo, em uma fonte de *electrospray* e monitorado pelo modo *Multiple Reaction Monitoring* (MRM), segundo os parâmetros da Tabela 4.1. Com a área obtida do composto em função da sua concentração na coluna foi construída a curva analítica.

Tabela 4.1 - Transições precursor-produto e suas respectivas energias de colisão (EC), selecionadas para a quantificação do composto, empregando o modo MRM do espectrômetro de massas

Compostos	Polaridade	Fragmentador (V)	Precursor (m/z)	Quantificação		Confirmação 1		Confirmação 2	
				m/z	EC (v)	m/z	EC (v)	m/z	EC (v)
ATZ	+	100	216,2	174,1	15	103,9	15	-	-

2.3. Teste de toxicidade aguda

Para os testes de toxicidade aguda com a ATZ, foram estabelecidas 6 concentrações (8, 16, 24, 30, 40 e 60 mg L⁻¹) e dois controles, sendo um com água de cultivo e o outro com o solvente metanol (0,06%). O teste foi estático, sem iluminação e sem alimentação dos organismos, com temperatura controlada de 25 ± 1° C. Para o experimento, foram utilizados 5 organismos por réplica e 4 réplicas por concentração (mais controles) com 10 mL de solução-teste em cada réplica (ABNT, 2017). O ensaio teve duração de 48h e foram observados e contabilizados os organismos imóveis. As variáveis abióticas foram medidas no início e ao final dos testes (ABNT, 2017).

2.4. Teste de toxicidade crônica intergeracional

O teste de toxicidade crônica foi realizado segundo protocolo da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). O teste foi semi-estático, com renovação do meio feita a cada dois dias. Em cada recipiente-teste foram adicionados 15 mL de solução-teste, sendo estabelecidas 10 réplicas por concentração e por controle, com um indivíduo em cada réplica.

Foram estabelecidas seis concentrações-teste para a ATZ (0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 mg L⁻¹) além do controle com água de cultivo e o controle com o solvente metanol (0,32%). Por ser um teste intergeracional, foi observado duas gerações: parenta (F₀) e a primeira geração filial (F₁). O teste se iniciou (F₀) com neonatas com menos de 24 horas de idade, isolados a partir dos cultivos pré-teste. A duração do teste foi estabelecida como sendo o tempo desde a montagem do teste até, no máximo, 8 dias, como estabelecido na ABNT (ABNT, 2017). Após o teste com a F₀ (duração máxima de 8 dias), foi iniciado o teste com a geração F₁, e para isso, os neonatas produzidos em cada tratamento (controle e as diferentes concentrações) foram transferidas aleatoriamente para novos meios do mesmo grupo que se encontravam na geração anterior. A duração do teste segue o mesmo critério da geração F₀.

Durante o teste foram observados e contados o número de neonatas de cada réplica. Foi feita a medida do comprimento do corpo dos neonatas no início dos testes e do comprimento dos adultos no final dos testes. As variáveis abióticas nas soluções-teste (pH, oxigênio dissolvido, condutividade e temperatura) foram medidas no início, uma vez no decorrer da semana e no final do teste para: controle (com água reconstituída e com o solvente metanol), soluções com a mais baixa e a mais alta concentração do herbicida ATZ (ABNT, 2017).

2.5. Análise estatística

Os valores da CE_{50-48h} e respectivo intervalo de 95% de confiança do teste de toxicidade aguda foram calculados por regressão não linear, ajustados por equação logística utilizando o programa Statistica 7.0 (Statsoft, 2004).

Para análise dos resultados do teste de toxicidade crônica intergeracional utilizou-se o programa SigmaPlot v11.0 software (Systat Software Inc., 2008). A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk. Quando os dados apresentaram distribuição normal foi aplicada a ANOVA paramétrica seguida do teste de Tukey que compara cada tratamento com todos os outros e do teste de Dunnett que compara os tratamentos com o controle (Demšar, 2006; Zar, 2010). Quando os dados não apresentaram distribuição normal foi feita uma ANOVA não paramétrica seguida do teste de Kruskal-Wallis, que compara cada tratamento com todos os demais e o teste de Dunn

(Theodorsson-Norheim, 1986; Zar, 2010). Nos testes estatísticos, o nível de significância foi de 95% ($p \leq 0,05$).

3. Resultados

3.1. Validação dos testes

Nos testes de toxicidade aguda com a ATZ, o pH variou de 7,3 a 7,7, a condutividade elétrica de 201 a 228 $\mu\text{S cm}^{-1}$, o oxigênio dissolvido de 4,64 a 6,02 mg L^{-1} , a temperatura de 24,1 a 26,1°C e a dureza entre 42 e 44 $\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$. Para o teste de toxicidade crônica, as faixas de variação registradas para as variáveis abióticas foram: para o pH 7,45 – 7,75, oxigênio dissolvido: 4,68 – 6,92 mg L^{-1} , condutividade elétrica: 234 – 287 $\mu\text{S cm}^{-1}$; temperatura 24,1 – 25,8 °C e dureza 42 – 50 $\text{mg CaCO}_3 \text{ L}^{-1}$. As variáveis abióticas atenderam os critérios estabelecidos pela Norma da ABNT (2017). A mortalidade dos adultos no controle não ultrapassou 20%, como recomendado pela ABNT (2017).

O valor da $\text{CE}_{50-48\text{h}}$ do cloreto de sódio, obtida no teste de sensibilidade foi de 1,07 \pm 0,03 g L^{-1} (1,01 – 1,14 g L^{-1}) situando-se dentro das faixas de sensibilidade de 1,0 - 1,83 g L^{-1} , por Casali-Pereira *et al.* (2015), e de 1,0 – 1,32 g L^{-1} estabelecida por Mansano *et al.* (2016).

A análise da solução-teste em LC-MS/MS (Tabela 4.2) evidencia que nos testes de toxicidade com a ATZ, a concentração real do composto não diferiu mais do que 20% da concentração nominal e, devido a isso, as concentrações foram reportadas como concentrações nominais (ABNT, 2017). O limite de quantificação instrumental para a ATZ foi de 1 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 4.2 - Concentração do composto atrazina determinado para a solução-estoque por Espectrometria de Massas (Marca Agilent, Espanha, modelo 6410B) com triplo quadrupolo

Concentração Nominal	Concentração Medida
ATZ (500,0 mg L^{-1})	517,7 mg L^{-1}

3.2. Teste de toxicidade aguda

Os valores da $CE_{50-48h} \pm$ desvios-padrão e respectivos intervalos de confiança (IC 95%) para os três testes de toxicidade aguda da ATZ são apresentados na Tabela 4.3. A CE_{50-48h} variou de 27,5 a 42,9 $mg L^{-1}$, com o valor médio de $35,2 \pm 3,8 mg L^{-1}$.

Tabela 4.3 - Valores da concentração efetiva que afeta 50% da população em 48 horas (CE_{50-48h}) de atrazina e respectivo intervalo de confiança (IC 95%). $\bar{X} \pm DP$: média \pm duas vezes o desvio padrão, LI: limite inferior e LS: limite superior

