INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

Comparação ecotoxicológica de princípios ativos de repelentes para invertebrados aquáticos irradiados e não irradiados com radiação gama

GIOVANA TEIXEIRA GIMILIANI

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações

Orientador:
Prof. Dr. José Roberto Rogero

SÃO PAULO

2013

Dedico este trabalho aos meus

queridos pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pelos desafios enfrentados e os que enfrentarei futuramente, pois tudo é válido para progredirmos em busca do amadurecimento, fortalecimento e realização pessoal.

Agradeço aos meus pais queridos, grandes companheiros neste trajeto sinuoso, que compreenderam, apoiaram e colaboraram (e muito!) durante o meu Mestrado.

Meus agradecimentos ao orientador Dr. José Roberto Rogero e à Msc. Sizue Ota Rogero, pela oportunidade de poder realizar este trabalho, pelo carinho, paciência, confiança e grande amizade.

À Dra. Maria Aparecida Faustino Pires, pela oportunidade de realizar o Mestrado no Centro de Química e Meio Ambiente – CQMA.

Aos funcionários do Centro de Tecnologia das Radiações – CTR: Beth, Carlos e Hélio, pela realização das radiações com o irradiador GammaCell.

À Dra. Vanessa Lameira (Vanessinha), pelas orientações no Laboratório de Ecotoxicologia do CQMA, pelas dicas e sugestões para o meu trabalho e claro, pela grande amizade e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Denis Abessa, pelas orientações e sugestões sobre a análise estatística.

Às estagiárias do laboratório: Caroline Nunes, Marina Victoretti e Diana Dias, pela ajuda no dia a dia e principalmente nas lavagens de inúmeros béqueres.

À Dra. Juliana Azevedo, pelo carinho e grande amizade.

Ao Rodolfo Molina, pela amizade e apoio.

Às companheiras do CRUSP: Sabrina, Luiza, Dalila, Clécia, Graziela e Gabriella, pelos momentos de descontração.

À minha grande colega e parceira de Mestrado: Gisela Martini, por compartilhar momentos de sabedoria e distrações.

Aos colegas do IPEN: Vanessa Magalhães (Vanessona), Andréa Andrade, Henrique, Talita Salles, Shayenne, Thiago, Flavia, Douglas, Caroline Oliveira, Gustavo Varca e Caroline Ferraz.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

E a todos que cruzaram em meu caminho e que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

"A vida tem duas faces:

Positiva e negativa

O passado foi duro

mas deixou o seu legado

Saber viver é a grande sabedoria

Que eu possa dignificar

Minha condição como mulher,

Aceitar suas limitações

E me fazer pedra de segurança

dos valores que vão desmoronando.

Aceitei contradições,

lutas e pedras como lições de vida

e delas me sirvo...

Aprendi a viver."

Cora Coralina

Comparação ecotoxicológica de princípios ativos de repelentes para invertebrados aquáticos irradiados e não irradiados com radiação gama

Giovana Teixeira Gimiliani

RESUMO

Nas últimas décadas, a introdução de produtos de uso diário nos ambientes aquáticos tem sido uma das questões mais discutidas no que se refere ao monitoramento ambiental. Estes produtos não são totalmente removidos pelos processos convencionais de estações de tratamento de esgoto e de água e são continuamente inseridos no ambiente aquático. O Dietiltoluamida, um princípio ativo de repelente de insetos bastante utilizado mundialmente, é um composto ambientalmente persistente e sua toxicidade para alguns organismos aquáticos tem sido comprovada. Em substituição aos produtos sintéticos, a população tem optado em utilizar produtos naturais, sendo cada vez mais comum o uso de repelentes com óleos essenciais de gramíneas. O óleo essencial de capim-limão é um dos mais utilizados nas formulações de cosméticos e de cuidados pessoais. Entretanto, nenhum estudo tem comprovado a sua toxicidade para a biota aquática. Além dos poluentes químicos, os organismos aquáticos podem estar sujeitos à exposição da radiação ionizante proveniente de fontes naturais (*background radiation*) ou nas proximidades de instalações de usinas nucleares. O presente estudo avaliou a reprodução de invertebrados aquáticos *C. silvestrii* após a exposição à radiação gama e posteriormente submetidos aos princípios ativos de repelente sintético e natural. Para isso, avaliou-se a citotoxicidade *in vitro* bem como a ecotoxicidade aguda e crônica dos princípios ativos e o efeito da radiação gama para *D. similis* e *C. silvestrii.* Os ensaios com radiação gama foram realizados sob as mesmas condições dos testes de ecotoxicidade, utilizando o irradiador Gamma-Cell com fonte de Co^{60}. De acordo com os resultados obtidos, o óleo essencial apresentou efeito citotóxico igual a 50 $mg.L^{-1}$ enquanto para o dietiltoluamida, foi de 420 $mg.L^{-1}$. O efeito tóxico agudo na sobrevivência (CE_{50}) foi encontrado na concentração de 7,2 $mg.L^{-1}$ e 3,8 $mg.L^{-1}$ de óleo essencial para *D. similis* e *C. silvestrii*, respectivamente. Concentrações de 64,9 e 53,9 $mg.L^{-1}$ de dietiltoluamida apresentaram efeito agudo na sobrevivência de *D. similis* e *C. silvestrii*, respectivamente. 3,4 $mg.L^{-1}$ foi estabelecida como a concentração de inibição (CI_{25}) de óleo essencial para o dietiltoluamida correspondeu a 16,4 $mg.L^{-1}$, ambos para *C. silvestrii*. As doses letais de radiação gama que causaram efeito agudo na sobrevivência (DL_{50}) foram de 242 Gy para *D. similis* e 525 Gy para *C. silvestrii*. A reprodução de *C. silvestrii* apresentou redução de 25% na dose de 29 Gy. Depois de determinar a ecotoxicidade dos princípios ativos e o efeito da radiação gama, os organismos foram irradiados com dose de 25 Gy, sendo a maior dose que não causou efeito na reprodução de *C. silvestrii*, e posteriormente foram expostos às mesmas concentrações utilizadas para os princípios ativos. Os resultados mostraram que a reprodução de *C. silvestrii* não foi afetada significativamente após a irradiação dos organismos testados quando comparada com os organismos não irradiados.

Palavras-chave: Ecotoxicidade; Dietiltoluamida; Óleo essencial de capim-limão; Radiação gama.

Ecotoxicological comparison of active ingredients of repellents for aquatic invertebrates irradiated and non-irradiated with gamma radiation

Giovana Teixeira Gimiliani

ABSTRACT

Over the last decades, the introduction of personal care products in aquatic environments has been one of the most discussed issues regarding environmental monitoring. These products are not completely removed by conventional sewage and water treatment processes and are continuously inserted into the aquatic environment. Diethyltoluamide an active ingredient in insect repellents widely used worldwide is an environmentally persistent compound and its toxicity to some aquatic organisms has been proven. In order to replace synthetic products, people have opted to use natural products which made more common the use of repellents with essential oils of grasses. The essential oil of lemongrass is one of the most used in the formulations of cosmetics and personal care. However, no study has proven its toxicity to aquatic biota. In addition to chemical pollutants, aquatic organisms may be subject to exposure of ionizing radiation from natural sources (background radiation) or near nuclear installations. The present study evaluated the reproduction of aquatic invertebrates *C. silvestrii* after exposure to gamma radiation and further submitted to synthetic and natural repellents. On this account, we evaluated the *in vitro* cytotoxicity as well as acute and chronic ecotoxicity of the diethyltoluamide and lemongrass oil, as well as the effect of gamma radiation over *D. similis* and *C. silvestrii*. Irradiation experiments were carried out under the same conditions as performed for ecotoxicity assays, using a Gamma-Cell irradiator with a Co^{60} source. According to the results, the essential oil presented a cytotoxic effect at concentrations of 50 $mg.L^{-1}$ whereas diethyltoluamide at 420 $mg.L^{-1}$. The acute toxic effect on survival (EC_{50}) was found at concentrations of 7.2 $mg.L^{-1}$ for essential oil to and 3.8 $mg.L^{-1}$ for *D. similis and C. silvestrii* respectively. Concentrations of 64.9 and 53.9 $mg.L^{-1}$ of diethyltoluamide showed acute effect on survival of *D. similis* and *C. silvestrii,* respectively. 3.4 $mg.L^{-1}$ of essential oil was established as the inhibition concentration (IC_{25}) while for diethyltoluamide such value corresponded to 16.4 $mg.L^{-1}$, both over *C. silvestrii.* The lethal doses induced by gamma radiation revealed an acute effect on survival (LD_{50}) at 242 Gy for *D. similis* and 525 Gy for *C. silvestrii*. The reproduction *C. silvestrii* decreased by 25% at a dose of 29 Gy. After determining the ecotoxicity of the active ingredients and the effect of gamma irradiation, the organisms were irradiated at 25 Gy, which corresponded to the higher dose which caused no effect over the reproduction *C. silvestrii* and were subsequently exposed to the same concentrations used for the active ingredients. The results showed that reproduction *C. silvestrii* was not significantly affected after irradiation of the assayed organisms when compared to non-irradiated organisms.

Key words: Ecotoxicity; Diethyltoluamide; Lemongrass essential oil; Gamma radiation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....1

2. OBJETIVOS 3

2.2 Objetivos específicos 3

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 4

3.1 Ecotoxicologia e aspectos gerais da poluição ambiental 4

3.1.1 Organismos-teste.....7

3.1.1.1 *Daphnia similis* 8

3.1.1.2 *Ceriodaphnia silvestrii* 10

3.1.2 Aspectos legais.....10

3.2 Fármacos e produtos de uso diário no ambiente aquático.....11

3.2.1 Dietiltoluamida.....12

3.2.2 Óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*).....15

3.3 Radiação ionizante.....17

3.3.1 Fontes de radiação ionizante 20

3.3.2 Acidente nuclear no Japão.....21

3.3.3 Radiação natural (*background radiation*) 21

3.3.4 Exposição dos organismos aquáticos às fontes de radiação ionizante.....22

4. METODOLOGIA.....26

4.1 Substâncias-teste.....27

4.2.1 Preparo das soluções-teste 29

4.2.2 Cultura celular e preparo da suspensão celular 30

4.2.3 Procedimento dos ensaios.....30

4.3 Ensaios de ecotoxicidade.....33

4.3.1 Coleta e preparo da água de diluição 33

4.3.2 Manutenção e cultivo dos organismos-teste 34

4.3.3 Alimentação dos organismos 34

4.3.4 Ensaios de sensibilidade e validação dos resultados 35

4.4 Ensaio de ecotoxicidade aguda 36

4.4.1 Preparo das soluções-teste.....36

4.4.2 Controle positivo com o solvente Dimetilsulfóxido – DMSO.....36

4.4.4 Ensaios definitivos 38

4.4.4.1 Procedimento dos ensaios.....38

4.5 Ensaios de ecotoxicidade crônica.....40

4.5.1 Definição das concentrações-testes 40

4.5.2 Procedimento dos ensaios.....40

4.6 Exposição dos organismos à radiação gama.....41

4.6.1 Determinação da DL_{50}.....42

4.6.1.1 Ensaios preliminares.....42

4.6.1.2 Ensaios definitivos 43

4.6.2 Efeito da radiação gama na reprodução 44

4.6.2.1 Ensaios preliminares.....44

4.6.2.2 Ensaios definitivos 44

4.6.3 Organismos irradiados e submetidos aos princípios ativos.....46

4.6.3.1 Procedimento dos ensaios.....46

4.7 Análise estatística dos resultados.....47

4.7.1 Ensaios *in vitro* de citotoxicidade 47

4.7.2 Ecotoxicidade aguda dos princípios ativos e DL_{50} de radiação gama.....48

4.7.3 Ecotoxicidade crônica dos princípios ativos e efeito da radiação gama na reprodução 48

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 52

5.1 Ensaio *in vitro* de citotoxicidade 52

5.1.1 Óleo essencial de capim-limão 52

5.1.2 Dietiltoluamida 53

5.2 Ensaios de ecotoxicidade 55

5.2.1 Ensaios de sensibilidade dos organismos 55

5.2.2 Ecotoxicidade aguda 56

5.2.2.1 Óleo essencial de capim-limão 56

5.2.2.2 Dietiltoluamida 58

5.2.3 Ecotoxicidade crônica 63

5.2.3.1 Óleo essencial de capim-limão 63

5.2.3.2 Dietiltoluamida 68

5.3 Exposição dos organismos à radiação ionizante 72

5.3.1 Determinação da dose letal – DL_{50} 72

5.3.2 Efeito da radiação ionizante na reprodução de *C. silvestrii* 74

5.3.3 Efeito da radiação gama na morfologia de *C. silvestrii* 78

5.4 Organismos irradiados e submetidos aos princípios ativos de repelente 80

5.4.1 Óleo essencial de capim-limão 80

5.4.2 Dietiltoluamida 83

5.5 Variabilidade dos resultados 87

5.6 Classificação dos princípios ativos conforme a diretiva 93/67/EEC da União Européia 88

5.7 Estabelecimento de valores de referência para a proteção da vida aquática em ecossistemas dulcícolas 90

6. CONCLUSÕES.....92

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....93

APÊNDICES 104

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Estimativas de doses anuais (mGy.ano^{-1}) recebidas por organismos marinhos e dulcícolas em regiões com fontes naturais de radiação ionizante Adaptado de IAEA (1976). 23

TABELA 2 – Características físicas e químicas do DEET (HANSCH *et al*., 1995; NPIC, *s.d.*).....27

TABELA 3 – Características físicas e químicas do OE (FERQUIMA, 2010; YALKOWSKY e HE, 2003).....28

TABELA 4 – Condições dos ensaios de ecotoxicidade aguda para *D. similis* e *C. silvestrii*. 39

TABELA 5 – Condições dos ensaios de ecotoxicidade crônica para *C. silvestrii*..41

TABELA 6 – Condições dos ensaios de radiação gama em *D. similis* e *C. silvestrii*. 44

TABELA 7 – Condições dos ensaios para avaliação do efeito da radiação gama na reprodução de *C. silvestrii*.....45

TABELA 8 – Condições dos ensaios com organismos *C. silvestrii* irradiados e submetidos aos princípios ativos. 47

TABELA 9 – Viabilidade celular e desvios padrões em diferentes concentrações da solução dos lotes de OE. 52

TABELA 10 – Viabilidade celular e desvios padrões em diferentes concentrações da solução de DEET. 54

TABELA 11 – Médias dos resultados de IC_{50} e desvios padrões dos testes *in vitro* de citotoxicidade para os princípios ativos utilizados. 55

TABELA 12 – Resultados da CE_{50} dos três ensaios de ecotoxicidade aguda com os dois lotes de OE para *D. similis*.....57

TABELA 13 – Resultados da CE_{50} dos três ensaios de ecotoxicidade aguda com os dois lotes de OE para *C. silvestrii*.....57

TABELA 14 – Resultados da CE_{50} dos três ensaios de ecotoxicidade aguda com o DEET para *D. similis*. 58

TABELA 15 – Resultados da CE_{50} dos três ensaios de ecotoxicidade aguda com o DEET para *C. silvestrii*. 59

TABELA 16 – Ecotoxicidade aguda para organismos aquáticos. Valores disponíveis na literatura e obtidos no presente trabalho, expressos em CE_{50} ou CL_{50}. Adaptado de Costanzo *et al*. (2007). 60

TABELA 17 – Concentrações máximas de DEET encontradas em alguns compartimentos ambientais e esgotos de alguns países. Adaptado de Costanzo *et al*. (2007). 61

TABELA 18 – Médias da CE_{50} dos três ensaios de ecotoxicidade aguda dos princípios ativos para *D. similis* e *C. silvestrii*. 62

TABELA 19 – Reprodução de *C. silvestrii* em diferentes concentrações do lote de OE. 63

TABELA 20 – Resultados da CENO e CEO do lote 180 de OE para a reprodução de *C. silvestrii*. 64

TABELA 21 – Resultados da CI_{25} para os ensaios com o lote 180 de OE.....65

TABELA 22 – Reprodução de *C. silvestrii* em diferentes concentrações do lote 183 de OE. 65

TABELA 23 – Resultados da CENO e CEO do lote 183 do OE para a reprodução de *C. silvetsrii*. 66

TABELA 24 – Resultados da CI_{25} para os ensaios com o lote 183 de OE.....67

TABELA 25 – Reprodução de *C. silvestrii* em diferentes concentrações de DEET. 69

TABELA 26 – Resultados da CEO e CENO do DEET para a reprodução de *C. silvestrii*. 70

TABELA 27 – Resultados da CI_{25} dos ensaios com DEET. 70

TABELA 28 – Sobrevivência de *D. similis* e *C. silvestrii* às doses de radiação gama. Média dos três ensaios. 72

TABELA 29 – Reprodução de *C. silvestrii* em diferentes doses de radiação gama. 75

TABELA 30 – Resultados da CENO e CEO da radiação gama para a reprodução de *C. silvestrii*.....76

TABELA 31 – Resultados da CI_{25} para as doses de radiação gama. 76

TABELA 32 – Doses de radiação gama e efeitos observados nos organismos da FIG. 31. 79

TABELA 33 – Reprodução de *C. silvestrii* irradiada e não irradiada e submetida às diferentes concentrações de OE. 80

TABELA 34 – Resultados da CENO e CEO para a reprodução de *C. silvestrii* irradiada e não irradiada e exposta ao OE.....82

TABELA 35 – Resultados da CI_{25} na reprodução dos organismos irradiados e não irradiados e expostos ao OE. 82

TABELA 36 – Reprodução de *C. silvestrii* irradiada e submetida em diferentes concentrações de DEET. 84

TABELA 37 – Resultados da CEO e CENO para a reprodução de *C. silvestrii* irradiada e não irradiada e exposta ao DEET. 85

TABELA 38 – Resultados da CI_{25} para os organismos irradiados e não irradiados expostos ao DEET. 86

Tabela 39 – Classificação conforme a diretiva 93/67/EEC da União Européia.....89

Tabela 40 – Classificação dos princípios ativos baseada na diretiva 93/67/EEC. 89

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Representação dos níveis de organização biológica e a relação entre os efeitos observados e sua relevância ecológica. Adaptado de Moore *et al.,* (2004).....6

FIGURA 2 – Fêmea adulta de *Daphnia similis*. Aumento de 100x.....9

FIGURA 3 – Fêmea adulta de *Daphnia similis* com ovo efípio. 9

FIGURA 4 – Fêmea adulta de *Ceriodaphnia silvestrii*. Aumento de 100x.....10

FIGURA 5 – Poder de penetração das partículas alfa, beta e raios gama. Adaptado de USEPA (2007). 18

FIGURA 6 – Ação direta e indireta da radiação ionizante na molécula de ácido desoxirribonucléico (DNA).....20

FIGURA 7 – Comparação da radiossensibilidade entre os grupos de organismos (WHICKER e SCHULTZ, 1982). 25

FIGURA 8 – Representação das etapas cumpridas neste trabalho.....26

FIGURA 9 – Estrutura química do DEET. 27

FIGURA 10 – Estrutura química dos aldeídos que compõem o citral, principal componente do OE. 28

FIGURA 11 – Representação do ensaio *in vitro* de citotoxicidade numa microplaca com 96 poços.....31

FIGURA 12 – Preparo das concentrações-teste (a); Distribuição da solução de lavagem na microplaca (b); Leitura da microplaca em espectrofotômetro (c); Microplaca após leitura no espectrofotômetro (d). 32

FIGURA 13 – Coleta de água no Reservatório de Ribeirão do Piraí, município de Salto, SP. 33

FIGURA 14 – *Pseudokirchneriella subcapitata*. Fonte: http: //algalweb.net.....35

FIGURA 15 – Ensaio de ecotoxicidade aguda. 39

FIGURA 16 – Irradiador Gamma-Cell 200 e os tubos *falcon* contendo os organismos a serem irradiados. 43

FIGURA 17 – Visualização de um ensaio de ecotoxicidade crônica (a) e a aplicação dos testes de hipóteses na determinação da CENO (NOEC = *no observed effect concentration*), CEO (LOEC = *lowest observed effect concentration*) e VC (MATC = *maximum allowable toxicant concentration*) (b). No exemplo, os organismos mortos estão denotados de preto. * = representa a diferença significativa em relação ao controle (NEWMAN e ZHAO, 2008). 49

FIGURA 18 – Fluxograma com as etapas para análise estatística e determinação dos valores de CENO, CEO e CI25 (USEPA, 2002b). 50

FIGURA 19 – Curvas de viabilidade celular no teste *in vitro* de citotoxicidade do OE. 53

FIGURA 20 – Curvas de viabilidade celular no teste *in vitro* de citotoxicidade do DEET. 54

FIGURA 21 – Média dos três ensaios de ecotoxicidade aguda para cada princípio ativo. 62

FIGURA 22 – Reprodução de *C. silvestrii* em função das concentrações do lote 180 de OE e os controles de água e DMSO. *Diferença significativa (CEO) ($p < 0,05$). 64

FIGURA 23 – Reprodução de *C. silvestrii* em função das concentrações do lote 183 de OE e os controles de água e DMSO. *Diferença significativa (CEO) ($p < 0,05$). 66

FIGURA 24 – Curvas de concentração-resposta da reprodução de *C. silvestrii* em função das concentrações de OE e os controles de água e DMSO. Média dos três ensaios de cada lote de OE. 68

FIGURA 25 – Reprodução de *C. silvestrii* em função das concentrações de DEET e o controle de água. *Diferença significativa (CEO) ($p < 0,05$). 69

FIGURA 26 – Curvas de concentração-resposta da reprodução de *C. silvestrii* em função das concentrações de DEET e controle de água. Média dos três ensaios. 71

FIGURA 27 – Reprodução de *C. silvestrii* em função das concentrações dos princípios ativos testados. 71

FIGURA 28 – Curvas de dose-resposta da DL_{50} para *D. similis* e *C. silvestrii* com 48 h de observação após a exposição dos organismos aos raios gama. 73

FIGURA 29 – Reprodução de *C. silvestrii* em função das doses de radiação gama e o controle de água. *Diferença significativa (CEO) ($p < 0,05$). Taxa de dose: de 1,50 a 1,52 $kGy.h^{-1}$.....75

FIGURA 30 – Curva de dose-resposta da reprodução de *C. silvestrii* em função das doses de radiação gama e controle de água. Média dos três ensaios. 77

FIGURA 31 – Modificações na morfologia de *C. silvestrii* em diferentes doses de radiação gama. A até D: aumento de 10x. E e F: aumento de 100x. 78

FIGURA 32 – Reprodução de *C. silvestrii* em função das concentrações de OE e os controles de água e DMSO. Controle + radiação = organismos irradiados em água natural; DMSO + radiação = organismos irradiados em solução de DMSO. *Diferença significativa (CEO) ($p < 0,05$). 81

FIGURA 33 – Curvas de concentração-resposta da reprodução de *C. silvestrii* irradiada e não irradiada e exposta às concentrações de OE. Controle = água natural com organismos irradiados. Média dos três ensaios. 83

FIGURA 34 – Reprodução de *C. silvestrii* em função das concentrações de DEET e o controle de água. Controle radiação = organismos irradiados em água natural. *Diferença significativa ($p < 0,05$). 84

FIGURA 35 – Curvas de reprodução de *C. silvestrii* irradiada e não irradiada e exposta ao DEET. Controle = água natural com organismos irradiados. Média dos três ensaios. 86

1. INTRODUÇÃO

A cada ano, cerca de 1.000 novos compostos são incluídos no mercado mundial. Grande parte destes compostos é introduzida nos ambientes aquáticos por diversas vias e exposições. Muitos são persistentes, podem bioacumular nos organismos aquáticos e provocar efeitos tóxicos gerando consequências que levam a impactos significativos nos ecossistemas, na qualidade ambiental e na saúde pública (DEZOTTI, 2008; MOORE *et al*., 2004).

Diante deste cenário, a ecotoxicologia ganha destaque como abordagem complementar às análises químicas, possibilitando o entendimento do comportamento dos compostos no ambiente bem como os possíveis efeitos causados em diferentes níveis de organização biológica (CORTEZ, 2011).

O uso cotidiano de diversos produtos tem chamado a atenção de gestores e pesquisadores no que se refere às concentrações de determinados compostos e princípios ativos detectados em relatórios de qualidade de água. Estes compostos resistem aos tratamentos convencionais de esgotos e águas de drenagem, permitindo o lançamento, às vezes nas formas inalteradas, para os corpos hídricos receptores (BRAUSCH e RAND, 2011).

O princípio ativo dietiltoluamida (DEET) é um dos mais utilizados nas formulações de repelentes de insetos. Concentrações deste composto já foram encontradas em algumas matrizes ambientais bem como a sua toxicidade para algumas espécies de organismos aquáticos. É um composto químico persistente e alguns processos avançados de remoção têm sido aplicados nas estações de tratamento de esgoto e de água para estudos sobre a sua remoção (COSTANZO *et al.,* 2007).

Em substituição aos repelentes sintéticos, o “consumismo verde” tem despertado o uso de produtos naturais à base de plantas, o que tem levado à produção de grande escala destes produtos (BURT, 2004).

Existe uma diversidade significativa de óleos essenciais com propriedades de repelência que são inseridos nas fórmulas de repelentes naturais. O gênero de gramíneas, *Cymbopogon* é um dos vegetais mais utilizados para extração de óleos essenciais e devido a sua composição química, é largamente aplicado em produtos de uso diário, cosméticos e desinfetantes (TASKINEN *et al*., 1983).

Além da introdução de produtos químicos no meio ambiente, a produção de radioisótopos e a geração de energia proveniente de fontes nucleares têm sido bastante criticadas após o acidente na estação nuclear de Fukushima, no Japão.

O lançamento de material radioativo no ambiente aquático permite a exposição da biota às doses de radiação ionizante e que, no caso de ocorrência de acidentes nucleares, podem desencadear efeitos potenciais e até irreversíveis (MEYERS-SCHÖNE e TALMAGE, 2002).

Neste contexto, os organismos aquáticos permanecem constantemente expostos a diversas vias de exposição tanto de materiais radioativos nas proximidades de intalações nucleares, quanto de produtos químicos de uso diário em regiões altamente industrializadas e urbanizadas (DALLAS *et al*., 2012).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo teve como principal objetivo avaliar os possíveis efeitos sinérgicos da radiação gama com princípios ativos de repelentes ra reprodução de *C. silvestrii*..

2.2 Objetivos específicos

Para atingir este objetivo, foram adotadas as seguintes metas:

- Determinar a citotoxicidade *in vitro* dos princípios ativos de repelentes;
- Avaliar a ecotoxicidade aguda dos princípios ativos de repelentes para *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii*;
- Avaliar a ecotoxicidade crônica dos princípios ativos de repelente para *Ceriodaphnia silvestrii*;
- Determinar a dose letal de 50% da radiação gama para *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii;*
- Avaliar os efeitos da radiação gama na reprodução de *Ceriodaphnia silvestrii;*

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Ecotoxicologia e aspectos gerais da poluição ambiental

A maioria dos recursos naturais disponíveis para o benefício do homem está especificamente localizada nas regiões costeiras e nas bacias hidrográficas de grandes sistemas fluviais. Milhões de pessoas vivem nestas regiões ou em suas proximidades e são dependentes de seus recursos para obtenção de alimentos e matérias-primas industriais (MOORE *et al*., 2004).

Diante deste cenário, nos deparamos com as consequências decorrentes da ocupação desordenada da população e do intenso desenvolvimento tecnológico em áreas com grande importância biológica e ao mesmo tempo econômica onde se inserem as mudanças dos ecossistemas e *habitats*, o lançamento de efluentes e resíduos de origem industrial e doméstico nos sistemas fluviais, entre outros impactos que atingem direta e indiretamente a qualidade ambiental e a saúde pública (MOORE *et al*., 2004).

A contaminação química, indubitavelmente, tem merecido maior atenção em nossa sociedade, pois as substâncias sintetizadas pelo homem têm aumentado de maneira quase exponencial no último século (DEZOTTI, 2008).

A grande maioria dos produtos químicos comercializados mundialmente não dispõe de informações suficientes sobre o risco apresentado para a saúde humana e para o meio ambiente (EUROPEAN COMMISSION, *s.d.*).

A seguir são fornecidos alguns números que revelam que a preocupação com essas substâncias é procedente (DEZOTTI, 2008):

- Existem cerca de sete milhões de substâncias químicas em uso;
- Cerca de 100 mil substâncias e produtos químicos fazem parte do uso diário;
- 7.000 são comercialmente produzidos em escala relativamente grande;
- Cerca de 1.000 novos compostos são incluídos nestas listas a cada ano;
- Estima-se que 79% dos produtos químicos comercializados não possuem informações disponíveis sobre seus efeitos tóxicos.

A indústria química mundial produziu no ano de 1999 cerca de 400 milhões de toneladas de produtos químicos, com previsão de 85% de crescimento na produção no ano de 2020 (OECD, 2001).

Para 99% dos produtos químicos inseridos no mercado, as informações quanto às propriedades, uso e risco são escassas. Apenas 3% das substâncias químicas são testadas quanto aos riscos à saúde e ao meio ambiente, outras 21% não possuem nenhum tipo de descrição para esse fim e 65% apresentam informações insuficientes (EUROPEAN COMMISSION, *s.d.*).

Grande parte desses produtos tem como destino final os corpos receptores (rios, lagos e oceanos) por diversas vias: lançamento de efluentes industriais e domésticos, chuvas e disposições diversas (DEZOTTI, 2008).

Muitos destes compostos são persistentes, tóxicos e podem bioacumular nos organismos, trazendo problemas para a população que vive no ecossistema no qual foi aplicado e, a longo prazo, para outras comunidades (DEZOTTI, 2008).

Neste contexto, além das determinações químicas e análises de parâmetros físico-químicos, os ensaios de toxicidade foram elaborados para fornecer dados qualitativos e quantitativos dos efeitos das substâncias químicas sobre os organismos aquáticos (DEZOTTI, 2008).

A Ecotoxicologia ganha destaque como abordagem complementar às análises químicas, possibilitando o entendimento do comportamento dos compostos no ambiente bem como os possíveis efeitos causados em diferentes níveis de organização (CORTEZ, 2011), desde o nível celular (bioquímico e fisiológico), individual até níveis mais elevados de organização, como populacional, comunidade, ecossistema e biosfera (RAND *et al*., 1995).

Compreende a sequência de eventos, representada na FIG. 1, a qual se refere à cadeia da causalidade e à relação entre os efeitos observados e a relevância ecológica.

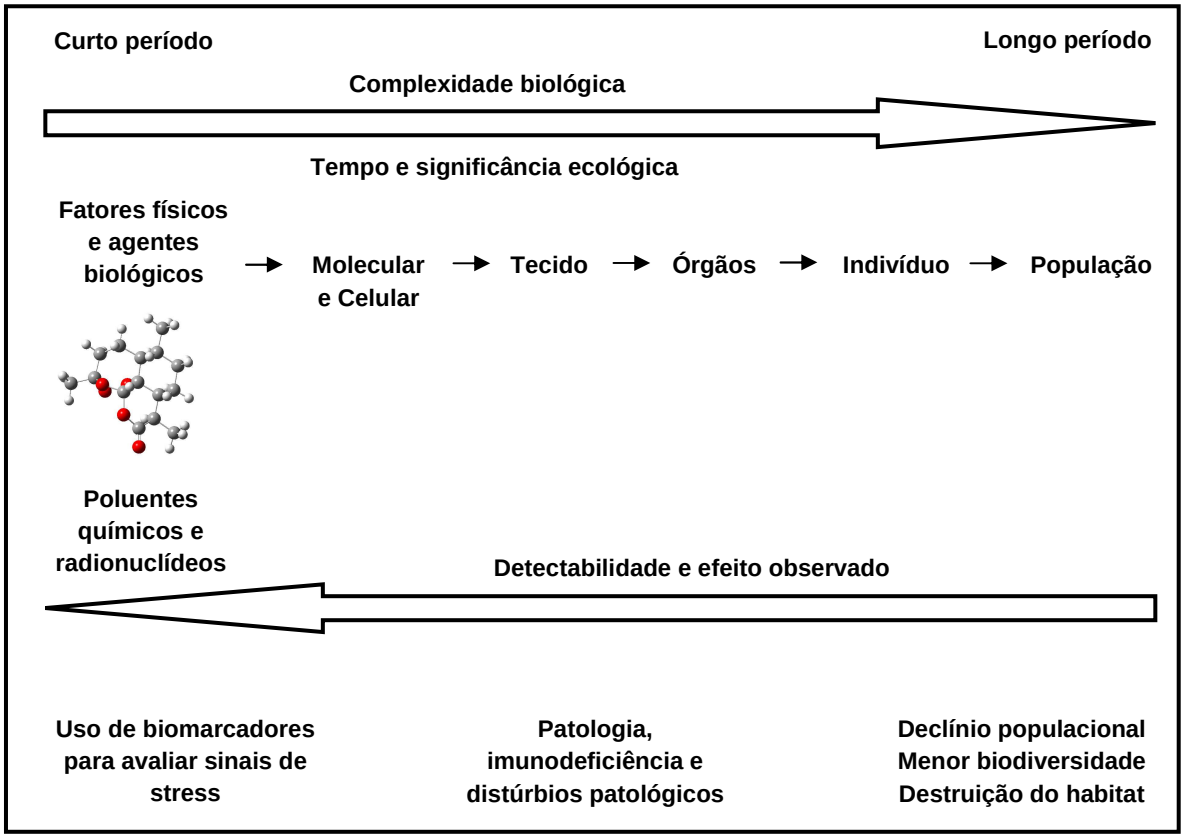


FIGURA 1 – Representação dos níveis de organização biológica e a relação entre os efeitos observados e sua relevância ecológica. Adaptado de Moore *et al.,* (2004).

As causas de um efeito observado em um determinado sistema de organização são procuradas a um nível abaixo, enquanto que a relevância ecológica é procurada a um nível superior. Por exemplo, a redução na reprodução de organismos expostos a um poluente (nível de indivíduo) é explicada pelas alterações no sistema endócrino (nível de órgãos). A consequência ou a relevância ecológica deve ser observada em nível populacional, onde uma análise de risco da população em áreas poluídas pode ser aplicada (COSTA *et al.*, 2008; MOORE *et al*., 2004).

Os ensaios de ecotoxicidade são caracterizados pela exposição de organismos aquáticos a várias concentrações de um efluente ou de uma substância química em um determinado período do seu ciclo de vida. Podem ser realizados com organismos aquáticos vivos, ou organismos-teste como são denominados, dulcícolas, estuarinos e marinhos em condições laboratoriais e/ou de campo (LAMEIRA, 2008).

Um dos objetivos da ecotoxicologia é o desenvolvimento de protocolos de testes de ecotoxicidade que permitam definir limiares de toxicidade permissíveis com níveis de incerteza aceitáveis e que sirvam de guia para as entidades reguladoras para a tomada de decisões. Diversos órgãos de proteção ambiental, como *Environment Canada* e *Environmental Protection Agency* dos Estados Unidos (USEPA), e de padronização, como *American Society for Testing and Materials* (ASTM), *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD), *Association of Analytical Communities* (AOAC) e *International Organization for Standardization* (ISO) têm se concentrado na elaboração e implementação de sistemas de diagnóstico, os quais constituem a base para a geração de estratégias que visam proteger os ecossistemas (COSTA *et al*., 2008).

No Brasil, o órgão responsável pelo desenvolvimento de protocolos de testes de toxicidade é a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) também tem padronizado ensaios de ecotoxicidade (Costa *et al*. 2008).

As vantagens de realizar ensaios de ecotoxicidade incluem: baixo custo, obtenção de respostas rápidas, simplicidade na maior parte dos métodos, fácil interpretação dos resultados e uma evidência direta das consequências da contaminação (CESAR *et al*., 2002).

3.1.1 Organismos-teste

Muitos organismos aquáticos podem ser utilizados como indicadores de problemas ambientais, porém, uma espécie ou grupo de organismos somente é adotado como organismo-teste caso apresentem algumas peculiaridades (LAMEIRA, 2008).

Domingues e Bertoletti (2006) ressaltam que a escolha dos organismos-teste deve seguir os seguintes princípios básicos: sensibilidade a uma diversidade de agentes químicos, tendo como requisito o conhecimento prévio da biologia das espécies; pequeno porte e ciclo de vida não muito longo; facilidade na manutenção/cultivo; disponibilidade dos organismos ao longo do ano, possibilitando o cultivo contínuo em laboratório; espécies autóctones ou representativas do ecossistema em estudo; ampla distribuição geográfica e

estabilidade genética, o que implica na obtenção de lotes uniformes de organismos.

Neste contexto, os cladóceros preenchem grande parte dos quesitos citados acima, por isso, são largamente utilizados como organismos-teste em ensaios de ecotoxicidade e ideais para cultivos em laboratório.

Os cladóceros são microcrustáceos planctônicos que pertencem à Ordem Cladocera, do Filo Crustacea. Atuam como consumidor primário na cadeia alimentar aquática e se alimentam por filtração de material orgânico particulado em suspensão e microalgas. São vulgarmente conhecidos como pulgas d'água (BUIKEMA e SHERBERGER, 1977).

Os cladóceros apresentam, em sua morfologia, pernas torácicas compostas por cerdas que agem como peneiras, retendo algas, bactérias e pequenas partículas de matéria orgânica provenientes da água (BUIKEMA e SHERBERGER, 1977).

As espécies de Cladocera mais utilizadas em ensaios de ecotoxicidade são: *Daphnia magna*, *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*.

3.1.1.1 *Daphnia similis*

Daphnia similis (FIG. 2) pertence à Família Daphnidae e apresenta comprimento máximo de 3,5 mm e possuem larga distribuição na América do Norte (ABNT NBR 12713, 2009).

FIGURA 2 – Fêmea adulta de *Daphnia similis*. Aumento de 100x.

Os dafinídeos se reproduzem por partenogênese, dando origem a populações constituídas inteiramente por fêmeas. Quando ocorrem condições desfavoráveis ou um estresse ambiental, como superpopulação, falta de alimento ou mudanças de temperatura, surgem na cultura machos e também fêmeas com dois ovos haplóides, os quais são fecundados pelos machos. Esses ovos envoltos em uma carapaça única, de cor escura, são altamente resistentes às condições desfavoráveis e são denominados de efípio (FIG. 3) (DOMINGUES e BERTOLETTI, 2006).

FIGURA 3 – Fêmea adulta de *Daphnia similis* com ovo efípio.

3.1.1.2 *Ceriodaphnia silvestrii*

A espécie *C. silvestrii* (FIG. 4) apresenta as mesmas características dos dafinídeos, se diferenciando apenas no tamanho que varia de 0,8 a 0,9 mm de comprimento (ABNT NBR 13343, 2010) e na distribuição, sendo no Brasil e Argentina.

FIGURA 4 – Fêmea adulta de *Ceriodaphnia silvestrii*. Aumento de 100x.

3.1.2 Aspectos legais

Nesse trâmite, a legislação sobre política de substâncias químicas da União Européia que foi aprovada pelo Parlamento Europeu e pelo Conselho da Comunidade Européia. O Regulamento (CE) nº 1907/2006, também conhecido como REACH (*Register, Evaluation, Authorization, Chemicals*) criou a Agência Européia de Substâncias Químicas e aplicou uma política de registro, avaliação, autorização e restrição aos produtos químicos inseridos no mercado europeu.

O REACH entrou em vigor a partir de 2007, sendo que todas as substâncias colocadas no mercado em quantidades acima de 1 tonelada deverão ser registradas. As substâncias identificadas como causadoras de risco, consideradas de grande preocupação, serão avaliadas com prioridade e estarão sujeitas à autorização pela Agência (ABIQUIM, 2007).

Os princípios que nortearam a concepção dessa política foram: a) precaução e prevenção; b) substituição de produtos perigosos por outros mais seguros; c) redução de testes em animais; d) maior responsabilidade da indústria

quanto à divulgação da segurança de seus produtos; e) transparência da informação (ABIQUIM, 2007).

3.2 Fármacos e produtos de uso diário no ambiente aquático

Os produtos farmacêuticos e os produtos de uso diário compreendem um grupo diversificado de compostos químicos utilizados interna ou externamente, tanto por humanos quanto por animais. Incluem desde compostos utilizados na formulação de medicamentos como analgésicos e antiinflamatórios, antimicrobianos, antiepiléticos, meios de contraste, como por exemplo, para raio-X, contraceptivos orais, drogas citostáticas, medicamentos de uso veterinário até produtos de uso diário como *shampoos*, cremes dentais, fragrâncias, cremes, sabonetes, protetores solares, cosméticos, etc. (TERNES, 1998; HEBERER, 2002; USEPA, *s.d.*).

A presença destes compostos no ambiente têm-se configurado como um importante tópico das ciências ambientais em fóruns internacionais, pois algumas toneladas de medicamentos são produzidas por ano e aplicadas na medicina humana e veterinária, sendo que muitos destes produtos não são descartados corretamente (CORDY *et al*., 2004; KOLPIN *et al*., 2004; STACKELBERG *et al*., 2004).

Há alguns anos, os fármacos e produtos de uso pessoal não eram considerados poluentes e não faziam parte dos programas de monitoramento ambiental, devido a estes compostos ocorrerem em concentrações muito baixas no ambiente (entre $\mu g.L^{-1}$ e $ng.L^{-1}$), não sendo possíveis de serem detectados pelos métodos analíticos disponíveis na época. Porém, com o desenvolvimento de métodos analíticos mais sensíveis, foi proporcionado um aumento significativo no número de trabalhos com fármacos nesta última década (HEBERER, 2002).

O monitoramento destes compostos no meio ambiente vem ganhando grande interesse devido a essas substâncias serem frequentemente encontradas em matrizes ambientais como águas superficiais e sedimentos, além de efluentes de estações de tratamento de esgoto e estações de tratamento de água no mundo todo, inclusive no Brasil (STACKELBERG *et al*., 2004).

Estes micropoluentes são desenvolvidos para serem persistentes, mantendo suas propriedades químicas para servirem a um propósito terapêutico e permanecendo maior tempo no ambiente (MULROY, 2001).

A descoberta destes compostos no ambiente aquático tem estimulado a pesquisa investigativa em busca de novas tecnologias nos processos convencionais de tratamento de água e de esgoto, os quais são insuficientes na remoção total destes compostos. Tem estimulado também a realização de ensaios de ecotoxicologia e avaliações de risco à saúde humana (TERNES, 2010).

A maioria dos fármacos e dos produtos de uso diário atua como interferente do sistema endócrino (TERNES, 1999), que possuem a propriedade de mimetizar as ações dos hormônios naturais. São substâncias químicas exógenas ou a mistura de várias substâncias que alteram as funções de síntese, transporte, ligação, ação e inibição de hormônios naturais responsáveis pela manutenção da homeostase, reprodução, desenvolvimento e/ou comportamento (CRISP *et al*., 1997; SUMPTER, 1998). Por isso, são considerados contaminantes biologicamente ativos (CHRISTENSEN, 1998).

Os principais produtos de uso diário incluem desinfetantes (cujo princípio ativo é o triclosan), fragrâncias (amíscares), repelentes de insetos (DEET), preservativos (parabenos) e filtros UV (metilbenzeno) (BRAUSCH e RAND, 2011).

Ao contrário dos fármacos que são produzidos para uso interno, alguns produtos de uso diário são destinados ao uso externo corporal e não estão sujeitos a alterações metabólicas. Portanto, são lançados nas formas inalteradas aos corpos hídricos receptores por meio do uso cotidiano destes produtos (BRAUSCH e RAND, 2011).

3.2.1 Dietiltoluamida

O dietiltoluamida (*N,N*-dietil-m-toluamida), conhecido pela sigla DEET, é um dos princípios ativos mais utilizados em formulações de repelentes de insetos (COSTANZO *et al*., 2007; GLASSMEYER *et al*., 2005).

Em 1946, o DEET foi formulado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos para o exército americano, com a função de proteção contra picadas de insetos e controle de transmissão de patologias durante as guerras.

Este composto foi registrado em 1957 pela USEPA para uso geral da população e tem estado no mercado há mais de 50 anos (TAY *et al*., 2009; COSTANZO, 2007; USEPA, 1998).

Seu mecanismo de ação consiste na interferência da percepção sensorial dos insetos durante a localização de seus hospedeiros. Pode ser encontrado em repelentes nas formas de cremes, géis e aerossóis (COSTANZO *et al.*, 2007; DAVIS, 1985; DOGAN, 1999).

As concentrações de DEET encontradas nos repelentes podem variar de 4 a 100% nos 225 produtos registrados pela USEPA (USEPA, 1998). De acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos (*Centers for Disease Control and Prevention* – CDC), a concentração indicada é de 50% (ANVISA, 2010).

Estima-se que cerca de 30% da população norte americana utiliza anualmente repelentes com DEET. Destes 30%, 34% são crianças (USEPA, 1998).

No Brasil, os produtos mais populares disponíveis no mercado têm entre 6 e 14,5% de DEET. Apenas uma única marca possui 50% do princípio ativo (TURMA DO PEDAL, 2009).

A ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, aprovou uma nova resolução (Consulta Pública nº 20, de 12 de março de 2012) com o objetivo de regulamentar os repelentes contra insetos. Os repelentes devem ter segurança e eficácia comprovada e informações obrigatórias que devem constar na rotulagem de todos os produtos.

De acordo com esta resolução (ANVISA, 2012), não é permitido o uso de DEET em repelentes para crianças menores de dois anos de idade. Para crianças de 2 a 12 anos, a concentração do composto não deve ser superior a 10%, e para pessoas com idade superior à 12 anos, a concentração pode exceder 30% de DEET nas formulações, desde que sejam realizados estudos de avaliação de risco para seres humanos.

Os repelentes que contêm DEET são eficientes contra insetos. Porém, quando usados incorretamente ou em excesso, podem apresentar efeitos adversos em adultos e crianças, como dermatites, quadros de hipotensão, crises convulsivas, coma, reações alérgicas e neurotoxicidade, atuando no bloqueio da enzima colinesterase, necessária para o bom funcionamento do sistema nervoso.

Este composto também possui propriedades carcinogênicas em células da mucosa nasal (ANVISA, 2010; COSTANZO, 2007; TISCH *et al*., 2002; ABOU-DONIA *et al*. 2004; USEPA, 1998).

Informações sobre a ecotoxicidade do DEET são limitadas. Desde o registro do composto em produtos comercialmente disponíveis, o DEET não foi submetido a uma avaliação de risco ecológico, onde se acreditava que o composto jamais atingiria os corpos hídricos e a biota aquática (USEPA, 1998).

A mudança desta percepção foi refletida nas investigações dos relatórios de água, desde amostras de áreas urbanas e agrícolas, efluentes de estações de tratamento de esgoto, sistemas de águas subterrâneas, em áreas distantes das fontes potenciais e até mesmo em água potável, persistindo aos processos convencionais de tratamento de água (SINGH *et al*., 2010; TAY *et al*., 2009; GLASSMEYER *et al*., 2005; CORDY *et al*., 2004; WEIGEL *et al*., 2004; KOLPIN *et al*., 2002).

A principal rota de exposição de DEET no ambiente aquático é pelo lançamento de esgotos domésticos com a presença dos metabólitos liberados pelo corpo humano. Menos de 20% do DEET é absorvido pela pele e grande parte é metabolizada e excretada na forma de metabólitos (SUDAKIN e TREVATHAN, 2003).

Alguns estudos têm comprovado que o DEET é um composto biodegradável devido a maior eficiência de remoção (cerca de 70%) deste composto nos tratamentos biológicos quando se utiliza lodo ativado (YANG *et al*., 2011; SUI *et al*., 2010).

Processos avançados de remoção de fármacos e produtos de uso pessoal têm sido aplicados, entretanto, para alguns processos não se têm verificado muita eficiência na remoção do DEET. No caso do processo de microfiltração por osmose reversa, o composto é eficientemente removido (> 90%) (YANG *et al*., 2011; SUI *et al*., 2010).

Quanto ao processo de ozonização, o composto apresenta remoção moderada (0 – 50%) devido à falta de reação do grupo amida com o ozônio. No processo de carvão ativado, que adsorve compostos hidrofóbicos, o DEET é relativamente resistente à adsorção (YANG *et al*., 2011; SUI *et al*., 2010).

O DEET é relativamente persistente no ambiente aquático, onde sofre processos de biodegradação e fotólise por cerca de vinte dias até a sua total

degradação. Mas, ao contrário de outros produtos de uso diário, este composto possui baixo potencial de bioconcentração sendo, portanto, não facilmente acumulado pelos organismos aquáticos (CALZA *et al*., 2011; COSTANZO *et al*., 2007).

Atualmente, existem alguns dados de ecotoxicidade aguda do DEET para a biota aquática disponíveis na literatura. De acordo com a USEPA (1998), o composto é levemente tóxico para peixes e invertebrados de regiões de água doce.

Costanzo *et al.* (2007) listaram todas as espécies de organismos aquáticos já estudados e seus respectivos resultados de ecotoxicidade aguda para o DEET. Desde então, nenhuma publicação de resultados adicionais tem sido feita (BRAUSCH e RAND, 2011).

Embora o DEET seja resistente à degradação e frequentemente encontrado em águas superficiais, não se tem conhecimentos sobre estudos da sua ecotoxicidade crônica em organismos aquáticos (BRAUSCH e RAND, 2011). Bioensaios desenvolvidos com mamíferos (roedores) levaram ao prognóstico de que o DEET possui ação anticolinesterásica e que não apresenta efeitos na morfologia e no sistema reprodutor destes organismos após nove semanas de exposição (LEBOWITZ *et al.*, 1983). Brausch e Rand (2011) acreditam que os mecanismos de ação deste composto podem ser semelhantes à biota aquática. Por outro lado, os autores Costanzo *et al.* (2007), afirmam que o composto não é suscetível em provocar efeitos biológicos aos organismos aquáticos em concentrações ambientalmente relevantes.

3.2.2 Óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon flexuosus*)

A atração da sociedade moderna pelo “consumismo verde” desejando menos ingredientes sintéticos em alimentos e produtos à base de plantas, ambos reconhecidos como “geralmente seguros” (*Generally Recognized As Safe* – GRAS), tem despertado o interesse científico para produção de grande escala (SMID e GORRIS, 1999; TULEY DE SILVA, 1996).

As gramíneas constituem um grupo importante de plantas medicinais. O gênero *Cymbopogon* possui espécies que produzem óleos essenciais com uma variedade de componentes químicos. Inclui cerca de 30 espécies, sendo muitas

delas espécies aromáticas e fornecem óleo essencial de valor comercial. A maioria é nativa da região tropical do Velho Mundo e atualmente podem ser encontradas nas regiões tropicais e subtropicais (GOMES e NEGRELLE, 2003; CORRIGEN, 1992).

Os óleos essenciais são produzidos a partir da infusão de folhas, caules e raízes. Os métodos de extração destes óleos são diversificados, incluindo o uso de microondas, dióxido de carbono líquido e destilação em baixa ou alta pressão com água fervente ou vapor (BAKKALI *et al*., 2008; ANGIONI *et al*., 2006; MASOTTI *et al*., 2003; NEGRELLE e GOMES, 2003; OYEDELE *et al*., 2002).

São conhecidos aproximadamente 3000 óleos essenciais, dos quais 300 possuem grande importância comercial, principalmente no uso farmacêutico, na agricultura, em alimentos, produtos de limpeza e de higiene pessoal (HAJHASHEMI *et al*., 2003; PERRY *et al*., 2003; SILVA *et al*., 2003). Além disso, possuem propriedades medicinais com ação antisséptica, analgésica, sedativa e anti-inflamatória. Suas fragrâncias são utilizadas nos processos de embalsamento e preservação de alimentos (BAKKALI *et al*., 2008).

As gramíneas são morfologicamente indistinguíveis, o que dificulta a identificação das espécies. O estudo da composição química dos óleos essenciais facilita a diferenciação entre elas. Algumas delas produzem óleos cuja composição é semelhante, como é o caso da espécie *Cymbopogon citratus* e *Cymbopogon flexuosus* (TASKINEN *et al*., 1983).

As espécies de *Cymbopogom* mais importantes incluem: *C. citratus* (DC) Stapf (capim-limão do oeste da Índia); *C. flexuosus* (Nees ex Steud) (capim-limão do leste da Índia); *C. nardus* (L) Watson/Rendle (citronela de Ceylon); *C. winterianus* Jowilt (citronela de Java); *C. martinii* (Roxb.) (palmarosa) (CORRIGEN, 1992).

O *Cymbopogon flexuosus* pertence à família de gramíneas Poaceae. Possui propriedades antifúngicas e antimicrobianas. Apresenta citotoxicidade para células cancerígenas e dose letal ($DL_{50\%}$) > 5000 mg/kg em ratos (SHARMA *et al.,* 2009; GOLOB *et al*., 1999).

No Brasil, existem alguns estudos sendo desenvolvidos com óleos essenciais com propriedades repelentes contra a epidemia da dengue. Um deles é a produção de sabonetes à base de óleos essenciais podendo atuar como coadjuvante no combate à doença (MEZZACAPPA, 2008). Outro estudo

envolvendo óleos essenciais repelentes, realizado por Rogero S. O., do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), é o desenvolvimento de um dispositivo repelente nas formas de pulseira, botão ou outro artefato similar, para liberação lenta dos óleos essenciais garantindo um tempo de ação prolongado (IPEN, 2010).

Devido a grande procura por repelentes para proteção individual contra doenças transmitidas por insetos, é cada vez mais frequente o uso de óleos essenciais com propriedades de repelência. Esses repelentes naturais atuam contra os vetores de patologias e dispensam o uso do DEET. Podem ser encontrados nas formas de adesivos e pulseiras ou nas formulações de *shampoos* e desinfetantes disponíveis mundialmente no mercado (OYEDELE *et al*., 2002; PUSHPANATHAN *et al*., 2006).

3.3 Radiação ionizante

Desde a descoberta dos raios-X e da radioatividade há mais de 100 anos, a sociedade tem se deparado com diferentes formas de produção da radiação e materiais radioativos artificiais. O benefício do uso da radiação foi estabelecido muito cedo, entretanto, os potenciais perigos da radiação também se tornaram evidentes. Desde então, diferentes aplicações da radiação ionizante e de materiais radioativos têm sido desenvolvidos (IAEA, 2004).

A radioatividade é a propriedade dos isótopos de elementos, denominados radionuclídeos, emitirem radiação pela desintegração (decaimento) de seus núcleos instáveis. A radiação pode ser emitida na forma de partículas ou de ondas eletromagnéticas (MEYERS-SCHÖNE e TALMAGE, 2002).

Existem três principais tipos de radiação que são emitidos pelos radionuclídeos durante o decaimento radioativo: i) partículas alfa (α), ii) partículas beta (β) e iii) raios gama (γ). O que difere entre os tipos de radiação são a energia e a capacidade de penetração na matéria (FIG. 6).

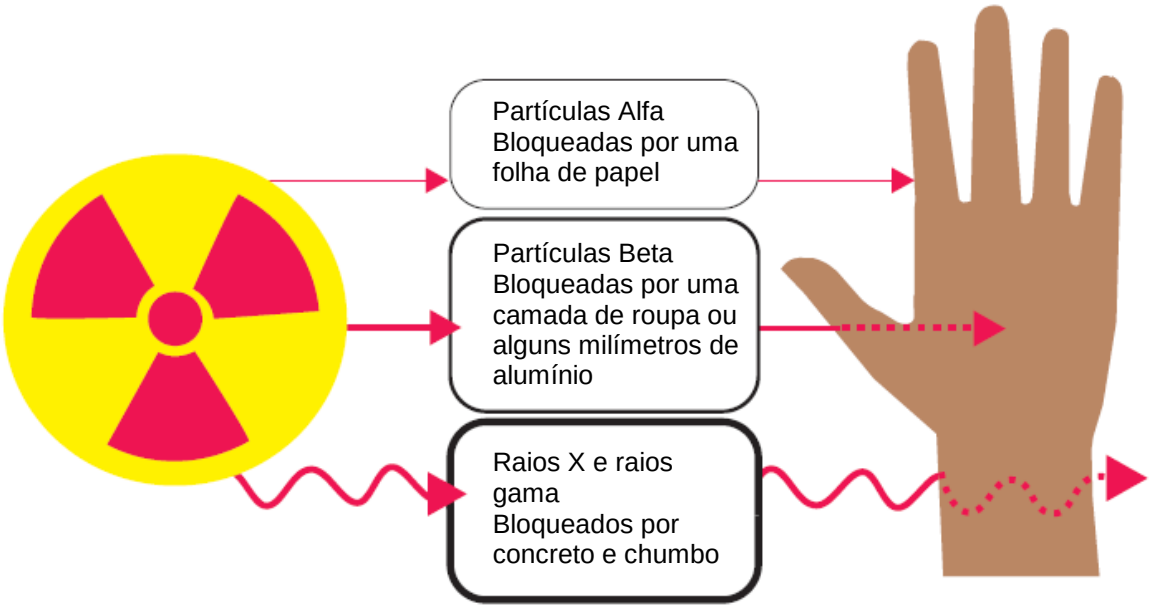


FIGURA 5 – Poder de penetração das partículas alfa, beta e raios gama. Adaptado de USEPA (2007).

As partículas α são formadas por dois prótons e dois nêutrons. São massivas e altamente energéticas, mas se propagam lentamente pelo ar. São emitidas, por exemplo, pelos radionuclídeos Urânio-238, Rádio-226 e Polônio-210 (USEPA, 2007).

As partículas β são elétrons que se movem rapidamente durante o decaimento radioativo. Seres humanos estão expostos a partículas β a partir de fontes artificiais e naturais de radiação, como o Trítio, Carbono-14 e Estrôncio-90 (USEPA, 2007).

Os raios γ são fótons eletromagnéticos sem massa ou carga elétrica, mas possuem alto poder de penetração na matéria. Uma das fontes naturais de radiação gama é o Potássio-40, e as fontes artificiais são, por exemplo, o Cobalto-60 e o Césio-137. A diferença entre estes dois radionuclídeos quanto a emissão de raios gama está na quantidade de energia, onde o Césio-137 possui 662 keV e o Cobalto-60 possui entre 1170 e 1330 keV (USEPA, 2007; HINTON, 2002).

A incidência da radiação ionizante nos organismos promove danos às células por mecanismos específicos que atuam pela ação direta ou indireta no meio celular (DOWD e TILSON, 1999).

A interação direta consiste na incidência da radiação ionizante diretamente nas macromoléculas biológicas como o ácido desoxirribonucléico (DNA) e o ácido ribonucléico (RNA). Essa interação promove danos que podem ser fatais à célula. As lesões no DNA que não induzem a morte celular, devido aos mecanismos fisiológicos de reparação celular, podem ser transmitidas para as gerações de células futuras, iniciando-se o processo de neoplasia celular (DOWD e TILSON, 1999).

Na ação indireta ocorrem sucessivas interações da radiação incidente com as diversas moléculas presentes no interior celular, destacando-se a água e o oxigênio (DOWD e TILSON, 1999). Essa interação é mais frequente do que a interação direta, devido à abundância de água presente no meio celular (METTLER JUNIOR e UPTON, 1995).

A primeira etapa da ação indireta da radiação gama é o processo da radiólise da água. Neste processo, são gerados espécies reativas primárias ($OH^{\bullet}$, $\bar{e}_{aq}$, $H^{\bullet}$) e produtos moleculares (H_2, H_2O_2), denominados “produtos primários da radiólise da água”. Altamente reativos, os produtos primários interagem com as moléculas presentes no meio (FIG. 6) ou sofrem recombinações, desencadeando uma série de reações tóxicas para as células que promovem alterações químicas e biológicas (FAJARDO *et al*., 2001; GETOFF, 1996).

A radiólise da água é um processo contínuo que pode ser representado pela seguinte equação:

$$\mathbf{H_2O + radiação \rightarrow OH^{\bullet} + H^{\bullet} + H_2O_2 + \bar{e}_{aq}\ H_2 + H_3O^{+}}$$

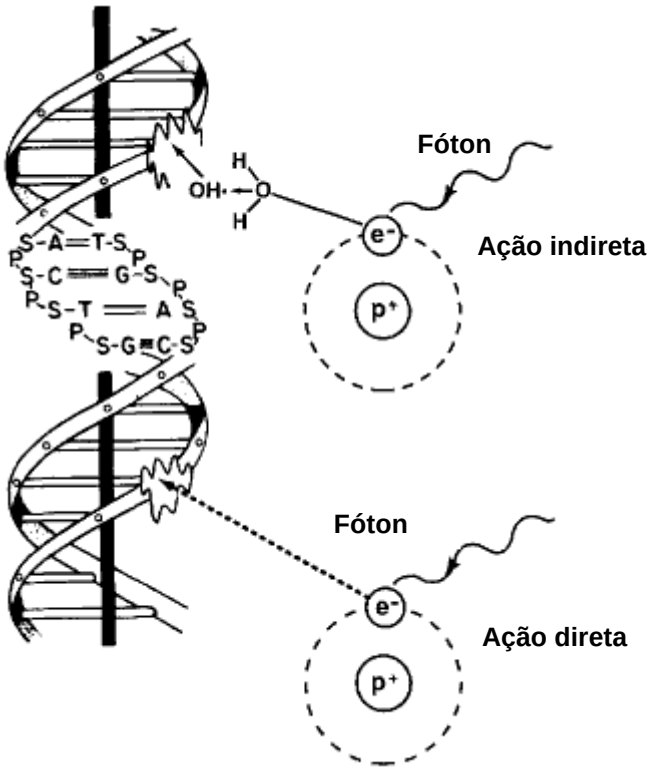


FIGURA 6 – Ação direta e indireta da radiação ionizante na molécula de ácido desoxirribonucléico (DNA).

A radiação gama, radiação ionizante do tipo eletromagnética com elevada energia de penetração, interage mais frequentemente com os organismos vivos pela ação indireta (METTLER JUNIOR e UPTON, 1995).

Diversos experimentos realizados com células em cultura e organismos aquáticos, evidenciaram que a sensibilidade à radiação ionizante depende da fase do ciclo celular em que as células se encontram quando irradiadas. Em geral, a maioria das células é considerada mais sensível durante a fase de mitose e mais resistente no período tardio da fase de síntese. Logo, uma mesma linhagem celular pode apresentar diferenças quanto à sensibilidade à radiação devido à distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular (METTLER JUNIOR e UPTON, 1995).

3.3.1 Fontes de radiação ionizante

A exposição à radiação ionizante pode resultar das fontes naturais (*background radiation*) assim como do lançamento de radionuclídeos durante a fabricação de materiais radioativos e também nos casos de acidentes com

reatores nucleares e locais de armazenamento de resíduos nucleares (MEYERS-SCHÖNE e TALMAGE, 2002).

3.3.2 Acidente nuclear no Japão

O acidente provocado pelo terremoto Tohoku e *tsunami* na estação de energia nuclear de Fukushima Daiichi, no Japão em 11 de março de 2011, foi classificado como acidente de nível 7 devido a liberação de material radioativo no meio ambiente. As rotas de contaminação por material radioativo foram o vazamento direto de água contaminada para água do mar no entorno da estação, transporte por lixiviação de águas pluviais em solos contaminados e deposição da pluma atmosférica contaminada sobre a superfície dos solos e oceano, chegando a dezenas de quilômetros de distância de Fukushima (WHO e FAO, 2011).

O acidente tem levantado diversas discussões pertinentes não só em relação à proteção do ser humano e do meio ambiente, mas também sobre a questão do monitoramento de áreas afetadas pela radiação ionizante.

De acordo com os relatórios da IAEA (2012), CNEN (2011) e USEPA/FDA/NOAA (2011), desde a ocorrência do acidente, foram encontrados os radionuclídeos Iodo-131, Césio-134 e Césio-137 em alguns alimentos e amostras de solo, água potável, água pluvial, água subterrânea, água do mar e sedimento marinho no entorno da estação nuclear. Foi detectado também *fall out* nos países da Ásia e Europa e nos Estados Unidos alguns dias após o acidente.

O pescado também tem apresentado níveis elevados de radionuclídeos em algumas espécies de peixes encontrados, mas programas de monitoramento estão sendo realizados para assegurar o consumo humano destes produtos.

Atualmente, quase um ano e meio após o acidente, níveis elevados de raios gama ainda são detectados no local da estação nuclear e preocupam mais as autoridades locais do que a radioatividade do Césio ainda emitida pelo complexo atômico (CRUZEIRO DO SUL, 2012).

3.3.3 Radiação natural (*background radiation*)

Seres humanos e outros organismos estão inevitavelmente expostos à radioatividade natural que existe em todas as regiões do mundo, sendo que os

níveis de radiação podem variar geograficamente e de acordo com as características geológicas e condições atmosféricas (ATTAR *et al*., 2007; GHIASSI-NEJAD *et al*., 2002).

Entende-se por radiação de fundo como a radiação natural encontrada na crosta terrestre (rochas e solos) e em águas subterrâneas. A radiação cósmica contribui para a radiação de fundo bem como, o *fall out* (nuvens radioativas) de testes nucleares e eventuais acidentes com materiais radioativos que podem atingir o nível do solo. As fontes naturais de radiação correspondem a 26% do total das fontes de radiação (desde medicina nuclear, raios-X, produtos radioativos e outros) (USEPA, 2007; AGHAMIRI *et al*., 2006).

A radiação de fundo emite, geralmente, radiações de baixas doses, consideradas doses crônicas. Embora, em determinadas regiões do mundo as radiações de fundo são 10 a 15 vezes maiores do que o normal. Algumas destas regiões, por exemplo, estão localizadas em Yangjiang, China; Kerala, Índia; Guarapari, Brasil e Ramsar, Irã (ATTAR *et al*., 2007; AGHAMIRI *et al*., 2006; GHIASSI-NEJAD *et al*., 2002).

Os principais elementos radioativos encontrados na radiação de fundo são: Urânio, Tório e Potássio, bem como seus produtos de decaimento radioativo. Esses radionuclídeos emitem partículas alfa, beta e raios gama (USEPA, 2007).

3.3.4 Exposição dos organismos aquáticos às fontes de radiação ionizante

A preocupação com a proteção ambiental da contaminação radioativa tem sido muito discutida por organizações internacionais IAEA (*International Atomic Energy Agency*), ICRP (*International Commission on Radiological Protection*), OECD-NEA (*Organisation for Economic Co-Operation and Development – Nuclear Energy Agengy*), órgãos reguladores *Environment Canada*, USDOE (*United States Department of Energy*) e cientistas da IUR (*International Union of Radioecology*) (ANDERSON *et al*., 2009).

A radioecologia é considerada um ramo da radiologia voltado para a proteção do meio ambiente e avaliação dos efeitos nos organismos presentes. Apresenta uma linha de estudos que abordam: (1) proteção ambiental, da qual estão inseridos estudos sobre fluxos e biodisponibilidade das substâncias radioativas ao longo do tempo; ecotoxicologia; harmonização dos métodos de

radionuclídeos e outros contaminantes; legislações; técnicas de medição e estratégias de monitoramento; (2) avaliação de risco, abordando efeitos biológicos da radiação em humanos e animais; (3) tratamento de rejeitos radioativos e (4) aspectos sociais, éticos e econômicos da proteção radiológica (EDITORIAL, 2009).

A exposição às diversas fontes de radionuclídeos, como mencionadas anteriormente, desencadeiam efeitos potenciais da radiação ionizante na biota aquática, como por exemplo, os efeitos genéticos. Esta exposição pode ocorrer externamente pela presença da radiação na água e no sedimento (TAB. 1) e pela absorção e ingestão de radionuclídeos (MEYERS-SCHÖNE e TALMAGE, 2002).

TABELA 1 – Estimativas de doses anuais (mGy.ano^{-1}) recebidas por organismos marinhos e dulcícolas em regiões com fontes naturais de radiação ionizante. Adaptado de IAEA (1976).

	Fitoplâncton	Zooplâncton	Molusco	Crustáceo	Peixe
Cósmico	0.24	0.24	0.19	0.19	0.19–0.24
Água	$6.4. \times 10^{-4}$–0.54	9.0×10^{-5}–7.4×10^{-2}	4.0×10^{-5}–3.1×10^{-2}	4.0×10^{-5}–3.1×10^{-2}	4.0×10^{-5}–6.1×10^{-2}
Sedimento	0	0	0.27–3.2	0.27–3.2	0–3.2
Dose interna total (ß+γ)	— 0.24–0.78	— 0.24–0.31	— 0.46–3.5	— 0.46–3.5	0.32–0.42 0.51–4.0
Cósmico	$4.4. \times 10^{-2}$	$4.4. \times 10^{-2}$	$4.4. \times 10^{-2}$	$4.4. \times 10^{-2}$	$4.4. \times 10^{-2}$
Água	$3.5. \times 10^{-2}$	$1.8. \times 10^{-2}$	9.0×10^{-3}	9.0×10^{-3}	9.0×10^{-3}
Sedimento	0	0	0.27–3.2	0.27–3.2	0–3.2
Dose interna total (ß+γ)	0.17–0.64 0.25–0.72	0.23–1.4 0.29–1.7	0.65–1.3 0.97–4.6	0.69–1.9 1.0–5.2	0.24–0.37 0.29–3.7

Vários são os estudos sobre os efeitos biológicos da radiação ionizante em organismos aquáticos, entretanto, a falta de uma padronização nas metodologias dos experimentos é uma das questões que dificultam na determinação das doses e efeitos da radiação ambientalmente realísticos (DALLAS *et al*., 2012)

O uso das fontes de radiação nos estudos com organismos aquáticos tem sido criticado por alguns autores, pois algumas delas não são representativas do ambiente em estudo. Recentemente, muitos autores têm utilizado água com Trítio e consideram uma representação mais realística de uma fonte de radiação

ionizante em ambientes aquáticos (DALLAS *et al*., 2012; JHA *et al*., 2005; KNOWLES *et al*., 1997).

Outra questão que deve ser considerada é a interação da radiação ionizante com outros fatores ambientais tais como temperatura, salinidade, presença de contaminantes não radioativos e fatores bióticos, que podem resultar em efeitos sinérgicos ou antagônicos nos organismos estudados, fornecendo respostas nem sempre evidentes (DALLAS *et al*., 2012).

A preferência em se utilizar invertebrados aquáticos na verificação de impactos causados pela radiação ionizante está na relevância ecológica destes organismos, já que representam cerca de 90% da vida existente na Terra e desempenham importante papel no ecossistema, sendo que 70% vivem em ambientes aquáticos (DALLAS *et al*., 2012).

Ainda conforme o autor, 50 espécies de invertebrados aquáticos têm sido submetidos à radiação ionizante para avaliação dos efeitos biológicos, incluindo desde moluscos, artrópodes e equinodermos. Por ser um grupo ecológico e taxonômico bastante diversificado, torna-se inviável avaliar o impacto da radiação ionizante em invertebrados aquáticos como um todo.

A maioria dos experimentos utilizam invertebrados marinhos ou estuarinos. No filo Crustacea, os principais organismos utilizados para avaliação dos efeitos da radiação pertencem aos gêneros *Artemia* e *Daphnia*, ambos considerados espécies sentinelas e aplicados em ensaios padronizados de ecotoxicologia (DALLAS *et al*., 2012).

Alguns autores afirmam que os invertebrados aquáticos tendem a ser mais resistentes à radiação ionizante do que os vertebrados. Estudos realizados com algumas espécies de peixes indicam que estes organismos apresentam radiossensibilidade semelhante aos mamíferos terrestres, dependendo da idade e do estágio de desenvolvimento embrionário (MEYERS-SCHÖNE e TALMAGE, 2002; NCRP, 1991).

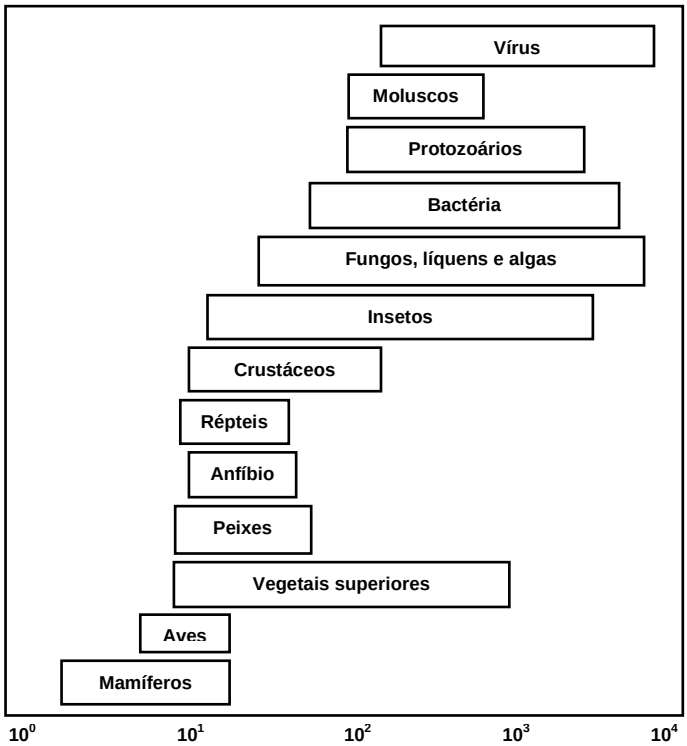


FIGURA 7 – Comparação da radiossensibilidade entre os grupos de organismos (WHICKER e SCHULTZ, 1982).

Embora a Radioecologia seja uma ciência desenvolvida há alguns anos, o estudo da proteção ambiental contra a radiação permanece em desenvolvimento, pois alguns aspectos ainda necessitam de mais estudos e definições (PENTREATH, 2009).

4. METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa estudou-se a citotoxicidade *in vitro* dos princípios ativos de repelente e estabeleceu-se a faixa de concentração destes compostos a ser utilizada nos ensaios preliminares de ecotoxicidade.

Na segunda etapa, estudou-se o efeito dos princípios ativos nos organismos irradiados e não irradiados com radiação ionizante. Para isso, foi necessário estabelecer a DL_{50} de radiação gama para os organismos e posteriormente encontrar a dose que não causou efeito na reprodução.

Estabelecida a dose de radiação gama, os organismos foram irradiados momentos antes da exposição aos princípios ativos.

A FIG. 8 apresenta as etapas realizadas para atingir o objetivo final deste trabalho.

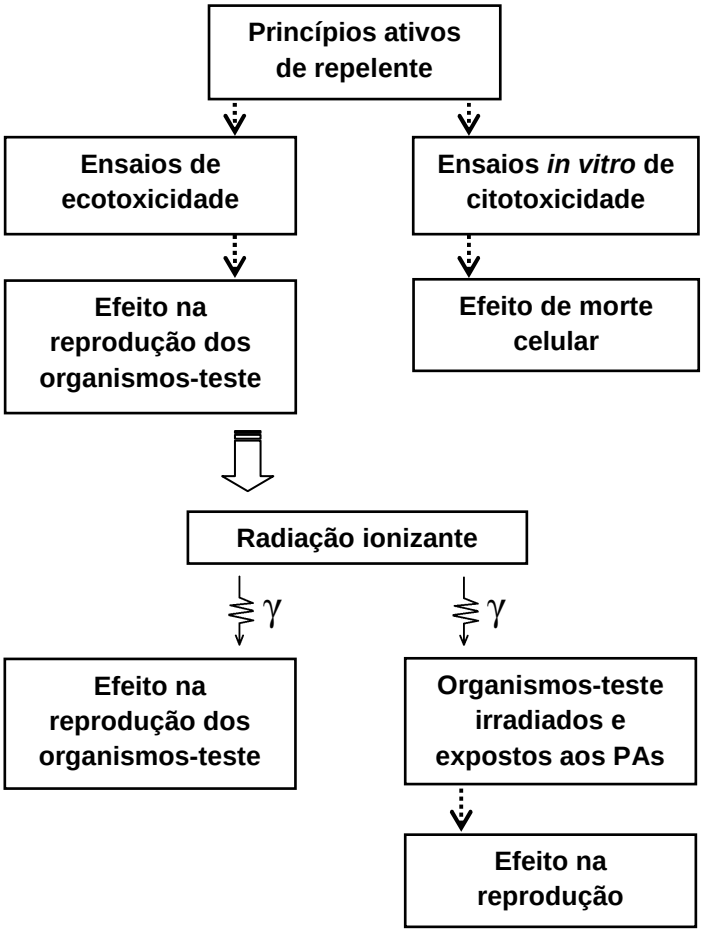


FIGURA 8 – Representação das etapas cumpridas neste trabalho.

4.1 Substâncias-teste

Foram utilizados dois princípios ativos de repelentes: sintético e natural. Como repelente sintético utilizou-se o DEET ALDRICH® (*N,N*-diethyl-meta-toluamide – $C_{12}H_{17}NO$). O composto é formado por amida (FIG. 9), classe química muita utilizada em repelentes químicos de inseto. Este princípio ativo é o mais utilizado nos produtos brasileiros de repelentes de insetos (COSTANZO *et al*., 2007; PALUCH *et al*., 2010). As características físico-químicas do DEET estão apresentadas na TAB. 2.

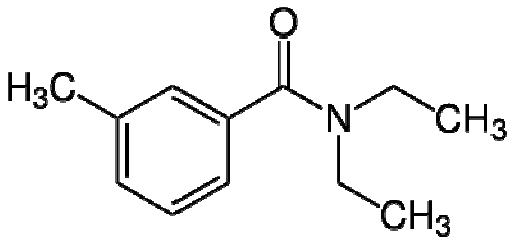


FIGURA 9 – Estrutura química do DEET.

TABELA 2 – Características físicas e químicas do DEET (HANSCH *et al*., 1995; NPIC, *s.d.*).

Propriedades físico-químicas	
Aparência	Líquido incolor
Massa molar	191,3 g/mol
Densidade (20º)	0,997-1,000 $g.mL^{-1}$
Pressão de vapor (20º)	$5,6 \times 10^{-3}$ mmHg
Massa molecular	191,3 $g.mol^{-1}$
Solubilidade em água (25º)	> 1000 $mg.L^{-1}$
Log K_{ow}	2,02
Log K_{co}	$3,0 \times 10^{2}$
Fator de bioacumulação	1,96

Log K_{ow} = constante de partição octanol-água
Log K_{co} = constante de sorção por carbono orgânico

O DEET possui características físico-químicas que contribuem para sua propagação no meio aquoso. Porém, não apresenta potencial de bioacumulação (EGGEN *et al*., 2010).

O princípio ativo natural escolhido foi o óleo essencial de capim-limão que apresenta propriedades de repelência de insetos. O óleo essencial (OE) é extraído da espécie de gramínea *Cymbopogon flexuosus*, fornecido pela FERQUIMA® Indústria e Comércio Ltda. Seu principal componente é o citral (3,7-dimethyl-2,6-octadienal, $C_{10}H_{16}O$), mistura de dois compostos aldeídicos: neral (30%) e geranial (40%).

Dois lotes de OE foram testados devido a sua provável flutuabilidade na composição por ser uma substância natural. Logo, utilizaram-se os lotes: 180 e 183.

A estrutura química e as características físico-químicas do OE dos principais aldeídos estão apresentadas na FIG. 10 e na TAB. 3.

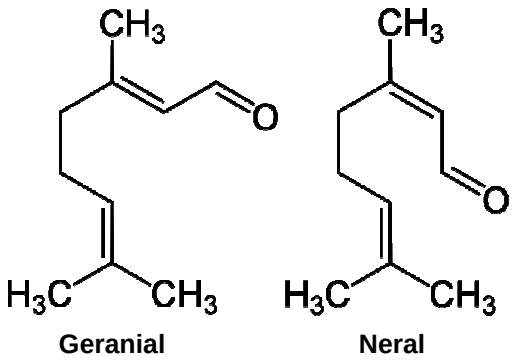


FIGURA 10 – Estrutura química dos aldeídos que compõem o citral, principal componente do OE.

TABELA 3 – Características físicas e químicas do OE (FERQUIMA, 2010; YALKOWSKY e HE, 2003).

Propriedades físico-químicas	
Aparência	Líquido límpido
Cor	Amarelo a alaranjado
Densidade (20º)	0,875-0,905 $g.mL^{-1}$
Solubilidade em água (25ºC)	1340 $mg.L^{-1}$

4.2 Ensaio *in vitro* de citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade é um teste *in vitro* eficaz, de baixo custo, reprodutível e quantitativo. Muito utilizado para verificar a toxicidade dos materiais e substâncias em cultura celular, tendo a vantagem de minimizar o uso de animais em laboratório.

A metodologia usada para os testes de citotoxicidade baseou-se na norma da *International Standard Organization* (ISO 10993 – 5, 2009) e na metodologia descrita por Rogero *et al*. (2003).

Neste trabalho foi utilizado o método de incorporação do vermelho neutro. O corante é solúvel em água a qual ultrapassa a membrana plasmática, se concentrando nos lisossomos de células vivas onde se fixam por ligações eletrostáticas hidrofóbicas com sítios aniônicos na matriz lisossomal. Muitas substâncias danificam as membranas celulares e lisossomais, resultando no decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro. Portanto, é possível distinguir entre células vivas e mortas pela medida da intensidade de cor no final do ensaio (CRUZ, 2003; ROGERO *et al*., 2003).

4.2.1 Preparo das soluções-teste

Cada lote de OE foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) VETEC® por possuir baixa solubilidade em água. A solução estoque foi preparada na concentração de 10^5 $mg.L^{-1}$ em DMSO. Esta solução estoque foi utilizada em todos os ensaios. A solução estoque, foi diluída na proporção de 1:100 em meio MEM (*Minimum Eagle Medium)* contendo 5% de soro fetal bovino e 1% de aminoácidos não essenciais) para obter a solução-teste na concentração de 500 $mg.L^{-1}$.

A solução estoque de DEET foi preparada na concentração de 2 x 10^3 $mg.L^{-1}$ em água. Diluiu-se a solução estoque em meio MEM, obtendo assim, a solução-teste na concentração de 10^3 $mg.L^{-1}$.

4.2.2 Cultura celular e preparo da suspensão celular

Esta etapa foi realizada no Setor de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz. Foi utilizada a linhagem celular NCTC-clone L929 de tecido conectivo de camundongo, originária da *American Type Culture Collection* (ATCC CCL 1). O meio de cultura utilizado foi o meio MEM, adicionado de 10% de soro fetal bovino, aminoácidos não essenciais e piruvato de sódio (meio MEM-uso). O cultivo das células NCTC-clone L929 foi feito em garrafa de cultura celular, em meio de cultura MEM-uso. Após o crescimento confluente, as células foram destacadas utilizando-se uma solução ATV (Tripsina 0,2% e Versene 0,02%). O número de células foi contado em câmara de Neubauer e a suspensão celular foi acertada para $3,5 \times 10^5$ células.mL^{-1}.

Para o preparo da microplaca com células em cultura, foram distribuídos 200 µL da suspensão celular em cada poço (7×10^4 células/poço). A placa foi incubada em estufa úmida a 37℃ e atmosfera com 5% de CO_2 durante 24 horas, a fim de atingir a confluência desejada.

4.2.3 Procedimento dos ensaios

O ensaio foi realizado a partir da exposição das células em microplacas contendo 96 poços (FIG. 11). Cada poço possui 10^5 células. As microplacas com células em cultura utilizadas nos ensaios foram fornecidas pelo Setor de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz.