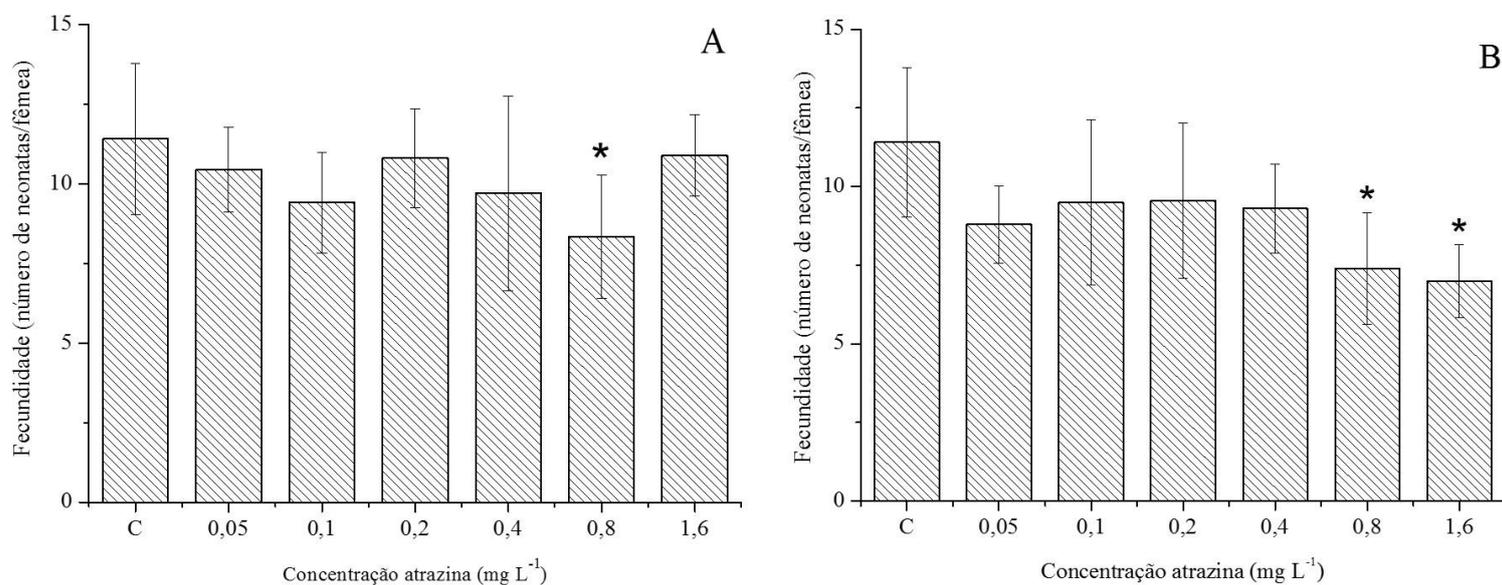
Testes	CE_{50-48h} ($mg L^{-1}$)	IC (95%)
1	$31,27 \pm 0,78$	22,66 – 32,88
2	$35,28 \pm 1,15$	32,91 – 37,66
3	$38,96 \pm 3,8$	35,23 – 42,69
$\bar{X} \pm DP$	$35,2 \pm 3,8$ (LI: 27,5 – LS: 42,9)	

Com os dados relativos aos três testes de toxicidade aguda da atrazina foi também calculada a CE_{10-48h} , que corresponde ao NOEC (concentração de efeito não observado). O valor médio da CE_{10-48h} foi igual a $25,7 \pm 1,4 mg L^{-1}$.

3.3. Teste de toxicidade intergeracional

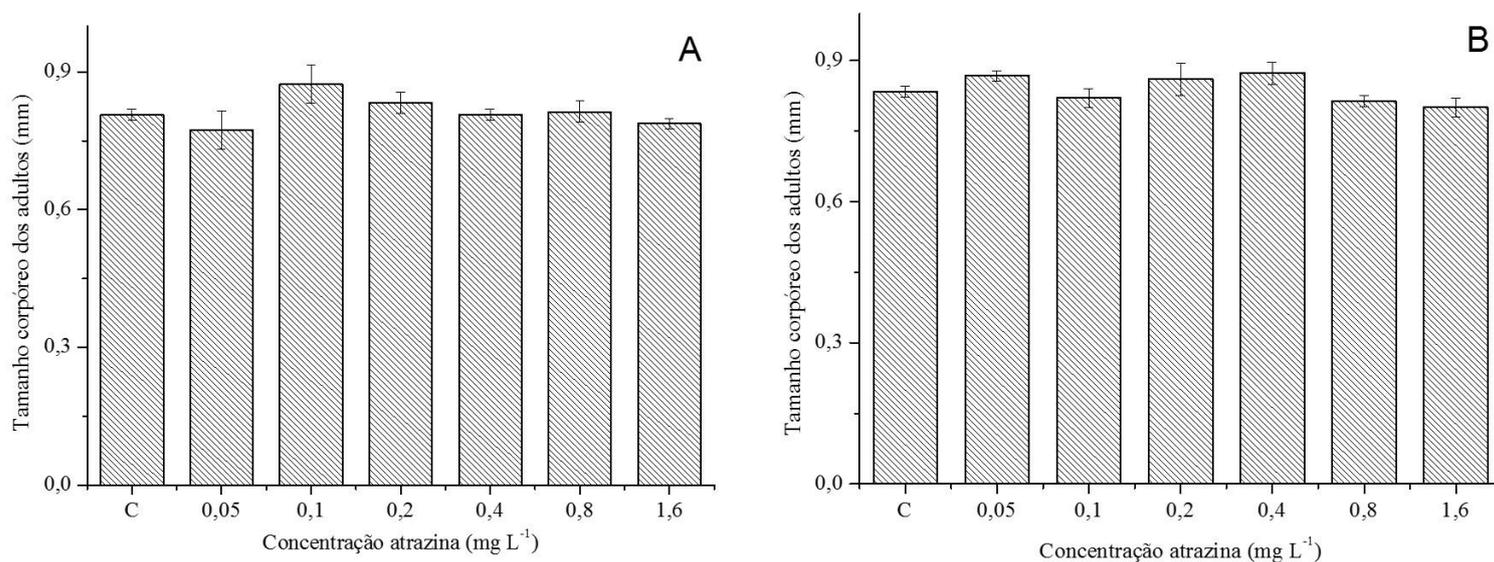
Os números de neonatas produzidos por fêmea de *Ceriodaphnia silvestrii* exposta ao herbicida atrazina (ATZ) para duas gerações são apresentados na Figura 1. Para a geração F_0 (Figura 1a), apenas na penúltima concentração, de $0,8 mg L^{-1}$, houve diferença significativa em relação ao controle, com menor produção de neonatas (Kruskal-Wallis $H = 15,972$ $p = 0,025$; Teste de Dunn, $p < 0,05$). Para a geração F_1 (Figura 1b), a fecundidade foi também menor ($p < 0,05$) nas duas maiores concentrações, $0,8$ e $1,6 mg L^{-1}$ (Kruskal-Wallis $H = 28,170$ $p \leq 0,001$; Teste de Dunn, $p < 0,05$).

Figura 1 - Fecundidade (número médio de neonatas produzidos por fêmea) de *Ceriodaphnia silvestrii* exposta ao herbicida atrazina em teste de toxicidade crônica intergeracional. (A) geração F₀; (B) geração F₁. As linhas verticais representam o desvio padrão e o asterisco (*) indica diferença significativa dos tratamentos com o controle



Os tamanhos dos adultos (mm) (Figura 2), ao final dos testes, não apresentaram diferença significativa na geração F₀ (Figura 2a) (Kruskal-Wallis $H = 16,952$ $p = 0,018$; Teste de Dunn, $p < 0,05$) e nem na geração F₁ (Figura 2b) (Kruskal-Wallis $H = 16,588$ $p = 0,02$; Teste de Dunn, $p < 0,05$).

Figura 2 - Tamanho corpóreo dos adultos (mm) de *Ceriodaphnia silvestrii* ao final da exposição ao herbicida atrazina, em teste crônico intergeracional. (A) geração F₀ e (B) geração F₁



4. Discussão

4.1. Teste de toxicidade aguda

Ao se comparar a sensibilidade de *C. silvestrii* ao herbicida ATZ com a de outras espécies a este mesmo composto verifica-se que esta é uma espécie bastante sensível a este herbicida. Comparando-se os resultados obtidos com os valores de CE₅₀ (ou CL₅₀) da literatura, observamos que *C. silvestrii* foi mais sensível que: o crustáceo *Daphnia magna* – 50,41 mg L⁻¹ (Moreira *et al.*, 2014), embriões do anfíbio *Physalaemus gracilis* – 229,43 mg L⁻¹ (Rutkoski *et al.*, 2018), alevinos de *Luciobarbus esocinus* – 56,56 mg L⁻¹ (Alishahi *et al.*, 2016), embriões do peixe *Danio rerio* – 98,5 mg L⁻¹ (Wang *et al.*, 2017) e o molusco *Hyriopsis bialata* – 158,235 mg L⁻¹ (Nuchan *et al.*, 2018).