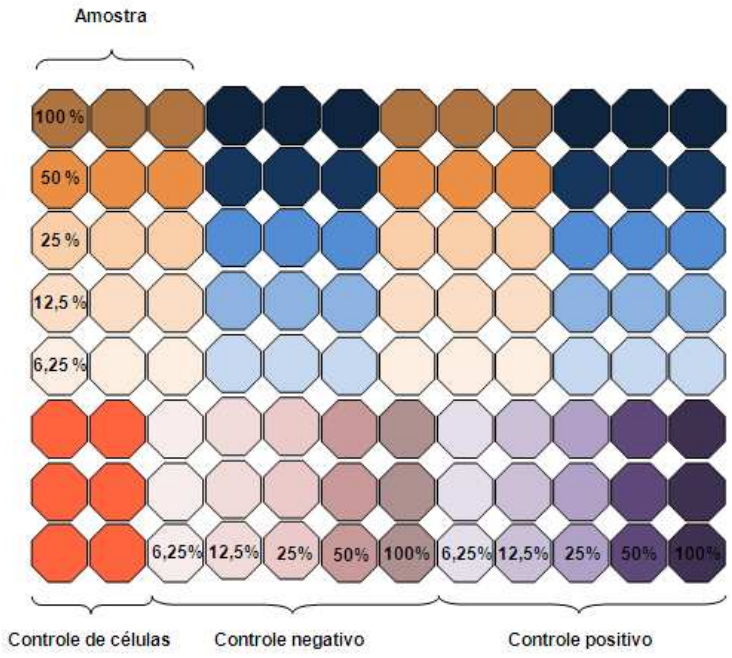


FIGURA 11 – Representação do ensaio *in vitro* de citotoxicidade numa microplaca com 96 poços.

Antes de dar início aos ensaios, as soluções dos princípios ativos foram diluídas em série (50, 25, 12,5 e 6,25%), obtendo-se as concentrações de OE correspondentes a: 500; 250; 125; 62,5 e 31,25 $mg.L^{-1}$ e da solução de DEET de: 1000; 500; 250; 125 e 62,5 $mg.L^{-1}$.

No ensaio propriamente dito, o meio de cultura das microplacas foi descartado e substituído com 200µL das soluções diluídas. Em cada microplaca foram reservados 6 poços para o controle de células. Foram utilizados como o controle positivo o látex de borracha natural e polietileno de alta densidade (HDPE) como controle negativo, sendo que esses controles foram incubados em MEM por 24h em estufa úmida a 37ºC com 5% de CO_2, tendo recebido o mesmo tipo de diluição em relação às soluções dos princípios ativos.

Após este período, as soluções foram substituídas pelo meio de cultura contendo vermelho neutro (e as microplacas foram mantidas a 37ºC por 3 h. Em seguida, o corante foi descartado e as microplacas foram lavadas com PBS (solução-tampão fosfato-salina pH 7,4) e solução de lavagem (1% cloreto de cálcio em formaldeído 0,5%).

Foi distribuído um volume de 200 µL da solução extratora (uma parte de álcool etílico: uma parte de ácido acético 2%) em cada poço para ruptura das

células e liberação do vermelho neutro e em seguida, realizou-se a leitura das microplacas em densidade óptica, no espectrofotômetro leitor de ELISA Sunrise da marca Tecan, após agitação por 10 minutos em 540 nm e filtro de referência de 620 nm.

O percentual de viabilidade foi calculado a partir da média de densidade óptica obtida em comparação à média do controle de células, consideradas 100% (FIG. 12).

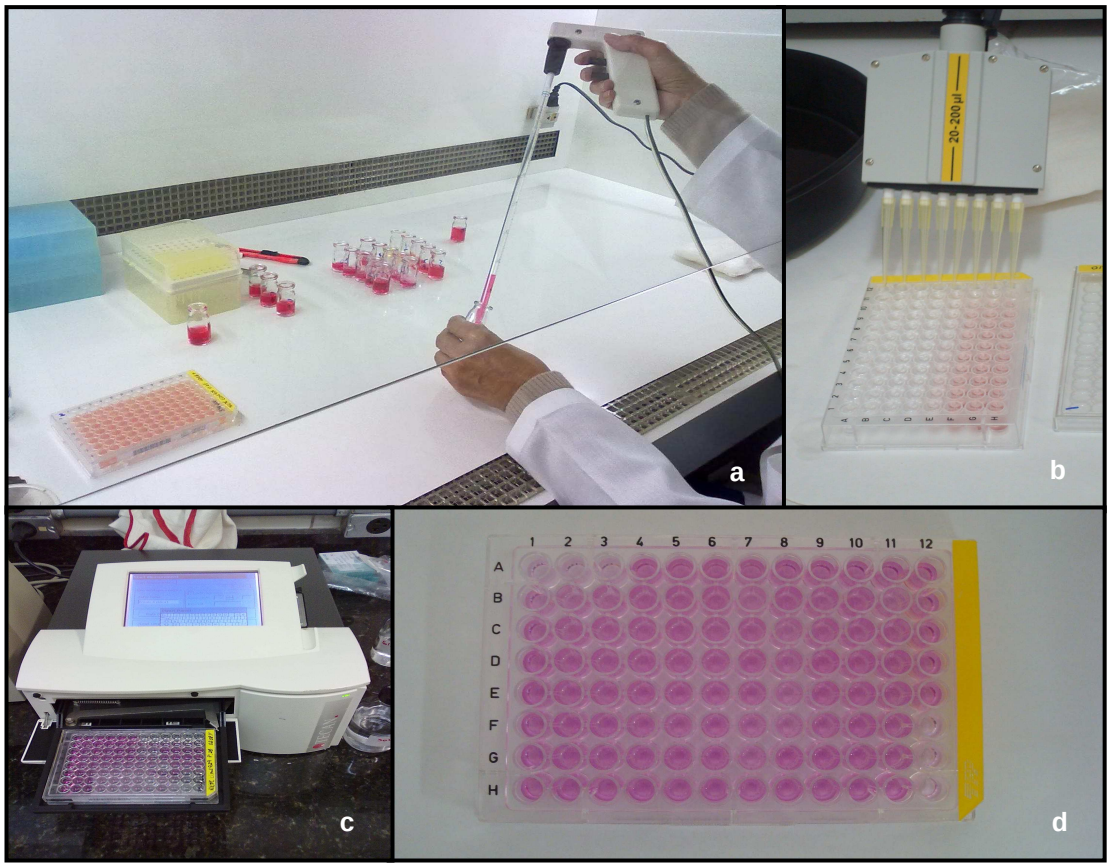


FIGURA 12 – Preparo das concentrações-teste (a); Distribuição da solução de lavagem na microplaca (b); Leitura da microplaca em espectrofotômetro (c); Microplaca após leitura no espectrofotômetro (d).

4.3 Ensaios de ecotoxicidade

4.3.1 Coleta e preparo da água de diluição

A água natural utilizada nos ensaios de ecotoxicidade deste trabalho é também utilizada pela CETESB, no cultivo de organismos aquáticos. Portanto, é uma água que apresenta seus parâmetros monitorados por este órgão (LAMEIRA, 2008).

A coleta de água foi feita mensalmente no Reservatório de Ribeirão do Piraí, localizado no município de Salto, SP (FIG. 13). A água coletada foi armazenada em galões de 20 L e mantida ao abrigo da luz.

FIGURA 13 – Coleta de água no Reservatório de Ribeirão do Piraí, município de Salto, SP.

Os parâmetros físico-químicos da água (pH, condutividade, oxigênio dissolvido e dureza) foram verificados após a coleta.

A viabilidade da água foi verificada em cada lote coletado realizando ensaios com os organismos cultivados em laboratório.

Antes da utilização para diluição das substâncias-teste e manutenção dos organismos-teste, a água foi filtrada com auxílio de um sistema de filtração com bomba a vácuo e filtro de celulose 40 µm para eliminação de detritos e organismos zooplanctônicos e os parâmetros físico-químicos foram ajustados conforme recomendações das normas ABNT NBR 12713 (2009) e 13373 (2010).

4.3.2 Manutenção e cultivo dos organismos-teste

Os procedimentos para o cultivo, manutenção dos organismos e realização dos ensaios foram desenvolvidos de acordo com as normas da ABNT NBR 12713 (2009) e 13373 (2010).

Os organismos utilizados neste trabalho foram *D. similis* e *C. silvestrii* que foram cultivados no Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Química e Meio Ambiente – CQMA, no IPEN.

Exemplares de *D. similis* foram mantidos em lotes de até 30 organismos para cada 800 mL de água de cultivo, com fotoperíodo de 12 h e temperatura de 20ºC (± 2).

O cultivo de *C. silvestrii* foi mantido em lotes de até 20 organismos para 300 mL de água de cultivo. As culturas foram mantidas em fotoperíodo de 12 h de e temperatura de 25ºC (± 2).

A manutenção das culturas de ambas as espécies foram realizadas periodicamente, 3 vezes por semana, incluindo a renovação do meio de cultivo e alimentação. Durante o manuseio dos organismos, utilizou-se pipeta de vidro Pasteur com diâmetro adequado ao seu tamanho.

4.3.3 Alimentação dos organismos

Os organismos foram alimentados diariamente com algas verdes unicelulares da espécie *Pseudokirchneriella subcapitata* (FIG. 14), na quantidade de 1 a $5x10^5$ células por organismo.

O meio de cultura algáceo foi preparado com sete soluções de acordo com as normas da ABNT NBR 12713 (2009) e 13373 (2010) e posteriormente foi adicionado o inóculo de algas. Este procedimento foi realizado em meio asséptico.

As algas foram cultivadas em temperatura de 20 a 30ºC sob iluminação e aeração constantes por sete dias. Em seguida, os lotes de algas foram centrifugados para retirada e descarte do sobrenadante e a alga foi ressuspendida com água natural utilizada para o cultivo dos organismos-teste.

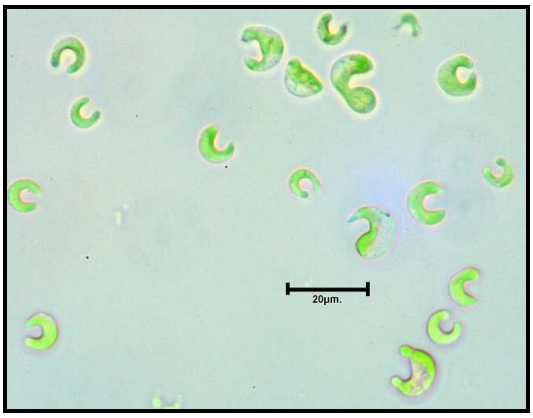


FIGURA 14 – *Pseudokirchneriella subcapitata*. Fonte: http: //algalweb.net

Além da alimentação à base de algas, foi fornecido um alimento complementar aos organismos, feito de ração de peixe com adição de fermento biológico (0,25 g de fermento biológico para cada 50 mL de ração aerado por sete dias).

4.3.4 Ensaios de sensibilidade e validação dos resultados

A verificação da sensibilidade dos organismos foi feita mensalmente com a substância de referência cloreto de sódio (NaCl). O uso de substâncias de referência permite avaliar as condições de sensibilidade dos organismos-teste perante as substâncias químicas e testar se os mesmos estão aptos a serem utilizados nos ensaios de ecotoxicidade.

Os ensaios de sensibilidade foram realizados sob as mesmas condições de um teste de ecotoxicidade aguda (descrito no item 4.4), com período de 48 h de exposição dos organismos ao NaCl. A faixa de sensibilidade foi determinada pelo número de organismos mortos em função da concentração da solução. E no final, determinou-se a concentração efetiva que causou mortalidade em 50% dos organismos expostos (CE_{50}).

Os resultados obtidos nos ensaios de sensibilidade dos organismos foram inseridos em um gráfico-controle, ou geralmente denominado como carta-controle.

De acordo com os requisitos das normas ABNT NBR 12713 (2009) e 13373 (2010) os resultados são considerados válidos por meio da realização de ensaios

em triplicatas e o percentual de mortalidade dos controles de água deve ser inferior a 10% nos ensaios de ecotoxicidade aguda e inferior a 20% nos ensaios de ecotoxicidade crônica.

Nos ensaios de ecotoxicidade crônica (descrito no item 4.5), considera-se um ensaio válido aquele que apresentar no controle a média de organismos jovens (neonatas) produzidos por fêmea ≥ 15.

A sensibilidade dos organismos e a validação dos ensaios permitem maior precisão e confiabilidade nos resultados obtidos.

4.4 Ensaio de ecotoxicidade aguda

O ensaio de ecotoxicidade aguda pode ser definido como aquele que avalia os efeitos, em geral severos e rápidos, sofridos pelos organismos expostos ao agente químico em um curto período de tempo. O critério de avaliação dos ensaios de ecotoxicidade aguda é a mortalidade ou imobilidade dos organismos-teste (ARAGÃO e ARAÚJO, 2006).

4.4.1 Preparo das soluções-teste

Por ser uma substância insolúvel em água, o óleo OE foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) (solução-estoque) e posteriormente diluído em água natural no preparo das soluções-teste.

A partir da solução estoque de OE preparada previamente, foi feita a diluição da solução-teste em água natural para obter concentração de 100 $mg.L^{-1}$.

A solução de DEET foi preparada com água destilada na concentração de 300 $mg.L^{-1}$.

4.4.2 Controle positivo com o solvente Dimetilsulfóxido – DMSO

Verificou-se o efeito do solvente DMSO na maior concentração testada em cada ensaio aos organismos-teste pela realização de um controle positivo do solvente.

4.4.3 Ensaios preliminares

As concentrações utilizadas nos ensaios preliminares foram baseadas nos resultados obtidos dos testes *in vitro* de citotoxicidade com os princípios ativos. Porém, todas as concentrações apresentaram efeito tóxico para os ensaios de ecotoxicidade.

As concentrações de DEET foram escolhidas com base na ecotoxicidade aguda para *Daphnia magna* (CE_{50} = 75 $mg.L^{-1}$) do relatório da USEPA (1998). Logo, as concentrações de DEET utilizadas foram 9,37; 18,7; 37,5; 75 e 150 $mg.L^{-1}$ para *D. similis* e *C. silvestrii*.

Para o caso do OE, utilizou-se uma faixa de concentrações tóxicas de óleo de *Cymbopogon citratus* (CL_{50} ≈ 10 $mg.L^{-1}$) para larvas de mosquito de *Aedes sp*., *Anopheles sp*. e *Culex sp*. (Diptera, Culicidae). As concentrações utilizadas foram: 2,5; 5; 10; 20 e 40 $mg.L^{-1}$ em *D. similis* e 1,25; 2,5; 5 10 e 20 $mg.L^{-1}$ em *C. silvestrii*.

Os ensaios de ecotoxicidade aguda consistiram na exposição dos organismos às concentrações dos princípios ativos por um período de 48 h. Para cada concentração foram utilizadas 4 réplicas, sendo que em cada réplica foi colocado volume de 10 mL das soluções-teste e 5 organismos com idade de 6 a 24 h de idade. Os organismos jovens, ou neonatas, foram selecionados a partir de fêmeas adultas cultivadas no laboratório de Ecotoxicologia do CQMA, IPEN. O mesmo procedimento foi aplicado ao controle de água.

Os ensaios foram mantidos a 20ºC (± 2) para *D. similis* e a 25ºC (± 2) para *C. silvestrii*. E os organismos não foram alimentados durante o período dos ensaios.

O critério de avaliação dos ensaios foi a mortalidade e a imobilidade dos organismos. Aqueles que não se movimentaram em um intervalo de 15 segundos, foram considerados imóveis, conforme as normas da ABNT NBR (2009 e 2010) e USEPA (2002a).

Os testes foram considerados válidos por apresentarem mortalidade inferior a 10% dos organismos expostos no controle.

E ao final dos ensaios, estabeleceu-se a menor concentração que causou imobilidade a 100% dos organismos e a maior concentração que não causou efeito na mobilidade dos organismos expostos. A partir dos resultados dos

ensaios preliminares, foram estabelecidas as concentrações definitivas com base na seguinte equação:

$$\sqrt[n-1]{\frac{a_f}{a_i}}$$

Onde:

n = número de concentrações

a_f = maior concentração que causou efeito

a_i = menor concentração que causou efeito

Estes ensaios possibilitaram um conhecimento prévio da faixa de concentrações a serem empregadas nos ensaios definitivos.

4.4.4 Ensaios definitivos

As concentrações utilizadas nos ensaios definitivos de ecotoxicidade aguda de OE foram: 3,8; 5,4; 7,6; 10,7 e 15 $mg.L^{-1}$ para *D. similis* e 1,8; 3; 5,2; 8,8 e 15 $mg.L^{-1}$ para *C. silvestrii*, sendo a razão de diluição igual a 1,4.

Quanto ao DEET, as concentrações mantiveram-se as mesmas, 9,37; 18,75;37,5;75 e 150 $mg.L^{-1}$ com razão de diluição igual a 1,7.

4.4.4.1 Procedimento dos ensaios

Os ensaios definitivos foram realizados sob as mesmas condições dos ensaios preliminares e as condições dos ensaios estão apresentadas na TAB. 4.

Para cada concentração foram utilizadas 4 réplicas. Em cada réplica contendo 10 mL da solução-teste, adicionou-se 5 organismos com idade de 6 a 24 h (FIG. 15).

FIGURA 15 – Ensaio de ecotoxicidade aguda.

TABELA 4 – Condições dos ensaios de ecotoxicidade aguda para *D. similis* e *C. silvestrii*.

PARÂMETROS	**CONDIÇÕES**
Tipo de ensaio	Estático
Duração do ensaio	48 h
Substâncias-teste	OE e DEET
Temperatura	20 ± 2ºC (*D. similis*); 25 ± 2ºC (*C. silvestrii*)
Fotoperíodo	12 h
Recipiente-teste	Tubos de ensaio
Volume da concentração-teste	10 mL
Nº de concentrações-teste	5 e controles
Nº de neonatas/recipiente	5
Nº de réplicas/concentração	4
Alimentação durante o ensaio	Não
Água de diluição	Natural (Salto, SP)
Critério de avaliação de efeito	Imobilidade
Expressão dos resultados	Quantitativo: CE_{50} Qualitativo: tóxico ou não tóxico
Validação dos ensaios	Mortalidade < 10% no controle

4.5 Ensaios de ecotoxicidade crônica

No ambiente aquático, devido a fatores de diluição, os organismos estão dispostos a níveis subletais dos poluentes. Esta exposição dos organismos ao agente químico em níveis subletais, pode não levar à morte do organismo, mas causar distúrbios fisiológicos e/ou comportamentais a longo prazo (ARAGÃO e ARAÚJO, 2006). O critério de avaliação de efeito foi a reprodução dos organismos-teste.

A metodologia foi baseada nas normas da ABNT NBR 12713 (2009) e 13373 (2010).

4.5.1 Definição das concentrações-testes

A partir dos resultados obtidos dos ensaios de ecotoxicidade aguda para *C. silvestrii*, foram definidas as concentrações para os ensaios de ecotoxicidade crônica com o OE: 1; 2; 4; 6; 8 e 16 $mg.L^{-1}$ e DEET: 3,75; 7,5; 15; 30 e 60 $mg.L^{-1}$

4.5.2 Procedimento dos ensaios

Os ensaios de ecotoxicidade crônica foram realizados sob as condições descritas na TAB. 5. Os exemplares do organismo-teste de *C. silvestrii* com idade de 6 a 24 h foram transferidos em béqueres de 30 mL contendo 15 mL da solução-teste. Para cada concentração, foram utilizadas 10 réplicas, sendo no total 5 concentrações incluindo os controles.

Os organismos foram mantidos por 7 dias de exposição às soluções-teste. A troca das soluções ocorreu no 3º e 5º dia dos ensaios, sendo verificados os parâmetros físico-químicos iniciais e finais em cada troca.

O alimento à base de algas foi fornecido diariamente na concentração de 10^5 $células.mL^{-1}$ para cada béquer. O alimento complementar foi adicionado apenas nos dias de troca das soluções-teste.

As neonatas produzidas por fêmea foram contadas e retiradas dos recipientes-testes todos os dias durante os ensaios.

Ao final dos ensaios, obteve-se a média de neonatas por fêmea produzidas em cada concentração, sendo comparada com os controles.

TABELA 5 – Condições dos ensaios de ecotoxicidade crônica para *C. silvestrii*.

PARÂMETROS	CONDIÇÕES
Tipo de ensaio	Semi-estático
Duração do ensaio	7 dias
Substâncias-teste	OE e DEET
Concentrações de DEET	3,75; 7,5; 15; 30 e 60 $mg.L^{-1}$
Concentrações de óleo	1; 2; 4; 6; 8 e 16 $mg.L^{-1}$
Temperatura	25 ± 2ºC
Fotoperíodo	12 h
Recipiente-teste	Béqueres de 30 mL
Volume da concentração-teste	15 mL
Nº de concentrações-teste	5 e controles
Nº de neonatas/recipiente	1
Nº de réplicas/concentração	10
Troca de soluções	Sim
Alimentação durante o ensaio	Algas (10^5 céls.mL^{-1})
Água de diluição	Natural (Salto, SP)
Critério de avaliação de efeito	Reprodução
Expressão dos resultados	Quantitativo: CENO; CEO; CI_{25} Qualitativo: tóxico ou não tóxico
Validação dos ensaios	Mortalidade < 20% e mínimo de 15 neonatas/fêmea no controle

CENO = concentração de efeito não observado
CEO = concentração de efeito observado
CI25 = concentração de inibição em 25%

Após a determinação da ecotoxicidade dos princípios ativos, os organismos-teste foram expostos à radiação gama para estimar a dose letal de 50%. Posteriormente foi determinada a maior dose que não causou efeito na reprodução e avaliar o efeito sinérgico da radiação gama com os princípios ativos na reprodução de *C. silvestrii*.

4.6 Exposição dos organismos à radiação gama

Estudos sobre o efeito de organismos aquáticos expostos à radiação ionizante são, geralmente, conduzidos em doses maiores do que o esperado em

ambientes aquáticos associados às atividades nucleares (NCRP, 1991). Neste trabalho, foram utilizadas doses agudas para que os efeitos nos organismos-teste pudessem ser visualmente identificados.

Com a finalidade de conhecer os efeitos da radiação ionizante ambiental a que os organismos estão expostos, foram realizados ensaios de exposição dos mesmos em diferentes doses de radiação gama para estudo dos efeitos na reprodução dos organismos-teste.

Os ensaios foram realizados com algumas adaptações à metodologia descrita pelos autores Gilbin *et al*. (2008) e Sarapultiseva e Bychkovskaya (2010), que realizaram estudos sobre o efeito da radiação ionizante ao cladócero *Daphnia magna*.

O presente estudo optou adaptar os ensaios de radiação gama com a metodologia dos ensaios de ecotoxicidade para que fosse possível a comparação dos resultados.

4.6.1 Determinação da DL_{50}

4.6.1.1 Ensaios preliminares

Partindo da dose letal para a classe Crustacea disponível na literatura – 100 Gy (Grays) (CHOPPIN *et al*., 1995), foram definidas para os ensaios preliminares da dose letal em 50% dos organismos-teste (DL_{50}) as seguintes doses de radiação gama: 0; 25; 50; 100; 200 e 400 Gy.

Neonatas (de 6 a 24 h de idade) de *D. similis* e *C. silvestrii* foram colocadas em tubos *falcon* de polietileno contendo 10 mL de água de diluição (água natural). Para cada dose consideraram-se 4 réplicas, sendo 5 organismos de cada espécie em cada replicata. Os recipientes-testes foram levados ao irradiador Gamma-Cell 200 (FIG. 16) com fonte de Cobalto-60, no Centro de Tecnologia das Radiações – CTR, na taxa de dose de radiação de 1,71 $kGy.h^{-1}$ (quilo Grays por hora).

FIGURA 16 – Irradiador Gamma-Cell 200 e os tubos *falcon* contendo os organismos a serem irradiados.

Após a irradiação, os organismos foram mantidos no mesmo meio em que foram irradiados por 48 h de observação. Depois deste período, obteve-se a DL_{50} pelo número médio total de mortalidade para cada dose.

O resultado da DL_{50} para *C. silvestrii* foi superior a 400 Gy, sendo necessário o aumento das doses de radiação gama.

4.6.1.2 Ensaios definitivos

As doses de radiação gama utilizadas para determinação da DL_{50} foram: 0; 100; 200; 400; 800 e 1600 Gy para ambas as espécies, *C. silvestrii* e *D. similis*.

Neonatas (de 6 a 24 h de idade) de *D. similis* e *C. silvestrii* foram colocadas em tubos *falcon* de polietileno contendo 10 mL de água de diluição (água natural). Para cada dose consideraram-se 4 réplicas, sendo 5 organismos de cada espécie em cada replicata.

Os frascos contendo os organismos foram levados ao irradiador Gamma-Cell 200 nas doses de 0; 100; 200; 400; 800 e 1600 Gy. As taxas de dose foram de 1,69 a 1,71 $kGy.h^{-1}$. O mesmo procedimento foi aplicado ao controle de água

(0 Gy), porém sem irradiar (TAB. 6). Após a irradiação, os organismos foram mantidos sob observação por 48 h.

TABELA 6 – Condições dos ensaios de radiação gama em *D. similis* e *C. silvestrii*.

PARÂMETROS	CONDIÇÕES
Tipo de ensaio	Estático
Doses de radiação	0; 100; 200; 400; 800 e 1600 Gy
Taxa de dose	1,69 a 1,71 $kGy.h^{-1}$
Recipiente-teste	Tubos *falcon* de 15 mL
Volume da água de diluição	10 mL
Nº de neonatas/recipiente	5
Nº de réplicas/dose	4
Tempo de observação após radiação	48 h
Alimentação durante o ensaio	Não
Água de diluição	Natural (Salto, SP)
Critério de avaliação de efeito	Imobilidade
Expressão dos resultados	Quantitativo: DL_{50}
Validação dos ensaios	Mortalidade < 10% no controle

4.6.2 Efeito da radiação gama na reprodução

4.6.2.1 Ensaios preliminares

Com base nos resultados obtidos nos ensaios para determinação da DL_{50}, optou-se partir da dose de radiação de 100 Gy por não apresentar mortalidade aos organismos após 48 h de observação.

4.6.2.2 Ensaios definitivos

O procedimento da irradiação dos organismos (TAB. 7) foi o mesmo usado para os ensaios de determinação da DL_{50}, porém, em doses mais baixas: 0 (Controle); 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 Gy. A taxa de dose variou de 1,50 a 1,52 $kGy.h^{-1}$.

Apenas a espécie *C. silvestrii* foi usada nestes ensaios. Os organismos foram levados ao irradiador em tubos *falcon* de polietileno com água de diluição.

Após a irradiação, foram transferidos aos béqueres de 30 mL contendo 15 mL de água de diluição nova e alimento. Apenas 1 organismo foi colocado em cada béquer.

Para cada dose de radiação gama, foram usadas 10 réplicas. Os organismos foram mantidos sob observação por 7 dias e os meios de cultivo foram trocados no 3º e 5º dia, assim como nos ensaios de ecotoxicidade crônica. O critério de avaliação foi a reprodução após a exposição à radiação gama.

O controle de água (0 Gy) foi mantido sob as mesmas condições dos ensaios, mas sem aplicação da radiação gama nos organismos.

Ao término dos ensaios, alguns organismos foram selecionados para verificação da sua morfologia em microscópio óptico.

TABELA 7 – Condições dos ensaios para avaliação do efeito da radiação gama na reprodução de *C. silvestrii*.

PARÂMETROS	**CONDIÇÕES**
Tipo de ensaio	Semi-estático
Doses de radiação	0; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 Gy
Taxas de dose	1,50 a 1,52 $kGy.h^{-1}$
Recipiente-teste	Béqueres de 30 mL
Volume de água de diluição	15 mL
Nº neonatas/ recipiente	1
Nº de réplicas/ dose	10
Tempo de observação após radiação	7 dias
Temperatura em que os ensaios foram mantidos	25 ± 2ºC
Fotoperíodo após radiação	12 h
Troca de soluções	Sim
Alimentação durante o ensaio	Algas (1×10^5 $céls.mL^{-1}$)
Água de diluição	Natural (Salto, SP)
Critério de avaliação de efeito	Reprodução
Expressão dos resultados	Quantitativo: CENO; CEO; CI_{25}
Validação dos ensaios	Mortalidade < 20% e mínimo de 15 neonatas/fêmea no controle

CENO = concentração de efeito não observado
CEO = concentração de efeito observado
CI25 = concentração de inibição de 25%

4.6.3 Organismos irradiados e submetidos aos princípios ativos

Os efeitos dos princípios ativos na reprodução e sobrevivência dos organismos irradiados com doses de radiação gama foram avaliados, sendo esta a última etapa dos experimentos.

4.6.3.1 Procedimento dos ensaios

Os organismos-teste foram irradiados a uma única dose de radiação gama: 25 Gy e taxas de dose entre 1,48 e 1,50 $kGy.h^{-1}$. O procedimento da irradiação dos organismos (TAB. 8) foi semelhante aos ensaios anteriores (itens 4.6.1 e 4.6.2).

Após a irradiação, os organismos foram transferidos aos béqueres de 30 mL contendo 15 mL da solução-teste do princípio ativo, nas mesmas concentrações utilizadas nos ensaios de ecotoxicidade crônica (item 4.5).

Dois controles foram utilizados: organismos em água isenta de princípios ativos sendo i) não irradiados (0 Gy) e ii) organismos irradiados na dose de 25 Gy.

As neonatas foram verificadas e contadas diariamente durante a realização dos ensaios.

TABELA 8 – Condições dos ensaios com organismos *C. silvestrii* irradiados e submetidos aos princípios ativos.

PARÂMETROS	CONDIÇÕES
Tipo de ensaio	Semi-estático
Dose de radiação	25 Gy
Taxas de dose	1,48 a 1,50 $kGy.h^{-1}$
Recipiente-teste	Béquer de 30 mL
Volume das concentrações-teste	15 mL
Tempo de observação após radiação	7 dias
Princípios ativos	OE e DEET
Temperatura em que os ensaios foram mantidos	25 ± 2ºC
Fotoperíodo após radiação	12 h
Nº de concentrações-testes	5 e controles
Nº de neonatas/recipiente	1
Nº de réplicas/dose	10
Troca de soluções	Sim
Alimentação durante o ensaio	Algas (1×10^5 $céls.mL^{-1}$)
Água de diluição	Natural (Salto, SP)
Critério de avaliação de efeito	Reprodução
Expressão dos resultados	Quantitativo: CENO; CEO; CI25
Validação dos ensaios	Mortalidade < 20% e mínimo de 15 neonatas/fêmea no controle

CENO = concentração de efeito não observado
CEO = concentração de efeito observado
CI25 = concentração de inibição de 25%

4.7 Análise estatística dos resultados

4.7.1 Ensaios *in vitro* de citotoxicidade

O percentual de viabilidade, obtido pela média de densidade óptica (calculado pelo espectrofotômetro leitor de Elisa) para cada concentração do princípio ativo e controles, foi inserido no gráfico onde se obteve o Índice de Citotoxicidade de 50% (IC_{50}) pela intersecção com as curvas das amostras. As curvas que se mantiveram acima da linha de IC_{50} foram consideradas não citotóxicas, como no controle negativo. E as curvas que se mantiveram abaixo da linha de IC_{50}, foram consideradas totalmente citotóxicas.

4.7.2 Ecotoxicidade aguda dos princípios ativos e DL_{50} de radiação gama

A partir da média de organismos mortos obtida para cada concentração e controles nos ensaios com os princípios ativos, foi calculada a estimativa pontual da concentração das soluções-teste que apresentou efeito na sobrevivência de 50% dos organismos testados (concentração efetiva – CE_{50}), utilizando o programa estatístico Trimmed Spearman-Karber (HAMILTON *et al*., 1977).

A determinação da DL_{50} foi feita pela plotagem gráfica da sobrevivência de organismos em função das doses de radiação gama.

4.7.3 Ecotoxicidade crônica dos princípios ativos e efeito da radiação gama na reprodução

O efeito dos princípios ativos e da radiação gama na reprodução de *C. silvestrii* e a exposição destes organismos irradiados aos princípios ativos, foi avaliado pela análise de variância (ANOVA) e comparação múltipla pelos testes de hipóteses do programa estatístico TOXSTAT 3.4 (WEST & GULLEY, 1994).

Os testes de hipóteses são sucessivos testes estatísticos aplicados para definir as concentrações-teste em que as respostas são significativamente diferentes daquela observada no controle. A maior concentração de efeito não observado (CENO) e a menor concentração de efeito observado (CEO) são identificadas pelos efeitos estatisticamente diferentes em relação ao controle (FIG. 17) (BURATINI e BERTOLETTI, 2006).

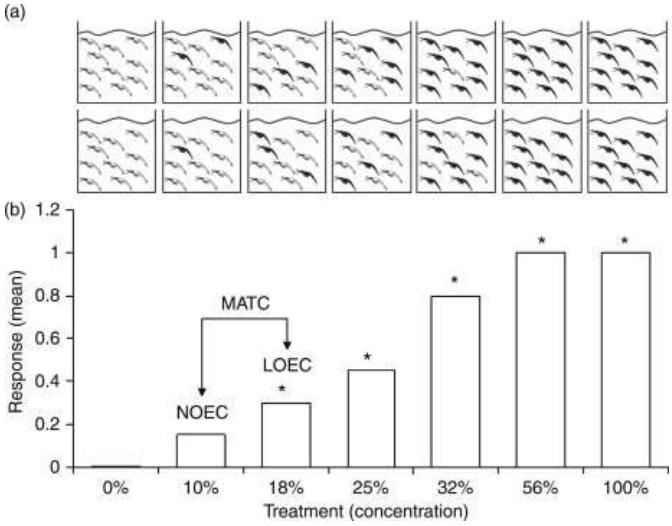


FIGURA 17 – Visualização de um ensaio de ecotoxicidade crônica (a) e a aplicação dos testes de hipóteses na determinação da CENO (NOEC = *no observed effect concentration*), CEO (LOEC = *lowest observed effect concentration*) e VC (MATC = *maximum allowable toxicant concentration*) (b). No exemplo, os organismos mortos estão denotados de preto. * = representa a diferença significativa em relação ao controle (NEWMAN e ZHAO, 2008).

O fluxograma da FIG. 18 apresenta o procedimento adotado para obter os resultados que apresentaram efeito na reprodução dos organismos-teste.

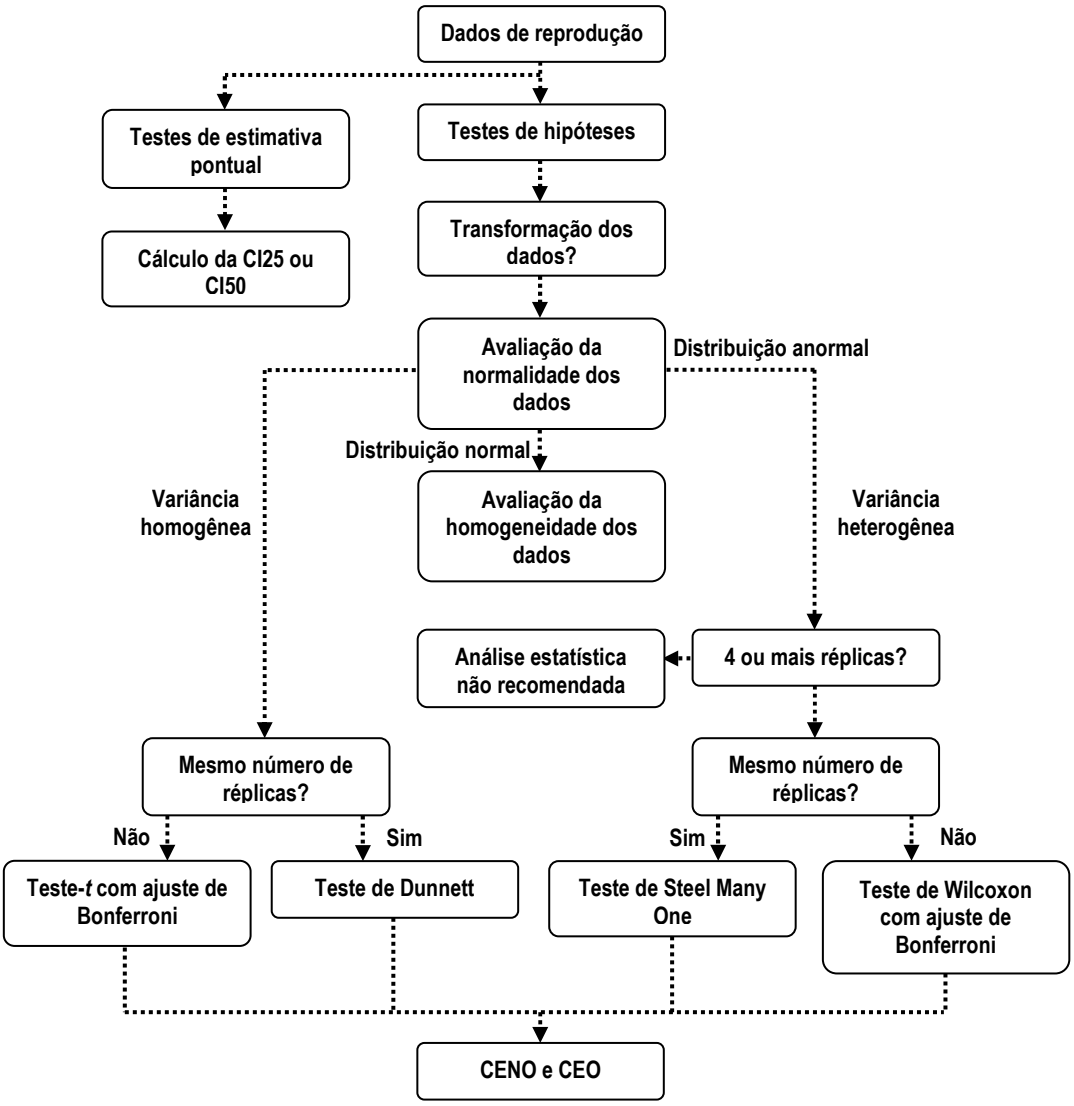


FIGURA 18 – Fluxograma com as etapas para análise estatística e determinação dos valores de CENO, CEO e CI25 (USEPA, 2002b).

Para obtenção da CENO e da CEO, os dados foram analisados quanto à normalidade pelo Teste de Chi-quadrado (x^2). E em seguida, foram analisados quanto à homocedasticidade pelo Teste de Bartlett.

Os testes de normalidade verificam se as respostas dos grupos ou concentrações-teste oscilam de modo simétrico em relação à média, comparando sua distribuição com uma distribuição normal, estabelecida teoricamente. O Teste de Chi-quadrado (x^2), estabelece o agrupamento dos dados em classes, comparando sua distribuição à distribuição normal (BURATINI e BERTOLETTI, 2006; USEPA, 2002b).

Os testes de homocedasticidade verificam se as variâncias dos grupos são homogêneas, ou seja, se apresentam o mesmo grau de dispersão em torno do valor central. O Teste de Bartlett é aplicado para grupos com número de réplicas igual ou diferente (BURATINI e BERTOLETTI, 2006).

Após verificar a normalidade e a homocedasticidade dos resultados, foi realizada uma análise de variância (ANOVA) pelo teste paramétrico Dunnett e testes não paramétricos Steel Many One e Wilcoxon com ajuste de Bonferroni, conforme a distribuição dos dados e do número de réplicas. As diferenças significativas foram determinadas com nível de significância de $p < 0,05$.

Além dos testes de hipóteses, os resultados da reprodução dos organismos-teste foram submetidos à análise da Concentração de Inibição de 25% pelo método de interpolação linear, ou seja, uma estimativa pontual da concentração que reduziu a reprodução em 25%.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio *in vitro* de citotoxicidade

Os resultados dos ensaios *in vitro* de citotoxicidade foram expressos em percentual de viabilidade celular para as diferentes concentrações dos princípios ativos.

5.1.1 Óleo essencial de capim-limão

A TAB. 9 apresenta os valores e os desvios padrões da viabilidade celular para as concentrações da solução dos dois lotes de OE, considerando duas replicatas para cada lote.

TABELA 9 – Viabilidade celular e desvios padrões em diferentes concentrações da solução dos lotes de OE.

Concentração ($mg.L^{-1}$)	**Viabilidade celular (%) ± σ**					
	Controle negativo	**Controle positivo**	**Óleo essencial**			
			L 180 (1)	**L 180 (2)**	**L 183 (1)**	**L 183 (2)**
500	100 ± 14	1 ± 0	8 ± 3	8 ± 3	8 ± 0	8 ± 1
250	100 ± 07	52 ± 15	8 ± 5	8 ± 5	8 ± 6	8 ± 2
125	93 ± 7	100 ± 9	7 ± 13	8 ± 5	9 ± 8	8 ± 3
62,5	93 ± 9	100 ± 10	35 ± 16	37 ± 7	38 ± 7	40 ± 17
31,25	86 ± 13	100 ± 14	72 ± 5	74 ± 3	70 ± 5	76 ± 13

σ = desvio padrão

As curvas de viabilidade celular das soluções de OE em função das concentrações dos princípios ativos estão apresentadas na FIG. 19.

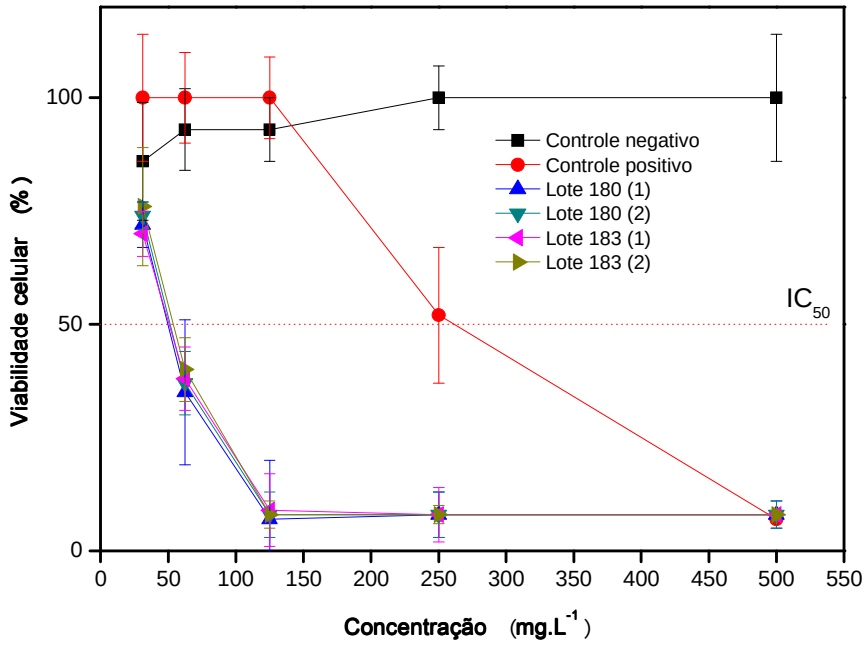


FIGURA 19 – Curvas de viabilidade celular no teste *in vitro* de citotoxicidade do OE.

De acordo com a FIG. 19, os resultados do IC_{50} das amostras foram: Lote 180 = 47 $mg.L^{-1}$ e 49 $mg.L^{-1}$ com média de 48 $mg.L^{-1}$; Lote 183 = 48 $mg.L^{-1}$ e 52 $mg.L^{-1}$ com média de 50 $mg.L^{-1}$. Para o controle positivo, o IC_{50} foi igual a 262 $mg.L^{-1}$ da solução de OE.

5.1.2 Dietiltoluamida

A TAB. 10 apresenta os valores de viabilidade celular para as concentrações das três replicatas da solução teste de DEET e os respectivos desvios padrões.

TABELA 10 – Viabilidade celular e desvios padrões em diferentes concentrações da solução de DEET.

Concentração ($mg.L^{-1}$)	Viabilidade celular (%) ± σ				
	Controle negativo	Controle positivo	DEET		
			Triplicata 1	Triplicata 2	Triplicata 3
1000	100 ± 10	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 0	0 ± 0
500	96 ± 14	0 ± 0	48 ± 15	34 ± 11	31 ± 3
250	98 ± 8	2 ± 20	100 ± 14	74 ± 12	74 ± 12
125	96 ± 8	100 ± 6	100 ± 10	75 ± 19	82 ± 8
62,5	97 ± 13	100 ± 13	100 ± 11	85 ± 05	86 ± 3

σ = desvio padrão

As curvas de viabilidade celular da solução de DEET em função das concentrações dos princípios ativos estão apresentadas na FIG. 20.

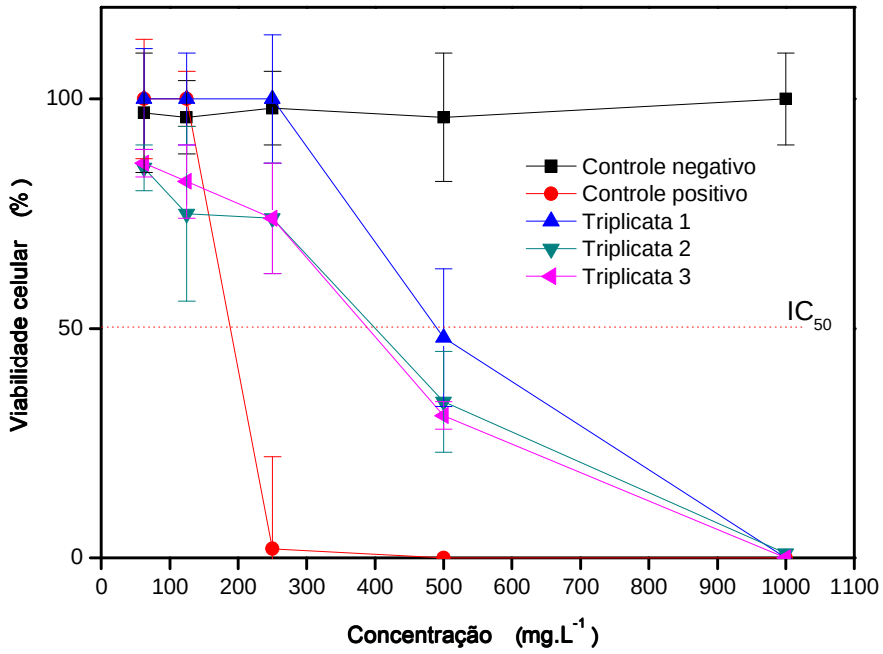


FIGURA 20 – Curvas de viabilidade celular no teste *in vitro* de citotoxicidade do DEET.

Os valores de IC_{50} encontrados para as triplicatas de DEET foram: 490 $mg.L^{-1}$, 400 $mg.L^{-1}$ e 380 $mg.L^{-1}$com média de 420 $mg.L^{-1}$.

No estudo desenvolvido por Kim *et al.* (2011), os autores realizaram ensaios *in vitro* de citotoxicidade com linhagem celular humana BE(2)-M17

originária da *American Type Culture Collection* e encontraram redução da viabilidade celular provocada pelo DEET nas concentrações de 500 a 4000 $mg.L^{-1}$. O IC_{50} determinado foi de 495,7 $mg.L^{-1}$ em 48 h de exposição. Também verificaram alterações significativas nas enzimas controladoras do ciclo celular, afetando todo o crescimento e a apoptose celular.

Neste trabalho, os autores compararam os resultados obtidos com aqueles disponíveis na literatura para os organismos aquáticos (ver TAB. 16).

Portanto, os resultados encontrados neste trabalho foram semelhantes aos encontrados por Kim *et al*. (2011).

As médias de IC_{50} dos princípios ativos usados nos ensaios estão apresentados na TAB 11.

TABELA 11 – Médias dos resultados de IC_{50} e desvios padrões dos testes *in vitro* de citotoxicidade para os princípios ativos utilizados.

Ensaio	**IC_{50} ($mg.L^{-1}$) ± σ**
OE lote 180	48 ± 0,7
OE lote 183	50 ± 2,8
DEET	420 ± 58,6

IC_{50} = índice de citotoxicidade
σ = desvio padrão

De acordo com os resultados obtidos para os dois princípios ativos, o OE apresentou valores menores de IC_{50} em comparação aos valores de IC50 de DEET. Portanto, o OE é mais citotóxico do que o DEET.

5.2 Ensaios de ecotoxicidade

5.2.1 Ensaios de sensibilidade dos organismos

Os resultados da CE_{50} dos ensaios de sensibilidade realizados com os organismos foram inseridos no gráfico para elaboração da carta-controle, que está apresentada no APÊNDICE A. A média acumulada e os limites superiores e inferiores também foram estabelecidos.

Os lotes dos organismos utilizados nos ensaios definitivos foram considerados qualificados apenas aqueles que apresentaram sensibilidade dentro dos limites estabelecidos (limites superior e inferior).

O intervalo de confiança dos ensaios de ecotoxicidade realizados neste trabalho foi obtido pelo programa estatístico Trimmed Spearman-Karber (HAMILTON *et al*., 1977). Quanto menor a extensão desta faixa maior a precisão dos resultados.

Os resultados da CE_{50} encontrados nos ensaios de sensibilidade com *C. silvestrii* variaram de 1,41 a 1,81 $g.L^{-1}$ de cloreto de sódio (NaCl).

Os resultados referentes aos ensaios de sensibilidade com *D. similis* variaram de 1,73 a 3,35 $g.L^{-1}$ de (NaCl).

Na carta-controle, o comportamento da sensibilidade dos organismos pode ser visto na forma de um serrote, adequado para que haja um equilíbrio na tolerância aos agentes químicos.

5.2.2 Ecotoxicidade aguda

5.2.2.1 Óleo essencial de capim-limão

5.2.2.1.1 Controle do solvente Dimetilsulfóxido – DMSO

Com a finalidade de verificar possíveis efeitos do solvente DMSO na mortalidade dos organismos-teste, realizou-se o controle do solvente com a maior concentração testada (16 $mg.L^{-1}$) em todos os ensaios.

Nos ensaios realizados com *D. similis* e *C. silvestrii,* a mortalidade dos organismos causada pelo solvente DMSO não ultrapassou 10%, conforme mencionado no item 4.3.4 (ensaios de sensibilidade e validação dos resultados).

O resultado da média de CE_{50} dos ensaios realizados com OE para *D. similis* foi 7,76 $mg.L^{-1}$ com o lote 180 e 6,69 $mg.L^{-1}$ com o lote 183, que estão apresentados na TAB. 12. Valores das médias, desvios padrões e coeficiente de variação também estão apresentados nestas tabelas.

TABELA 12 – Resultados da CE_{50} dos três ensaios de ecotoxicidade aguda com os dois lotes de OE para *D. similis*.

Ensaio	Lote 180		Lote 183	
	CE_{50} ($mg.L^{-1}$)	Intervalo de confiança ($mg.L^{-1}$)	CE_{50} ($mg.L^{-1}$)	Intervalo de confiança ($mg.L^{-1}$)
1	7,6	6,94 - 8,32	6,4	5,92 - 6,92
2	6,51	6,00 - 7,07	6,22	5,64 - 6,87
3	9,17	8,87 - 9,48	7,46	6,74 - 8,27
Média	7,76		6,69	
Desvio padrão	1,34		0,67	
Coeficiente de variação	17%		10%	
Faixa de sensibilidade	6,00 - 9,48		5,64 - 8,27	

A diferença dos resultados de CE_{50} entre os dois lotes de OE foi calculada utilizando o método estatístico Teste *t* de *Student,* onde não se observou diferença significativa entre os dois lotes (APÊNDICE M).

Os resultados das médias de CE_{50} encontrados para os dois lotes de OE para *C. silvestrii* estiveram compreendidos entre 4,45 e 3,16 $mg.L^{-1}$, como apresentados na TAB. 13.

TABELA 13 – Resultados da CE_{50} dos três ensaios de ecotoxicidade aguda com os dois lotes de OE para *C. silvestrii*.

Ensaio	Lote 180		Lote 183	
	CE_{50} ($mg.L^{-1}$)	Intervalo de confiança ($mg.L^{-1}$)	CE_{50} ($mg.L^{-1}$)	Intervalo de confiança ($mg.L^{-1}$)
1	4,1	3,80 - 4,43	2,21	1,91 - 2,55
2	4,73	4,13 - 5,40	3,85	3,65 - 4,05
3	4,52	4,00 - 5,11	3,42	2,89 - 4,06
Média	4,45		3,16	
Desvio padrão	0,32		0,85	
Coeficiente de variação	7%		27%	
Faixa de sensibilidade	3,80 - 5,40		1,91 - 4,06	

Nos ensaios realizados com *C. silvestrii,* os dois lotes de OE não apresentaram diferença significativa para os resultados de CE_{50}, conforme o Teste *t* de *Student* (APÊNDICE M).

Não há trabalhos publicados na literatura sobre a ecotoxicidade do OE de capim-limão em organismos aquáticos. Dias (2013, Comunicação Pessoal[1]) encontrou a concentração tóxica de 6,6 $mg.L^{-1}$ de OE de capim-limão para a larva de *Chironomus xanthus* (Diptera, Chironomidae), que durante seu estágio larval vive em sedimentos de regiões dulcícolas.

No trabalho publicado por Caballero-Gallardo *et al*. (2012), os autores estudaram a mortalidade do besouro castanho *Tribolium castaneum* em contato com o OE e mais dois óleos também usados como princípios ativos de repelentes de inseto, *Cymbopogon martinii* e *Lippia origanoides*. As leituras dos ensaios foram feitas com 24, 48 e 72 h de exposição dos organismos aos óleos essenciais. Neste trabalho, o OE apresentou maior mortalidade para os organismos nos períodos de 24 e 48 h na concentração de 1,2 $\mu L.cm^{-2}$ em comparação aos outros, mostrando ser mais tóxico do que o restante dos óleos essenciais testados.

5.2.2.2 Dietiltoluamida

Os resultados dos ensaios de ecotoxicidade aguda do DEET para *D. similis* e *C. silvestrii* estão apresentados nas TAB. 14 e 15, assim como as médias, desvios padrões e o coeficiente de variação.

TABELA 14 – Resultados da CE_{50} dos três ensaios de ecotoxicidade aguda com o DEET para *D. similis*.

Ensaio	CE_{50} ($mg.L^{-1}$)	Intervalo de confiança ($mg.L^{-1}$)
1	60,74	50,61 - 72,89
2	66,58	54,90 - 80,74
3	67,30	52,80 - 85,79
Média	64,87	
Desvio padrão	3,60	
Coeficiente de variação	6%	
Faixa de sensibilidade	50,61 - 85,79	

[1] Diana da Silva Dias, iniciação científica no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN (Comunicação Pessoal).

TABELA 15 – Resultados da CE_{50} dos três ensaios de ecotoxicidade aguda com o DEET para *C. silvestrii*.

Ensaio	CE_{50} ($mg.L^{-1}$)	Intervalo de confiança ($mg.L^{-1}$)
1	52,80	47,69 - 58,46
2	56,46	47,49 - 67,11
3	52,36	44,03 - 62,26
Média	53,87	
Desvio padrão	2,25	
Coeficiente de variação	4%	
Faixa de sensibilidade	44,03 - 67,11	

Os resultados mostraram que a concentração média de 64,87 $mg.L^{-1}$ de DEET causou mortalidade de 50% para *D. similis*. Enquanto a concentração média de 53,87 $mg.L^{-1}$ causou mortalidade de 50% para *C. silvestrii*.

No trabalho de Martini[2] (2012), a autora encontrou a concentração letal de 50% (CL_{50}) igual a 114,7 $mg.L^{-1}$ de DEET para o mexilhão marinho *Perna perna* (Bivalvia; Mytilidae).

De acordo com a literatura, outras espécies de organismos aquáticos foram submetidas a ensaios com DEET para determinação da CE_{50} ou CL_{50}. Alguns destes resultados estão apresentados na TAB. 16.

[2] Gisela de Assis Martini, mestranda no Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN (Comunicação Pessoal).

TABELA 16 – Ecotoxicidade aguda do DEET para organismos aquáticos. Valores disponíveis na literatura e obtidos no presente trabalho, expressos em CE_{50} ou CL_{50}. Adaptado de Costanzo *et al*. (2007).

Organismo	**Classificação**	**CE_{50} ou CL_{50}**	**Fonte**
Chlorella protothecoides	Alga verde	388 $mg.L^{-1}$/24h	Costanzo *et al*. (2007)
Ceriodaphnia silvestrii	Crustáceo	53,9 $mg.L^{-1}$/48h	Presente trabalho
Daphnia similis	Crustáceo	64,9 $mg.L^{-1}$/48h	Presente trabalho
Daphnia magna	Crustáceo	75 $mg.L^{-1}$/48h	Office of Pesticide Programs (2000)
Gammarus fasciatus	Crustáceo	100 $mg.L^{-1}$/24h	Mayer e Ellersieck, (1986)
Perna perna	Mexilhão	112 $mg.L^{-1}$/72h	Martini (2012)
Pimephales promelas	Peixe	75,7 $mg.L^{-1}$/96h	Brooke *et al*. (1984)
Gambusia affinis	Peixe	235 $mg.L^{-1}$/24h	Michael and Grant (1974)
Oncorhynchus mykiss	Peixe	71,3 $mg.L^{-1}$/96h	Office of Pesticide Programs (2000)

Os organismos aquáticos listados na TAB. 16 apresentam valores de CE_{50} ou CL_{50} que variam entre 53,9 e 388 $mg.L^{-1}$ de DEET, considerando tempo de exposição de 24 a 96h. Os resultados deste trabalho foram mais sensíveis, visto que a espécie nativa brasileira *C. silvestrii* representa rigorosamente os efeitos do DEET.

Diversos estudos foram desenvolvidos para determinação das concentrações ambientais de DEET em vários países. Na TAB. 17 estão listados alguns países e concentrações máximas encontradas em águas superficiais, subterrâneas, costeiras e efluentes e afluentes de estações de tratamento de esgoto (ETEs).

TABELA 17 – Concentrações máximas de DEET encontradas em alguns compartimentos ambientais e esgotos de alguns países. Adaptado de Costanzo *et al*. (2007).

Compartimento	**Concentração máxima (µg.L^{-1})**	**País**	**Fonte**
Águas subterrâneas	13,0	EUA	Barnes *et al.* (2005)
Águas costeiras	1,09	Mar do Norte	Weigel *et al*. (2004)
Água potável	0,07	EUA	Stackelberg *et al*. (2004)
Esgoto (afluente)	3,0	Austrália	Knepper (2004)
Esgoto (efluente)	2,10	EUA	Glassmeyer *et al*. (2005)
Águas superficiais	1,13	EUA	Kolpin *et al*. (2002); Sandstrom, *et al*. (2005)

Pode ser observado que as concentrações de DEET encontradas no ambiente aquático são entre 10^{-4} e 10^{-2} mg.L^{-1} (na ordem de ng.L^{-1} a µg.L^{-1}). Os valores de CE_{50} encontrados na literatura e estimados neste trabalho estão acima das concentrações ambientais de DEET publicadas.

Para o caso do efeito citotóxico do DEET em duas linhagens celulares NCTC-clone L929 (ver item 5.1.2) e BE(2)-M17 (KIM *et al.,* 2011), as concentrações foram relativamente maiores do que aquelas que causaram efeito tóxico para os organismos testados no presente trabalho e para outras espécies aquáticas mencionadas na TAB. 16.

A TAB. 18 apresenta a média das concentrações de CE_{50} dos três ensaios de ecotoxicidade aguda com os princípios ativos realizados neste trabalho.

TABELA 18 – Médias da CE_{50} dos três ensaios de ecotoxicidade aguda dos princípios ativos para *D. similis* e *C. silvestrii*.

Princípio ativo	Média CE_{50} ($mg.L^{-1}$) ± dp		CV	
	D. similis	***C. silvestrii***	***D. similis***	***C. silvestrii***
OE lote 180	7,76 ± 1,34	4,45 ± 0,32	17%	7%
OE lote 183	6,69 ± 0,67	3,16 ± 0,85	10%	27%
Dietiltoluamida (DEET)	64,87 ± 3,6	53,87 ± 2,25	6%	4%

σ = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

Os resultados variaram de 4 a 27% de acordo com o coeficiente de variação (CV). A agência ambiental *Environment Canada* considera o método bom quando valores forem ≤ 30% (ENVIRONMENT CANADA, 1990).

As médias de CE_{50} dos três ensaios estão representadas na FIG. 21.

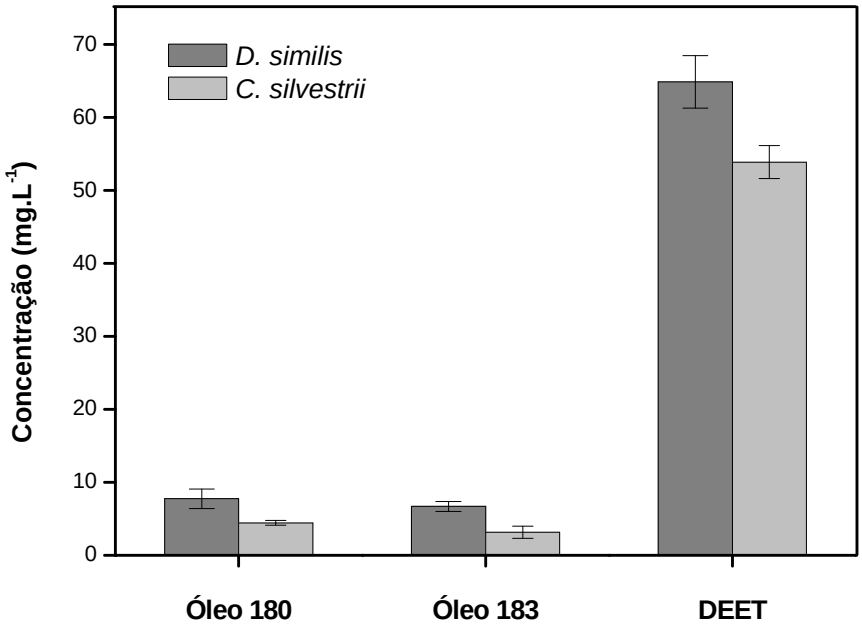


FIGURA 21 – Média dos três ensaios de ecotoxicidade aguda para cada princípio ativo.

5.2.3 Ecotoxicidade crônica

5.2.3.1 Óleo essencial de capim-limão

Os resultados foram expressos em número médio de neonatas produzidas por fêmea de *C. silvestrii*.

Na TAB. 19 e na FIG. 22, estão apresentadas as médias e os desvios padrões de cada concentração e dos controles dos três ensaios realizados com o lote 180 de OE.

O controle do solvente DMSO foi realizado sob as mesmas condições dos ensaios com OE.

TABELA 19 – Reprodução de *C. silvestrii* em diferentes concentrações do lote 180 de OE.

Concentração ($mg.L^{-1}$)	**Média de neonatas/fêmea ± σ**			**Média ± σ**
	Ensaio 1	**Ensaio 2**	**Ensaio 3**	
Controle	16,5 ± 3,7	18,8 ± 2,3	25,3 ± 6	20,2 ± 4
Controle DMSO	17,8 ± 2,7	17,6 ± 4,1	25,9 ± 2,4	20,4 ± 4,7
1,0	19,9 ± 1,2	18,9 ± 3,8	28,8 ± 2,2	22,5 ± 5,5
2,0	16,5 ± 4,6	16,8 ± 8	27,0 ± 3,9	20,1 ± 6
4,0	6,7 ± 3,1	14,8 ± 5,6	22,0 ± 6,9	14,5 ± 7,7
8,0	0,6 ± 1	7 ± 5,3	11,1 ± 4,2	6,2 ± 5,3
16,0	0,3 ± 0,7	0 ± 0	0 ± 0	0,1 ± 0,2

σ = desvio padrão

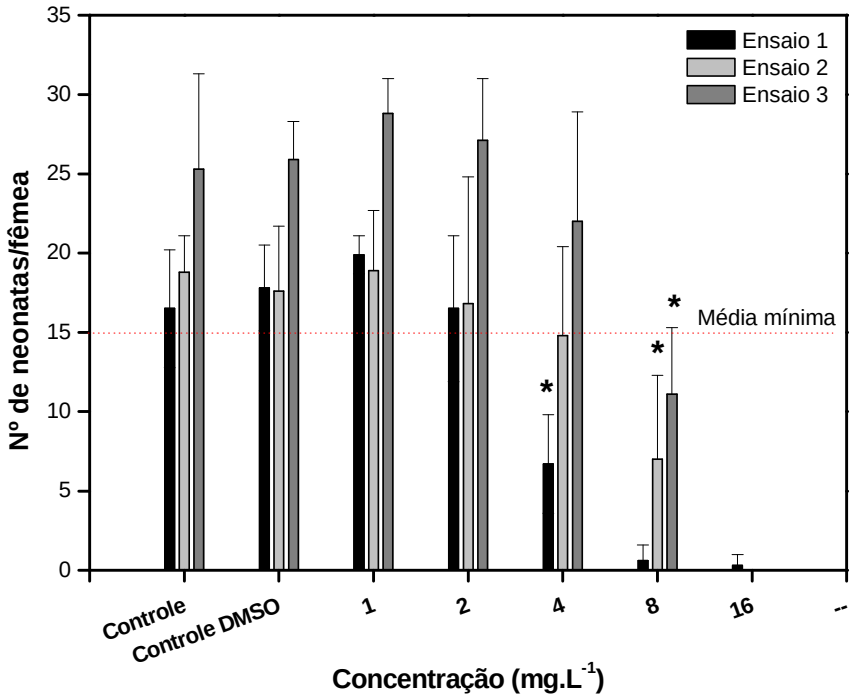


FIGURA 22 – Reprodução de *C. silvestrii* em função das concentrações do lote 180 de OE e os controles de água e DMSO. *Diferença significativa (CEO) ($p < 0,05$).

O ensaio 1 apresentou efeito estatisticamente significativo (CEO) na concentração de 4 $mg.L^{-1}$ de OE e os ensaios 2 e 3 apresentaram efeito significativo na concentração de 8 $mg.L^{-1}$.

A TAB. 20 apresenta os resultados da CEO e CENO para a reprodução de *C. silvestrii*.

TABELA 20 – Resultados da CENO e CEO do lote 180 de OE para a reprodução de *C. silvestrii*.

Ensaio	Concentração ($mg.L^{-1}$)	
	Lote 180	
	CENO	CEO
1	2	4
2	4	8
3	4	8

CENO = concentração de efeito não observado
CEO = concentração de efeito não observado

A CENO variou de 2 a 4 $mg.L^{-1}$ enquanto que a CEO, variou entre 4 e 8 $mg.L^{-1}$ de OE.

A TAB. 21 apresenta os resultados da CI_{25} obtidos para os três ensaios.

TABELA 21 – Resultados da CI_{25} para os ensaios com o lote 180 de OE.

Ensaio	CI25 ($mg.L^{-1}$)
1	2,6
2	4,3
3	4,6
Média	3,8
Desvio padrão	1,1
Coeficiente de variação	28%

CI25 = concentração de inibição de 25%

A CI_{25} variou de 2,6 a 4,6 $mg.L^{-1}$ de OE com média igual a 3,8 $mg.L^{-1}$.

A TAB. 22 e a FIG. 23 apresentam as médias e os desvios padrões de cada concentração e dos controles dos três ensaios realizados com o lote 183 de OE.

O controle do solvente DMSO foi realizado sob as mesmas condições dos ensaios com OE.

TABELA 22 – Reprodução de *C. silvestrii* em diferentes concentrações do lote 183 de OE.

Concentração ($mg.L^{-1}$)	Média de neonatas/fêmea ± σ			Média ± dp
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	
Controle	15,5 ± 3,3	18,2 ± 2,1	17 ± 3,5	17 ± 1,4
Controle DMSO	15 ± 2,3	15,6 ± 3,2	17,7 ± 5,4	16,1 ± 3,6
1,0	16,1 ± 4,9	16,3 ± 2	17 ± 5,8	16 ± 1,3
2,0	10 ± 3,3	14,9 ± 2	14,3 ± 2,4	13 ± 2,7
4,0	9,3 ± 4,5	14,8 ± 1	11,6 ± 5	12 ± 2,8
8,0	3,3 ± 1,4	5,5 ± 4,2	2,3 ± 2,4	4 ± 1,6
16,0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

dp = desvio padrão

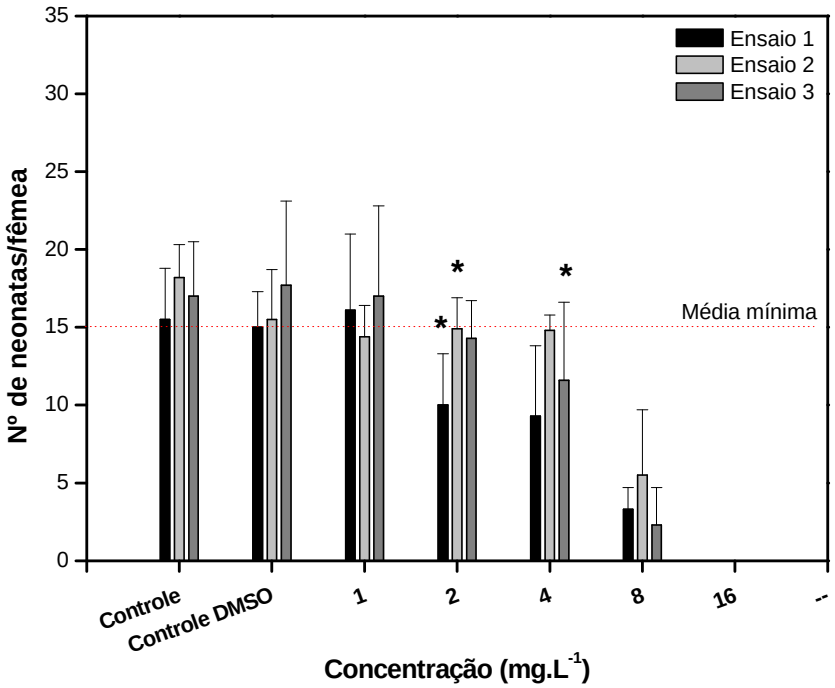


FIGURA 23 – Reprodução de *C. silvestrii* em função das concentrações do lote 183 de OE e os controles de água e DMSO. *Diferença significativa (CEO) ($p < 0,05$)**.**

Os ensaios 1 e 2 apresentaram efeito estatisticamente significativo (CEO) na concentração de 2 $mg.L^{-1}$ e o ensaio 3, na concentração de 4 $mg.L^{-1}$ de OE.

A TAB. 23 apresenta os resultados da CENO e CEO para a reprodução de *C. silvestrii*.

TABELA 23 – Resultados da CENO e CEO do lote 183 do OE para a reprodução de *C. silvetsrii*.

Ensaio	**Concentração ($mg.L^{-1}$)**	
	Lote 183	
	CENO	**CEO**
1	1	2
2	1	2
3	2	4

CENO = concentração de efeito não observado
CEO = concentração de efeito não observado

A CENO variou de 1 a 2 $mg.L^{-1}$. A CEO variou entre 2 e 4 $mg.L^{-1}$ de OE.

A TAB. 24 apresenta os resultados da CI_{25} obtidos para os três ensaios.

TABELA 24 – Resultados da CI_{25} para os ensaios com o lote 183 de OE.

Ensaio	**CI_{25} ($mg.L^{-1}$)**
1	1,7
2	4,5
3	3,1
Média	3,1
Desvio padrão	1,4
Coeficiente de variação	45%

CI_{25} = concentração de inibição de 25%

A CI_{25} variou de 1,7 a 4,5 $mg.L^{-1}$ do lote 183 de OE, com média igual de 3,1 $mg.L^{-1}$.

Os resultados da CI_{25} para os dois lotes foram semelhantes, sendo 3,8 $mg.L^{-1}$ para o lote 180 e 3,1 $mg.L^{-1}$ para o lote 183, com média igual a 3,4 $mg.L^{-1}$.

As curvas de concentração-resposta, expressas em média dos três ensaios para cada lote de OE, estão apresentadas na FIG. 24.

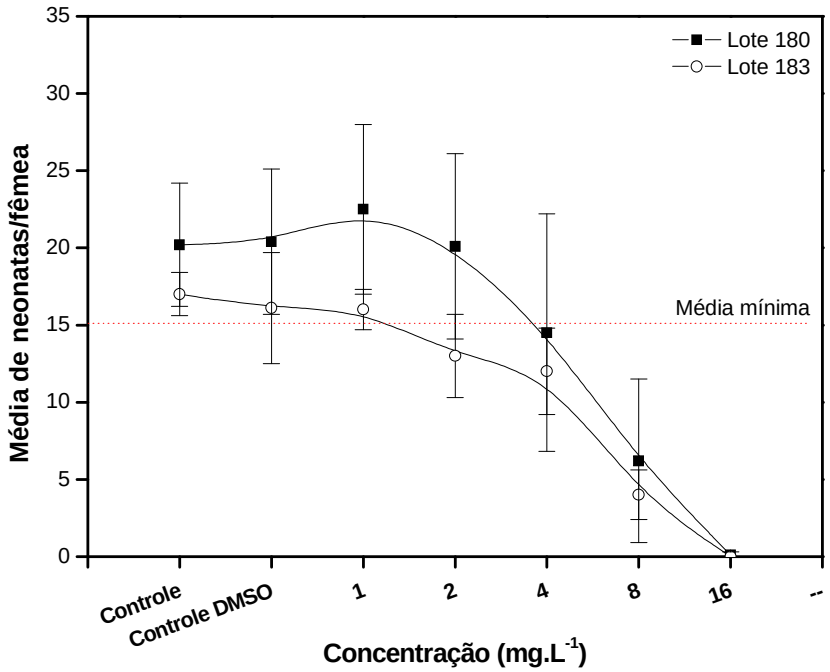


FIGURA 24 – Curvas de concentração-resposta da reprodução de *C. silvestrii* em função das concentrações de OE e os controles de água e DMSO. Média dos três ensaios de cada lote de OE.

Visualizando a FIG. 24, a reprodução dos organismos-teste foi menor para o lote 183, isso poderia ser explicado por ser um lote mais novo.

Os lotes de OE não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre si, sendo verificada pelo Teste *t* de *Student* (APÊNDICE M).

5.2.3.2 Dietiltoluamida

Os resultados dos ensaios de ecotoxicidade crônica com DEET estão apresentados na TAB. 25 e na FIG. 25.

TABELA 25 – Reprodução de *C. silvestrii* em diferentes concentrações de DEET.

Concentração ($mg.L^{-1}$)	Média de neonatas/fêmea ± σ			Média ± dp
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	
Controle	24 ± 3,2	16,6 ± 4,1	16,8 ± 4	19,1 ± 4,2
3,75	23,7 ± 3,8	19,7 ± 5,3	19,6 ± 4,2	21 ± 2,3
7,5	23,3 ± 4,2	15,6 ± 8,4	16,1 ± 3,9	18,3 ± 4
15,0	18,1 ± 9,9	18,0 ± 3,4	15 ± 3,6	17 ± 1,8
30,0	0 ± 0	14,5 ± 4,2	0,3 ± 0,7	6,2 ± 10,3
60,0	0 ± 0	3,3 ± 2,5	0 ± 0	1,4 ± 2,4

σ = desvio padrão

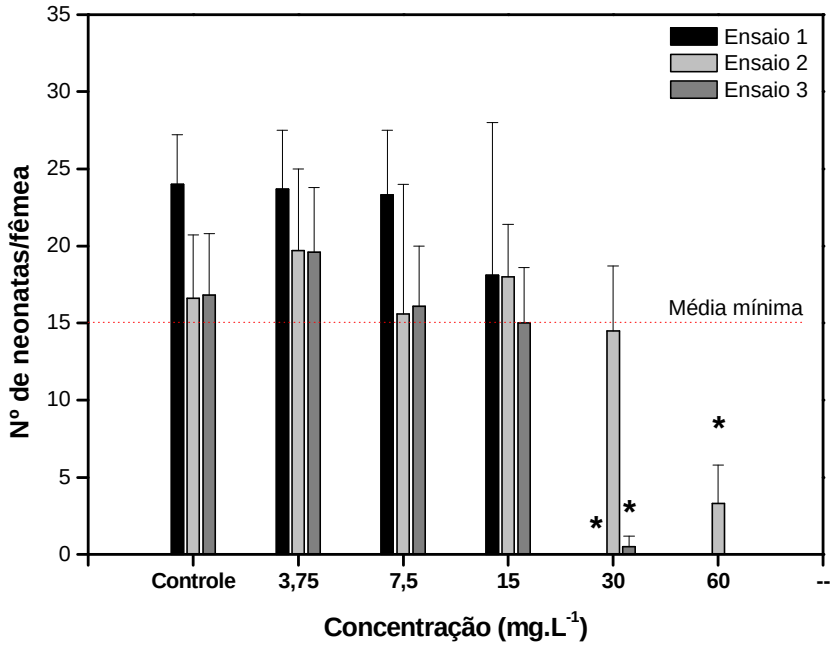


FIGURA 25 – Reprodução de *C. silvestrii* em função das concentrações de DEET e o controle de água. *Diferença significativa (CEO) ($p < 0,05$).

Observando a FIG. 25, a concentração de 30 $mg.L^{-1}$ apresentou efeito estatisticamente significativo nos ensaios 1 e 3, enquanto no ensaio 2 o efeito foi observado na concentração de 60 $mg.L^{-1}$.

A TAB. 26 apresenta os resultados da CENO e CEO para a reprodução de *C. solvestrii*.

TABELA 26 – Resultados da CEO e CENO do DEET para a reprodução de *C. silvestrii*.

Ensaio	Concentração ($mg.L^{-1}$)	
	CENO	**CEO**
1	15	30
2	30	60
3	15	30

CENO = concentração de efeito não observado
CEO = concentração de efeito não observado

A CENO variou de 15 a 30 $mg.L^{-1}$ de DEET. E a CEO variou de 30 a 60 $mg.L^{-1}$ de DEET.

A TAB. 27 apresenta os resultados da CI_{25} para os ensaios realizados.

TABELA 27 – Resultados da CI_{25} dos ensaios com DEET.

Ensaio	CI_{25} ($mg.L^{-1}$)
1	15,0
2	17,8
3	16,4
Média	16,4
Desvio padrão	1,4
Coeficiente de variação	8,5%

CI_{25} = concentração de inibição de 25%

A CI_{25} apresentou variação de 15 a 17,8 $mg.L^{-1}$ com média igual a 16,4 $mg.L^{-1}$ de DEET. Estes resultados foram mais precisos em relação aos obtidos pelos testes de hipótese (CENO e CEO).

Martini (2012) encontrou efeito citotóxico a partir da desestabilização da membrana lisossômica em hemócitos de mexilhões *P. perna* em concentrações acima de 0,001 $mg.L^{-1}$ de DEET.

As curvas de concentração-resposta, expressas em média dos três ensaios de DEET, estão apresentadas na FIG. 26.

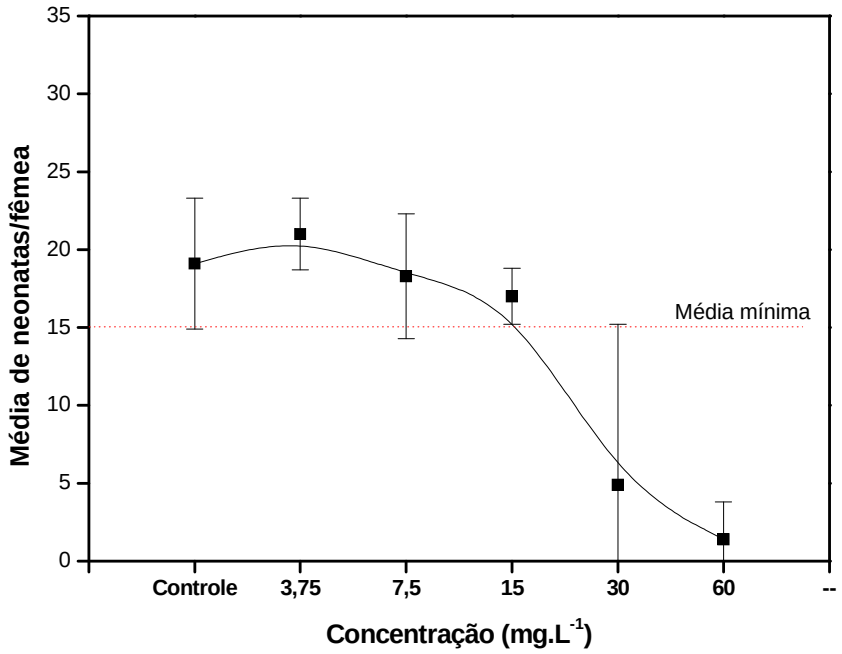


FIGURA 26 – Curvas de concentração-resposta da reprodução de *C. silvestrii* em função das concentrações de DEET e controle de água. Média dos três ensaios.

Os resultados da média de neonatas por fêmea, obtidos dos ensaios crônicos com DEET e OE, estão representados na FIG. 27, onde é possível visualizar a diferença da ecotoxicidade na reprodução de *C. silvestrii*.

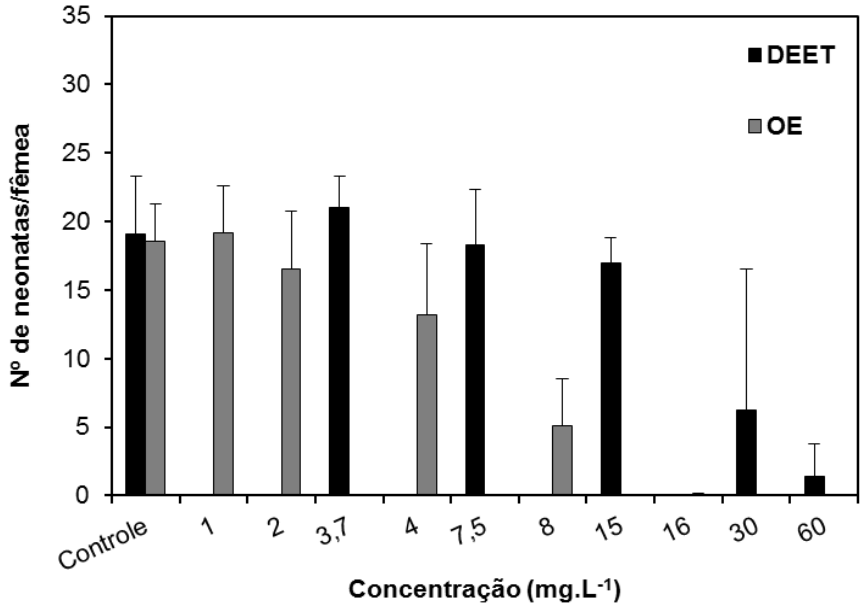


FIGURA 27 – Reprodução de *C. silvestrii* em função das concentrações dos princípios ativos testados.

5.3 Exposição dos organismos à radiação ionizante

5.3.1 Determinação da dose letal – DL_{50}

Os resultados dos três ensaios para determinação da DL_{50} estão representados na TAB. 28 e na FIG. 28.

TABELA 28 – Sobrevivência de *D. similis* e *C. silvestrii* às doses de radiação gama. Média dos três ensaios.