Ao analisarem três espécies de cladóceros em exposição à atrazina (produto comercial) Moreira *et al.* (2014) observaram que *D. magna* teve menor sensibilidade que os cladóceros *C. silvestrii* e *Macrothrix flabelligera*. Entre os possíveis fatores responsáveis pelas diferenças observadas, os autores consideraram que além das diferenças intrínsecas de sensibilidade entre as espécies, geneticamente determinadas,

outro fator de possível influência seriam diferenças nas características do ambiente onde vivem, como a temperatura, a dureza da água, entre outros fatores que distinguem corpos de água de regiões temperadas e de regiões tropicais.

Uma menor sensibilidade de *C. silvestrii* à atrazina é, no entanto, verificada quando a resposta desta espécie obtida no presente estudo é comparada com o cladóceros *Pseudosida ramosa* ($CE_{50} = 20,9 \text{ mg L}^{-1}$, Freitas e Rocha, 2012), a alga *Selenastrum capricornutum* ($CE_{50} = 0,046 \text{ mg L}^{-1}$, Zhao *et al.*, 2018), girinos de *Physalaemus cuvieri* ($CL_{50} = 19,69 \text{ mg L}^{-1}$, Wrubleswski *et al.*, 2018), larvas e juvenis de *Danio rerio* ($CL_{50} = 27,37 \text{ mg L}^{-1}$ e $CL_{50} = 10,1 \text{ mg L}^{-1}$, Wang *et al.*, 2017).

Mesmo usando o mesmo composto, a sensibilidade de organismos varia muito, se tornando mais sensíveis ou mais tolerantes, dependendo das condições abióticas e do organismo (Moreira *et al.*, 2014; Alishahi *et al.*, 2016). A comparação direta de valores de CE_{50} e CL_{50} entre diferentes espécies obtidas em diferentes estudos deve, no entanto, ser feita com cautela, visto que as condições de laboratório como temperatura, fotoperíodo, composição dos meios e tempo de exposição, diferem de um lugar para outro. Sabe-se que a toxicidade da atrazina é maior em maiores temperaturas (Freitas e Rocha, 2012).

A dose e o tempo de exposição são fatores que interferem na sensibilidade dos organismos e na toxicidade do composto, como evidenciado para alevinos do peixe *Luciobarbus esocinus* que foram mais sensíveis em exposição de 96h ($CL_{50} = 44,30 \text{ mg L}^{-1}$) do que em 48h ($CL_{50} = 56,56 \text{ mg L}^{-1}$), tendo sido hipotetizado que a ATZ poderia induzir a apoptose de células de carpa via indução dependente da dose e tempo de exposição (Alishahi *et al.*, 2016). Resposta similar foi observada também em peixe *Danio rerio* com maior sensibilidade dada a menos CL_{50} -96h da ATZ (Wang *et al.*, 2017).

4.2. Teste de toxicidade crônica

A exposição crônica à ATZ causou diminuição da fecundidade da *C. silvestrii* na maior concentração em F_0 e nas duas maiores concentrações na F_1 . Porém, em nenhuma geração foi observado diferença no tamanho corporal dos adultos.

Para sucessivas gerações com exposição à ATZ foram observados mecanismos de herança epigenética quando a geração parental em reprodução foi diretamente exposta a este herbicida. Apesar das gerações seguintes não serem diretamente expostas, elas apresentaram alterações na reprodução como reportados por Cleary *et al.* (2019) para o

peixe *Oryzias latipes*, em que a motilidade e o número de espermatozoides nas gerações F₁ e F₂ decresceram. Embora neste peixe a fecundidade não tenha sido afetada em nenhuma das gerações, a taxa de fertilização foi reduzida na F₂, diminuindo o sucesso de fertilização. Segundo os autores, a exposição direta (geração F₀) não causa tantos danos quanto a herança transgeracional (gerações F₁ e F₂), contudo em gerações subsequentes, o risco de disfunções reprodutivas é maior. O efeito de herança transgeracional pela ATZ também foi reportado por Hao *et al.* (2016) e McBirney *et al.* (2017) para camundongos.

Efeitos de desregulação endócrina pela ATZ são comumente reportados em crustáceo. Um aumento no número de fêmeas do lagostim *Cherax quadricarinatus* foram observados por Mac Loughlin *et al.* (2016), os quais relacionaram este efeito a uma desregulação endócrina. A inibição do crescimento ovariano do lagostim *Procambarus clarkii*, e também aumento do estradiol e inibição na expressão de vitelogenina em ovários e hepatopâncreas dos indivíduos expostos à atrazina, foram verificados por Silveyra *et al.* (2018). O retardamento no tempo de desenvolvimento entre a fase de náuplio para a de copepodito e entre a de copepodito para adulto, foram observados no desenvolvimento pós-embrionário do copépodo marinho *Tigriopus japonicus* exposto a ATZ (Yoon *et al.*, 2019). No anfíbio *Physalaemus gracilis* exposto à ATZ, foram observadas a redução da mobilidade dos indivíduos nas fases iniciais (embrião e larva), a indução de malformações na boca e intestino, e o aparecimento de edemas (Rutkoski *et al.*, 2018). Diminuição de mobilidade também foi observada para girinos de *Physalaemus cuvieri* por Wrubleswski *et al.* (2018). O efeito negativo na atividade natatória faz com que muitos organismos tenham sua capacidade de escape alterada, aumentando a suscetibilidade dos mesmos à predação e afetando, portanto, sua sobrevivência. Alterações foram observadas para o mexilhão *Mytilus edulis* por Feng *et al.* (2017). Estes autores também verificaram alterações no sistema imunológico, devido à morte de hemócitos, que fazem parte do sistema imune deste molusco. A ATZ pode agir interromper o mecanismo de sinalização do receptor de andrógeno, que age na motilidade espermática, afetando a reprodução (Feng *et al.*, 2017). Imunotoxicidade também foi constatada por Liu *et al.* (2017) ao expor larvas de *Danio rerio* à ATZ.

Em organismos fotossintetizantes, a ATZ age bloqueando o transporte de elétrons do fotossistema II, diminuindo a taxa fotossintética (Albuquerque *et al.*, 2020). Uma resposta semelhante foi observada na ação da ATZ sobre *Drosophila melanogaster*. As células animais possuem dois complexos (I e II) da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. Esses complexos possuem um local de ligação Q, à qual a ATZ pode se

ligar e afetar o transporte de elétrons. Essa interação leva a um aumento do estresse oxidativo, que está relacionado com a diminuição da longevidade e da fase reprodutiva do indivíduo exposto (Marcus e Fiumera, 2016).

Ceriodaphnia silvestrii apresentou sensibilidade ao herbicida ATZ e o principal efeito deletério foi sobre a reprodução, tanto na primeira como na segunda geração, indicando que a ATZ pode representar considerável risco para os sistemas aquáticos.