Dose (Gy)	Sobrevivência (%) ± σ	
	C. silvestrii	***D. similis***
Controle	100 ± 6	100 ± 3
100	100 ± 3	100 ± 0
200	100 ± 3	61 ± 20
400	72 ± 9	8 ± 8
800	2 ± 3	0 ± 0
1600	0 ± 0	0 ± 0

σ = desvio padrão
Taxas de dose: de 1,69 a 1,71 $kGy.h^{-1}$

O percentual de sobrevivência foi colocado em função das doses de radiação gama, de modo a obter as curvas de dose-resposta para os dois organismos aquáticos, representado na FIG. 28.

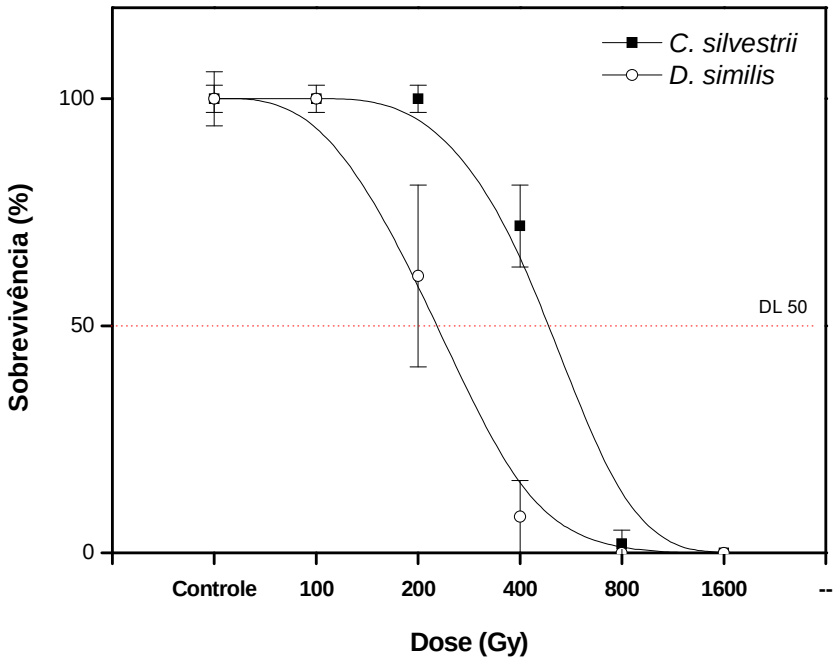


FIGURA 28 – Curvas de dose-resposta da DL_{50} para *D. similis* e *C. silvestrii* com 48 h de observação após a exposição dos organismos aos raios gama.

A DL_{50} encontrada para *D. similis* foi igual a 242 Gy e para *C. silvestrii* foi 525 Gy. A espécie *C. silvestrii* se mostrou mais resistente à radiação gama do que a espécie *D. similis.* Para o caso de substâncias químicas, a carta-controle estabelecida pelo laboratório (APÊNDICE A) mostrou que *C. silvestrii* é mais sensível do que *D. similis*.

Bacq e Alexander (1961) e Blaylock (1974) acreditam que a radiação ionizante produz efeitos mais rápidos em temperaturas mais elevadas (> 28ºC) devido ao aumento da taxa metabólica dos organismos expostos. Isso comprova os resultados obtidos pelos autores Ravera (1967) e Engel (1971), que observaram efeitos rápidos e severos da radiação gama em ostras *Crassostrea gigas* e gastrópodo *Physa acuta* (Gastropoda, Basommatophora) cultivados em temperaturas elevadas.

O efeito da interação entre a radiação ionizante e a temperatura nos organismos aquáticos, ainda não é um fato comprovado (DALLAS *et al*., 2012).

Os resultados obtidos no presente trabalho são divergentes aos observados na literatura. A fonte de radiação ionizante utilizada, o tempo de exposição, a sensibilidade dos organismos, a dose e a taxa de dose podem favorecer esta divergência entre os estudos observados.

Lameira[3] (2012, Comunicação Pessoal) acredita que para a espécie *D. similis,* que tolera temperaturas mais baixas, o reparo aos danos provocados pela radiação gama no DNA tende a ser lento em comparação à espécie *C. silvestrii*, que tolera temperaturas mais altas e apresenta maior taxa metabólica e como consequência disso, o reparo dos danos no DNA tende a ser relativamente mais rápido.

Nos ensaios com *C. xanthus*, Dias encontrou DL_{50} de 32,3 Gy com taxa de dose de 1,37 $kGy.h^{-1}$ com 96 horas de observação após a exposição dos organismos ao Co-60 (Comunicação Pessoal, 2013).

Martini[2] (2012, Comunicação Pessoal) encontrou a DL_{50} de 1068 Gy com taxa de dose igual a 1,50 $kGy.h^{-1}$ para o mexilhão marinho *P. perna* com 72 h de observação após a irradiação. Os organismos também foram irradiados com fonte Co-60, a mesma utilizada neste trabalho.

Conforme Engel (1971), a radiação ionizante juntamente com a salinidade pode afetar a capacidade osmorregulatória dos organismos expostos, o que implica na tolerância dos organismos à radiação ionizante. Indivíduos da espécie de caranguejo *Callinectes sapidus* e camarão *Palaemonetes pugio* tornaram-se tolerantes após exposição a uma dose elevada de radiação (6 Gy).

No estudo desenvolvido por Sarapultseva e Bychkovskaya (2010), que avaliaram os efeitos da radiação gama proveniente de uma fonte de Co-60 em *Daphnia magna*, foi encontrada a DL_{50} igual a 250 Gy e taxa de dose igual a 0,15 $Gy.min^{-1}$. A partir desta dose, a gravidade dos efeitos aumentou conforme o aumento das doses, sendo um comportamento característico de um efeito determinístico, evento semelhante ao ocorrido no presente trabalho.

5.3.2 Efeito da radiação ionizante na reprodução de *C. silvestrii*

A média de neonatas produzidas por fêmea, obtida em cada dose, está apresentada na TAB. 29 e na FIG. 29.

---

[3] Dra. Vanessa Lameira, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN (Comunicação Pessoal).

TABELA 29 – Reprodução de *C. silvestrii* em diferentes doses de radiação gama.

Dose (Gy)	Média de neonatas/fêmea ± σ			Média ± σ
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	
Controle	23,3 ± 11,3	19,9 ± 2,5	16,8 ± 3,3	19,7 ± 3,3
6,25	23,1 ± 10	18,2 ± 4,2	16,8 ± 4,7	18,6 ± 3,7
12,5	27,1 ± 2,4	18,7 ± 3,4	22,5 ± 1,5	22,8 ± 4,2
25	21,1 ± 7,9	16,8 ± 3,8	16,9 ± 3,1	18,3 ± 2,5
50	4,3 ± 4,5	3,5 ± 3,7	2,6 ± 2,2	3,5 ± 0,9
100	0,1 ± 0	0 ± 0	0,4 ± 1,3	0,2 ± 0,4

σ = desvio padrão

Os resultados foram colocados no gráfico, sendo o número médio de neonatas por fêmea em função das doses de radiação gama.

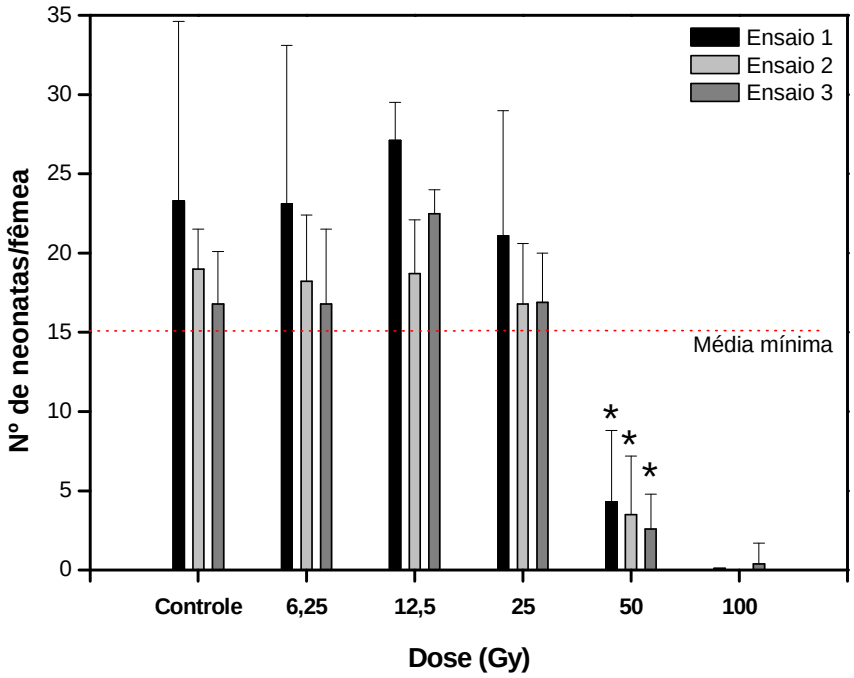


FIGURA 29 – Reprodução de *C. silvestrii* em função das doses de radiação gama e o controle de água. *Diferença significativa (CEO) ($p < 0,05$). Taxa de dose: de 1,50 a 1,52 $kGy.h^{-1}$.

De acordo com a FIG. 29, a radiação gama apresentou efeito significativo (CEO) na dose de 50 Gy. A dose de 100 Gy apresentou a sobrevivência dos organismos, resultado semelhante idem ao encontrado por Choppin *et al*. (1995).

A TAB. 30 apresenta os resultados de CENO e CEO para a reprodução de *C. silvestrii*.

TABELA 30 – Resultados da CENO e CEO da radiação gama para a reprodução de *C. silvestrii*.

Ensaio	Dose (Gy)	
	CENO	CEO
1	25	50
2	25	50
3	25	50

CENO = concentração de efeito não observado
CEO = concentração de efeito observado

A dose de 25 Gy foi a maior dose de radiação gama que não provocou efeito na reprodução dos organismos (CENO), sendo utilizada posteriormente nos ensaios com os organismos irradiados e expostos aos princípios ativos.

As doses que inibiram 25% da reprodução variaram de 28,5 a 30 Gy com média igual a 29,2 Gy, visto na TAB. 31.

TABELA 31 – Resultados da CI_{25} para as doses de radiação gama.

Ensaio	CI_{25} (Gy)
1	29,0
2	28,5
3	30,0
Média	29,2
Desvio padrão	0,8
Coeficiente de variação	2,6%

CI_{25} = concentração de inibição de 25%

Gilbin *et al.* (2008) avaliaram a reprodução de *D.magna* exposta à radiação gama de uma fonte de Césio-137 e detectaram a redução de 21% na reprodução a uma dose crônica acumulada de 17 Gy com taxa de dose de 31 $mGy.h^{-1}$ durante 15 dias de exposição.

Neste trabalho, a dose que reduziu em 25% a reprodução dos organismos foi igual a dose única de 29 Gy após 7 dias de observação, diferentemente do

estudo de Gilbin *et al.* (2008) que mantiveram os organismos expostos por 15 dias em uma dose crônica de 17 Gy e utilizaram uma fonte de radiação gama diferente da utilizada no presente estudo.

A FIG. 30 apresenta a curva de dose-resposta da média dos três ensaios de reprodução de *C. silvestrii* em função das doses de radiação gama.

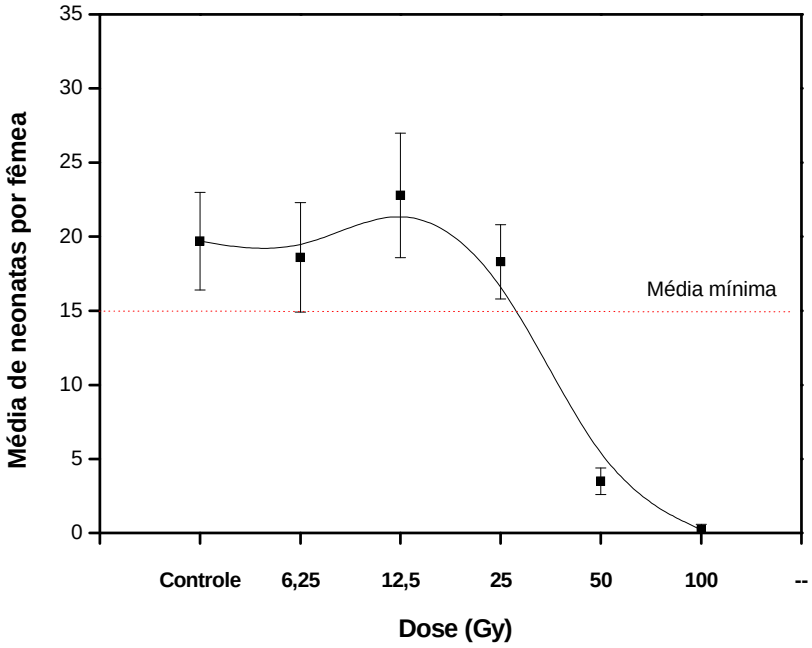


FIGURA 30 – Curva de dose-resposta da reprodução de *C. silvestrii* em função das doses de radiação gama e controle de água. Média dos três ensaios.

A curva de dose-resposta resultou em uma curva com características de efeito estocástico, onde a gravidade dos efeitos independe das doses.

É possível visualizar na dose de 12,5 Gy um aumento na reprodução dos organismos em relação às demais doses de radiação gama. Este aumento pode vir a ser uma *hormesis* que é basicamente uma resposta ao *stress* ambiental.

Segundo Chapman (2002), a *hormesis* é um efeito estimulatório que pode estender de 30 a 60% acima do nível do controle do ensaio e 10 vezes abaixo dos valores da CENO. Sobre condições baixas de *stress*, os organismos não só fazem a reparação dos danos como também compensam e reduzem os efeitos mais efetivamente.

5.3.3 Efeito da radiação gama na morfologia de *C. silvestrii*

A FIG. 31 e a TAB. 32 apresentam as modificações na morfologia das fêmeas após exposição à radiação gama.

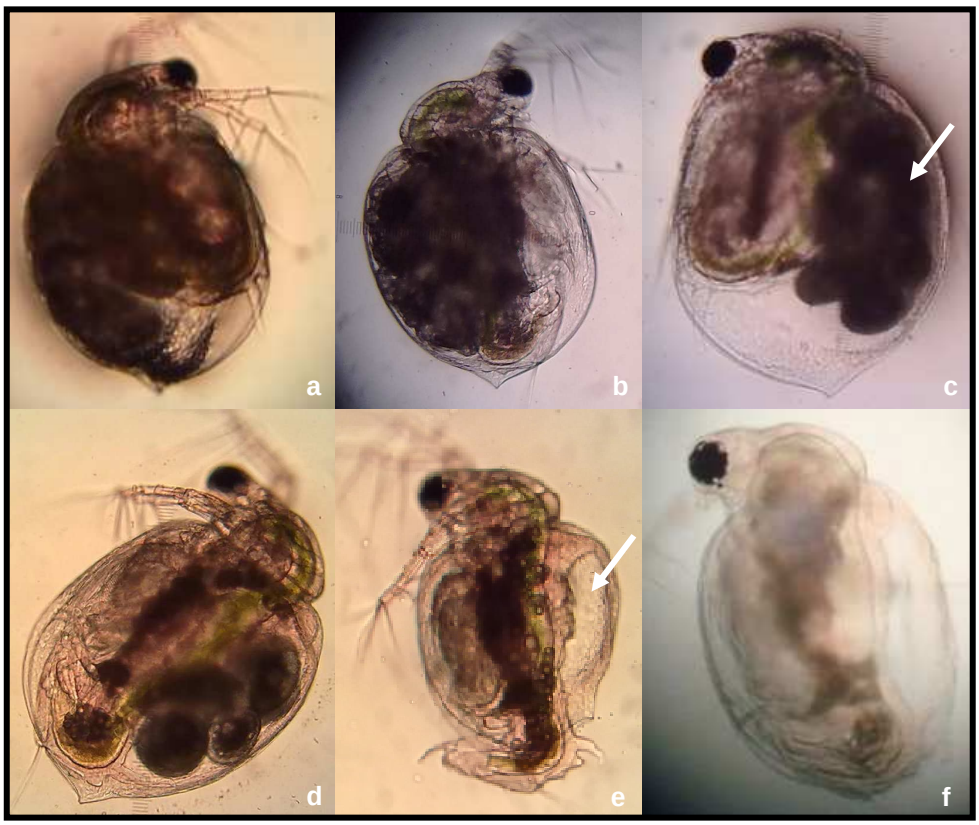


FIGURA 31 – Modificações na morfologia de *C. silvestrii* em diferentes doses de radiação gama. A até D: aumento de 10x. E e F: aumento de 100x.

TABELA 32 – Doses de radiação gama e efeitos observados nos organismos da FIG. 31.

Identificação	Dose (Gy)	Efeito
A	**Controle**	Não observado
B	**6,25**	Não observado
C	**12,5**	Aumento do tamanho corpóreo; aumento da câmara de incubação de ovos
D	**25**	Não observado
E	**50**	Redução do tamanho corporal; saliência do abdômen posterior
F	**100**	Redução do tamanho corpóreo; anomalias no funcionamento dos órgãos e coloração branca

Na dose de 100 Gy, os organismos apresentaram redução do tamanho corpóreo e coloração branca, podendo indicar mau funcionamento do sistema fisiológico.

A concentração de oxigênio no ambiente aquático pode ser um fator de *stress* no caso de exposição à radiação ionizante (DALLAS *et al*., 2012). Mustafa *et al*. (2011) associaram efeitos na fisiologia do peixe *Cyprinus carpio* aos danos no DNA provocados por hipóxia.

A partir da dose de 50 Gy observou-se a nítida redução do tamanho corpóreo, saliência do abdômen posterior, diminuição da câmara de incubação dos ovos, retardo no desenvolvimento dos embriões e redução do número de neonatas produzidas.

Na dose de 12,5 Gy, os organismos se mostraram mais túrgidos ou maiores em relação ao grupo controle, evidenciando o aumento na câmara de incubação dos ovos e consequentemente maior reprodução, o que pode ser um efeito característico de *hormesis*.

No trabalho de Marshall (1962), o autor revela a importância da competição intraespecífica do efeito da radiação ionizante em *Daphnia pulex*. Os organismos tiveram sua massa corpórea aumentada após serem irradiados. O autor atribuiu este resultado ao aumento da disponibilidade de alimento nas populações expostas a elevadas doses de radiação ionizante devido à grande taxa de mortalidade.

A falta de alimento é um *stress* biológico relativamente comum e pode ocorrer em situações de contaminação por material radioativo. Se a presa for mais radiossensível do que o predador, pode ocorrer um desequilíbrio na estrutura do nível trófico e, consequentemente, a resistência à falta de alimento pode ser um fator ecologicamente relevante a ser considerado nas avaliações de impactos da radiação ionizante (DALLAS *et al*., 2012).

5.4 Organismos irradiados e submetidos aos princípios ativos de repelente

Os organismos-teste foram irradiados com dose de 25 Gy, sendo cerca de 5% da DL_{50} e a maior dose que não causou efeito na reprodução de *C. silvestrii*.

5.4.1 Óleo essencial de capim-limão

As médias de neonatas produzidas por fêmeas irradiadas com radiação gama e posteriormente expostas ao OE estão apresentadas na TAB. 33.

TABELA 33 – Reprodução de *C. silvestrii* irradiada e não irradiada e submetida às diferentes concentrações de OE.

Concentração ($mg.L^{-1}$)	**Média de neonatas/fêmea ± σ**			**Média ± σ**
	Ensaio 1	**Ensaio 2**	**Ensaio 3**	
Controle	20 ± 1,6	18,5 ± 3,0	15,6 ± 1,6	18,0 ± 2,0
Controle + radiação	19,5 ± 1,4	17,5 ± 2,0	15,1 ± 1,7	17,4 ± 1,7
Controle DMSO	19 ± 6,9	17,5 ± 2,0	15,4 ± 2,0	17,3 ± 3,6
DMSO + Radiação	19,3 ± 1,0	17,4 ± 6,0	15,0 ± 1,3	17,2 ± 2,8
1,0	19,4 ± 2,6	18,1 ± 6,0	15,5 ± 1,3	17,7 ± 3,3
2,0	16 ± 11,3	13,5 ± 8,3	12,1 ± 2,2	13,9 ± 7,3
4,0	11,5 ± 5,0	11,3 ± 3,4	9,4 ± 2,5	10,7 ± 3,6
8,0	0,3 ± 1,0	3,4 ± 0,5	3,2 ± 3,3	2,3 ± 1,6
16,0	0,1 ± 0,4	0,2 ± 2,0	0,5 ± 0,8	0,3 ± 1,0

σ = desvio padrão

Foram considerados os seguintes grupos controles: água natural, água natural com organismos irradiados a 25 Gy, solução de DMSO e solução de DMSO com organismos irradiados a 25 Gy, vistos na FIG. 32.

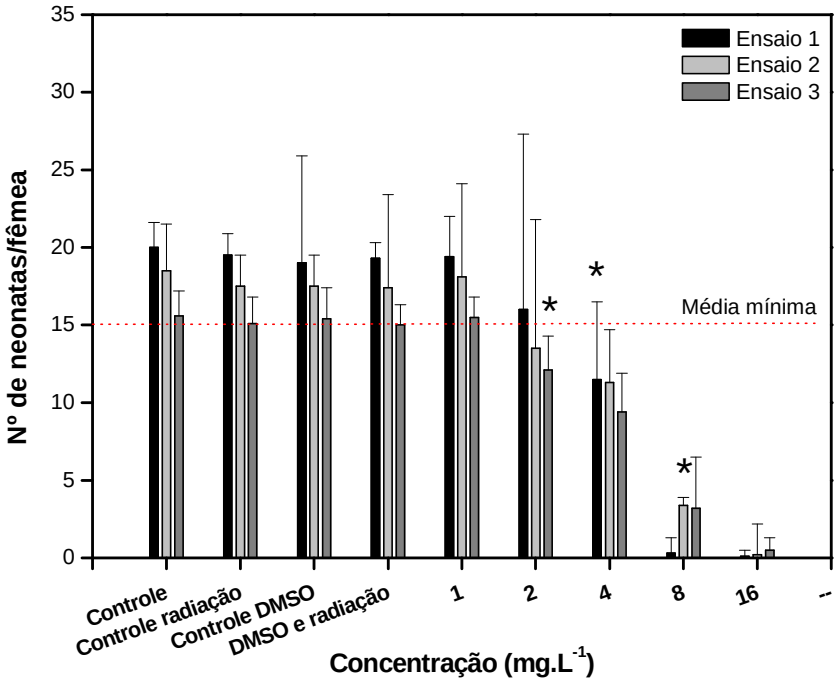


FIGURA 32 – Reprodução de *C. silvestrii* em função das concentrações de OE e os controles de água e DMSO. Controle + radiação = organismos irradiados em água natural; DMSO + radiação = organismos irradiados em solução de DMSO. *Diferença significativa (CEO) ($p < 0,05$).

O efeito estatisticamente significativo variou entre 2 e 8 $mg.L^{-1}$ de OE nos três ensaios, sendo as mesmas concentrações que causaram efeito significativo na reprodução dos organismos não irradiados.

A TAB. 34 apresenta os resultados da CEO e CENO de OE para reprodução de *C. silvestrii*.

TABELA 34 – Resultados da CENO e CEO para a reprodução de *C. silvestrii* irradiada e não irradiada e exposta ao OE.

Ensaio	Organismos irradiados		Organismos não irradiados	
	CENO	CEO	CENO	CEO
1	2	4	1	2
2	4	8	1	2
3	1	2	2	4

CENO = concentração de efeito não observado
CEO = concentração de efeito observado

Para os organismos irradiados, a CENO variou entre 1 e 4 $mg.L^{-1}$ de OE, enquanto os organismos não irradiados apresentaram entre 1 e 2 $mg.L^{-1}$. A CEO variou de 2 a 8 $mg.L^{-1}$ para os organismos irradiados e de 2 a 4 $mg.L^{-1}$ para os não irradiados.

A TAB. 35 apresenta os resultados da CI_{25} encontrados, bem como as médias e os respectivos desvios padrões.

TABELA 35 – Resultados da CI_{25} na reprodução dos organismos irradiados e não irradiados e expostos ao OE.

Ensaio	CI_{25} ($mg.L^{-1}$)	
	Irradiados	Não irradiados
1	2,6	1,7
2	2,1	4,5
3	2,5	3,1
Média	2,4	3,1
Desvio padrão	0,3	1,4
Coeficiente de variação	11%	45%

CI_{25} = concentração de inibição de 25%

Os resultados da CI_{25} para os organismos irradiados foram mais precisos, variando apenas de 2,1 a 2,6 $mg.L^{-1}$ com média igual a 2,4 $mg.L^{-1}$. E para os organismos não irradiados, de 1,7 a 4,5 $mg.L^{-1}$ com média de 3,1 $mg.L^{-1}$ de OE, como visto anteriormente.

De acordo com estes resultados, os organismos irradiados foram mais sensíveis aos efeitos dos princípios ativos.

A FIG. 33 acima apresenta as curvas de concentração-resposta dos organismos irradiados e não irradiados expostos às concentrações de OE.

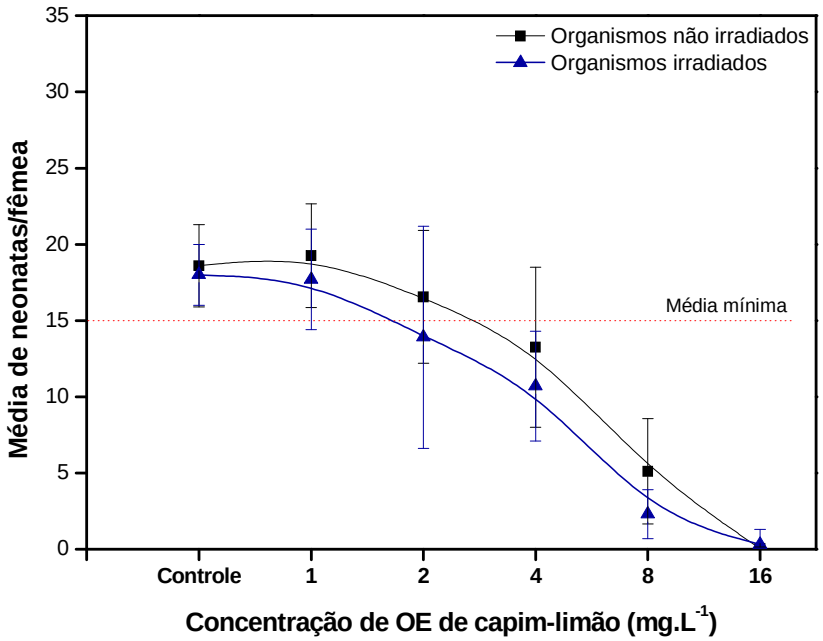


FIGURA 33 – Curvas de concentração-resposta da reprodução de *C. silvestrii* irradiada e não irradiada e exposta às concentrações de OE. Controle = água natural com organismos irradiados. Média dos três ensaios.

As curvas visualizadas na FIG. 33 mostram maior sensibilidade dos organismos irradiados quando expostos ao OE do que aqueles não irradiados.

A diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) foi calculada pelo método Teste *t* de Student (APÊNDICE M), mostrando que não houve diferença na reprodução dos organismos entre os controles de água natural e DMSO com organismos irradiados e não irradiados.

5.4.2 Dietiltoluamida

As médias de neonatas produzidas por fêmeas irradiadas com radiação gama e posteriormente expostas ao DEET estão apresentadas na TAB. 36.

TABELA 36 – Reprodução de *C. silvestrii* irradiada e submetida em diferentes concentrações de DEET.

Concentração ($mg.L^{-1}$)	Média de neonatas/fêmea ± σ			Média ± σ
	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 3	
Controle	20,4 ± 2,4	15,1 ± 2,4	16,7 ± 7,2	17,4 ± 2,7
Controle radiação	18,2 ± 3,3	15 ± 4,4	16,3 ± 4,9	16,5 ± 1,6
3,75	18 ± 4,1	14,8 ± 4,3	14,3 ± 4,6	15,7 ± 2
7,5	14,2 ± 5,2	13,3 ± 2,7	14,8 ± 1,4	14,1 ± 0,8
15,0	14,5 ± 2,9	13,1 ± 4,4	12,6 ± 5,7	13,4 ± 1
30,0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
60,0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

σ = desvio padrão

Os controles considerados foram: água natural e água natural com organismos expostos à radiação gama, vistos na FIG.34.

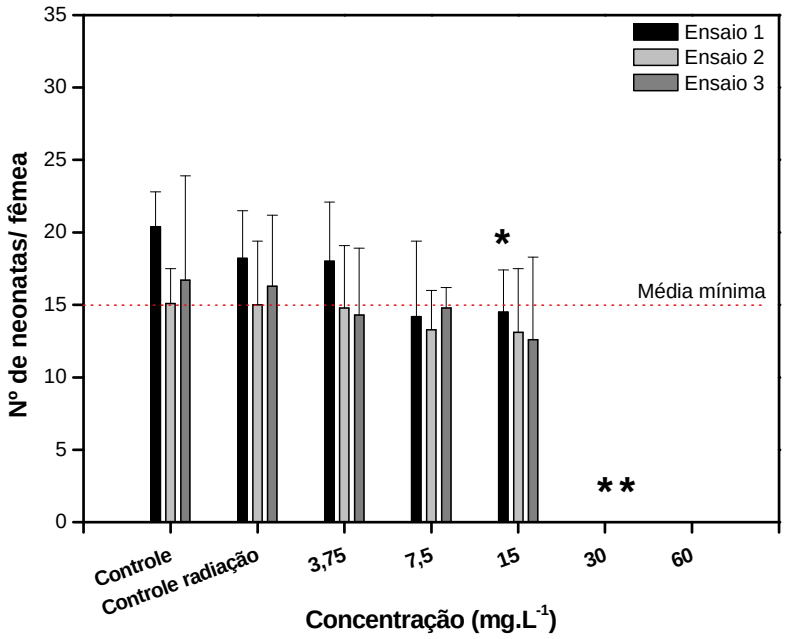


FIGURA 34 – Reprodução de *C. silvestrii* em função das concentrações de DEET e o controle de água. Controle radiação = organismos irradiados em água natural. *Diferença significativa ($p < 0,05$).

As diferenças significativas variaram de 15 $mg.L^{-1}$ para o ensaio 1 e 30 $mg.L^{-1}$ para os ensaios 2 e 3.

Nas concentrações de 30 e 60 $mg.L^{-1}$ de DEET, não houve reprodução, sendo que nestas mesmas concentrações com organismos não irradiados (FIG. 29) houve reprodução dos organismos.

A TAB. 37 apresenta os resultados da CEO e CENO para a reprodução de C. silvestrii irradiada e não irradiada e exposta ao DEET.

TABELA 37 – Resultados da CEO e CENO para a reprodução de *C. silvestrii* irradiada e não irradiada e exposta ao DEET.

Ensaio	**Organismos irradiados**		**Organismos não irradiados**	
	CENO	**CEO**	**CENO**	**CEO**
1	7,5	15	15	30
2	15	30	30	60
3	15	30	15	30

CENO = concentração de efeito não observado
CEO = concentração de efeito observado

Para os organismos irradiados, a CENO variou de 7,5 a 15 $mg.L^{-1}$ de DEET, enquanto a CEO variou entre 15 e 30 $mg.L^{-1}$. Esta variação pode ter ocorrido devido aos diferentes lotes de água que, apesar de serem provenientes do mesmo local, são coletados em períodos diferentes, contribuindo para alteração da sua composição em épocas de chuva ou qualquer outro fator físico ou químico que possa ocorre eventualmente.

A análise da CI_{25} apresentou resultados mais precisos (TAB. 38), variando de 15,4 a 17,1 $mg.L^{-1}$ de DEET com média de 16 $mg.L^{-1}$, semelhante aos valores obtidos para os organismos não irradiados, onde variou de 15 a 17,8 $mg.L^{-1}$ com média igual a 16,4 $mg.L^{-1}$.

TABELA 38 – Resultados da CI_{25} para os organismos irradiados e não irradiados expostos ao DEET.

Ensaio	CI_{25} ($mg.L^{-1}$)	
	Irradiados	Não irradiados
1	15,7	15,0
2	17,1	17,8
3	15,4	16,4
Média	16,1	16,4
Desvio padrão	0,9	1,4
Coeficiente de variação	5,6%	8,5%

CI_{25} = concentração de inibição de 25%

A FIG. 35 apresenta as curvas de concentração-resposta da reprodução de C. silvestrii irradiada e não irradiada e exposta ao DEET.

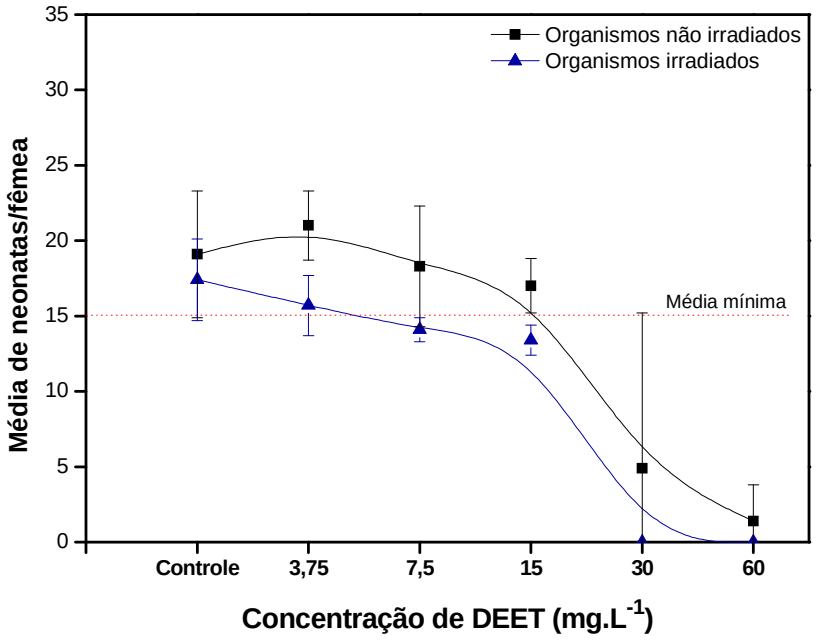


FIGURA 35 – Curvas de reprodução de *C. silvestrii* irradiada e não irradiada e exposta ao DEET. Controle = água natural com organismos irradiados. Média dos três ensaios.

Entre os controles de água natural com organismos irradiados e não irradiados, não foi verificada diferença estatisticamente significativa na reprodução, sendo avaliada pelo Teste *t* de Student ($p < 5$) (APÊNDICE M).

Para o mexilhão marinho *P. perna*, a dose de radiação gama de 11 Gy em combinação com diferentes concentrações de DEET afetou a estabilidade da

membrana lisossômica, sugerindo um possível efeito sinérgico da radiação com substâncias de potencial citotóxico (MARTINI, 2012, Comunicação Pessoal).

5.5 Variabilidade dos resultados

A variabilidade dos resultados dos ensaios pode ser medida por dois caminhos: i) pelas faixas dos valores de CENO e CEO para sobrevivência, crescimento e reprodução obtidos pelos testes de hipóteses e ii) pelos coeficientes de variação (CVs) dos ensaios de estimativas pontuais como CE_{50} e CI_{25} (HINTON, 2003).

A CENO é um parâmetro estatístico que fornece uma “concentração segura” por calcular uma concentração sem efeito significativo, mas existe uma tendência de 10 a 50% de chance de ocorrer um efeito adverso e não ser detectado pelos testes de hipóteses (MAGALHÃES e FILHO, 2008).

Os valores de CENO e CEO são cada vez menos recomendados para análises dos resultados ecotoxicológicos devido à falta de interpretação e imprecisão dos resultados que não permitem uma estimativa de uma concentração “segura” (CRANE e NEWMAN, 2000; CHAPMAN, 1997).

Os testes de hipóteses não permitem interpolações entre as concentrações utilizadas e os resultados correspondem a uma das concentrações utilizadas no ensaio. Para minimizar essa deficiência, deve ser utilizado intervalo mais estreito entre as diluições (BURATINI e BERTOLETTI, 2006).

Além disso, não permitem o cálculo de um intervalo de confiança e nos casos de ocorrência de *hormesis*, podem comprometer os resultados causando diferenças significativas e dificultando o cálculo da CENO (BURATINI e BERTOLETTI, 2006).

No presente trabalho, os resultados obtidos pelos testes de hipóteses apresentaram variações relativamente altas nos ensaios de ecotoxicidade crônica. Apesar de algumas agências ambientais, como a USEPA e a OECD não utilizarem este parâmetro devido variabilidade dos resultados, é utilizado pelas normas da ABNT NBR 12713 (2009) e 13373 (2010) e nas avaliações de risco ecológico. As variações podem ocorrer na ordem de 10 a 34% e em casos extremos, aproxima-se de 100% (CRANE e NEWMAN, 2000; MAGALHÃES e FILHO, 2008).

Conforme as variações nos resultados de CENO encontradas neste trabalho, os resultados da CEO também variaram, não mostrando uma definição sucinta da concentração tóxica para os organismos, com exceção nos ensaios de radiação gama que apresentou uniformidade nos resultados.

Os resultados da CI_{25} encontrados neste trabalho foram mais precisos em todos os ensaios. Este método de análise, interpolação linear, não se restringe a uma das concentrações-teste, permitindo determinar o valor do efeito em qualquer ponto da curva de dose-resposta (BURATINI e BERTOLETTI, 2006).

Além da precisão, este método pode ser aplicado a qualquer tipo de dados, letais ou subletais. E possibilita obtenção de intervalos de confiança, porém requer conhecimentos específicos de programas computadorizados, o que torna um procedimento trabalhoso (BURATINI e BERTOLETTI, 2006).

Neste trabalho, o método da interpolação linear se mostrou mais aplicável às análises de ecotoxicidade frente às substâncias químicas e materiais radioativos e servir como base para subsídios de análises de riscos ambientais.

5.6 Classificação dos princípios ativos conforme a diretiva 93/67/EEC da União Européia

A Resolução CONAMA nº 357/2005 que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e estabelece os padrões de lançamento de efluentes, que foi parcialmente alterada e complementada pela Resolução CONAMA nº 430/2011, lista os padrões permissíveis para substâncias orgânicas e inorgânicas bem como para coliformes fecais, onde os compostos farmacêuticos e de uso pessoal não estão inseridos.

Diante deste contexto, autores e pesquisadores brasileiros têm utilizado a diretiva 93/67/CEE da União Européia que classifica as substâncias químicas conforme os resultados obtidos a partir de ensaios ecotoxicológicos realizados com organismos padronizados expostos aos princípios ativos de produtos farmacêuticos e de cuidado pessoal.

A classificação das substâncias é feita a partir dos resultados pontuais de toxicidade (valores de CE_{50} ou CL_{50}), como visualizado na TAB. 35.

Tabela 39 – Classificação conforme a diretiva 93/67/EEC da União Européia.

Concentração ($mg.L^{-1}$)	**Classificação**
CE_{50} > 100	Não tóxico
CE_{50} entre 10 e 100	Nocivo
CE_{50} entre 1,0 e 10	Tóxico
CE_{50} entre 0,1 e 1,0	Muito tóxico
CE_{50} < 0,1	Extremamente tóxico

Com base nos resultados obtidos dos ensaios de ecotoxicidade aguda com os princípios ativos em *D. similis* e *C. silvestrii,*a toxicidade destes compostos foram classificados de acordo com a diretiva européia, visto na TAB. 36.

Tabela 40 – Classificação dos princípios ativos baseada na diretiva 93/67/EEC.

	D. similis	***C. silvestrii***
OE	Tóxico	Tóxico
DEET	Nocivo	Nocivo

Apesar de o OE ser tóxico, este composto é de origem natural e possui algumas propriedades físico-químicas que podem promover sua rápida degradação no ambiente aquático. Durante a realização dos ensaios, foi possível observar sua volatilidade e rápida degradação na presença de luz. As soluções-teste de OE não podiam ser mais utilizadas após uma semana depois de serem preparadas, cuja propriedade tóxica se reduzira.

O DEET é um composto persistente e se propaga no meio aquoso. Porém, possui baixo potencial de bioconcentração, não sendo facilmente absorvido pelos tecidos e órgãos de organismos aquáticos expostos a ele.

5.7 Estabelecimento de valores de referência para a proteção da vida aquática em ecossistemas dulcícolas

Com a finalidade de estabelecer critérios de qualidade da água sob as condições naturais brasileiras, foi realizado um *workshop* no Brasil promovido por pesquisadores, universidades, órgãos do governo e empresas, onde se elaborou uma proposta de metodologia para derivação de critérios de qualidade da água para proteção da vida aquática no Brasil. São valores numéricos ou narrativos de um determinado parâmetro de qualidade, estabelecido a partir de informações científicas que buscam garantir concentrações seguras para proteger as comunidades biológicas presentes nos ambientes aquáticos (UMBUZEIRO *et al*., 2011).

Tais critérios não são padrões legais, mas são valores orientadores que poderão ser utilizados pelos tomadores de decisão no estabelecimento de padrões e/ou regulamentações sobre a qualidade da água para preservação da vida aquática (UMBUZEIRO *et al*., 2011).

De acordo com o protocolo, o valor determinado pode ser derivado de acordo com a quantidade de dados de ecotoxicidade existentes e aplicar os fatores de avaliação (FA) específicos.

Para calcular a concentração dos princípios ativos que não causará risco ambiental, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{Valor crônico de um peixe ou invertebrado}}{100\ \text{FA}} = [\mu g.L^{-1}]$$

Deste modo, foi utilizado o menor resultado da CENO encontrado nos ensaios de ecotoxicidade crônica dos princípios ativos para *C. silvestrii*. Logo, o menor valor de CENO para o OE foi igual a 1 mg.L^{-1} e o menor valor de CENO para o DEET foi 15 mg.L^{-1}.