5. Conclusão

Nesse estudo, o herbicida atrazina diminuiu a fecundidade da espécie tropical *Ceriodaphnia silvestrii* em ambas as gerações, sendo que, na primeira geração o efeito foi observado em uma concentração, e na segunda geração o efeito foi observado em duas concentrações. Com isso, o efeito da atrazina na espécie nativa de cladóceros foi intergeracional e mais pronunciado na segunda geração, mostrando que se trata de um composto que representa risco para os organismos aquáticos e sua progênie

Referências

- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera). **ABNT NBR 13373**, 2017
- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (*Chlophyceae*). **ABNT NBR 12648**, 2018
- ABREU, M.J., SANTOS-WISNIEWSKI, M.J., ROCHA, O., ORLANDO, T.C. **The use of PCR-RFLP to genetically distinguish the morphologically close species: *Ceriodaphnia dubia* Richard, 1894 and *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Crustacea Cladocera).** Braz. J. Biol., 70:1, 121-124 p, 2010
- ACKERMAN, F. **The economics of atrazine.** Int. J. Occup. Environ. Health, 13:4, 441-449 p, 2007
- ALBUQUERQUE, F.P., OLIVEIRA, J.L., MOSCHINI-CARLOS, V., FRACETO, L.F. **An overview of the potential impacts of atrazine in aquatic environments: Perspectives for tailored solutions based on nanotechnology.** Science of the Total Environment, 700, 134868, 2020
- ALISHAHI, M., TULABY DEZFUY, Z., MOHAMMADIAN, T. **Acute toxicity evaluation of five herbicides: paraquat, 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D), trifluralin, glyphosate and atrazine in *Luciobarbus esocinus* fingerlings.** IJVM 10: 319-330, 2016
- BARBOSA, M.O., RIBEIRO, A.R., RATOLA, N., HAIN, E., HOMEM, V., PEREIRO, M.F.R., BLANEY, L., SILVA, A.M.T. **Spatial and seasonal occurrence of micropollutants in four Portuguese rivers and a case study for fluorescence excitation-emission matrices.** Science of the Total Environment, 644, 1128–1140 p, 2018
- BRAIN, R.A., ARNIE, J.R., PORCH, J.R., HOSMER, A.J. **Recovery of photosynthesis and growth rate in green, blue-green, and diatom algae after exposure to atrazine.** Environmental Toxicology and Chemistry, 31:11, 2572–2581 p, 2012
- CALLICOTT, K., HOOPER-BÙI, L. **An investigation of environmental concentrations of atrazine, chlorothalonil, and fipronil in a Mississippi River-influenced marsh in southern Louisiana.** Microchemical Journal, 146, 1241–1248 p, 2019
- CASALI-PEREIRA, M.P., DAAM, M.A., RESENDE, J.C., VASCONCELOS, A.M., ESPÍNDOLA, E.L.G., BOTTA, C.M.R. **Toxicity of Vertimec® 18 EC (active ingredient abamectin) to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*.** Chemosphere, 139, 558–564 p, 2015

- CHIN, Y.Y., CHU, W.L., KOK, Y.Y., PHANG, S.M., WONG, C.Y., TAN, B.K., MUSTAFA, E.M. **Sensitivity of selected tropical microalgae isolated from a farmland and a eutrophic lake to atrazine and endosulfan.** Journal of Applied Phycology, Vol. 31, 2981–2998p, 2019
- CLEARY, J.A., TILLITT, D.E., VOM SAAL, F.S., NICKS, D.K., CLAUNCH, R.A., BHANDARI, R.K. **Atrazine induced transgenerational reproductive effects in medaka (*Oryzias latipes*).** Environmental Pollution 251:639-650 p, 2019
- DEMŠAR, J. **Statistical Comparisons of classifier over multiple data sets.** Journal of Machine Learning Research, 7, 1-30 p, 2006
- DIETRICH, S., PLOESSL, F., BRACHER, F., LAFORSCH, C. **Single and combined toxicity of pharmaceuticals at environmentally relevant concentrations in *Daphnia magna* – A multigenerational study.** Chemosphere, 79, 60-66, 2010
- ESPERANZA, M., SEOANE, M., RIOBOO, C., HERRERO, C., CID, A. ***Chlamydomonas reinhardtii* cells adjust the metabolism to maintain viability in response to atrazine stress.** Aquatic Toxicology, 2015
- FENG, J., LIU, A., ZHU, W. **Toxic Effects of Atrazine on Reproductive and Immune Systems in Animal Models.** Reprod. Syst. Sex. Disord. 6:2, 2-6 p, 2017
- FERNÁNDEZ-NAVEIRA, A., RIOBOO, C., CID, A., HERRERO, C. **Atrazine induced changes in elemental and biochemical composition and nitrate reductase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*.** European Journal of Phycology, Vol. 51, 338-345 p, 2016
- FREITAS, E.C., ROCHA, O. **Acute and chronic effects of atrazine and sodium dodecyl sulfate on the tropical freshwater cladoceran *Pseudosida ramosa*.** Ecotoxicology 21:1347–1357 p, 2012
- GRIFFERO, L., ALCÂNTARA-DURÁN, J., ALONSO, C., RODRÍGUEZ-GALLEGO, L., MORENO-GINZÁLEZ, D., GARCIA-REYES, J.F., MOLINA-DÍAZ, A., PÉREZ-PARADA, A. **Basin-scale monitoring and risk assessment of emerging contaminants in South American Atlantic coastal lagoons.** Science of the Total Environment, Vol. 697, No. 134058, 2019
- HAO, C., GELY-PERNOT, A., KERVARREC, C., BOUDJEMA, M., BECKER, E., KHIL, P., TEVOSIAN, S., J'EGOU, B., SMAGULOVA, F. **Exposure to the widely used herbicide atrazine results in deregulation of global tissue-specific RNA transcription in the third generation and is associated with a global decrease of histone trimethylation in mice.** Nucleic Acids Research 44: 9784–9802, 2016
- HÉNAULT-ETHIER, L. **Backgrounder: Atrazine: Banned in Europe, Common in Canada.** Canadian Association of Physicians for the Environment (CAPE), 1-11 p., 2016
- LIU, Z., FU, Z., JIN, Y. **Immunotoxic effects of atrazine and its main metabolites at environmental relevant concentrations on larval zebrafish (*Danio rerio*).** Chemosphere 166:212-220, 2017

MAC LOUGHLIN, C., CANOSA, I.S., SILVEYRA, G.R., LÓPEZ GRECO, L.S., RODRÍGUEZ, E.M. **Effects of atrazine on growth and sex differentiation, in juveniles of the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus***. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 131:96–103 p, 2016

MANSANO, A.S., MOREIRA, R.A., DORNFELD, H.C., DINIZ, L.G.R., VIEIRA, E.M., DAAM, M.A., ROCHA, O., SELEGHIM, M.H.R. **Acute and chronic toxicity of diuron and carbofuran to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii***. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 25, 13335–13346 p, 2016

MARCUS, S.R., FIUMERA, A.C. **Atrazine exposure affects longevity, development time and body size in *Drosophila melanogaster***. *Journal of Insect Physiology* 91-92:18–25 p, 2016

MASIÁ, A., CAMPO, J., NAVARRO-ORTEGA, A., BARCELÓ, D., PICÓ, Y. **Pesticide monitoring in the basin of Llobregat River (Catalonia, Spain) and comparison with historical data**. *Science of the Total Environment*, 503–504, 58–68 p, 2015

MCBIRNEY, M., KING, S.E., PAPPALARDO, M., HOUSER, E., UNKEFER, M., NILSSON, E., SADLER-RIGGLEMAN, I., BECK, D., WINCHESTER, P., SKINNER, M.K. **Atrazine induced epigenetic transgenerational inheritance of disease, lean phenotype and sperm epimutation pathology biomarkers**. *Plos One* 12:1-37 p, 2017

MONTAGNER, C.C., SODRÉ, F.F., ACAYABA, D., VIDAL, C., CAMPESTRINI, I., LOCATELLI, M.A., PESCARA, I.C., ALBUQUERQUE, A.F., UMBUZEIRO, G.A., JARDIM, W.F. **Ten Years-Snapshot of the Occurrence of Emerging Contaminants in Drinking, Surface and Ground Waters and Wastewaters from São Paulo State, Brazil**. *J. Braz. Chem. Soc.*, 30:3, 614-632 p, 2019

MONTIEL-LEÓN, J.M., DUY, S.V., MUNOZ, G., BOUCHARD, M.F., AMYOT, M., SAUVÉ, S. **Quality survey and spatiotemporal variations of atrazine and desethylatrazine in drinking water in Quebec, Canada**. *Science of the Total Environment*, 671, 578–585 p, 2019

MOREIRA, R.A., MANSANO, A.S., SILVA, L.C., ROCHA, O. **A comparative study of the acute toxicity of the herbicide atrazine to cladocerans *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii* and *Macrothrix flabelligera***. *Acta Limnologica Brasiliensia* 26:1-8 p, 2014