OE → $$\frac{1000}{100} = 10\mu g.L^{-1}$$

DEET → $$\frac{15000}{100} = 150\mu g.L^{-1}$$

Conforme os resultados obtidos pela fórmula, as concentrações dos princípios ativos que não apresentam risco ambiental foram: 10 $\mu g.L^{-1}$ de OE e 150 $\mu g.L^{-1}$ de DEET.

Foi verificado que as concentrações ambientais de DEET encontradas na literatura não ultrapassam a concentração de 150 $\mu g.L^{-1}$. E quanto ao OE, não há informações disponíveis sobre as concentrações ambientais detectadas nos ambientes aquáticos.

No entanto, este trabalho contribuiu para as informações sobre a ecotoxicidade destes princípios ativos comumente utilizados nos repelentes de insetos.

6. CONCLUSÕES

- O óleo essencial de capim-limão apresentou citotoxicidade na concentração média de 50 $mg.L^{-1}$. Enquanto o dietiltoluamida apresentou citotoxicidade na concentração média de 420 $mg.L^{-1}$.
- O óleo essencial causou efeito agudo na sobrevivência de *D. similis* e *C. silvestrii* nas concentrações médias de 7,2 e 3,8 $mg.L^{-1}$, respectivamente.
- O dietiltoluamida causou efeito agudo na sobrevivência de *D. similis* e *C. silvestrii* nas concentrações médias de 64,8 e 53,8 $mg.L^{-1}$, respectivamente.
- A reprodução de *C. silvestrii* foi reduzida significativamente em 25% na concentração média de 3,4 $mg.L^{-1}$ de óleo essencial e 16,4 $mg.L^{-1}$ de dietiltoluamida.
- O óleo essencial foi mais tóxico do que o dietiltoluamida tanto nos ensaios *in vitro* de citotoxicidade quanto para os organismos-teste *D. similis* e *C. silvestrii*.
- A $DL_{50/48h}$ de radiação gama para *D. similis* foi de 242 Gy e para *C. silvestrii* igual a 525 Gy.
- A dose de 29,2 Gy reduziu 25% da reprodução de *C. silvestrii*.
- Não foi observada diferença estatisticamente significativa na reprodução de *C. silvestrii* irradiada na dose de 25 Gy e não irradiada e exposta aos princípios ativos.
- O óleo essencial de capim-limão foi classificado como substância tóxica. Enquanto o dietiltoluamida foi classificado como substância nociva.
- O risco ecológico encontrado para os princípios foi de 10 $\mu g.L^{-1}$ para o óleo essencial e 150 $\mu g.L^{-1}$ para o DEET.
- Os resultados dos ensaios de ecotoxicidade crônica, obtidos pela interpolação linear (CI_{25}), mostraram-se mais precisos do que aqueles obtidos pela CENO e CEO.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIQUIM – Associação Brasileira da Indústria Química. **A nova política de substâncias químicas da União Européia – REACH**. 10p. 2007.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Aguda** – Método de Ensaio com *Daphnia spp*. (Crustacea, Cladocera). Norma ABNT-NBR 12713. 21p. 2009.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade Crônica** – Método de Ensaio com *Ceriodaphnia spp*. (Crustacea, Cladocera). Norma ABNT-NBR 13343. 15p. 2010.

ABOU-DONIA, M.B; DECHKOVSKAIA, A.M.; GOLDSTEIN, L.B.; ABDEL-RAHMAN, A.; BULLMAN, S.L.; KHAN, W.A. Co-exposure to pyridostigmine bromide, DEET and/or permethrin causes sensorimotor deficit and alterations in brain acetylcholinesterase activity. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 77:253-262. 2004.

AGHAMIRI, S. M. R.; GHORBANI, Z.; DARAFSHEH, A.; TORABZADEH, H.; FATHIVAND, A. A.; MINICHEHR, A.; JALINOOS, A. ^{226}Ra concentration in the teeth of habitants of areas with high level of natural radioactivity in Ramsar. **Journal Environmental Radioactivity.** 89:212-218. 2006.

AMER, A.; MEHLHORN, H. Larvicidal effects of various essential oils against *Aedes, Anopheles, and Culex* larvae (Diptera, Culicidae). **Parasitoly Research**. 99: 466-476. 2006.

ANGIONI, A.; BARRA, A.; CORONEO, V.; DESSI, S.; CABRAS, P. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 54:4364-4370. 2006.

ANDERSON, P.; GARNIER-LAPLACE, J.; BERESFORD, N. A.; COPPLESTONE, D.; HOWARD, B. J.; HOWE, P.; OUGHTON, D.; WHITEHOUSE, P. Protection of the environment from ionizing radiation in a regulatory context (protect): proposed numerical benchmark values. **Journal of Environmental Radioactivity**. 100:1100-1108. 2009.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consulta Pública nº 20, de 12 de março de 2012**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br> Acesso em: 8 de novembro de 2012.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Parecer Técnico Nº 2 de 11 de dezembro de 2006**. Câmara Técnica de Cosméticos – CATEC. Utilização do DEET em preparações de repelentes para insetos. 2006. Disponível em: <www.anvisa.gov.br/cosmeticos/informa/parecer_deet> Acesso em: 8 de abril de 2010.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de Ensaios de Toxicidade com Organismos Aquáticos. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia: Princípios e aplicações**. Editora Rima. São Carlos. 464p. 2006.

ATTAR, M.; KONDOLOUSY, Y. M.; KANSARI, N. Effect high dose natural ionizing radiation on the immune system of the exposed residents of Ramsar town, Iran. Original Article. **Iran Journal Allergy Asthma Immunology**. 6(2): 73-78. 2007.

BACQ, Z. M.; ALEXANDER, P. Fundamentals of radiobiology. 2nd ed. **Pergamon Press**. New York. 1961.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essentiol oils – A review. **Food and Chemical Toxicology.** 46:446-75. 2008.

BLAYLOCK, B. G. Effects on aquatic biota of radioactive effluents from nuclear power stations. **Transactions of the American Nuclear Society**. 18:46-47. 1974.

BRASIL. **CONAMA. Resolução Federal nº 357**. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília. Diário da União, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação de corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.

BRASIL. **CONAMA. Resolução Federal nº 430**. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Brasília. Diário da União, de 13 de maio de 2011. Complementa e altera a Resolução nº 357/2005. Dispõe sobre a classificação de corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.

BRAUSCH, J. M.; RAND, G. M. A review of personal care products in aquatic environment: Environmental concentrations and toxicity. **Chemosphere**. 82:1518-1532. 2011.

BUIKEMA, A. L.; SHERBERGER, S. R. ***Daphnia***. Carolina Tips. 15(10):1-5. 1977.

BURATINI, S. V.; BERTOLETTI, E. Análise estatística. In: Ecotoxicologia aquática: Princípios e aplicações. ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Editora Rima**. 221-249. 2006.

CABALLERO-GALLARDO, K.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. E. Repellency and toxicity of essential oils from *Cymbopogon martini*, *Cymbopogon flexuosus* and *Lippia origanoides* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*. **Journal of Stored Products Research**. 50:62-65. 2012.

CALZA, P.; MEDANA, C.; RASO, E.; GIANCOTTI, V.; MINERO, C. N,N-diethyl-m-toluamide transformation in river water. **Science of the Total Environment**. 409:3894-3901. 2011.

CDC – Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: <www.cdc.gov> Acesso em: 29 de abril de 2010.

CESAR, A.; MARÍN-GUIRAO, L.; VITA, R.; MARÍN, A. Sensibilidad de anfipodos y erizos Del Mar Mediterrâneo a substâncias tóxicas de referência. **Ciências Marinas**. 28(4):407-417. 2002.

CHAPMAN, P. M. Ecological risk assessment (ERA) and hormesis. **The Science of the Total Environment**. 288:131-140. 2002.

CHAPMAN, P. OECD Workshop recommends phasing out NOECs for aquatic toxicity test. **Marine pollution Bulletin**. 34(3):145-156. 1997.

CHOPPIN, G.; RYDBERG, J.; LILJENZIN, J. O. **Radiochemistry and Nuclear Chemistry**. Oxford: Butterworth-Heinemann. 480p. 1995.

CNEN – Comissão Nacional de Energia Nuclear. Japão – **Boletim Diário. Informações sobre o acidente na Central Nuclear de Fukushima Dai-ichi e dados sobre as condições ambientais**. Acesso em: <E:\RADIAÇÃO IONIZANTE\Acidentes nucleares no Japão\CNEN_notícias de Fukushima.mht> Acesso em: 9 de dezembro de 2011.

CORDY, G.E.; DURAN, N.L.; BOUWER, H.; RICE, R.C.; FURLONG, E.T.; ZAUGG, S.D.; MEYER, M.T.; BARBER, L.B.; KOLPIN, D.W. Do Pharmaceuticals, Pathogens, and Other Organic Waste Water Compounds Persist When Waste Water is used for Recharge? **Ground Water Monitoring & Remediation.** 24(2):58-69. 2004.

CORTEZ, F. S. **Avaliação ecotoxicológica do fármaco Triclosan para invertebrados marinhos**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN. Universidade de São Paulo – USP. São Paulo. 218p. 2011.

CORRIGEN, D. *Cymbopogon* species. In: DE-SMET, P.A.G.M.; KELKER, K.; HANSEL, R.; CHANDLER, R.F. Adverse effects on herbal drugs. **Springer-Verlag**. 115-123.1992.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**. 31(7):1820-1830. 2008.

COSTANZO, S.D.; WATKINSON, A.J.; MURBY, E.J.; KOLPIN, D.W.; SANDSTROM, M.W.; Is there a risk associated with the insect repellent DEET (*N,N*-diethyl-m-toluamide) commonly found in aquatic environments? **Science of the Total Environment**. 384:214-220. 2007.

CRANE, M.; NEWMAN, M. C. What level of effect is a no observed effect? **Environmental Toxicology and Chemistry**. 19(2):516-519. 2000.

CRISP, T. M.; CREGG, E. D.; COOPER, R. L.; WOOD, W. P.; ANDERSON, D. G.; BAETCKE, K. P.; HOFFMANN, J. L.; MORROW, M. S.; RODIER, D. L.; SCHAEFFER, J. E.; TOUART, L. W.; ZEEMAN, M. G.; PATEL, Y. M. **Special report on environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis. Prepared for the risk assessment forum U.S.** Environmental Protection Agency – Office of Research and Development. EPA/630/R-96/012. 120p. 1997.

CRUZ, A.S. Teste de Citotoxicidade *in vitro* como alternativa ao teste *in vivo* de draize na avaliação de produtos cosméticos. **Tese de Doutorado**. Fármacos e medicamentos – Área de produção e controles farmacêuticos. Universidade de São Paulo. São Paulo. 107p. 2003.

CRUZEIRO DO SUL – **Jornal Cruzeiro do Sul**. Raios gama preocupam mais que césio em Fukushima, Sorocaba, 27 ago. 2012. Disponível em: <www.cruzeirodosul.inf.br> Acesso em: 13 setembro 2012.

DALLAS, L. J.; KEITH-ROACH, M.; LYONS, B. P.; JHA, A. N. Assessing the impact of ionizing radiation on aquatic invertebrates: A critical review. **Radiation Research**. 177:693-716. 2012.

DAVIS, E.E. Insect repellents: Concepts of their mode of action relative to potential sensory mechanisms in mosquitoes (Diptera, Culicidae). **Journal of Medical Entomology**. 22:237-43. 1985.

DEZOTTI, M. Processos e técnicas para o controle ambiental de efluentes líquidos. In: DEZOTTI, M. Processos e técnicas para o controle ambiental de efluentes líquidos. Série Escola Piloto em Engenharia Química. COPPE/UFRJ. 2008. Disponível em: <books.google.com.br/books> Acesso em: 3 dez. 2012

DIRETIVA EUROPÉIA. **Diretiva 93/67/CEE da Comissão**, de 20 de julho de 1993. Estabelece os princípios para avaliação dos riscos para o homem e para o ambiente das substâncias notificadas em conformidade com a Diretiva 67/548/CEE do Conselho.

DOGAN, E.B.; AYRES, J.W.; ROSSIGNOL, P.A. Behavioural mode of action of DEET: Inhibition of lactic acid attraction. **Medical and Veterinary Entomology**. 13:97-100. 1999.

DOMINGUES, D. F.; BERTOLETTI, E. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. Editora Rima. São Carlos. 2006.153-182.

DOWD, S.B.; TILSON, E.R. **Practical radiation protection and applied radiobiology**. 2nd ed. Philadelphia, P.A.: Saunders Company, 1999.

EDITORIAL. The international conference on radioecology and environmental radioactivity. **Journal of Environmental Radioactivity**. 100:999-1001. 2009.

EGGEN, T.; MOEDER, M.; ARUKWE, A. Municipal landfill leachates: A significant source for new and emerging and pollutants. **Science of the Total Environment**. 408:5147-5157. 2010.

ENGEL, D. W.; DAVIS, E. M.; ANGELOVIC, J. W.; SMITH, D. E.; Effect of radiation, salinity, and temperature on the ionic regulation of the blue crab (*Callinectes sapidus*). In: NELSON, D. J. Editor. Radionuclides in ecosystems: Proceedings of the Third National Symposium on Radioecology. Alexandria, VA. **National Technical Information Service**. 1113-1118. 1971.

ENVIRONMENT CANADA. **Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants**. Report EPS 1/RM/12. 85p. 1990.

EUROPEAN COMMISSION – **Environment fact sheet: REACH – A new chemicals for the EU**. 4p. [*s.d.*] Disponível em: <ec.europa.eu/environment/pubs/pdf/factsheets/reach.pdf> Acesso em: 30 set. 2012.

FAJARDO, L.F.; NERTHRONG, M.; ANDERSON, R. E. **Radiation pathology**. New York. NY. Oxford. 2001.

FERQUIMA. Especificações técnicas – **Óleo essencial de lemongrass (*Cymbopogon flexuosus*)**. Disponível em: < http://www.ferquima.com.br/pdf> Acesso em: 28 de junho de 2010.

GETOFF, N. Radiation-induced degradation of water pollutants-state of the art. **Radiation Physics and Chemistry**. 47. 581-593. 1996.

GILBIN, R.; ALONZO, F.; GARNIER-LAPLACE, J. Effects of chronic external gamma irradiation on growth and reproductive success of *Daphnia magna*. **Journal of Environmental Radioactivity**. 99:134-145. 2008.

GHIASSI-NEJAD, M.; MORTAZAVI, S. M. J.CAMERON, J. R.; NIROOMAND-RAD, A.; KARAN, P. A. Very high background radiation areas of Ramsar, Iran: preliminary biological studies. **Health Physics**. 82(1): 87-93.2002.

GLASSMEYER, S.T.; FURLONG, E.T.; KOLPIN, D.W.; CAHILL, J.D.; ZAUGG, S.D.; WERNER,S.L. Transport of chemical and microbial compounds fromknown wastewater discharges: potential for use as indicators of human fecal contamination. **Environmental Science Technology**. 39:5157–69. 2005.

GOLOB, P.; MOSS, C.; DALES, M.; FIDGEN, A.; EVANS, J.; GUDRUPS, I. The use of spices and medicinal as bioactive protectans for grains. In: FAO **Agricultural Services Bulletins**. 137. Italy. 1999.

GOMES, E.C.; NEGRELLE, R.R.B. *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf: Aspectos Botânicos e Ecológicos. **Visão Acadêmica**. 4(2):137-144. 2003.

HAJHASHEMI, V.; GHANNADI, A.; SHARIF, B. Anti-inflammatory and analgesic properties of the leaf extracts and essential oil of *Lavandula angustifolia*. **Journal of Etnopharmacology**. 89:67-71. 2003.

HAMILTON, M.A., RUSSO, R.C., THURSTON, R.V. Trimmed Spearman–Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science & Technology**. 11(7):714-719. 1977.

HANSCH, C.; LEO, A.; HOEKMAN, D. Exploring QSAR – Hidrophobic, electronic and steric constants. **American Chemical Society**. Washington, D.C. 103p. 1995.

HEBERER, T. Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. **Journal of Hidrology**. 266:175-189. 2002.

HINTON, T. G. Risks from exposure to radiation. In: NEWMAN, M. C. **Fundamentals of Ecotoxicology**. 2nd ed. CRC Press/ Lewis Publishers. Boca Raton, FL. p.303-304. 2003.

IAEA – International Atomic Energy Atomic. **Fukushima Daiichi Report**. 10p. 2012. Disponível em: <www.iaea.org/newscenter/focus/fukushima> Acesso em: 3 de março de 2012.

IAEA – International Atomic Energy Atomic. Radiation**, people and the environment.** IAEA/PI/A.75 / 04-00391. 86p. 2004.

IAEA – International Atomic Energy Atomic. **Effects of ionizing radiation on aquatic organisms and ecosystems**. Technical Report Series. 172. Vienna. 1976.

ISO – International Standard: Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5 – **Tests for Cytotoxity *in vitro* methods**. ISO 10993-5. 2009.

IPEN – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. **Notícias em foco: Projetos para dispositivos repelentes naturais de mosquitos é desenvolvido no IPEN**. IPEN – Autarquia associada à Universidade de São Paulo (USP). Disponível em: <https://www.ipen.br/sitio> Acesso em: 1 de julho de 2010.

JHA, A. N.; DOGRA, Y.; TURNER, A.; MILLWARD, G. E. Impact of low doses of tritium on the marine mussel, Mytilus edulis: Genotoxicic effects and tissue-specific bioconcentration. **Mutation Research**. 586:47-57. 2005.

KIM, I. S.; REN, X.; CHANG, J. S.; LEE, J. K.; YU, H. W.; KIM, S. J.; HEO, J. S.; JANG, A.; HAN, H. J. The effect of environmental micropollutant (DEET) on the expression of cell cycle and apoptosis regulatory proteins in humans cells. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**. 16:400-406. 2011.

KOLPIN, D.W.; SKOPEC, M.; MEYER, M.T.; FURLONG, E.T.; ZAUGG, S.D. Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. **Science of the Total Environment** 328:119-130. 2004.

KNOWLES, J. F.; GREENWOOD, L. N. A comparison of the effects of long-term β and γ irradiation on the reproductive performance of a marine on invertebrate *Ophryotrocha diadema* (Polychaeta, Dorvilleidae). **Journal of Environmental Radioactivity**. 34:1-7. 1997.

LAMEIRA, V. Estudo dos efeitos letais e subletais (reprodução e teratogênese) do fármaco Triclosan para Daphnia similis, Ceriodaphnia dubia e Ceriodaphnia silvestrii (CLADOCERA, CRUSTACEA). **Dissertação de Mestrado**. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN. Universidade de São Paulo – USP. São Paulo. 209p. 2008.

LEBOWITZ, H.; YOUNG, R.; KIDWELL, J.; McGOWAN, J.; LAGLOSS, J.; BRUSICK, D. DEET (N,N-diethyltoluamide) does not affect sperm number, viability and head morphology in male rats treated dermally. **Drug and Chemical Toxicology**. 6:379-395. 1983.

MAGALHÃES, D. P.; FILHO, A. S. F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**. 12(3):355-381. 2008.

MARSHALL, J. S. The effects of continuous gamma radiation on the intrinsic rate of natural increase of *Daphnia pulex*. **Ecology**. 43(4):598-602. 1962.

MARTINI, G. A. Avaliação da toxicidade do dietiltoluamida (DEET) em mexilhões *Perna perna* (Linnaeus, 1758). In: **XII CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA**, 25-28 setembro, 2012, Resumos. Pernambuco, REC.

MASOTTI, V.; JUTEAU, F.; BESSIE'RE, J.M.; VIANO, J. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 51:7115-7121. 2003.

MEYERS-SCHÖNE, L.; TALMAGE, S. S. Nuclear and Thermal. In: HOFFMAN, D. J.; BARNETT, A.; RATTNER, G.; BURTON, A. J.; CAIRNS, J. J. (Ed.) **Handbook of Ecotoxicology**. 2nd ed. CRC Press. 2002.

MEZZACAPPA, M. **Sabonete repelente pode ser coadjuvante no combate à dengue**. Com Ciência SBPC/Labjor. Revista eletrônica de jornalismo científico. 2008. Disponível em: <www.cenargen.embrapa.br> Acesso em: 10 de maio de 2010.

METTLER JUNIOR, F.A.; UPTON, A.C. **Medical effects of ionizing radiation**. 2nd ed. Philadelphia, P.A. Saunders Company, 1995.

MOORE, M. N.; DEPLEDGE, M. H.; READMAN, J. W.; LEONARD, D. R. P. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk environmental management. **Mutation Research**. 552:247-268. 2004.

MULROY, A. When the cure is the problem. **Water Environment Technology**. 13(2):32-36. 2001.

MUSTAFA, S. A.; AL-SUBIAI, S. N.; DAVIES, S. J.; JHA, A. N.; Hypoxia-induced oxidative DNA damage links with higher level biological effects including specific growth rate in common carp, *Cyprinus carpio*. **Ecotoxicology**. 20(6):1455-1466. 2011.

NCRP – National Council on Radiation Protection and Measurements. **Effects of ionizing radiation on aquatic organisms**. Bethesda, MD. Report nº 109. 115p. 1991.

NEWMAN, M. C.; ZHAO, Y. Ecotoxicology nomenclature: LC, LD, LOEC and MAC. **Encyclopedia of Ecology**. 1187-1193. 2008.

NPIC – National Pesticide Information Center. DEET: Technical fact sheet. Oregon State University and U. S. Environmental Protection Agency (USEPA). 9p. [*s.d.*]

OECD – Organisation for Economic Co-Operation and Development. **The application of biotechnology to industrial sustainability – A primer**. Sustainable Development. 19p. 2001.

OYEDELE, A. O.; GBOLADE, A. A.; SOSAN, M. B.; ADEWOYIN, F. B.; SOYELU, O. L.; ORAFIDIYA, O. O. Formulation of an effective mosquito-repellent topical product from lemongrass oil. **Phytomedicine**. 9:259-262. 2002.

PALUCH, G.; BARTHOLOMAY, L.; COATS, J. Mosquito repellents: a review of chemical structure diversity and olfaction. **Pest Management Science**. 66:925-935. 2010.

PENTREATH, R. J. Radioecology, radiobiology and radiological protection: frameworks and fractures. **Journal of Environmental Radioactivity**. 100. 1019-1026. 2009.

PERRY, N.S.; BOLLEN, C.; PERRY, E.K.; BALLARD, C. Salvia for dementia therapy: review of pharmacological activity and pilot tolerability clinical trial. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. 75:651-659. 2003.

PUSHPANATHAN, T.; JEBANESAN, A.; GOVINDARAJAN, M. Larvicidal, Ovicidal and Repellent Activities of *Cymbopogon citratus* Stapf (Graminae) Essencial Oil Against the Filarial Mosquito *Culex quinquefasciatus* (Say) (Diptera:Culicidae). **Tropical Biomedicine**. 23(2):208-212. 2006.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; McCARTY, L. S. Introduction to aquatic ecotoxicology. In: **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects,**

Environmental Fate and Risk Assessment. 2nd. Ecological Services Inc. North Palm Beach, FL. 1125p. 1995.

RAVERA, O. The effect x-rays on the demographic characteristics of *Physa acuta* (Gastropoda, Basommatophora). **Malacologia**. 5:95-109. 1967.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**. 6(3):317-320. 2003.

SARAPULTSEVA, E. I.; BYCHKOVSKAYA, I. B. Peculiar disturbing effects of low radiation – Unusual damaging effects of low level radiation: Model experiments with Protozoa and Invertebrates. **Proceedings of Third European IRPA Congress** 2010, June 14-16. Helsinki, Finland. Oral presentation. Disponível em: <http://www.irpa2010europe.com/proceedings/S09/S09-05.pdf> Acesso em: 30 de junho de 2010.

SHARMA, P. R.; MONDHE, D. M.; MUTHIAH, S.; PAL, H. C.; SHAHI, A. K.; SAXENA, A.K.; QAZI, G.N. Anticancer activity of an essential oil from *Cymbopogon flexuosus*. **Chemico-Biological Interactions**. 179. 160-168. 2009.

SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S. M.; DUARTE, V. G.; MACHADO, M. I. L.; MATOS, F. J. A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. **Journal of Etnopharmacology**. 89:277-283. 2003.

SINGH, S.P.; AZUA, A.; CHAUDHARY, A.; KHAN, S.; WILLETT, K.L.; GARDINALI, P.R. Occurrence and distribution of steroids, hormones and selected pharmaceuticals in South Florida coastal environments. **Ecotoxicology**. 19:338-350. 2010.

SMID, E.J.; GORRIS, L.G.M. Natural antimicrobials for food preservation. In: RAHMAN, M.S. **Handbook of Food Preservation**. Marcel Dekker. New York. 285-308. 1999.

STACKELBERG, P.E.; FURLONG, E.T.; MEYER, M.T.; ZAUGG, S.D.; HENDERSON, A.K.; REISSMAN, D.B. Persisctence of pharmaceutical compounds and other organic wastewater contaminants in a conventional drinking-water-treatment plant. **Science of the Total Environment**. 329.99-113.2004.

SUDAKIN, D. L.; TREVATHAN, W. R.; DEET: A review and update of safety and risk in the general population. **Journal Toxicology Clinical Toxicology**. 41:831-839. 2003.

SUI, Q.; HUANG, J.; DENG, S.; YU, G.; FAN, Q. Occurrence and removal of pharmaceuticals, caffeine and DEET in wastewater treatment plants of Beijing, China. **Water Research**. 44:417-426. 2010.

SUMPTER, J. P. Xenoendocrine disrupters – environmental impacts. **Toxicology Letters**. 102-103:337-342. 1998.

TASKINEN, J.; MATHELA, D.K.; MATHELA, C.S. Composition of the essential oil of *Cymbopogon flexuosus*. **Journal of Chromatography**. 262. 364-366. 1983.

TAY, K. S.; RAHMAN, N. A.; ABAS, N. R. B. degradation of DEET by ozonation in aqueous solution. **Chemosphere**. 76:1296-1302. 2009.

TERNES, T. A. Editorial to special issue in water research emerging contaminants in water. **Water Research**. 44:351. 2010.

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. **Science of the Total Environment**. 225(12):81-90. 1999.

TERNES, T. A. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. **Water Research**. 32(11):3245-3260. 1998.

TISCH, M.; SCHMEZER, P.; FAULDE, M.; GROH, A.; MAIER, H. Genotoxicity studies on permethrin, DEET and diazinon in primary human nasal mucosa cells. **European Archives of Otorhinolaryngology**. 259:150-153. 2002.

TULEY DE SILVA, K. **A manual on the essential oil industry**. United Nations Industrial Development Organization. Vienna. 1996.

TURMA DO PEDAL. **Discussion Topics: Mudança da fórmula do repelente Exposis® e ineficácia da nova**. 2009. Disponível em: <turmadopedal.groupsite.com/discussion/topic> Acesso em: 29 de abril de 2010.

UMBUZEIRO, G. A.; SIMONE, S.; DEUS, A. C. C. R.; ALTAFIN, L.; VEIGA, L. F.; ALVES, L. S. N.; CASTRO, M. L. M. P.; LAMPARELLI, M. C.; OHE, P. V. D.; ARAUJO, R. P. A.; VARGAS, V. M. F. **Protocolo para derivação de critérios de qualidade da água para proteção da vida aquática no Brasil**. Universidade de Campinas – UNICAMP. Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental – SBMCTA. Campinas, SP. 55p. 2011.

USEPA/FDA/NOAA – United States Environmental Protection Agency; United States Food and Drug Administration; National Oceanic and Atmospheric Administration. U. S. **Seafood Safe and Unaffected by Radiation Contamination from Japanese Nuclear Power Plant Incident**; U. S. Monitoring Control Strategy Explained. 2011.

USEPA – U. S. Environment Protection Agengy. Ionizing Radiation – Fact Book. **Office of radiation and indoor air**. EPA-402-F-06-061. 22p. 2007.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms.** Fifth edition. EPA-821-R-02-012. 266p. 2002a.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. Fifth edition. EPA-821-R-02-013. 335p. 2002b.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Reregistration Eligibility Decision (RED) DEET**. Prevention, pesticides and toxic substances. EPA 738-R-98-010. 134p. 1998.

USEPA – United States Environmental Protection Agengy. **Pharmaceulticals and Personal Care Products (PPCPs)**. [*s.d.*] Disponível em: <www.epa.gov/ppcp> Acesso em: 15 jun. 2012.

WEST, I.; GULLEY, D. Western Ecosystems Technology. **TOXSTAT 3.4 Computer Program**. 1994.

WEIGEL, S.; BERGER, U.; JENSEN, E.; KALLENBORN, R.; THORESEN, H.; HUHNERFUSS, H. Determination of selected pharmaceuticals and caffeine in sewage and sweater from Tromso/ Norway with emphasis on ibuprofen and its metabolites. **Chemosphere**. 56:583-592. 2004.

WHICKER, F. W.; SCHULTZ, V. Radioecology: Nuclear energy and environment. **CRC Press**. Boca Raton, FL. 212(1). 228p. 1982.

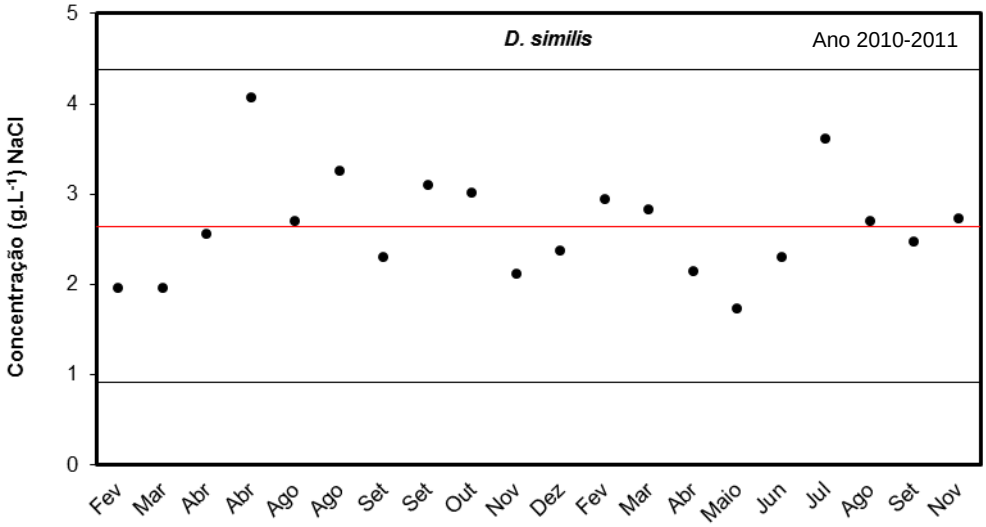
WHO e FAO – World Health Organization; Food and Agriculture Organization of United Nations. **Impact on seafood safety of the nuclear accident in Japan**. 2011.

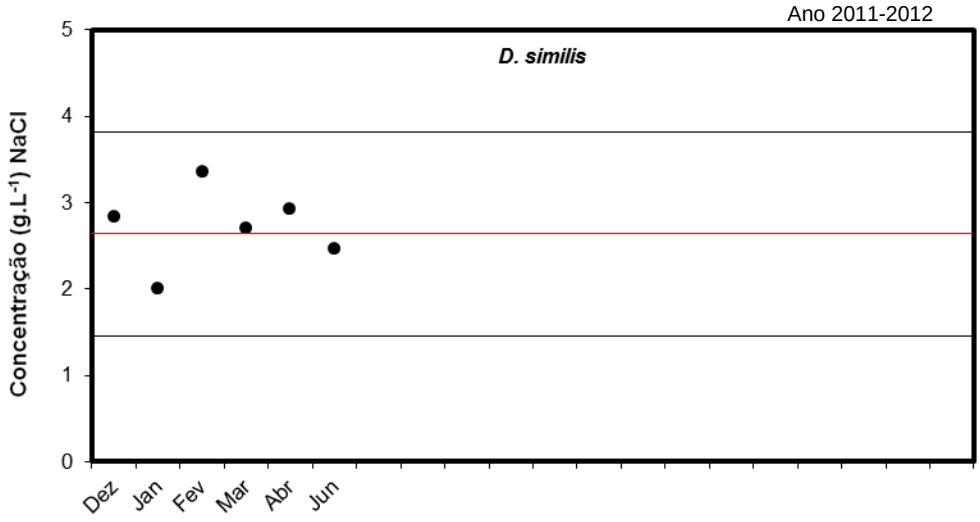
YALKOWSKY, S. H.; HE, Y. Handbook of aqueous solubility data: An extensive compilation of aqueous solubility data for organic compounds extracted from the AQUASOL DATABASE. **CRC Press**. 1496p. 2003.

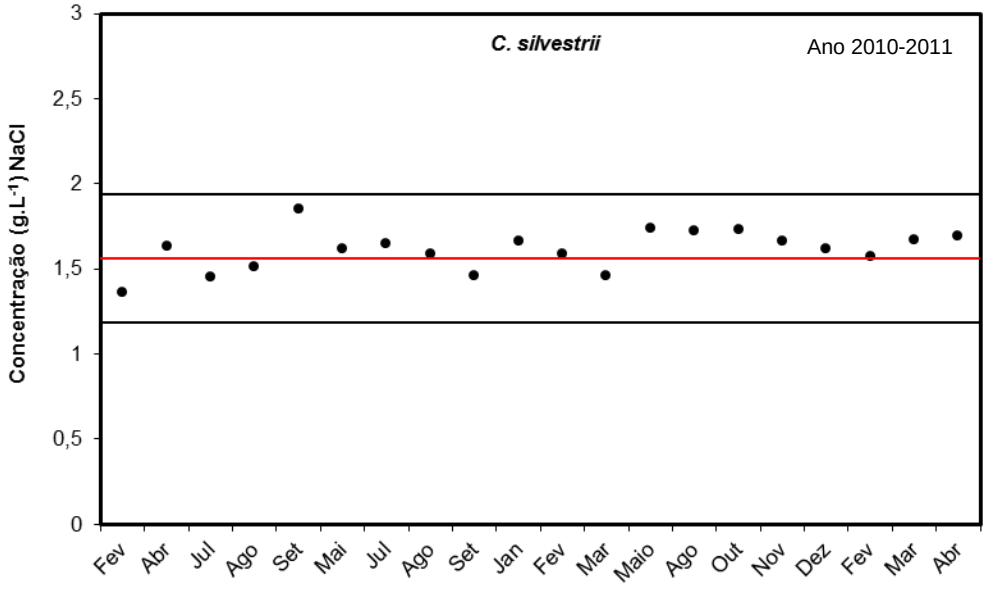
YANG, X.; FLOWERS, R. C.; WEINBERG, H. S.; SINGER, P. C. Occurrence and removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in an advanced wastewater reclamation plant. **Water Research**. 45:5218-5228. 2011.

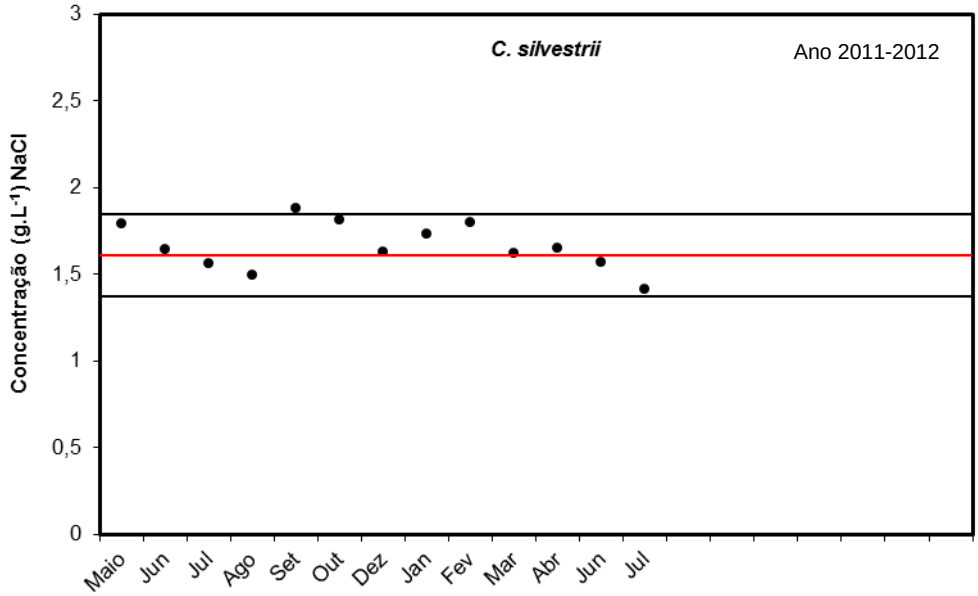
APÊNDICES

APÊNDICE A – Cartas-controle de sensibilidade para *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii*


D. similis
Ano 2010-2011
Concentração (g.L-1) NaCl
0
1
2
3
4
5
Fev
Mar
Abr
Abr
Ago
Ago
Set
Set
Out
Nov
Dez
Fev
Mar
Abr
Maio
Jun
Jul
Ago
Set
Nov


Ano 2011-2012
D. similis
Concentração (g.L-1) NaCl
0
1
2
3
4
5
Dez
Jan
Fev
Mar
Abr
Jun


C. silvestrii
Ano 2010-2011
Concentração (g.L-1) NaCl
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Fev
Abr
Jul
Ago
Set
Mai
Jul
Ago
Set
Jan
Fev
Mar
Maio
Ago
Out
Nov
Dez
Fev
Mar
Abr


C. silvestrii
Ano 2011-2012
Concentração (g.L-1) NaCl
3
2,5
2
1,5
1
0,5
0
Maio
Jun
Jul
Ago
Set
Out
Dez
Jan
Fev
Mar
Abr
Jun
Jul

APÊNDICE B – Parâmetros de qualidade da água de cultivo e de diluição

Data	Lote	pH	OD (mg.L-1)	Dureza (mg.L CaCO3)	Condutividade (μS_{25}/cm)
dez/10	71	6,3	7,93	20	97,6
jan/11	72	-	6,95	15	47,5
fev/11	73	-	14,52	20	114,1
mar/11	74	-	6,78	18	61,1
abr/11	75	-	7,38	18	76,4
jun/11	76	-	8,1	20	92,6
jul/11	77	-	8	20	76,5
ago/11	78	-	5,27	26	82,9
set/11	79	5	8,7	17	82,3
out/11	80	6,85	8,28	23	89,8
nov/11	81	6,69	8,19	20	104,5
dez/11	82	6,86	8,04	20	153,8
jan/12	83	7,5	-	20	137,1
mar/12	84	6,82	-	20	79,2
abr/12	85	7,5	-	20	139,2
mai/12	86	7,43	-	20	147,8
jun/12	87	6,73	-	15	135
jul/12	88	7,07	-	20	86,6
ago/12	89	7,25	-	20	89,1

- = medida não realizada; oxímetro quebrado.