NUCHAN, P., SRAKAEW, N., SOIMALAITONG, S., KOVITVADHI, U., KOVITVADHI, S., KLAIMALA, P. **Acute toxicity and histopathological effects of atrazine on the freshwater pearl mussel *Hyriopsis bialata* Simpson, 1900**. *Journal of Kasetsart Veterinarians* 28:192-208 p, 2018

PIVATO, A., RAGA, R., VANIN, S., ROSSI, M. **Assessment of compost quality for its environmentally safe use by means of an ecotoxicological test on a soil organism**. *J. Mater Cycles Wast Manag* Vol. 16, 763-774 p, 2014

- RAYMUNDO, L.B., ROCHA, O., MOREIRA, R.A., MIGUEL, M., DAAM, M.A. **Sensitivity of tropical cladocerans to chlorpyrifos and other insecticides as compared to their temperate counterparts.** Chemosphere, 220, 937-942, 2019
- RELIGIA, P., KATO, Y., FUKUSHIMA, E.O., MATSUURA, T., MURANAKA, T., WATANABE, H. **Atrazine exposed phytoplankton causes the production of non-viable offspring on *Daphnia magna*.** Marine Environmental Research, 145, 177–183 p, 2019
- RUTKOSKI, C.F., MACAGNAN, N., KOLCENTI, C., VANZETTO, G.V., STURZA, P.F., HARTMANN, P.A., HARTMANN, M.T. **Lethal and sublethal effects of the herbicide atrazine in the early stages of development of *Physalaemus gracilis* (Anura: Leptodactylidae).** Archives of Environmental Contamination and Toxicology 74:587–593 p, 2018
- SILVEYRA, G.R., SILVEYRA, P., VATNICK, I., MEDESANI, D.A., RODRÍGUEZ, E.M. **Effects of atrazine on vitellogenesis, steroid levels and lipid peroxidation, in female red swamp crayfish *Procambarus clarkii*.** Aquatic Toxicology, 197, 136–142 p, 2018
- STATSOFT, INC. Statistica (**data analysis software system**), version 07, 2004
- STAYNER, L.T., ALMBERG, K., JONES, R., GRABER, J., PEDERSEN, M., TURYK, M. **Atrazine and nitrate in drinking water and the risk of preterm delivery and low birth weight in four Midwestern states.** Environmental Research, 152, 294–303 p, 2017
- SYSTAT. Systat Software, **Incorporation SigmaPlot for Windows.** Version 11.0, 2008
- THEODORSSON-NORHEIM, E. **Kruskal-Wallis test:** BASIC computer program to perform nonparametric one-way analysis of variance and multiple comparisons on ranks of several independent samples. Computer Methods and Programs in Biomedicine, Vol 23, 57-62 p, 1986
- WANG, Y., LV, L., YU, Y., YANG, G., XU, Z., WANG, Q., CAI, L. **Single and joint toxic effects of five selected pesticides on the early life stages of zebrafish (*Danio rerio*).** Chemosphere 170:61-67 p, 2017
- WRUBLESWSKI, J., REICHERT JR, W., GALON, L., HARTMANN, P.A., HARTMANN, M.T. **Acute and chronic toxicity of pesticides on tadpoles of *Physalaemus cuvieri* (Anura, Leptodactylidae).** Ecotoxicology 27:369-368, 2018
- YOON, D.S., PARK, J.C., PARK, H.G., LEE, J.S., HAN, J. **Effects of atrazine on life parameters, oxidative stress, and ecdysteroid biosynthetic pathway in the marine copepod *Tigriopus japonicas*.** Aquatic Toxicology, 213, 105213, 2019
- ZAR, J.H. **Biostatistical analysis.** Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, 5 ed., 944 p, 2010

ZHAO, F., LI, Y., HUANG, L., GU, Y., ZHANG, H., ZENG, D., TAN, H. **Individual and combined toxicity of atrazine, butachlor, halosulfuronmethyl and mesotrione on the microalga *Selenastrum capricornutum***. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 148:969–975 p, 2018

ZHAO, F., XIANG, Q., ZHOU, Y., XU, X., QIU, X., YU, Y., AHMAD, F. **Evaluation of the toxicity of herbicide topramezone to *Chlorella vulgaris***: Oxidative stress, cell morphology and photosynthetic activity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 143:129–135 p, 2017

Considerações finais

As substâncias atrazina e etinilestradiol são frequentemente encontrados nos corpos de água e análises de risco preliminar mostraram que ambas apresentam risco ecológico. Com isso, em relação à primeira hipótese estabelecida, esta foi aceita, pois os compostos etinilestradiol e atrazina podem afetar adversamente os cladóceros *C. silvestrii* e *C. rigaudi*. Ambos cladóceros tiveram a reprodução e tamanho corporal afetados, evidenciando que estes compostos impõem reais riscos à sobrevivência destas espécies. Os testes intergeracionais mostraram que os cladóceros podem apresentar diferenças nas respostas, se tornando mais ou menos resistentes aos compostos nas gerações subsequentes. Algumas gerações se tornam resistentes através de adaptação fisiológica, como foi o caso da *D. magna* exposta ao hormônio, onde a segunda geração foi menos afetada que a primeira. Para o cladóceros tropical *C. silvestrii*, o efeito de ambas substâncias foi intergeracional, no entanto afetou mais a segunda geração do que a primeira. Este resultado evidencia que organismos taxonomicamente próximos podem apresentar respostas diferentes, mesmo quando expostos à mesma substância tóxica.

Com relação à mistura, nossa hipótese foi em parte corroborada, pois se observou a interação sinérgica, mas também a interação antagônica. A interação dos compostos ocorreu em nível de dose, ocorrendo sinergismo nas concentrações mais baixas e o antagonismo nas mais altas. As concentrações mais baixas representam as concentrações ambientalmente relevantes sendo, portanto, preocupantes devido ao risco para a biota aquática, visto que nessas concentrações o efeito dos compostos foi potencializado.

Foi verificado que o hormônio e o herbicida diminuem a fecundidade dos cladóceros *C. silvestrii* e *C. rigaudi*.

Outro nível trófico afetado pelos compostos é o dos produtores primários, como evidenciado para a microclorófito *Raphidocelis subcapitata*. Quando exposta a ambos compostos isoladamente, foi adversamente afetado o processo de fotossíntese, com diminuição do teor de clorofila *a* e do rendimento fotossintético, e a composição bioquímica com alterações nas classes lipídicas. Quando exposta ao hormônio, esta espécie de alga apresentou hormesis em seu crescimento além de alterações no teor de carboidratos e lipídios totais.

Este estudo mostrou a importância de se utilizar as espécies nativas tropicais em estudos ecotoxicológicos. A sensibilidade das espécies de diferentes regiões pode diferir,

devido às diferentes características abióticas de cada região e a adaptação de longo prazo pelas quais passam as espécies. Devido a isso, as espécies nativas tornam a avaliação do risco potencial de compostos tóxicos na água ecologicamente mais relevantes, para estudos em regiões tropicais.

Para estudos futuros, sugerimos testes com o hormônio 17 α -etinilestradiol e a atrazina por sucessivas gerações (mais de quatro) de cladóceros, para se avaliar como se comporta a toxicidade dessas substâncias, transgeracionalmente. Uma outra possibilidade seria expor cronicamente apenas a geração parental até o nascimento das neonatas, e o teste ser prolongado através de várias outras gerações, sem exposição das neonatas ao tóxico, para avaliar se as substâncias podem afetar os organismos em nível genético. É importante que os testes sejam realizados com as substâncias tanto de forma isolada como em mistura, visto que há grande probabilidade de ocorrerem juntas no ambiente.

APÊNDICES

APÊNDICE A
Referente ao Capítulo 1

Tabela A1 - Dados da literatura sobre as concentrações ambientais de 17 α -etinilestradiol registradas em águas superficiais de diferentes países

17 α-Ethinilestradiol		
Concentração (ng L⁻¹)	Localização	Referências
1	Alemanha	Ternes <i>et al.</i> , 1999
9	Canadá	Ternes <i>et al.</i> , 1999
73	Estados Unidos	Kolpin <i>et al.</i> , 2002
11600	Uruguai	Griffero <i>et al.</i> , 2019
0,2 - 7	Inglaterra	Desbrow <i>et al.</i> , 1998
0,45	Itália	Baronti <i>et al.</i> , 2000
6 - 310	Brasil (Campinas)	Sodré <i>et al.</i> , 2007
24 - 480	Brasil (Piracicaba)	Torres <i>et al.</i> , 2015
38,5	Brasil (Mato Grosso do Sul)	Sposito <i>et al.</i> , 2018
32 – 777	Brasil (Estado de São Paulo)	Montagner <i>et al.</i> , 2019
0,005 – 0,68	Europa Central	Avar <i>et al.</i> , 2016
4500 - 48200	Brasil (Sorocaba)	França <i>et al.</i> , 2020
1,64 – 19,72	Argentina	Scala-Benuzzi <i>et al.</i> , 2018
< 0,98 – 10,2	Inglaterra	Wilkinson <i>et al.</i> , 2017
< 0,1 – 19,6	China	Wang <i>et al.</i> , 2018

Referências usadas na tabela

AVAR, P, ZRÍNY, Z, MAÁSZ, G, TAKÁTSY, A, LOVAS, S, G-TÓTH, L, PIRGER, Z. **β -estradiol and ethinyl-estradiol contamination in the rivers of the Carpathian Basin.** Environ Sci Pollut Res 23:11630–11638 p, 2016

BARONTI, C, CURINI, R, D' ASCENZO, G, DI CORCIA, A, GENTILI, A, SAMPERI, R. **Monitoring natural and synthetic estrogens at activated sludge sewage treatment plants and in a receiving river water.** Environ Sci Technol 34:5059-5066 p, 2000

DESBROW, C, ROUTLEDGE, EJ, BRIGHTY, GC, SUMPTER, JP, WALDOCK, M. **Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 1. Chemical fractionation and in Vitro Biological Screening.** Environ Sci Technol 32:1549-1558 p, 1998

FRANÇA, JF, PICKLER, TB, JOZALA, AF, SANTOS, CA, BATISTA, BL, PEDRON, T, VIEIRA, RAL, GROTO, D. **Determination of 17 α -ethinylestradiol and toxic metals in surface waters, and estimation of daily intake.** Environ Monit Assess 192:1-10 p, 2020

GRIFFERO, L, ALCÂNTARA-DURÁN, J, ALONSO, C, RODRÍGUEZ-GALLEGO, L, MORENO-GINZÁLEZ, D, GARCIA-REYES, JF, MOLINA-DÍAZ, A, PÉREZ-PARADA, A. **Basin-scale monitoring and risk assessment of emerging contaminants in South American Atlantic coastal lagoons.** Sci Total Environ 697:134058, 2019

KOLPIN, DW, FURLONG, ET, MEYER, MT, THURMAN, EM, ZAUGG, SD, BARBER, LB, BUXTON, HT. **Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance.** Environ Sci Technol 36:1202-1211 p, 2002

MONTAGNER, CC, SODRÉ, FF, ACAYABA, D, VIDAL, C, CAMPESTRINI, I, LOCATELLI, MA, PESCARA, IC, ALBUQUERQUE, AF, UMBUZEIRO, GA, JARDIM, WF. **Ten Years-Snapshot of the Occurrence of Emerging Contaminants in Drinking, Surface and Ground Waters and Wastewaters from São Paulo State, Brazil.** J Braz Chem Soc 30:614-632 p, 2019

SCALA-BENUZZI, ML, RABA, J, SOLER-ILLIA, GJAA, SCHNEIDER, RJ, MESSINA, GA. **Novel Electrochemical Paper-Based Immunocapture Assay for the Quantitative Determination of Ethinylestradiol in Water Samples.** Anal Chem 90:4104-4111 p, 2018

SODRÉ, FF, MONTAGNER, CC, LOCATELLI, MAF, JARDIM, WF. **Ocorrência de Interferentes Endócrinos e Produtos Farmacêuticos em Águas Superficiais da Região de Campinas (SP, Brasil).** J Braz Soc Ecotoxicol 2:187-196 p, 2007

SPOSITO, JCV., MONTAGNER, CC, CASDO, M, NAVARRO-MARTÍN, L, SOLÓRZANO, JCJ, PIÑA, B, GRISOLIA, AB. **Emerging contaminants in Brazilian rivers: Occurrence and effects on gene expression in zebrafish (*Danio rerio*) embryos.** Chemosphere 209:696-704 p, 2018

TERNES, TA, STUMPF, M, MUELLER, J, HABERER, K, WILKEN, RD, SERVOS, M. **Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants – I. Investigations in Germany, Canada and Brazil.** Sci Total Environ 225:81-90 p, 1999

TORRES, NH, AGUIAR, MM, FERREIRA, LFR, AMÉRICO, JHP, MACHADO, AM, CAVALCANTI, EB, TORNISIELO, VL. **Detection of hormones in surface and drinking water in Brazil by LC-ESI-MS/MS and ecotoxicological assessment with *Daphnia magna*.** Environ Monit Assess 187:2-13 p, 2015

WANG, S, ZHU, Z, HE, J, YUE, X, PAN, J, WANG, Z (2018) **Steroid and phenolic endocrine disrupting chemicals (EDCs) in surface water of Bahe River, China: Distribution, bioaccumulation, risk assessment and estrogenic effect on *Hemiculter leucisculus***. *Environ Pollut* 243:103-114 p, 2018

WILKINSON, JL, HOODA, PS, SWINDEN, J, BARKER, J, BARTON, S. **Spatial distribution of organic contaminants in three rivers of Southern England bound to suspended particulate material and dissolved in water**. *Sci Total Environ* 593–594:487–497 p, 2017

APÊNDICE B

Referente ao Capítulo 2

B1 – Fórmula para preparação do Meio Chu-12 para o cultivo de alga

O meio Chu-12 é preparado com:

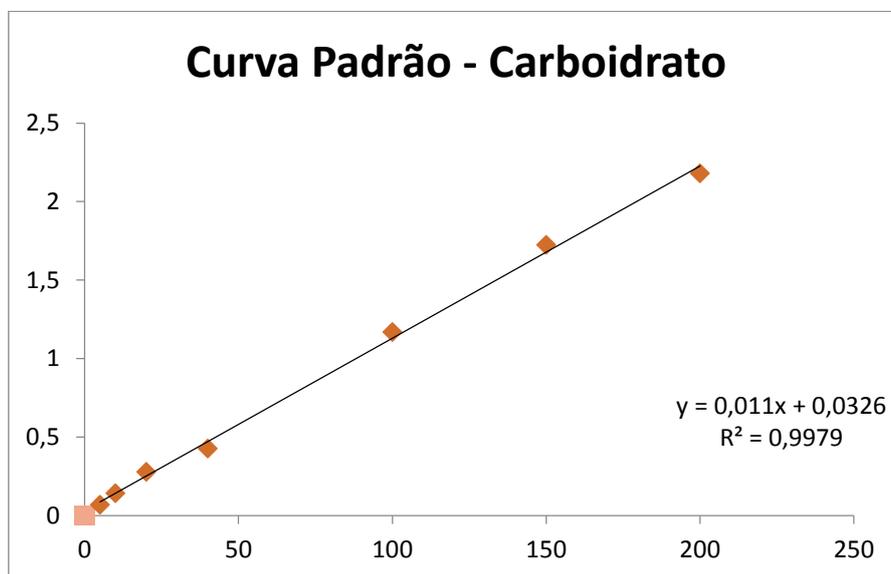
- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \rightarrow 3,0 \text{ g}$ ou $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4,3 \text{ g}$
- $\text{K}_2\text{HPO}_4 \rightarrow 0,5 \text{ g}$
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \rightarrow 7,5 \text{ g}$
- $\text{KCl} \rightarrow 0,5 \text{ g}$
- $\text{Na}_2\text{CO}_3 \rightarrow 2,0 \text{ g}$
- $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow 0,05 \text{ g}$
- Água destilada $\rightarrow 1000 \text{ mL}$

A solução pode ser guardada em vidro âmbar na geladeira.