APÊNDICE C – **Ensaios de ecotoxicidade aguda com os princípios ativos**

Teste de avaliação da toxicidade aguda do óleo 180 para D. similis

Ensaio 1

Início: 07/06/11 Término: 09/06/11 Resultado: CE50 = 7,60 mg/L (6,94 - 8,32)

Concentração (mg/L)	Número de organismos imóveis/mortos 48 horas						pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	1	2	3	4	Total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle	0	0	0	0	0	0	7,0	7,0	138,9	137,5	7,5	7,1
3,8	0	0	0	0	0	0	7,0	7,1	139,5	135,0	7,5	7,1
5,4	0	0	0	0	0	0	7,1	7,2	126,5	118,2	7,5	7,3
7,6	3	4	4	2	3	65	7,5	7,4	123,6	120,5	7,5	7,0
10,7	4	4	5	4	17	85	7,7	7,5	120,2	117,5	7,5	7,0
15,0	5	5	5	5	20	100	7,7	7,5	116,5	112,4	7,5	7,0
DMSO	0	0	0	0	0	0	7,8	7,6	136	137	7,6	7,5

Ensaio 2

Início: 05/07/11 Término: 07/07/11 Resultado: CE50 = 6,51 mg/L (6,0 - 7,07)

Concentração (mg/L)	Número de organismos imóveis/mortos 48 horas						pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	1	2	3	4	Total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle	0	0	0	0	0	0	7,2	7,2	242,0	225,2	8,0	7,9
3,8	0	0	0	0	0	0	7,3	7,3	215,6	212,3	8,5	7,9
5,4	1	0	0	2	3	15	7,5	7,3	203,5	180,5	8,0	7,8
7,6	5	4	4	3	16	80	7,5	7,5	156,3	143,5	8,0	8,0
10,7	5	5	5	5	20	100	7,7	7,4	120,5	112,8	8,3	8,0
15,0	5	5	5	5	20	100	7,6	7,6	114,2	110,4	8,2	7,9
DMSO	0	0	0	0	0	0	7,6	7,6	231	216	8,0	7,8

Ensaio 3

Início: 12/07/11 Término: 14/07/11 Resultado: CE50 = 9,17 mg/L (8,87 - 9,48)

Concentração (mg/L)	Número de organismos imóveis/mortos 48 horas						pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	1	2	3	4	Total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle	0	0	0	0	0	0	7,0	7,3	142,5	140,0	8,5	8,0
3,8	0	0	0	0	0	0	7,6	7,5	165,2	162,8	8,2	8,0
5,4	1	0	0	2	3	15	7,6	7,5	183,5	176,0	8,2	8,0
7,6	5	4	4	3	16	80	7,5	7,5	198,2	182,3	8,3	8,0
10,7	5	5	5	5	20	100	7,6	7,5	194,3	185,2	8,0	8,0
15,0	5	5	5	5	20	100	7,5	7,5	201,0	199,2	8,0	8,2
DMSO	0	0	0	0	0	0	7,5	7,7	154	152	8,0	8,0

Teste de avaliação da toxicidade aguda do óleo 183 para D. similis

Ensaio 1

Início: 02/08/11 Término: 04/08/11 Resultado: CE50 = 6,40 mg/L (5,92 - 6,92)

Concentração (mg/L)	Número de organismos imóveis/mortos 48 horas						pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	1	2	3	4	Total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle	0	0	0	0	0	0	7,3	7,5	154,4	150	8,0	7,7
3,8	0	0	0	0	0	0	7,3	7,5	152,3	150,3	8,2	7,8
5,4	1	1	0	1	3	15	7,5	7,5	163	161,0	8,2	7,8
7,6	3	4	5	5	17	85	7,5	7,5	165	164,2	8,2	7,7
10,7	5	5	5	5	20	100	7,7	7,7	168	165,8	8,0	7,6
15,0	5	5	5	5	20	100	7,7	7,6	171	168,2	8,0	7,8
DMSO	0	0	0	0	0	0	7,5	7,6	154	153	8,0	8,0

Ensaio 2

Início: 09/08/11 Término: 11/08/11 Resultado: CE50 = 6,22 mg/L (5,64 - 6,87)

Concentração (mg/L)	Número de organismos imóveis/mortos 48 horas						pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	1	2	3	4	Total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle	0	0	0	0	0	0	7,5	7,4	114,3	112,9	8,0	7,6
3,8	0	0	1	1	2	10	7,5	7,4	115,8	115,4	7,5	7,7
5,4	0	1	2	1	4	20	7,7	7,3	112,2	110,2	7,5	7,7
7,6	5	4	3	5	17	85	7,7	7,3	101,5	98,6	7,5	7,7
10,7	5	5	5	5	20	100	7,8	7,4	94,8	95,6	7,5	75
15,0	5	5	5	5	20	100	7,8	7,7	92,1	84,5	7,5	7,7
DMSO	0	0	0	0	0	0	7,6	7,5	115	114	7,5	7,5

Ensaio 3

Início: 16/08/11 Término: 18/08/11 Resultado: CE50 = 7,46 mg/L (6,74 - 8,27)

Concentração (mg/L)	Número de organismos imóveis/mortos 48 horas						pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	1	2	3	4	Total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle	0	0	0	0	0	0	7,1	6,8	135,2	132,0	7,7	7,5
3,8	0	0	0	0	0	0	7,1	6,8	135,5	132,0	8,0	7,8
5,4	1	0	2	1	4	20	7,5	6,9	126,1	125,1	8,0	7,8
7,6	2	3	2	1	8	40	7,5	7,0	114,5	113,6	7,6	7,5
10,7	5	4	5	5	19	95	7,5	7,0	110,4	105,2	7,6	7,5
15,0	5	5	5	5	20	100	7,5	7,0	90,5	98,8	7,6	7,5
DMSO	0	0	0	0	0	0	7,4	7,4	136,0	137	7,5	7,0

Teste de avaliação da toxicidade aguda do óleo 180 para C. silvestrii

Ensaio 1

Início: 07/06/11 Término: 09/06/11 Resultado: CE50 = 4,10 mg/L (3,80 - 4,43)

Concentração (mg/L)	Número de organismos imóveis/mortos 48 horas						pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	1	2	3	4	Total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle	0	0	0	0	0	0	7,0	6,8	125,3	125,2	7,5	7,3
1,8	1	0	0	0	1	5	7,0	6,7	121,3	122,4	7,5	7,2
3,0	0	0	0	0	0	0	7,2	7,0	121,4	120,4	7,7	7,5
5,2	4	4	5	5	18	90	7,2	7,0	115,4	114,4	7,5	7,3
8,8	5	5	5	5	20	100	7,5	7,4	110,8	108,4	7,5	7,3
15,0	5	5	5	5	20	100	7,5	7,3	92,5	91,4	7,8	7,7
DMSO	0	0	0	0	0	0	7,4	7,3	124,3	122,1	7,5	7,4

Ensaio 2

Início: 14/06/11 Término: 16/06/11 Resultado: CE50 = 4,73 mg/L (4,13 - 5,40)

Concentração (mg/L)	Número de organismos imóveis/mortos 48 horas						pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	1	2	3	4	Total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle	0	0	0	0	0	0	7,0	7,0	145,0	143,6	7,0	7,2
1,8	1	0	0	0	1	5	7,0	7,0	132,5	135,5	7,0	7,3
3,0	0	1	0	0	1	5	7,1	7,0	135,3	130,8	7,0	7,2
5,2	3	4	4	2	13	65	7,0	6,8	112,3	111,8	7,3	7,3
8,8	5	5	4	5	19	95	7,0	7,0	108,2	95,8	7,3	7,3
15,0	5	5	5	5	20	100	7,5	7,3	85,6	82,7	7,3	7,3
DMSO	0	0	0	0	0	0	7,5	7,3	135,2	129,2	7,0	7,2

Ensaio 3

Início: 21/06/11 Término: 23/06/11 Resultado: CE50 = 4,52 mg/L (4,0 - 5,11)

Concentração (mg/L)	Número de organismos imóveis/mortos 48 horas						pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	1	2	3	4	Total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle	0	0	0	0	0	0	7,3	7,5	125,8	122,3	8,0	7,6
1,8	0	0	0	0	0	0	7,3	7,0	126,5	120,4	8,0	7,2
3,0	0	1	0	0	1	5	7,3	7,0	115,8	113,8	8,0	7,3
5,2	4	4	5	1	14	70	7,5	7,2,	115,6	104,8	8,0	7,6
8,8	5	5	5	5	20	100	7,6	7,2	115,9	85,2	8,5	7,5
15,0	5	5	5	5	20	100	7,5	7,1	112,0	86,2	8,5	7,1
DMSO	0	0	0	0	0	0	7,4	7,3	124,5	114,2	8,2	7,5

Teste de avaliação da toxicidade aguda do óleo 183 para C. silvestrii

Ensaio 1

Início: 27/07/11 Término: 29/0711 Resultado: CE50 = 2,21 mg/L (1,91 - 2,55)

Concentração (mg/L)	Número de organismos imóveis/mortos 48 horas						pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	1	2	3	4	Total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle	0	1	1	0	2	10	7,0	6,8	143,2	140,8	7,2	7,0
1,8	2	1	2	1	6	0	7,0	6,8	142,6	136,9	7,8	7,5
3,0	5	5	1	5	16	80	7,0	6,9	136,2	138,4	7,4	7,2
5,2	5	5	5	5	20	100	7,2	6,8	138,2	137,2	7,8	7,7
8,8	5	5	5	5	20	100	7,2	7,0	128,6	125,8	7,6	7,5
15,0	5	5	5	5	20	100	7,3	7,0	114,8	112,4	7,0	7,0
DMSO	0	0	0	0	0	0	7,0	6,8	142,8	140,5	7,5	7,3

Ensaio 2

Início: 03/08/11 Término: 05/08/11 Resultado: CE50 = 3,85 mg/L (3,65 - 4,05)

Concentração (mg/L)	Número de organismos imóveis/mortos 48 horas						pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	1	2	3	4	Total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle	0	0	0	0	0	0	7,2	7,0	138,2	135,4	8,2	8,0
1,8	0	0	0	0	0	0	7,2	7,0	135,2	130,8	8,5	8,2
3,0	0	0	1	0	1	5	7,3	7,1	132,1	124,5	8,0	7,8
5,2	5	5	5	5	20	100	7,2	7,2	124,7	122,5	8,0	7,9
8,8	5	5	5	5	20	100	7,2	7,3	115,8	110,4	8,0	7,9
15,0	5	5	5	5	20	100	7,3	7,2	104,9	105,1	8,2	8,1
DMSO	0	0	0	0	0	0	7,5	7,1	135,4	135,8	8,0	7,8

Ensaio 3

Início: 02/08/11 Término: 04/08/11 Resultado: CE50 = 3,42 mg/L (3,22 - 4,62)

Concentração (mg/L)	Número de organismos imóveis/mortos 48 horas						pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	1	2	3	4	Total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle	0	1	0	1	2	10	7,3	7,2	125,8	124,9	7,5	7,2
1,8	1	0	1	0	2	10	7,2	7,2	123,6	123,5	7,8	7,3
3,0	3	1	2	1	7	35	7,3	7,1	125,8	126,2	7,6	7,5
5,2	5	3	4	5	17	85	7,3	7,2	115,9	116,8	7,8	7,6
8,8	5	5	5	5	20	100	7,5	7,3	113,8	113,8	7,9	7,2
15,0	5	5	5	5	20	100	7,5	7,3	104,8	102,8	8,0	7,9
DMSO	0	1	0	0	1	5	7,2	7,0	125,8	123,8	7,5	7,5

Teste de avaliação da toxicidade aguda do DEET para D. similis

Ensaio 1

Início: 14/09/11 Término: 16/09/11 Resultado: CE50 = 60,74 mg/L (50,6 - 72,9)

Concentração (mg/L)	Número de organismos imóveis/mortos 48 horas						pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	1	2	3	4	Total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle	0	0	0	0	0	0	7,0	6,9	140,5	137,9	8,2	8,0
9,37	0	0	0	0	0	0	7,2	6,9	132,7	129,3	8,0	7,8
18,75	0	2	0	0	2	10	7,3	7,0	125,2	121,0	8,0	7,9
37,5	0	0	2	0	2	10	7,3	7,1	107,4	104,4	8,3	8,0
75,0	5	4	5	3	17	85	7,4	7,3	80,5	87,4	8,5	8,4
150,0	5	5	5	5	20	100	7,5	7,6	10,2	7,0	8,5	8,4

Ensaio 2

Início: 20/09/11 Término: 22/09/11 Resultado: CE50 = 66,58 mg/L (54,9 - 80,74)

Concentração (mg/L)	Número de organismos imóveis/mortos 48 horas						pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	1	2	3	4	Total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle	0	0	0	0	0	0	7,0	7,9	152,0	147,9	8,0	7,8
9,37	0	1	1	0	2	10	7,0	8,0	153,2	147,1	8,0	7,5
18,75	0	1	0	1	2	10	7,1	8,0	151,0	142,1	8,5	8,0
37,5	1	0	1	0	2	10	7,5	8,0	145,2	133,4	8,2	8,0
75,0	4	4	2	2	12	60	7,5	8,0	121,3	116,4	8,5	8,2
150,0	5	5	5	5	20	100	7,3	8,1	98,0	95,1	8,5	8,3

Ensaio 3

Início: 04/10/11 Término: 06/10/11 Resultado: CE50 = 67,30 mg/L (52,8 - 85,9)

Concentração (mg/L)	Número de organismos imóveis/mortos 48 horas						pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	1	2	3	4	Total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle	0	0	0	0	0	0	7,3	7,6	244,0	214,2	8,5	8,5
9,37	0	0	0	0	0	0	7,5	7,5	237,0	221,3	8,5	8,4
18,75	0	0	0	0	0	0	7,5	7,6	216,0	203,0	8,0	8,0
37,5	1	2	0	1	4	20	7,6	7,7	180,5	172,4	8,1	8,2
75,0	4	1	1	5	11	55	7,6	7,3	177,1	163,0	8,4	8,3
150,0	5	4	4	5	18	90	7,7	7,5	115,9	95,2	8,3	8,2

Teste de avaliação da toxicidade aguda do DEET para C. silvestrii

Ensaio 1

Início: 20/09/11 Término: 22/09/11 Resultado: CE50 = 52,8 mg/L (47,69 - 58,46)

Concentração (mg/L)	Número de organismos imóveis/mortos 48 horas						pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	1	2	3	4	Total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle	0	0	1	0	1	5	7,5	7,6	135,8	131,5	7,6	7,5
9,37	0	0	0	0	0	0	7,5	7,7	135,8	132,4	7,6	7,5
18,75	0	0	0	0	0	0	7,5	7,7	131,2	124,5	7,7	7,5
37,5	1	0	0	0	1	5	7,8	7,9	125,8	123,4	8,0	7,8
75,0	5	5	4	5	19	95	7,6	7,6	124,3	120,8	8,0	7,8
150,0	5	5	5	5	20	100	7,5	7,7	134,4	135,0	8,0	7,7

Ensaio 2

Início: 27/09/11 Término: 29/09/11 Resultado: CE50 = 56,46 mg/L (47,5 - 67,1)

Concentração (mg/L)	Número de organismos imóveis/mortos 48 horas						pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	1	2	3	4	Total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle	1	1	0	0	2	10	7,3	7,1	153,9	161,2	7,5	7,6
9,37	1	0	0	0	1	5	7,4	7,3	148,5	148,1	8,0	7,7
18,75	1	0	0	0	1	5	7,5	7,4	144,0	142,7	8,1	7,7
37,5	0	2	0	0	2	10	7,5	7,5	133,5	133,7	8,0	7,7
75,0	4	5	4	3	16	80	7,6	7,6	115,3	116,2	8,5	7,6
150,0	5	5	5	5	20	100	7,6	7,7	91,9	94,5	8,5	7,6

Ensaio 3

Início: 04/10/11 Término: 06/10/11 Resultado: CE50 = 52,36 mg/L (44,03 - 62,26)

Concentração (mg/L)	Número de organismos imóveis/mortos 48 horas						pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	1	2	3	4	Total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle	0	0	0	0	0	0	7,3	7,8	155,3	150,1	7,5	7,5
9,37	0	0	0	1	1	5	7,4	7,8	147,8	147,7	7,0	7,3
18,75	0	0	1	0	1	5	7,5	7,8	146,8	142,9	7,5	7,4
37,5	0	1	1	1	3	15	7,5	7,9	139,2	131,9	7,5	7,4
75,0	4	4	4	5	17	75	7,6	7,9	125,9	116,6	7,3	7,4
150,0	5	5	5	5	20	100	7,6	8,0	98,2	95,0	7,5	7,4

APÊNDICE D – Ensaios de ecotoxicidade crônica com os princípios ativos

Óleo Lote 180 - *Teste 1* - Início: 1 jul 2011 Término: 8 jul 2011

Data	Controle										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
01/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
02/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
03/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
04/jul	2	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/jul	4	4	2	3	3	3	3	4	4	4	0
06/jul	2	4	3	6	3	3	6	4	3	6	0
07/jul	•	3	6	•	•	4	3	4	•	•	0
08/jul	11	10	3	12	5	3	6	2	7	10	0
Total	19	21	14	21	11	13	18	14	14	20	0
Média	16,5										

Data	Controle DMSO										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
01/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
02/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
03/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
04/jul	•	•	•	3	•	•	3	2	3	4	0
05/jul	2	4	3	4	6	4	3	2	2	2	0
06/jul	4	6	6	4	6	8	3	3	2	3	0
07/jul	3	•	2	5	•	3	5	4	3	3	0
08/jul	6	9	7	5	7	6	6	6	3	3	0
Total	15	19	18	21	19	21	20	17	13	15	0
Média	17,8										

Data	1 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
01/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
02/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
03/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
04/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/jul	3	4	3	3	4	4	4	4	4	4	0
06/jul	6	4	6	6	8	8	8	6	6	6	0
07/jul	6	5	5	5	5	4	3	5	4	4	0
08/jul	6	6	6	5	5	5	5	5	5	4	0
Total	21	19	20	19	22	21	20	20	19	18	0
Média	19,9										

Data	2 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
01/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
02/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
03/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
04/jul	•	1	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/jul	3	4	6	4	4	4	4	4	6	4	0
06/jul	3	6	7	4	2	7	4	6	3	6	0
07/jul	•	4	•	5	•	4	•	4	5	5	0
08/jul	•	4	7	5	5	4	7	4	5	5	0
Total	6	19	20	18	11	19	15	18	19	20	0
Média	16,5										

Data	4 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
01/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
02/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
03/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
04/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/jul	2	3	2	5	2	3	3	2	3	5	0
06/jul	2	3	2	•	•	•	3	2	6	•	0
07/jul	•	•	•	•	5	2	•	•	3	•	0
08/jul	•	•	2	•	•	•	2	2	3	•	0
Total	4	6	6	5	7	5	8	6	15	5	0
Média	6,7										

Data	8 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
01/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
02/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
03/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
04/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/jul	2	†	†	†	•	•	•	2	•	2	3
06/jul	†	•	•	•	•	•	•	†	•	†	3
07/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	†	•	1
Total	2	0	0	0	0	0	0	2	0	2	7
Média	0,6										

Data	16 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
01/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
02/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
03/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
04/jul	†	1	•	†	•	†	†	†	†	•	6
05/jul	-	†	•	-	•	-	-	-	-	2	1
06/jul	-	-	•	-	•	-	-	-	-	†	1
07/jul	-	-	•	-	†	-	-	-	-	-	1
08/jul	-	-	†	-	•	-	-	-	-	-	1
Total	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	10
Média	0,3										

Óleo Lote 180 - *Teste 2* - Início: 27 ago 2011 Término: 3 set 2011

Data	Controle										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
27/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
28/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
29/ago	•	3	•	•	2	2	•	•	•	•	0
30/ago	3	5	4	4	•	4	•	4	3	3	0
31/ago	4	1	4	4	5	4	5	5	4	5	0
01/set	7	4	7	5	5	•	4	3	4	•	0
02/set	•	•	3	4	•	3	4	3	4	3	0
03/set	7	5	2	4	8	3	5	5	5	3	0
Total	21	18	20	21	20	16	18	20	20	14	0
Média	18,8										

Data	Controle DMSO										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
27/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
28/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
29/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
30/ago	1	3	5	3	2	3	2	4	3	3	0
31/ago	4	4	5	3	3	4	3	4	2	3	0
01/set	5	•	•	2	•	4	•	4	•	•	0
02/set	3	7	5	2	5	4	5	4	7	7	0
03/set	3	7	7	9	•	5	7	6	•	4	0
Total	16	21	22	19	10	20	17	22	12	17	0
Média	17,6										

Data	1 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
27/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
28/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
29/ago	•	•	•	2	•	•	•	•	•	2	0
30/ago	5	•	5	•	4	2	2	4	4	4	0
31/ago	4	5	2	2	2	4	2	3	3	2	0
01/set	•	3	3	2	2	5	5	5	2	2	0
02/set	•	3	3	7	6	8	•	•	3	5	0
03/set	6	8	3	10	•	•	7	7	10	11	0
Total	15	19	16	23	14	19	16	19	22	26	0
Média	18,9										

Data	2 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
27/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
28/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
29/ago	•	•	•	•	4	2	†	•	1	•	1
30/ago	3	3	2	5	•	•	-	2	4	3	0
31/ago	3	2	2	3	2	2	-	2	4	3	0
01/set	2	2	2	•	2	3	-	2	7	4	0
02/set	3	•	•	4	7	4	-	2	•	4	0
03/set	•	7	8	3	8	11	-	9	11	11	0
Total	11	14	14	15	23	22	0	17	27	25	1
Média	16,8										

Data	4 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
27/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
28/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
29/ago	•	4	•	•	2	•	•	•	•	•	0
30/ago	5	4	2	2	2	•	1	•	•	•	0
31/ago	2	2	2	2	2	2	•	3	2	4	0
01/set	†	4	2	2	2	2	3	3	2	2	1
02/set	-	3	•	3	3	1	3	3	4	5	0
03/set	-	9	7	3	9	7	3	5	6	9	0
Total	7	26	13	12	20	12	10	14	14	20	1
Média	14,8										

Data	8 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
27/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
28/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
29/ago	•	†	•	•	•	•	•	•	•	•	1
30/ago	2	-	•	3	4	•	2	•	1	2	0
31/ago	•	-	3	•	•	†	2	4	1	•	1
01/set	•	-	•	•	3	-	3	•	•	•	0
02/set	•	-	•	•	•	-	•	•	•	4	0
03/set	5	-	6	5	10	-	4	6	•	•	0
Total	7	0	9	8	17	0	11	10	2	6	2
Média	7										

Data	16 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
27/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
28/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
29/ago	†	†	†	•	†	†	†	†	†	†	9
30/ago	-	-	-	•	-	-	-	-	-	-	0
31/ago	-	-	-	•	-	-	-	-	-	-	0
01/set	-	-	-	•	-	-	-	-	-	-	0
02/set	-	-	-	•	-	-	-	-	-	-	0
03/set	-	-	-	†	-	-	-	-	-	-	1
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
Média	0										

Óleo Lote 180 - *Teste 3* - Início: 7 out 2011 Término: 14 out 2011

Data	Controle										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
07/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
10/out	6	•	•	•	1	4	4	4	•	4	0
11/out	•	6	•	2	•	•	•	•	5	5	0
12/out	6	7	•	4	5	6	7	7	6	1	0
13/out	9	9	•	3	8	9	9	8	6	6	0
14/out	9	7	•	2	7	8	7	10	10	11	0
Total	30	29	0	11	21	27	27	29	27	27	0
Média	25,3										

Data	Controle DMSO										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
07/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
10/out	3	4	2	3	4	4	1	5	4	4	0
11/out	•	•	•	•	•	•	•	•	5	•	0
12/out	6	6	5	8	7	7	5	6	•	6	0
13/out	9	8	8	6	9	9	7	8	4	8	0
14/out	9	7	8	9	9	10	10	5	12	9	0
Total	27	25	23	26	29	30	23	24	25	27	0
Média	25,9										

Data	1 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
07/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
10/out	3	5	2	•	•	5	4	4	•	•	0
11/out	7	•	•	5	6	•	5	•	•	5	0
12/out	1	9	8	10	6	6	1	7	•	6	0
13/out	9	8	8	6	9	10	7	9	•	9	0
14/out	13	8	8	8	6	10	10	9	•	8	0
Total	33	30	26	29	27	31	27	29	0	28	0
Média	28,9										

Data	2 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
07/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
10/out	4	•	•	3	4	3	5	•	4	2	0
11/out	•	4	5	7	•	•	•	4	•	•	0
12/out	6	7	8	•	7	7	6	4	5	4	0
13/out	6	9	10	11	5	9	10	9	8	5	0
14/out	9	4	6	12	11	11	11	8	7	10	0
Total	25	24	29	33	27	30	32	25	24	21	0
Média	27										

Data	4 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
07/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
10/out	4	•	•	•	•	4	4	3	2	3	0
11/out	•	•	4	•	•	•	•	•	•	•	0
12/out	7	5	14	•	3	8	8	4	6	8	0
13/out	•	8	7	•	•	4	7	3	1	1	0
14/out	8	12	11	•	9	10	5	6	9	10	0
Total	19	25	36	0	12	26	24	16	18	22	0
Média	22										

Data	8 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
07/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
10/out	1	•	•	4	•	3	4	4	3	4	0
11/out	•	3	2	1	3	•	•	•	•	•	0
12/out	•	•	1	•	•	1	1	•	6	4	0
13/out	6	7	•	•	8	•	•	•	•	•	0
14/out	2	5	3	10	2	3	2	9	9	•	0
Total	9	15	6	15	13	7	7	13	18	8	0
Média	11,1										

Data	16 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
07/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
10/out	•	†	†	†	†	†	†	†	†	•	8
11/out	•	-	-	-	-	-	-	-	-	•	0
12/out	•	-	-	-	-	-	-	-	-	•	0
13/out	•	-	-	-	-	-	-	-	-	•	0
14/out	†	-	-	-	-	-	-	-	-	•	1
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
Média	0										

Óleo Lote 183 - *Teste 1* - Início: 3 fev 2012 Término: 10 fev 2012

Data	Controle										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
03/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
04/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
06/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
07/fev	4	3	•	5	5	4	5	4	4	3	0
08/fev	3	3	•	1	•	•	1	•	3	•	0
09/fev	•	•	2	6	3	3	2	4	3	3	0
10/fev	6	5	8	8	9	10	8	8	2	8	0
Total	13	20	10	20	17	17	16	16	12	14	0
Média	15,5										

Data	Controle DMSO										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
03/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
04/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
06/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
07/fev	4	4	4	3	3	4	4	•	4	•	0
08/fev	•	•	3	•	•	2	•	2	•	•	0
09/fev	5	4		4	3	4	2	2	3	•	0
10/fev	9	8	7	7	6	4	7	8	7	•	0
Total	18	20	15	14	15	14	13	12	14	0	0
Média	15										

Data	1 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
03/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
04/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
06/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	2	•	0
07/fev	4	4	3	5	4	4	4	3	•	3	0
08/fev	3	4	2	2	•	•	3	4	5	4	0
09/fev	6	6	4	3	4	5	4	•	6	1	0
10/fev	9	11	6	6	7	6	4	4	8	8	0
Total	19	26	20	11	15	18	15	11	16	10	0
Média	16,1										

Data	2 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
03/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
04/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
06/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
07/fev	4	4	3	4	3	3	4	4	3	4	0
08/fev	•	4	1	•	•	•	•	•	1	•	0
09/fev	3	•	3	3	5	3	4	4	4	3	0
10/fev	1	8	7	•	•	•	1	5	2	2	0
Total	8	16	14	7	8	6	9	13	10	9	0
Média	10,0										

Data	4 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
03/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
04/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
06/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
07/fev	•	•	1	•	1	4	3	4	4	4	0
08/fev	•	•	•	•	•	•	4	4	3	•	0
09/fev	5	6	7	5	4	•	•	•	•	1	0
10/fev	2	1	3	•	•	•	7	9	7	4	0
Total	7	7	11	5	5	4	14	17	14	9	0
Média	9,3										

Data	8 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
03/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
04/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
06/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
07/fev	•	4	•	1	•	•	•	•	•	•	0
08/fev	•	•	•	•	•	4	•	•	•	•	0
09/fev	1	•	•	1	3	†	2	2	•	•	1
10/fev	2	•	1	4	•	-	•	2	3	•	0
Total	3	4	1	6	3	4	2	4	3	0	1
Média	3,3										

Data	16 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
03/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
04/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
06/fev	†	†	†	†	†	†	†	†	•	•	8
07/fev	-	-	-	-	-	-	-	-	•	•	0
08/fev	-	-	-	-	-	-	-	-	•	•	0
09/fev	-	-	-	-	-	-	-	-	†	•	1
10/fev	-	-	-	-	-	-	-	-	-	•	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9
Média	0										

Óleo Lote 183 - *Teste 2* - Início: 2 jul 2011 Término: 5 ago 2011

Data	Controle										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
29/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
30/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
31/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
01/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
02/ago	4	4	3	4	4	4	4	4	2	4	0
03/ago	1	3	3	4	4	3	3	4	2	2	0
04/ago	•	5	•	•	•	•	•	6	•	•	0
05/ago	9	6	13	11	10	13	13	6	15	9	0
Total	14	18	19	19	18	20	20	20	19	15	0
Média	18,2										

Data	Controle DMSO										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
29/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
30/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
31/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
01/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
02/ago	•	3	3	3	•	4	2	3	3	4	0
03/ago	4	2	2	2	1	3	2	3	2	2	0
04/ago	4	•	•	•	4	4	2	6	•	4	0
05/ago	•	12	11	12	11	10	8	4	10	6	0
Total	8	17	16	17	16	21	14	16	15	16	0
Média	15,6										

Data	1 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
29/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
30/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
31/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
01/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
02/ago	3	3	4	4	1	3	2	4	4	3	0
03/ago	2	2	3	2	3	2	2	2	2	3	0
04/ago	•	•	•	1	•	•	•	•	•	•	0
05/ago	12	11	10	8	17	12	10	10	8	10	0
Total	17	16	17	15	21	17	14	16	14	16	0
Média	16,3										

Data	2 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
29/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
30/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
31/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
01/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
02/ago	2	3	4	2	4	3	4	2	3	1	0
03/ago	2	3	3	2	2	2	3	2	2	2	0
04/ago	•	•	1	4	•	•	•	2	•	2	0
05/ago	8	10	5	8	8	8	11	8	11	12	0
Total	12	16	13	16	14	13	18	14	16	17	0
Média	14,9										

Data	4 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
29/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
30/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
31/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
01/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
02/ago	4	2	4	1	4	3	3	3	4	4	0
03/ago	3	3	3	5	2	3	2	2	3	3	0
04/ago	•	•	•	•	•	•	•	5	1	•	0
05/ago	7	10	9	8	10	9	11	4	5	8	0
Total	14	15	16	14	16	15	16	14	13	15	0
Média	14,8										

Data	8 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
29/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
30/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
31/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
01/ago	†	•	†	•	•	•	•	•	•	†	3
02/ago	-	•	-	•	•	•	1	2	2	-	0
03/ago	-	2	-	2	•	2	2	3	2	-	0
04/ago	-	4	-	4	6	2	1	†	3	-	1
05/ago	-	4	-	3	4	1	5	-	•	-	0
Total	0	10	0	9	10	5	9	5	7	0	4
Média	5,5										

Data	16 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
29/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
30/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
31/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
01/ago	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	10
02/ago	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
03/ago	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
04/ago	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
05/ago	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
Média	0										

Óleo Lote 183 - *Teste 3* – Início: 12 ago 2011 Término: 19 ago 2011

Data	Controle										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
12/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
13/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
14/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
15/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
16/ago	4	•	1	4	5	5	2	2	4	2	0
17/ago	6	6	6	5	5	5	4	4	4	4	0
18/ago	•	7	8	•	•	•	4	•	9	8	0
19/ago	9	8	8	8	6	8	2	7	•	•	0
Total	19	21	23	17	16	18	12	13	17	14	0
Média	17										

Data	Controle DMSO										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
12/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
13/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
14/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
15/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
16/ago	4	3	4	1	4	4	•	4	•	•	0
17/ago	6	4	4	6	5	5	4	4	3	4	0
18/ago	9	8	8	9	11	5	5	•	•	4	0
19/ago	•	•	•	6	10	•	9	9	7	8	0
Total	19	15	16	22	30	14	18	17	10	16	0
Média	17,7										

Data	1 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
12/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
13/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
14/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
15/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
16/ago	2	2	1	2	4	2	1	•	4	2	0
17/ago	1	4	7	6	5	•	3	7	•	7	0
18/ago	•	6	10	9	•	4	9	9	7	8	0
19/ago	2	10	•	•	9	6	•	9	11	1	0
Total	5	22	18	17	18	12	13	25	22	18	0
Média	17										

Data	2 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
12/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
13/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
14/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
15/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
16/ago	3	•	1	2	1	3	1	1	1	•	0
17/ago	5	5	5	7	1	6	5	3	4	5	0
18/ago	8	8	•	•	6	3	•	•	6	•	0
19/ago	1	•	9	9	6	5	6	9	•	8	0
Total	17	13	15	18	14	17	12	13	11	13	0
Média	14,3										

Data	4 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
12/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
13/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
14/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
15/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	2	•	0
16/ago	1	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
17/ago	4	•	•	5	6	5	•	3	5	4	0
18/ago	•	•	5	•	•	•	•	7	•	•	0
19/ago	7	7	•	8	9	8	4	10	9	7	0
Total	12	7	5	13	15	13	4	20	16	11	0
Média	11,6										

Data	8 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
12/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
13/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
14/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
15/ago	•	•	•	†	•	•	•	•	•	†	2
16/ago	•	•	•	-	2	1	•	•	•	-	0
17/ago	•	•	2	-	•	•	•	3	•	-	0
18/ago	•	•	•	-	•	•	1	1	•	-	0
19/ago	2	•	5	-	•	•	1	•	5	-	0
Total	2	0	7	0	2	1	2	4	5	0	2
Média	2,5										

Data	16 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
12/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
13/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
14/ago	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
15/ago	†	†	†	†	†	†	†	†	†	†	10
16/ago	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
17/ago	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
18/ago	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
19/ago	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
Média	0										

DEET - *Teste 1* – Início: 7 out 2011 Término: 14 out 2011

Data	Controle										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
07/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
10/out	4	2	5	3	•	•	2	•	•	2	0
11/out	•	6	•	1	5	•	•	5	7	6	0
12/out	7	•	5	5	5	•	6	6	5	•	0
13/out	6	5	8	6	6	•	8	5	9	5	0
14/out	12	7	10	8	8	•	7	7	5	7	0
Total	29	20	28	23	24	0	23	23	26	20	0
Média	24										

Data	3,75 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
07/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
10/out	5	2	•	•	2	4	•	•	•	•	0
11/out	•	•	6	5	6	•	6	5	4	4	0
12/out	6	4	8	6	•	5	5	5	6	7	0
13/out	9	6	3	7	6	6	9	6	10	8	0
14/out	7	8	•	7	8	7	8	6	9	6	0
Total	27	20	17	25	22	22	28	22	29	25	0
Média	23,7										

Data	7,5 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
07/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
10/out	•	4	•	•	•	4	•	4	2	•	0
11/out	•	•	4	4	5	•	•	•	•	•	0
12/out	•	7	7	6	5	6	•	5	6	•	0
13/out	•	9	7	10	•	7	•	5	6	•	0
14/out	•	7	9	4	5	8	•	10	7	•	0
Total	0	27	27	27	15	25	0	24	21	0	0
Média	23,7										

Data	15,0 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
07/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
10/out	2	5	4	•	•	2	4	4	3	2	0
11/out	•	•	•	6	3	•	•	8	•	5	0
12/out	•	5	5	•	3	6	6	•	5	•	0
13/out	•	6	4	•	•	7	7	8	8	4	0
14/out	•	7	7	•	•	12	9	10	5	9	0
Total	2	23	20	6	6	27	26	30	21	20	0
Média	18,1										

Data	30,0 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
07/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
10/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
11/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
12/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
13/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
14/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Média	0										

Data	60,0 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
07/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
10/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
11/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
12/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
13/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
14/out	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Média	0										

DEET - *Teste 2* – Início: 4 nov 2011 Término: 11 nov 2011

Data	Controle										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
04/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
06/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
07/nov	•	•	•	•	•	2	•	•	•	•	0
08/nov	•	5	4	4	3	•	6	5	•	4	0
09/nov	•	4	4	3	4	3	4	5	•	6	0
10/nov	•	•	•	4	•	6	•	5	•	•	0
11/nov	•	4	7	6	4	8	11	8	•	4	0
Total	0	13	15	17	11	19	21	23	0	14	0
Média	16,6										

Data	3,75 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
04/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
06/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
07/nov	•	•	4	•	•	•	•	•	•	•	0
08/nov	4	•	•	3	4	2	7	4	4	6	0
09/nov	8	3	5	5	7	1	6	7	4	4	0
10/nov	5	•	6	5	•	•	5	5	4	6	0
11/nov	6	6	6	7	11	9	8	7	7	6	0
Total	23	9	21	20	22	12	26	23	19	22	0
Média	19,7										

Data	7,5 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
04/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
06/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
07/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/nov	•	4	5	3	4	4	4	2	•	4	0
09/nov	•	6	3	9	6	6	6	3	•	4	0
10/nov	2	4	•	6	6	4	5	•	•	4	1
11/nov	•	10	•	3	7	5	7	•	•	5	0
Total	2	24	8	21	23	19	22	5	0	17	1
Média	15,6										

Data	15,0 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
04/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
06/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
07/nov	•	•	•	•	4	4	•	•	•	•	0
08/nov	5	3	3	4	•	•	4	5	3	5	0
09/nov	4	5	2	5	6	6	6	7	8	3	0
10/nov	3	3	5	5	3	3	5	2	1	7	0
11/nov	7	3	7	5	2	9	7	7	•	4	0
Total	19	14	17	19	15	22	22	21	12	19	0
Média	18,0										

Data	30,0 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
04/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
06/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
07/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
10/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
11/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Média	0										

Data	60,0 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
04/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
06/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
07/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
10/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
11/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Média	0										

DEET - *Teste 3* – Início: 18 nov 2011 Término: 25 nov 2011

Data	Controle										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
18/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
19/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
20/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
21/nov	1	4	•	•	•	2	2	1	1	•	0
22/nov	6	•	4	2	3	•	•	3	•	3	0
23/nov	4	•	5	2	5	3	•	•	3	3	0
24/nov	4	3	4	5	2	6	4	5	6	6	0
25/nov	4	5	7	7	7	11	5	8	8	•	0
Total	19	12	20	16	17	22	15	20	18	9	0
Média	16,8										

Data	3,75 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
18/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
19/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
20/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
21/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
22/nov	3	3	4	4	3	6	4	4	2	4	0
23/nov	3	4	4	2	5	•	4	•	1	•	0
24/nov	5	6	8	5	5	7	7	10	4	8	0
25/nov	•	8	11	9	6	7	8	5	9	8	0
Total	11	21	27	20	19	20	23	19	16	20	0
Média	19,6										

Data	7,5 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
18/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
19/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
20/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
21/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	2	•	0
22/nov	4	4	3	5	•	4	4	•	•	3	0
23/nov	3	4	2	2	•	•	3	•	5	4	0
24/nov	6	6	4	3	•	5	4	•	6	1	0
25/nov	9	11	6	6	•	6	4	•	8	8	0
Total	22	25	15	16	0	15	15	0	21	16	0
Média	18,1										

Data	15,0 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
18/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
19/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
20/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
21/nov	•	2	•	•	•	•	•	•	•	•	0
22/nov	2	4	4	3	2	2	2	4	4	4	0
23/nov	2	•	2	2	5	2	•	2	3	•	0
24/nov	2	6	6	4	4	4	6	4	5	7	0
25/nov	9	7	6	8	4	•	3	7	•	7	0
Total	15	19	18	17	15	8	11	17	12	18	0
Média	15,0										

Data	30,0 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
18/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
19/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
20/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
21/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
22/nov	†	†	†	†	•	2	•	1	•	•	4
23/nov	-	-	-	-	•	•	•	•	•	•	0
24/nov	-	-	-	-	•	•	•	•	•	•	0
25/nov	-	-	-	-	•	•	•	•	•	•	0
Total	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	4
Média	0,3										

Data	60,0 mg.L^{-1}										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
18/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
19/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
20/nov	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
21/nov	•	•	•	•	†	•	•	•	•	†	2
22/nov	†	•	•	•	-	†	•	•	•	-	2
23/nov	-	•	•	•	-	-	•	•	•	-	0
24/nov	-	•	•	•	-	-	•	•	•	-	0
25/nov	-	•	•	•	-	-	•	•	•	-	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
Média	0										

APÊNDICE E – Análises físico-químicas dos ensaios de ecotoxicidade crônica com os princípios ativos

Óleo Lote 180 - *Teste 1* - Início: 1 jul 2011 Término: 8 jul 2011

Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)		Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
		ini	fin	ini	fin	ini	fin			ini	fin	ini	fin	ini	fin
01/jul		7,5	7,3	125,5	124,3	7,7	8,5	01/jul		7,5	7,7	124,5	121,0	8,0	8,5
04/jul	Controle	7,0	6,9	154,3	152,0	8,0	8,7	04/jul	Controle DMSO	7,5	7,7	155,0	125,6	8,0	8,5
06/jul		7,0	7,0	132,0	126,9	8,0	8,7	06/jul		7,5	7,7	135,0	132,3	8,5	8,8
01/jul		7,6	7,6	124,6	122,3	8,0	8,5	01/jul		7,5	7,6	125,2	125,0	8,0	8,5
04/jul	1,0	7,6	7,7	153,0	142,6	7,5	8,0	04/jul	2,0	7,6	7,7	154,0	151,0	7,5	8,2
06/jul		7,5	7,6	130,0	129,3	8,0	8,5	06/jul		7,6	7,7	132,0	130,0	7,5	8,5
01/jul		7,6	7,7	124,9	124,0	7,5	7,8	01/jul		7,6	7,7	124,7	120,5	7,0	7,8
04/jul	4,0	7,5	7,6	150,0	145,5	7,7	8,0	04/jul	8,0	7,6	7,7	153,0	150,2	8,0	7,9
06/jul		7,5	7,6	132,5	130,0	8,0	8,5	06/jul		7,6	7,7	131,6	130,0	8,0	8,5
01/jul		7,5	7,7	125,0	120,6	7,0	7,6								
04/jul	16,0	7,6	7,7	154,0	150,3	8,0	8,6								
06/jul		7,6	7,7	131,0	130,5	7,5	8,0								

Óleo Lote 180 - *Teste 2* - Início: 27 ago 2011 Término: 3 set 2011

Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)		Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
		ini	fin	ini	fin	ini	fin			ini	fin	ini	fin	ini	fin
27/ago		7,2	7,2	183,1	180,5	8,5	8,7	27/ago		7,5	7,8	181,4	180,5	9,0	9,4
30/ago	Controle	7,3	7,5	183,1	182,3	9,0	9,3	30/ago	Controle DMSO	7,0	7,3	179,1	179,0	8,5	8,8
02/set		7,5	7,6	229,0	224,2	7,6	7,8	02/set		7,3	7,3	148,3	145,2	7,4	7,6
27/ago		7,0	7,2	179,5	165,4	8,5	8,6	27/ago		7,5	7,5	178,5	177,5	8,7	8,9
30/ago	1,0	7,1	7,2	179,8	176,2	8,8	9,0	30/ago	2,0	7,4	7,5	180,1	178,9	8,7	9,0
02/set		7,0	7,1	149,2	145,8	7,5	7,8	02/set		7,4	7,6	149,5	148,5	7,7	7,8
27/ago		7,3	7,3	179,7	175,5	8,6	8,7	27/ago		7,7	7,8	179,9	178,5	8,8	9,0
30/ago	4,0	7,2	7,2	179,7	175,2	8,8	9,0	30/ago	8,0	7,5	7,7	183,1	185,4	8,5	8,8
02/set		7,4	7,5	144,3	142,8	7,4	7,5	02/set		7,7	7,7	144,7	142,0	7,5	7,7
27/ago		7,7	7,8	179,1	162,8	9,0	9,4								
30/ago	16,0	7,5	7,7	180,0	176,7	8,5	8,8								
02/set		7,8	7,9	148,3	148,0	7,6	7,7								