Para preparar 1500 mL de meio de cultura, colocar 30 mL da solução Chu-12 e completar para 1500 mL com água destilada. Autoclavar por 20 minutos a 121 °C.

Antes de inocular a alga, deixar o meio de cultivo esfriar.

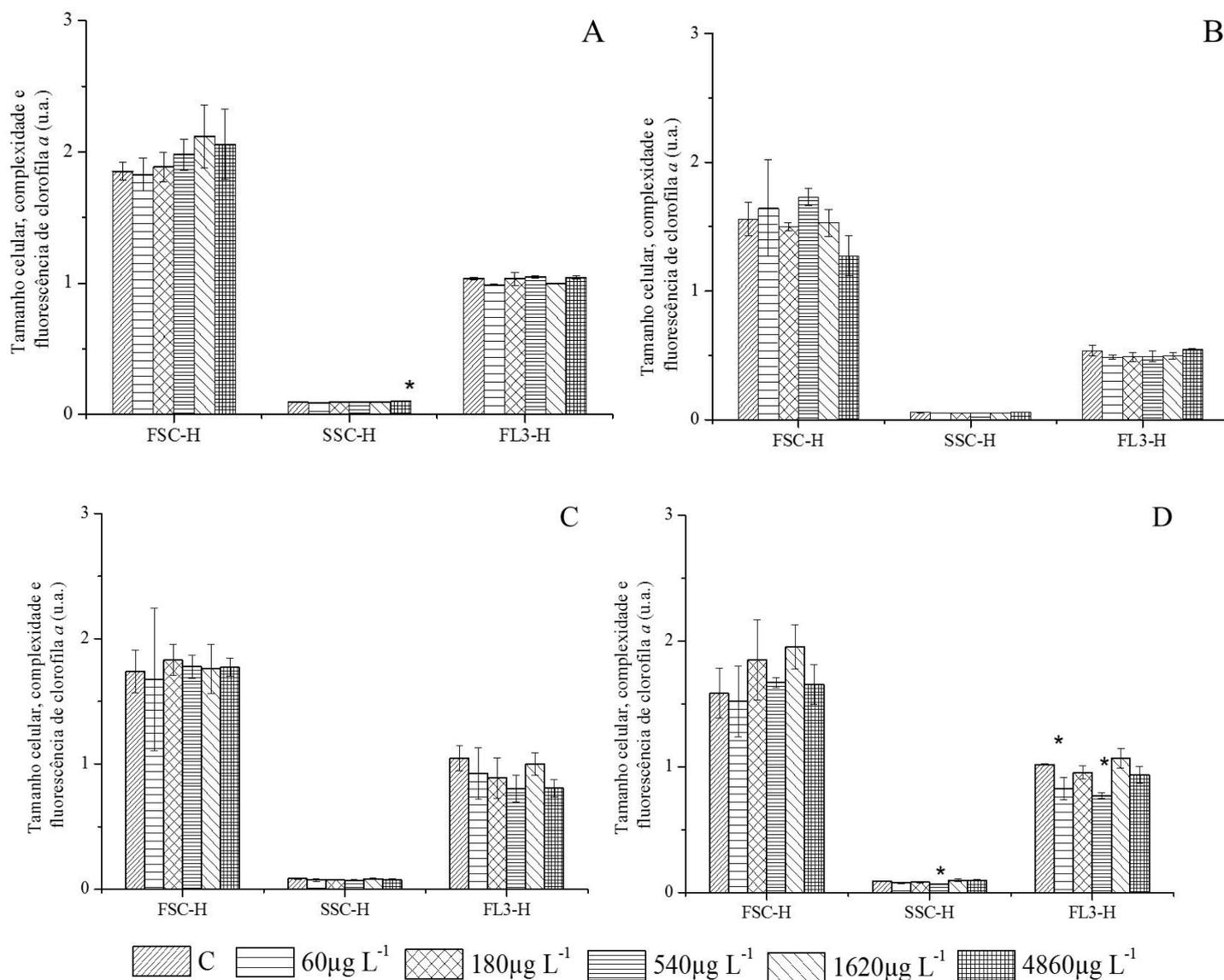
Figura B2 - Curva de calibração do teor de carboidratos totais a partir de 7 concentrações de dextrose anidra (5 a 200 μ L) plotando-se os valores de absorbância das soluções versus a concentração de carboidrato



B3 – Fórmula para a preparação da água lavada com clorofórmio, usada para a extração de lipídios

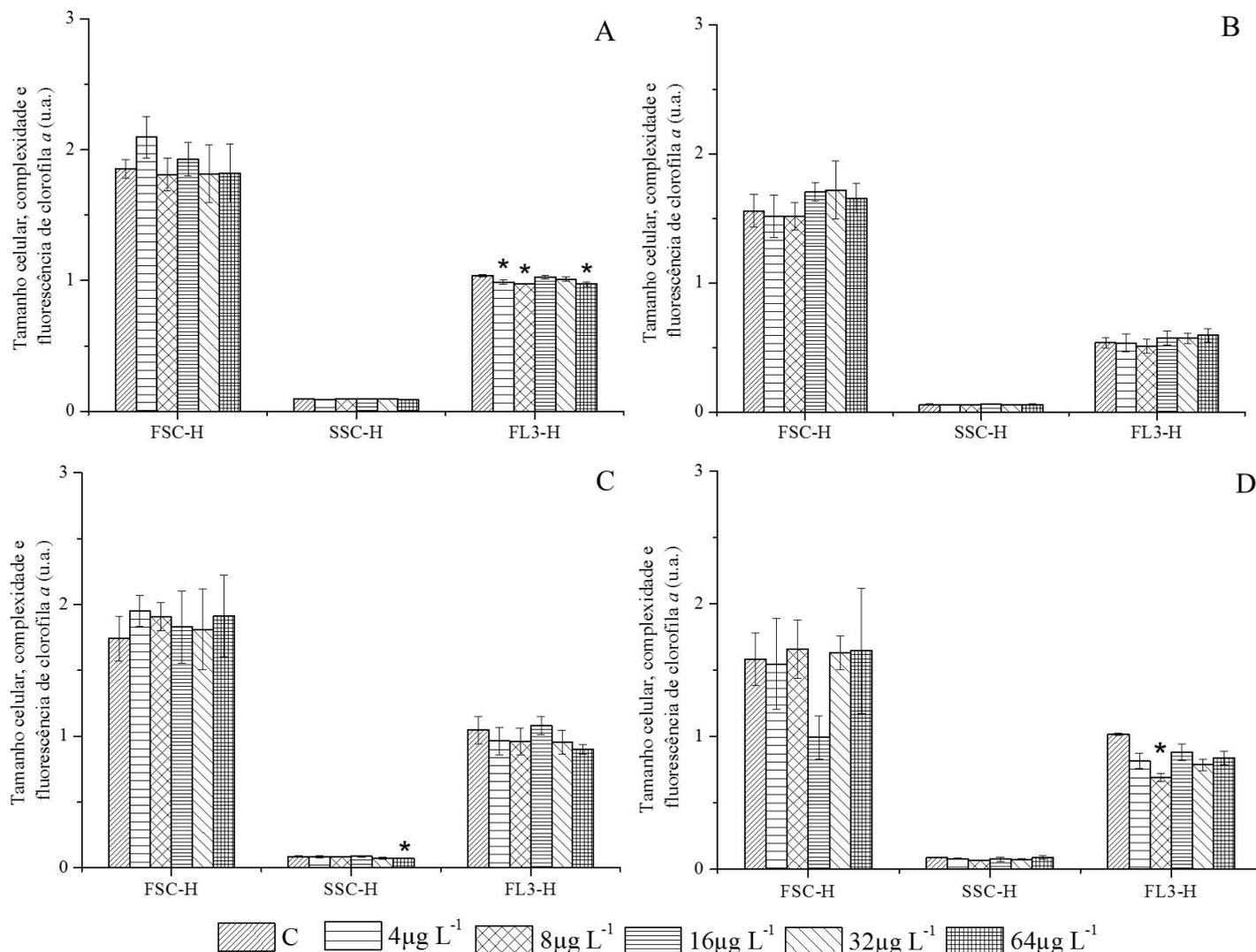
Para preparar a água lavada com clorofórmio, coloca-se 180 mL de água destilada + 20 mL de clorofórmio. Após agitação, a solução é transferida para um balão bureta previamente lavado com metanol e clorofórmio, e fica em repouso por 2 min para aguardar a separação das fases. Após esse tempo, retira-se o clorofórmio (por ser mais denso, fica abaixo da água) e acrescenta-se mais 20 mL de clorofórmio. Deixar por mais dois minutos para separação das fases e novamente, retirar o clorofórmio. Repetir esse passo mais uma vez. Após a terceira repetição, retirar o clorofórmio e guardar a água em frasco âmbar, previamente calcinado a 400 °C por 8 horas e lavado com metanol e clorofórmio, para uso na extração dos lipídios.

Figura B4 – Variações no tamanho celular, complexidade e fluorescência da clorofila, determinados por citometria de fluxo para a alga *Raphidocelis subcapitata* exposta a diferentes concentrações do hormônio 17 α -ethinilestradiol (EE₂)



Valores médios de tamanho celular (FSC-H), complexidade (SSC-H) e fluorescência da clorofila *a* (FL3-H) da alga *R. subcapitata* exposta ao hormônio EE₂ nos tempos 0 horas (A), 24 horas (B), 48 horas (C) e 72 horas (D). O asterisco (*) indica valor com diferença significativa quando comparado com o controle ($p \leq 0,05$). Valores expressos em unidade arbitrária (u.a.)

Figura B5 – Variações no tamanho celular, complexidade e fluorescência da clorofila, determinados por citometria de fluxo para a alga *Raphidocelis subcapitata* exposta a diferentes concentrações do herbicida atrazina (ATZ)



Valores médios de tamanho celular (FSC-H), complexidade (SSC-H) e fluorescência da clorofila *a* (FL3-H) da alga *R. subcapitata* exposta ao herbicida ATZ nos tempos 0 horas (A), 24 horas (B), 48 horas (C) e 72 horas (D). O asterisco (*) indica valor com diferença significativa quando comparado com o controle ($p \leq 0,05$). Valores expressos em unidade arbitrária (u.a.)

APÊNDICE C

Referente ao Capítulo 3

Tabela C1 - Valores da Concentração Efetiva - CE_{50-48h} ($g L^{-1}$) do cloreto de sódio e seus respectivos Intervalos de Confiança (IC) para 95% de confiabilidade. São também apresentados o valor médio, o desvio-padrão (DP), a variância (Var) e o coeficiente de variação expresso em porcentagem (CV)

Testes	CE_{50-48h}	IC (95%)
1	1,25	1,11 - 1,40
2	1,30	1,22 - 1,39
3	1,18	1,10 - 1,25
4	1,09	0,98 - 1,19
5	1,28	1,15 - 1,42
6	1,31	1,23 - 1,39
7	1,29	1,21 - 1,37
8	1,18	1,15 - 1,21
9	1,15	1,07 - 1,24
10	1,06	1,01 - 1,11
11	0,84	0,69 - 0,99
12	1,26	1,19 - 1,33
13	1,3	1,30 - 1,39
14	1,31	1,15 - 1,47
15	1,58	1,52 - 1,64
16	0,91	0,62 - 1,19
17	1,21	1,13 - 1,29
18	1,37	1,32 - 1,42
19	1,39	1,29 - 1,48
20	1,51	1,33 - 1,68

Continua na pag 171...

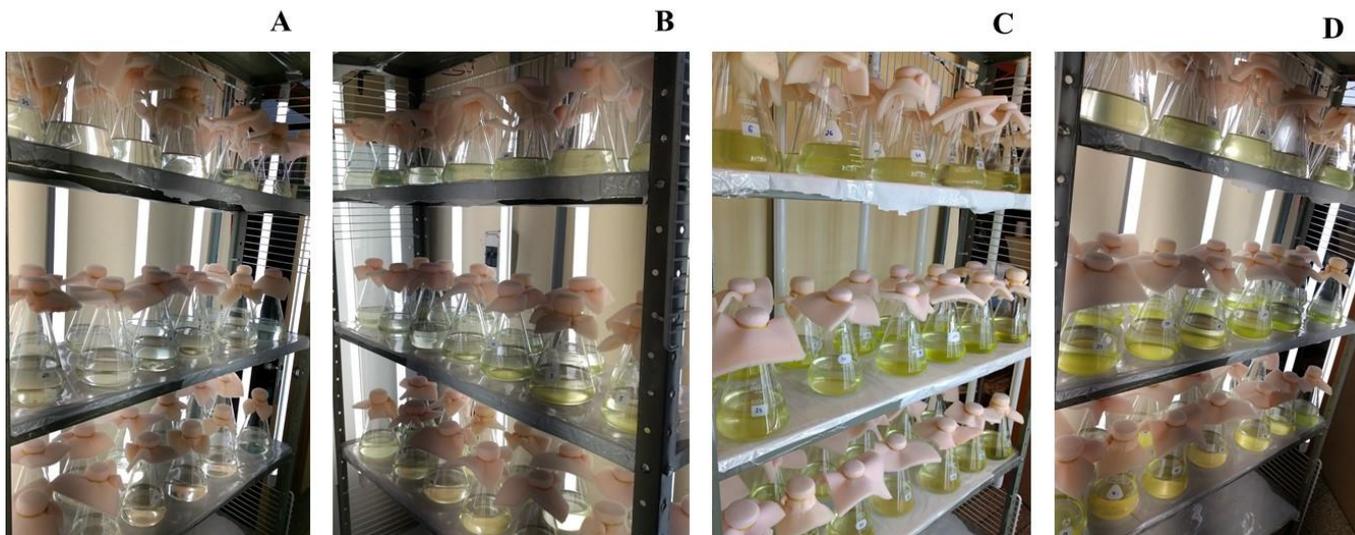
Continuação Tabela C1

Média	1,24
DP	0,18
Var	0,03
CV (%)	14,34

Apêndice D

Fotos

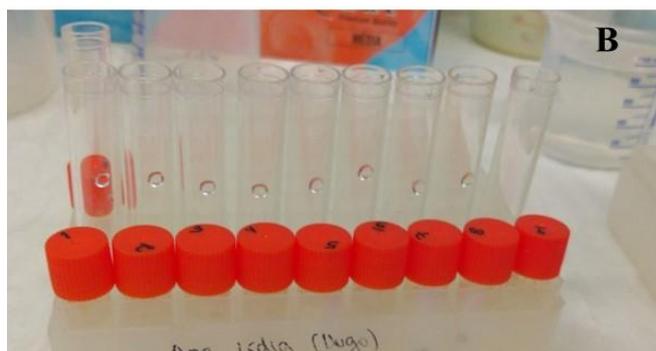
Fotos D.1 - Exposição da alga *R. subcapitata* ao EE₂ e a ATZ, de forma isolada, no decorrer de 72h. (A) 0 horas; (B) 24 horas; (C) 48 horas; (D) 72 horas



Fotos D.2 – Alga *R. subcapitata* após 72 horas de exposição ao EE₂ e a ATZ. Finalização do teste.



Fotos D.3 – Análise da contagem celular da alga por (A) citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson) equipado com laser de íon-argônio de 15 mW (emissão em 488 nm). (B) Criotubos com as amostras de alga e as microesferas (padrão interno) de carboxilato (Fluoresbrite®, Polysciences Inc., EUA)



Fotos D.4 – Análise das classes lipídicas e lipídios totais através de cromatografia de camada delgada com detecção por ionização em chama (TLF/FID) - Iatroscan™. Grades usadas na leitura dos lipídios