Óleo Lote 180 - *Teste 3* - Início: 7 out 2011 Término: 14 out 2011

Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)		Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
		ini	fin	ini	fin	ini	fin			ini	fin	ini	fin	ini	fin
07/out		7,2	7,5	229,0	228,5	8,0	8,4	07/out		7,5	7,7	149,2	149,0	8,0	8,5
10/out	Controle	7,0	7,1	123,5	120,4	8,5	8,7	10/out	Controle DMSO	7,2	7,2	110,4	105,1	8,4	8,6
12/out		7,0	7,1	180,4	176,0	8,5	8,6	12/out		7,3	7,4	162,5	160,2	8,5	8,7
07/out		7,4	7,2	149,5	148,8	8,3	8,5	07/out		7,5	7,5	144,3	144,1	8,0	8,5
10/out	1,0	7,5	7,5	110,5	108,4	8,5	8,6	10/out	2,0	7,6	7,6	112,0	109,9	8,7	8,9
12/out		7,5	7,6	160,5	158,9	8,5	8,7	12/out		7,5	7,7	160,2	158,7	8,5	8,7
07/out		7,6	7,7	143,5	142,5	8,5	8,7	07/out		7,6	7,7	144,7	143,2	8,0	8,4
10/out	4,0	7,6	7,6	101,4	98,5	8,7	9,0	10/out	8,0	7,5	7,6	101,5	98,6	8,4	8,6
12/out		7,5	7,6	161,0	158,7	8,5	8,7	12/out		7,7	7,8	162,4	158,9	8,0	8,6
07/out		7,6	7,7	148,3	148,1	8,5	8,7								
10/out	16,0	7,7	7,9	102,4	98,9	8,7	9,0								
12/out		7,6	7,6	155,0	150,1	8,0	8,5								

Óleo Lote 183 - *Teste 1* - Início: 3 fev 2012 Término: 10 fev 2012

Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)		Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
		ini	fin	ini	fin	ini	fin			ini	fin	ini	fin	ini	fin
03/fev		7,0	7,1	110,5	98,5	8,0	8,1	03/fev		7,1	7,2	112,0	99,5	8,0	8,3
06/fev	Controle	7,0	7,1	125,4	122,5	8,0	8,2	06/fev	Controle DMSO	7,0	7,1	125,3	122,8	8,0	8,2
08/fev		7,1	7,1	136,2	135,4	8,0	8,2	08/fev		7,2	7,2	136,2	135,2	8,1	8,3
03/fev		7,0	7,0	110,6	99,4	8,0	8,2	03/fev		7,0	7,0	110,3	97,6	8,1	8,3
06/fev	1,0	7,1	7,1	125,4	124,6	8,0	8,2	06/fev	2,0	7,0	7,1	126,2	125,3	8,0	8,2
08/fev		7,1	7,1	135,2	135,2	8,0	8,1	08/fev		7,1	7,1	135,4	134,2	8,5	8,6
03/fev		7,1	7,1	114,0	95,3	8,0	8,2	03/fev		7,1	7,2	115,0	94,1	8,2	8,5
06/fev	4,0	7,1	7,2	124,0	124,1	8,1	8,5	06/fev	8,0	7,2	7,2	124,7	124,8	8,0	8,2
08/fev		7,1	7,2	135,5	134,8	8,0	8,1	08/fev		7,2	7,2	136,0	134,1	8,5	8,6
03/fev		7,2	7,3	114,6	94,2	8,2	8,2								
06/fev	16,0	7,1	7,2	125,3	124,0	8,5	8,5								
08/fev		7,2	7,3	135,1	133,0	8,0	8,4								

Óleo Lote 183 - *Teste 2* - Início: 29 jul 2011 Término: 5 ago 2011

Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)		Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
		ini	fin	ini	fin	ini	fin			ini	fin	ini	fin	ini	fin
29/jul		7,3	7,4	132,8	131,6	8,0	8,2	29/jul		7,4	7,5	133,0	128,9	8,0	8,5
01/ago	Controle	7,2	7,2	115,2	112,5	8,5	8,6	01/ago	Controle DMSO	7,3	7,3	116,2	114,3	8,5	8,7
03/ago		7,2	7,3	141,5	139,2	8,7	8,8	03/ago		7,3	7,3	145,6	144,0	8,3	8,6
29/jul		7,3	7,3	132,5	132,0	8,0	8,4	29/jul		7,1	7,2	138,4	129,0	8,0	8,5
01/ago	1,0	7,2	7,2	115,3	114,8	8,6	8,7	01/ago	2,0	7,2	7,2	117,1	112,2	8,5	8,7
03/ago		7,2	7,3	141,9	141,8	8,4	8,5	03/ago		7,3	7,3	146,3	146,2	8,3	8,4
29/jul		7,2	7,3	132,7	132,1	8,1	8,4	29/jul		7,4	7,5	134,2	129,7	8,0	8,6
01/ago	4,0	7,3	7,4	110,0	98,2	8,6	8,9	01/ago	8,0	7,5	7,5	114,2	112,1	8,4	8,5
03/ago		7,2	7,4	140,5	139,4	8,5	8,7	03/ago		7,4	7,3	144,5	141,3	8,6	8,9
29/jul		7,3	7,3	132,9	131,8	8,2	8,4								
01/ago	16,0	7,5	7,5	114,8	112,8	8,5	8,6								
03/ago		7,5	7,5	142,2	140,3	8,4	8,5								

Óleo Lote 183 - *Teste 3* – Início: 12 ago 2011 Término: 19 ago 2011

Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)		Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
		ini	fin	ini	fin	ini	fin			ini	fin	ini	fin	ini	fin
12/ago		7,0	7,1	114,5	112,0	8,0	8,5	12/ago		7,4	7,4	114,8	113,7	8,0	8,5
15/ago	Controle	7,2	7,2	125,3	124,6	8,0	8,4	15/ago	Controle DMSO	7,2	7,3	125,0	124,9	8,0	7,9
17/ago		7,5	7,5	140,8	139,8	7,5	8,0	17/ago		7,3	7,4	142,6	141,5	7,5	8,0
12/ago		7,0	7,2	114,6	113,5	8,0	8,4	12/ago		7,2	7,3	114,7	113,8	8,0	8,5
15/ago	1,0	7,2	7,2	124,4	123,5	7,5	8,0	15/ago	2,0	7,4	7,5	125,6	124,5	8,0	8,5
17/ago		7,5	7,5	142,0	140,2	7,5	8,0	17/ago		7,5	7,5	144,3	142,5	8,0	7,6
12/ago		7,0	7,2	114,8	113,5	8,0	8,4	12/ago		7,3	7,4	115,4	114,9	7,5	7,9
15/ago	4,0	7,2	7,3	125,5	124,5	7,5	8,0	15/ago	8,0	7,5	7,6	125,8	124,7	8,0	8,5
17/ago		7,5	7,5	142,3	142,6	7,5	7,8	17/ago		7,6	7,6	144,0	143,5	8,0	8,4
12/ago		7,3	7,5	115,2	115,0	8,0	8,4								
15/ago	16,0	7,5	7,6	125,6	124,5	8,0	7,8								
17/ago		7,6	7,6	144,1	142,7	7,5	7,9								

DEET - *Teste 1* – Início: 7 out 2011 Término: 14 out 2011

Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)		Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
		ini	fin	ini	fin	ini	fin			ini	fin	ini	fin	ini	fin
07/out		7,0	6,7	142,0	139,6	8,0	7,9	07/out		7,0	6,7	140,4	136,0	8,0	8,0
10/out	Controle	7,1	6,8	136,5	135,2	8,0	7,9	10/out	3,75	7,1	6,8	136,7	127,5	8,0	8,0
12/out		7,0	6,8	150,2	148,7	8,5	8,3	12/out		7,0	6,8	149,8	142,5	8,5	8,4
07/out		7,0	6,7	141,5	138,7	8,0	7,9	07/out		7,0	6,8	137,8	131,5	8,0	8,0
10/out	7,5	7,1	8,9	134,7	131,5	8,0	8,0	10/out	15,0	7,0	7,0	125,4	122,6	7,5	7,0
12/out		7,0	7,0	143,5	136,8	8,5	8,4	12/out		7,1	7,0	138,7	133,0	7,5	7,0
07/out		7,1	6,9	133,6	122,3	8,0	8,0	07/out		7,1	6,9	128,7	120,0	8,0	6,8
10/out	30,0	7,2	7,0	129,5	115,6	7,5	7,4	10/out	60,0	7,1	7,0	125,0	106,2	8,0	6,8
12/out		7,2	7,0	139,8	124,9	7,5	7,4	12/out		7,2	7,0	135,4	116,7	7,6	7,6

DEET - *Teste 2* – Início: 4 nov 2011 Término: 11 nov 2011

Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)		Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
		ini	fin	ini	fin	ini	fin			ini	fin	ini	fin	ini	fin
04/nov		7,5	7,4	133,0	129,7	8,0	8,2	04/nov		7,5	7,4	130,5	129,6	8,0	8,4
07/nov	Controle	7,3	7,3	142,6	140,5	8,0	8,3	07/nov	3,75	7,3	7,2	140,8	140,2	8,0	8,2
09/nov		7,1	7,0	125,3	123,7	8,5	8,9	09/nov		7,2	7,2	125,4	123,5	8,5	8,7
04/nov		7,4	7,3	130,1	129,4	8,0	8,2	04/nov		7,3	7,2	129,8	129,3	8,0	8,4
07/nov	7,5	7,0	7,0	140,2	138,7	8,0	8,3	07/nov	15,0	7,2	7,2	140,1	138,5	8,0	8,2
09/nov		7,1	7,0	124,5	120,3	8,4	8,7	09/nov		7,2	7,1	120,3	120,0	8,5	8,7
04/nov		7,3	7,1	127,8	125,0	8,0	8,5	04/nov		7,4	7,2	124,3	123,1	8,0	8,5
07/nov	30,0	7,0	6,8	139,7	138,2	8,2	8,6	07/nov	60,0	7,1	7,0	138,6	138,0	8,1	8,7
09/nov		6,9	6,7	120,1	115,8	8,5	8,8	09/nov		7,0	7,0	119,2	112,6	8,5	8,8

DEET - *Teste 3* – Início: 18 nov 2011 Término: 25 nov 2011

Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)		Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
		ini	fin	ini	fin	ini	fin			ini	fin	ini	fin	ini	fin
18/nov		7,5	7,4	135,0	134,6	8,0	7,8	18/nov		7,5	7,4	135,2	134,5	8,0	7,8
21/nov	Controle	7,0	6,9	122,5	120,4	8,5	8,2	21/nov	3,75	7,0	6,9	122,8	120,2	8,5	8,4
23/nov		7,3	7,1	145,6	144,5	8,3	8,0	23/nov		7,3	7,1	145,3	144,6	8,3	8,2
18/nov		7,5	7,3	135,4	134,7	8,0	7,8	18/nov		7,4	7,3	135,2	134,6	7,9	7,6
21/nov	7,5	7,0	6,9	121,0	120,1	8,4	8,2	21/nov	15,0	6,9	6,8	121,3	120,2	8,5	8,4
23/nov		7,3	7,0	140,0	139,4	8,2	8,0	23/nov		7,3	6,9	139,2	138,7	8,2	8,0
18/nov		7,4	7,3	134,2	133,2	7,9	7,6	18/nov		7,3	7,2	134,1	133,1	7,9	7,5
21/nov	30,0	6,9	6,8	120,5	119,4	8,4	8,2	21/nov	60,0	6,9	6,8	120,0	119,2	8,4	8,0
23/nov		7,2	6,9	139,0	138,4	8,2	8,0	23/nov		7,2	6,9	139,1	138,5	8,2	7,9

APÊNDICE F – Ensaios de exposição dos organismos à radiação ionizante

Dose Letal 50% - Radiação Gama para D. similis

Ensaio 1

Início: 08/06/11 Término: 10/06/11

Dose (Gy)	Número de organismos imóveis/mortos						pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	1	2	3	4	Total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle	0	0	0	0	0	0	7,0	7,0	121,4	126,0	8,0	7,9
100	0	0	0	0	0	0	7,0	6,9	121,4	121,7	8,0	7,8
200	3	3	2	4	12	60	7,0	6,9	121,4	121,2	8,0	7,8
400	5	4	4	5	18	90	7,0	7,0	121,4	121,5	8,0	7,9
800	5	5	5	5	20	100	7,0	7,0	121,4	121,5	8,0	7,8
1600	5	5	5	5	20	100	7,0	7,0	121,4	121,5	8,0	7,8

Ensaio 2

Início: 15/06/11 Término: 17/06/11

Dose (Gy)	Número de organismos imóveis/mortos						pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	1	2	3	4	Total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle	0	0	0	1	1	5	7,3	7,3	125,3	128,4	7,5	7,4
100	0	0	0	0	0	0	7,3	7,1	125,3	125,4	7,5	7,5
200	2	2	1	0	5	20	7,3	7,2	125,3	125,8	7,5	7,2
400	4	5	4	4	17	85	7,3	7,2	125,3	125,0	7,5	7,0
800	5	5	5	5	20	100	7,3	7,2	125,3	125,8	7,5	7,0
1600	5	5	5	5	20	100	7,3	7,1	125,3	125,5	7,5	7,2

Ensaio 3

Início: 22/06/11 Término: 24/06/11

Dose (Gy)	Número de organismos imóveis/mortos						pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	1	2	3	4	Total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle	0	0	0	0	0	0	7,4	7,4	130,5	133,2	8,0	7,5
100	0	0	0	0	0	0	7,4	7,3	130,5	130,4	8,0	7,5
200	2	1	3	2	8	40	7,4	7,3	130,5	131,4	8,0	7,5
400	5	5	5	5	20	100	7,4	7,4	130,5	130,8	8,0	7,6
800	5	5	5	5	20	100	7,4	7,3	130,5	132,0	8,0	7,5
1600	5	5	5	5	20	100	7,4	7,3	130,5	135,2	8,0	7,5

Dose Letal 50% - Radiação Gama para C. silvestrii

Ensaio 1

Início: 08/06/11 Término: 10/06/11

Dose (Gy)	Número de organismos imóveis/mortos						pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	1	2	3	4	Total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle	0	0	0	0	0	0	7,0	7,0	121,4	125,2	8,0	7,7
100	0	0	0	0	0	0	7,0	6,9	121,4	122,3	8,0	7,8
200	0	0	0	0	0	0	7,0	6,9	121,4	122,0	8,0	7,7
400	0	2	1	2	5	25	7,0	6,8	121,4	121,5	8,0	7,7
800	5	5	5	5	20	100	7,0	6,9	121,4	121,6	8,0	7,7
1600	5	5	5	5	20	100	7,0	6,9	121,4	122,1	8,0	7,8

Ensaio 2

Início: 15/06/11 Término: 17/06/11

Dose (Gy)	Número de organismos imóveis/mortos						pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	1	2	3	4	Total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle	0	0	0	0	0	0	7,3	7,3	125,3	126,1	7,5	7,4
100	0	0	0	0	0	0	7,3	7,1	125,3	125,6	7,5	7,0
200	0	0	0	0	0	0	7,3	7,0	125,3	125,7	7,5	7,0
400	1	1	2	1	5	25	7,3	7,0	125,3	125,6	7,5	7,0
800	5	5	5	5	20	100	7,3	7,0	125,3	125,6	7,5	7,0
1600	5	5	5	5	20	100	7,3	7,0	125,3	125,4	7,5	7,0

Ensaio 3

Início: 22/06/11 Término: 24/06/11

Dose (Gy)	Número de organismos imóveis/mortos						pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
	1	2	3	4	Total	%	ini	fin	ini	fin	ini	fin
Controle	0	0	0	2	2	10	7,4	7,4	130,5	135,2	8,0	7,7
100	1	0	0	0	1	5	7,4	7,2	130,5	130,2	8,0	7,7
200	0	0	1	0	1	5	7,4	7,1	130,5	130,8	8,0	7,6
400	1	1	2	4	8	40	7,4	7,1	130,5	130,8	8,0	7,5
800	4	5	5	5	19	95	7,4	7,1	130,5	130,8	8,0	7,6
1600	5	5	5	5	20	100	7,4	7,1	130,5	130,5	8,0	7,6

Ensaio 1 **– Início: 21 jan 2012 Término: 28 jan 2012**

Data	Controle										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
21/jan	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
22/jan	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
23/jan	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
24/jan	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
25/jan	4	4	6	2	3	5	5	4	3	2	0
26/jan	5	6	•	4	•	6	7	4	6	†	1
27/jan	14	14	7	13	•	12	13	11	12	-	0
28/jan	6	7	12	6	•	7	9	8	6	-	0
Total	29	31	25	25	3	30	34	27	27	2	1
Média	23,3										

Data	6,25 Gy										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
21/jan	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
22/jan	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
23/jan	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
24/jan	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
25/jan	4	4	4	3	*	4	3	•	2	2	0
26/jan	3	6	7	7	*	7	6	4	3	•	0
27/jan	16	15	7	•	*	•	13	14	7	•	0
28/jan	•	12	•	13	*	15	12	7	8	•	0
Total	23	37	18	23	*	26	34	25	20	2	0
Média	23,1										

Data	12,5 Gy										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
21/jan	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
22/jan	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
23/jan	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
24/jan	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
25/jan	3	4	2	•	4	4	2	4	3	3	0
26/jan	3	3	2	4	2	2	4	5	6	5	0
27/jan	12	13	10	11	11	13	11	13	12	9	0
28/jan	8	10	11	10	10	7	9	7	11	8	0
Total	26	30	25	25	27	26	26	29	32	25	0
Média	27,1										

Data	25 Gy										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
21/jan	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
22/jan	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
23/jan	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
24/jan	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
25/jan	3	3	3	4	2	4	2	•	2	2	0
26/jan	1	2	2	3	1	4	3	4	4	2	0
27/jan	7	10	13	13	14	13	4	7	†	11	0
28/jan	10	9	7	7	10	7	†	6	†	12	0
Total	21	24	25	27	27	28	9	17	6	27	0
Média	21,1										

Data	50 Gy										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
21/jan	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
22/jan	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
23/jan	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
24/jan	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
25/jan	1	1	1	2	•	•	2	•	2	•	0
26/jan	1	2	2	1	•	•	2	•	1	•	0
27/jan	1	4	3	3	•	•	•	•	•	•	0
28/jan	•	6	6	2	•	•	•	•	•	•	0
Total	3	13	12	8	0	0	4	0	3	0	0
Média	4,3										

Data	100 Gy										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
21/jan	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
22/jan	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
23/jan	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
24/jan	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
25/jan	•	†	•	•	•	•	•	1	•	•	1
26/jan	•	-	•	•	•	•	•	•	•	•	0
27/jan	•	-	•	•	•	•	•	†	•	•	1
28/jan	•	-	•	•	•	•	•	-	•	•	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2
Média	0,1										

***Ensaio 2* – Início: 10 fev 2012 Término: 17 fev 2012**

Data	Controle										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
10/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
11/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
12/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
13/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
14/fev	5	7	5	6	5	5	7	5	6	4	0
15/fev	5	5	7	•	7	7	4	4	6	6	0
16/fev	•	•	•	6	•	•	•	•	•	•	0
17/fev	7	9	11	9	9	8	8	8	7	11	0
Total	17	21	23	21	21	20	19	17	19	21	0
Média	19,9										

Data	6,25 Gy										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
10/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
11/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
12/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
13/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
14/fev	5	4	2	6	5	6	4	6	4	4	0
15/fev	2	•	5	4	4	5	4	6	6	3	0
16/fev	•	•	9	•	•	•	•	•	•	•	0
17/fev	13	9	10	9	13	9	5	5	8	7	0
Total	20	13	26	19	22	20	13	17	18	14	0
Média	18,2										

Data	12,5 Gy										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
10/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
11/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
12/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
13/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
14/fev	5	6	6	5	7	4	3	3	6	6	0
15/fev	7	4	6	4	5	•	8	4	4	5	0
16/fev	4	•	•	•	•	5	7	•	•	•	0
17/fev	•	8	10	8	12	8	2	5	11	9	0
Total	16	18	22	17	24	17	20	12	21	20	0
Média	18,7										

Data	25 Gy										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
10/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
11/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
12/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
13/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
14/fev	4	4	5	3	5	6	3	4	5	3	0
15/fev	•	•	5	5	•	3	•	2	4	5	0
16/fev	•	1	•	•	4	6	6	•	•	•	0
17/fev	10	14	10	10	5	†	•	15	12	9	0
Total	14	19	20	18	14	15	9	21	21	17	0
Média	16,8										

Data	50 Gy										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
10/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
11/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
12/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
13/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
14/fev	1	•	2	•	1	5	2	1	3	3	0
15/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
16/fev	1	•	•	•	•	•	•	2	•	•	0
17/fev	•	•	•	•	3	•	•	10	•	1	0
Total	2	0	2	0	4	5	2	13	3	4	0
Média	3,5										

Data	100 Gy										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
10/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
11/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
12/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
13/fev	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
14/fev	†	•	•	•	•	•	†	•	•	•	2
15/fev	-	†	•	†	†	†	-	•	•	•	4
16/fev	-	-	•	-	-	-	-	•	•	•	0
17/fev	-	-	•	-	-	-	-	•	•	†	1
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
Média	0										

Ensaio 3 **– Início: 2 mar 2012 Término: 9 mar 2012**

Data	Controle										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
02/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
03/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
04/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
06/mar	5	4	3	4	4	6	4	4	†	5	0
07/mar	5	5	6	2	•	6	5	6	-	•	0
08/mar	•	•	•	•	3	•	•	•	-	4	0
09/mar	10	10	10	9	6	12	8	10	-	12	0
Total	20	19	19	15	13	24	17	20	0	21	0
Média	16,8										

Data	6,25 Gy										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
02/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
03/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
04/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
06/mar	4	5	5	6	6	6	5	5	6	5	0
07/mar	2	5	5	•	3	•	6	5	5	5	0
08/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/mar	8	12	5	•	8	9	7	12	9	9	0
Total	14	22	15	6	17	15	18	22	20	19	0
Média	16,8										

Data	12,5 Gy										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
02/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
03/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
04/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
06/mar	•	6	6	5	7	5	6	5	6	5	0
07/mar	3	5	4	5	7	•	5	6	6	4	0
08/mar	6	•	•	•	•	5	•	•	•	•	0
09/mar	14	14	10	12	8	12	11	13	12	12	0
Total	23	25	20	22	22	22	22	24	24	21	0
Média	22,5										

Data	25 Gy										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
02/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
03/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
04/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
06/mar	5	4	5	4	6	4	6	5	4	5	0
07/mar	1	5	•	•	•	4	5	1	•	•	0
08/mar	•	•	•	5	5	•	•	•	2	2	0
09/mar	6	13	13	8	7	11	9	9	7	8	0
Total	12	22	18	17	18	19	20	15	13	15	0
Média	16,9										

Data	50 Gy										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
02/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
03/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
04/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
06/mar	•	•	•	•	•	1	1	2	•	2	0
07/mar	•	•	•	•	•	•	•	1	•	•	0
08/mar	•	•	•	•	2	•	1	•	2	•	0
09/mar	3	•	•	•	•	3	•	5	3	•	0
Total	3	0	0	0	2	4	2	8	5	2	0
Média	2,6										

Data	100 Gy										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
02/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
03/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
04/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
06/mar	•	•	•	•	•	†	•	•	•	•	0
07/mar	•	•	•	•	•	-	•	•	†	•	0
08/mar	•	†	†	•	†	-	†	•	-	•	0
09/mar	•	-	-	•	-	-	-	•	-	•	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Média	0										

APÊNDICE G – Análises físico-químicas dos ensaios com radiação ionizante

***Ensaio 1* – Início: 21 jan 2012 Término: 28 jan 2012**

Data	Dose (Gy)	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)		Data	Dose (Gy)	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
		ini	fin	ini	fin	ini	fin			ini	fin	ini	fin	ini	fin
21/jan		7,0	7,5	161,2	150,8	-	-	21/jan		7,0	7,3	161,2	156,0	-	-
24/jan	Controle	7,2	7,5	131,9	128,9	-	-	24/jan	6,25	7,2	7,5	131,9	130,5	-	-
26/jan		7,0	7,6	138,8	135,6	-	-	26/jan		7,0	7,2	138,8	129,0	-	-
21/jan		7,0	7,7	161,2	156,4	-	-	21/jan		7,0	7,1	161,2	160,3	-	-
24/jan	12,5	7,2	7,6	131,9	125,3	-	-	24/jan	25	7,2	7,3	131,9	128,8	-	-
26/jan		7,0	7,1	138,8	131,7	-	-	26/jan		7,0	7,2	138,8	126,9	-	-
21/jan		7,0	7,2	161,2	158,7	-	-	21/jan		7,0	7,3	161,2	156,9	-	-
24/jan	50	7,2	7,3	131,9	124,8	-	-	24/jan	100	7,2	7,5	131,9	123,9	-	-
26/jan		7,0	7,5	138,8	131,7	-	-	26/jan		7,0	7,3	138,8	128,9	-	-

- = medida não realizada; oxímetro quebrado.

***Ensaio 2* – Início: 10 fev 2012 Término: 17 fev 2012**

Data	Dose (Gy)	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)		Data	Dose (Gy)	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
		ini	fin	ini	fin	ini	fin			ini	fin	ini	fin	ini	fin
10/fev		7,2	7,3	128,9	121,3	-	-	10/fev		7,2	7,0	128,9	122,3	-	-
13/fev	Controle	7,3	7,5	135,2	126,9	-	-	13/fev	6,25	7,3	7,4	135,2	130,2	-	-
15/fev		7,1	7,3	126,8	124,5	-	-	15/fev		7,1	7,3	126,8	126,3	-	-
10/fev		7,2	7,5	128,9	127,8	-	-	10/fev		7,2	7,3	128,9	127,2	-	-
13/fev	12,5	7,3	7,2	135,2	134,8	-	-	13/fev	25	7,3	7,4	135,2	122,8	-	-
15/fev		7,1	7,2	126,8	122,0	-	-	15/fev		7,1	7,1	126,8	125,0	-	-
10/fev		7,2	7,3	128,9	127,0	-	-	10/fev		7,2	7,2	128,9	128,2	-	-
13/fev	50	7,3	7,3	135,2	132,0	-	-	13/fev	100	7,3	7,2	135,2	132,2	-	-
15/fev		7,1	7,2	126,8	124,3	-	-	15/fev		7,1	7,1	126,8	125,4	-	-

- = medida não realizada; oxímetro quebrado.

***Ensaio 3* – Início: 2 mar 2012 Término: 9 mar 2012**

Data	Dose (Gy)	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)		Data	Dose (Gy)	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
		ini	fin	ini	fin	ini	fin			ini	fin	ini	fin	ini	fin
02/mar		7,5	8,2	152,9	142,0	-	-	02/mar		7,5	7,6	152,9	143,8	-	-
05/mar	Controle	7,0	7,4	125,6	122,0	-	-	05/mar	6,25	7,0	7,2	125,6	122,6	-	-
07/mar		7,3	7,5	124,6	121,4	-	-	07/mar		7,3	7,5	124,6	124,8	-	-
02/mar		7,5	7,8	152,9	150,9	-	-	02/mar		7,5	8,0	152,9	133,5	-	-
05/mar	12,5	7,0	7,1	125,6	122,0	-	-	05/mar	25	7,0	7,1	125,6	110,8	-	-
07/mar		7,3	7,4	124,6	121,3	-	-	07/mar		7,3	7,5	124,6	124,7	-	-
02/mar		7,5	7,7	152,9	136,0	-	-	02/mar		7,5	7,8	152,9	142,8	-	-
05/mar	50	7,0	7,2	125,6	124,4	-	-	05/mar	100	7,0	7,3	125,6	120,6	-	-
07/mar		7,3	7,4	124,6	123,5	-	-	07/mar		7,3	7,5	124,6	118,3	-	-

- = medida não realizada; oxímetro quebrado.

APÊNDICE H – Ensaios com os organismos irradiados e expostos aos princípios ativos

Ensaio 1 **– Organismos irradiados e expostos ao OE**

Início: 29 jun 2012 Término: 6 jul 2012

Data	Controle de água										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
29/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
30/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
01/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
02/jul	2	2	3	2	4	2	2	•	2	2	0
03/jul	2	4	1	4	4	4	4	4	2	4	0
04/jul	4	•	•	•	•	•	•	•	4	2	0
05/jul	•	6	6	7	6	7	6	6	6	2	0
06/jul	10	8	8	8	8	8	8	10	8	8	0
Total	18	20	18	21	22	21	20	20	22	18	0
Média	20										

Data	Controle de água com orgs. Irradiados)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
29/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
30/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
01/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
02/jul	2	2	2	2	3	2	2	2	2	2	0
03/jul	4	4	4	4	2	2	4	4	2	4	0
04/jul	•	•	1	•	2	•	2	•	•	•	0
05/jul	6	8	6	6	4	8	4	8	6	6	0
06/jul	8	7	8	8	7	8	7	7	7	6	0
Total	20	21	21	20	18	20	19	21	17	18	0
Média	19,5										

Data	1 mg.L^{-1} de óleo										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
29/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
30/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
01/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
02/jul	2	3	2	2	2	4	2	2	2	3	0
03/jul	4	2	4	2	1	2	4	1	2	2	0
04/jul	4	•	•	•	4	4	•	•	5	4	0
05/jul	5	6	5	5	5	6	6	5	6	5	0
06/jul	7	8	6	6	8	6	8	8	7	7	0
Total	22	19	17	15	20	22	20	16	22	21	0
Média	19,4										

Data	2 mg.L^{-1} de óleo										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
29/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
30/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
01/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
02/jul	2	3	3	†	2	†	2	2	2	†	3
03/jul	•	2	4	-	5	-	4	2	2	-	0
04/jul	4	•	4	-	•	-	4	4	4	-	0
05/jul	6	6	6	-	6	-	8	6	8	-	0
06/jul	8	7	8	-	10	-	8	8	10	-	0
Total	20	18	25	0	23	0	26	22	26	0	3
Média	16										

Data	4 mg.L^{-1} de óleo										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
29/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
30/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
01/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
02/jul	2	•	2	3	•	2	•	3	2	†	1
03/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	-	0
04/jul	2	3	1	4	4	2	1	2	4	-	0
05/jul	4	4	2	2	1	2	2	2	2	-	0
06/jul	6	8	†	7	7	7	8	7	7	-	1
Total	14	15	5	16	12	13	11	14	15	0	2
Média	11,5										

Data	8 mg.L^{-1} de óleo										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
29/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
30/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
01/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
02/jul	†	•	†	†	•	†	†	†	†	†	8
03/jul	-	•	-	-	†	-	-	-	-	-	1
04/jul	-	•	-	-	-	-	-	-	-	-	0
05/jul	-	•	-	-	-	-	-	-	-	-	0
06/jul	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	0
Total	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	9
Média	0,3										

Data	16 mg.L^{-1} de óleo										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
29/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
30/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
01/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
02/jul	†	†	†	•	†	†	•	•	†	†	7
03/jul	-	-	-	•	-	-	•	•	-	-	1
04/jul	-	-	-	•	-	-	•	•	-	-	0
05/jul	-	-	-	1	-	-	•	•	-	-	0
06/jul	-	-	-	•	-	-	•	•	-	-	0
Total	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	7
Média	0,1										

Data	DMSO										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
29/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
30/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
01/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
02/jul	2	4	2	2	3	2	2	2	†	2	1
03/jul	4	3	4	4	2	4	4	5	-	3	0
04/jul	4	•	•	1	2	•	2	•	-	•	0
05/jul	6	5	6	4	6	8	6	4	-	1	0
06/jul	8	10	8	8	8	9	8	9	-	13	0
Total	24	22	20	19	21	23	22	20	0	19	1
Média	19										

Data	DMSO com orgs. Irradiados										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
29/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
30/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
01/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
02/jul	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2	0
03/jul	4	2	2	4	3	4	4	2	3	4	0
04/jul	•	4	3	•	•	•	•	•	•	2	0
05/jul	6	5	5	7	6	4	6	6	6	4	0
06/jul	8	7	7	8	9	9	8	7	8	8	0
Total	20	20	19	20	19	19	20	17	19	20	0
Média	19,3										

Ensaio 2 **– Organismos irradiados e expostos ao OE**

Início: 6 jul 2012 Término: 13 jul 2012

Data	Controle de água										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
06/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
07/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/jul	2	2	2	1	3	2	2	1	2	2	0
10/jul	2	2	•	2	2	4	2	4	2	•	0
11/jul	•	•	4	•	•	•	•	5	•	4	0
12/jul	6	6	4	6	4	8	5	6	6	6	0
13/jul	7	6	8	6	9	8	6	8	10	8	0
Total	17	16	18	15	18	22	15	24	20	20	0
Média	18,5										

Data	Controle de água com orgs. Irradiados)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
06/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
07/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/jul	•	2	2	3	4	2	2	2	1	2	0
10/jul	4	2	2	2	•	•	•	•	5	•	0
11/jul	•	•	•	•	4	2	2	2	•	2	0
12/jul	6	4	6	6	5	4	4	4	4	4	0
13/jul	8	10	7	8	6	11	7	12	6	6	0
Total	18	18	17	19	19	19	15	20	16	14	0
Média	17,5										

Data	1 mg.L^{-1} de óleo										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
06/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
07/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/jul	4	4	2	3	2	2	2	2	2	2	0
10/jul	4	2	2	4	2	2	4	4	•	3	0
11/jul	•	1	•	•	4	4	•	•	•	2	0
12/jul	4	•	6	7	•	•	6	6	•	•	0
13/jul	9	13	8	8	10	11	8	12	•	10	0
Total	21	20	18	22	18	19	20	24	2	17	0
Média	18,1										

Data	2 mg.L^{-1} de óleo										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
06/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
07/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/jul	2	2	•	2	2	2	4	2	2	3	0
10/jul	•	2	†	•	•	•	•	4	•	2	1
11/jul	2	•	-	2	2	3	2	†	3	•	1
12/jul	4	7	-	6	5	6	6	-	4	4	0
13/jul	6	5	-	7	8	6	5	-	6	7	0
Total	14	16	0	17	17	17	17	6	15	16	2
Média	13,5										

Data	4 mg.L^{-1} de óleo										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
06/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
07/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/jul	•	•	2	2	†	2	†	†	•	2	3
10/jul	2	2	•	•	-	•	-	-	4	•	0
11/jul	•	•	4	5	-	4	-	-	5	4	0
12/jul	6	7	•	6	-	•	-	-	7	•	1
13/jul	7	6	6	8	-	9	-	-	5	8	0
Total	15	15	12	21	0	15	0	0	21	14	3
Média	11,3										

Data	8 mg.L^{-1} de óleo										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
06/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
07/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/jul	†	2	•	2	2	†	†	2	4	2	3
10/jul	-	•	†	†	•	-	-	•	•	•	2
11/jul	-	4	-	-	4	-	-	5	4	2	0
12/jul	-	•	-	-	•	-	-	•	•	•	0
13/jul	-	•	-	-	1	-	-	•	•	•	0
Total	0	6	0	2	7	0	0	7	8	4	5
Média	3,4										

Data	16 mg.L^{-1} de óleo										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
06/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
07/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/jul	†	†	•	•	•	†	•	†	†	•	5
10/jul	-	-	†	†	-	†	•	•	-	†	4
11/jul	-	-	-	•	-	-	•	•	-	-	0
12/jul	-	-	-	1	-	-	•	1	-	-	0
13/jul	-	-	-	•	-	-	†	•	-	-	1
Total	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	10
Média	0,2										

Data	DMSO										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
06/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
07/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/jul	2	2	3	2	2	2	4	2	3	2	0
10/jul	4	2	4	4	2	4	2	3	4	2	0
11/jul	•	1	2	•	4	•	•	•	3	1	0
12/jul	6	6	•	7	6	5	6	5	•	7	0
13/jul	5	7	6	8	6	6	7	5	6	5	0
Total	17	18	15	21	20	17	19	15	16	17	0
Média	17,5										

Data	DMSO com orgs. Irradiados										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
06/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
07/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/jul	2	1	2	2	2	2	4	2	2	2	0
10/jul	4	5	2	2	4	2	2	2	†	3	0
11/jul	•	1	•	•	•	4	•	•	-	6	0
12/jul	6	6	6	6	7	4	7	6	-	8	1
13/jul	8	7	7	5	8	7	6	7	-	5	0
Total	20	20	17	15	21	19	19	17	2	24	1
Média	17,4										

Ensaio 3 **– Organismos irradiados e expostos ao OE**

Início: 13 jul 2012 Término: 20 jul 2012

Data	Controle de água										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
13/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
14/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
15/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
16/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
17/jul	4	4	4	3	2	4	4	4	3	2	0
18/jul	4	1	5	2	2	2	4	4	2	2	0
19/jul	•	•	•	•	•	•	1	•	•	3	0
20/jul	8	9	9	11	10	8	8	10	9	8	0
Total	16	14	18	16	14	14	17	18	14	15	0
Média	15,6										

Data	Controle de água com orgs. irradiados										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
13/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
14/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
15/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
16/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
17/jul	3	4	4	2	4	3	2	4	4	3	0
18/jul	2	4	5	2	4	4	2	2	4	2	0
19/jul	1	•	•	3	•	•	1	•	•	1	0
20/jul	7	7	8	6	10	9	11	9	7	7	0
Total	13	15	17	13	18	16	16	15	15	13	0
Média	15,1										

Data	1 mg.L^{-1} de óleo										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
13/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
14/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
15/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
16/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
17/jul	4	2	2	4	4	2	4	5	3	4	0
18/jul	3	3	4	4	3	4	4	1	4	3	0
19/jul	2	•	•	1	•	•	1	•	•	1	0
20/jul	5	8	10	7	9	9	7	9	11	8	0
Total	14	13	16	16	16	15	16	15	18	16	0
Média	15,5										

Data	2 mg.L^{-1} de óleo										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
13/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
14/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
15/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
16/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
17/jul	2	2	4	2	4	2	•	4	4	2	0
18/jul	2	4	1	3	4	2	4	1	3	2	0
19/jul	•	•	•	•	•	•	2	2	•	•	0
20/jul	5	7	5	6	5	8	5	8	9	7	0
Total	9	13	10	11	13	12	11	15	16	11	0
Média	12,1										

Data	4 mg.L^{-1} de óleo										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
13/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
14/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
15/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
16/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
17/jul	•	4	2	4	•	4	•	3	4	5	0
18/jul	4	1	2	•	2	2	5	2	2	1	0
19/jul	•	•	•	•	•	†	1	•	•	•	1
20/jul	4	5	4	6	7	-	6	7	7	•	0
Total	8	10	8	10	9	6	12	12	13	6	1
Média	9,4										

Data	8 mg.L^{-1} de óleo										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
13/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
14/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
15/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
16/jul	•	•	•	•	†	•	•	•	•	•	1
17/jul	•	†	•	4	-	†	•	2	•	4	2
18/jul	4	-	2	•	-	-	†	2	2	•	1
19/jul	•	-	•	•	-	-	-	•	•	•	0
20/jul	•	-	3	6	-	-	-	1	2	•	0
Total	4	0	5	10	0	0	0	5	4	4	4
Média	3,2										

Data	16 mg.L^{-1} de óleo										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
13/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
14/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
15/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
16/jul	•	†	•	•	•	•	•	†	•	•	2
17/jul	†	-	•	•	1	†	•	-	†	†	4
18/jul	-	-	•	•	•	-	2	-	-	-	0
19/jul	-	-	2	†	•	-	•	-	-	-	1
20/jul	-	-	•	-	•	-	•	-	-	-	0
Total	0	0	2	0	1	0	2	0	0	0	7
Média	0,5										

Data	DMSO										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
13/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
14/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
15/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
16/jul	2	•	3	•	•	2	1	•	•	•	0
17/jul	2	2	4	4	4	2	3	4	4	4	0
18/jul	4	4	2	4	2	•	2	4	2	4	0
19/jul	•	•	•	•	•	•	•	1	•	2	0
20/jul	7	6	8	5	9	11	9	8	10	9	0
Total	15	12	17	13	15	15	15	17	16	19	0
Média	15,4										

Data	DMSO com orgs. irradiados										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
13/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
14/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
15/jul	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
16/jul	•	•	•	2	1	•	•	•	•	•	0
17/jul	3	4	4	4	4	4	3	4	2	4	0
18/jul	2	2	4	2	3	3	4	2	4	3	0
19/jul	•	•	•	•	•	1	•	•	•	2	0
20/jul	8	9	7	6	8	7	10	10	7	7	0
Total	13	15	15	14	16	15	17	16	13	16	0
Média	15										

Ensaio 1 **– Organismos irradiados e expostos ao DEET**

Início: 2 mar 2012 Término: 9 mar 2012

Data	Controle										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
02/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
03/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
04/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
06/mar	2	2	4	4	4	2	4	2	4	4	0
07/mar	4	4	•	6	•	•	5	6	4	6	0
08/mar	•	2	5	•	5	7	•	•	•	•	0
09/mar	10	8	8	7	8	8	9	8	9	8	0
Total	16	16	17	17	17	17	18	16	17	18	0
Média	16,9										

Data	Controle (organismos irradiados)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
02/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
03/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
04/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/mar	•	•	•	•	•	3	•	•	•	•	0
06/mar	4	3	4	2	2	2	4	3	6	4	0
07/mar	•	2	6	1	2	2	•	•	3	4	0
08/mar	5	•	•	1	6	4	4	5	•	•	0
09/mar	8	12	7	11	8	6	8	7	6	7	0
Total	17	17	17	15	18	17	16	15	15	15	0
Média	16,2										

Data	3,75 mg.L^{-1} DEET										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
02/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
03/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
04/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	3	0
06/mar	5	5	6	5	6	5	2	5	4	4	0
07/mar	4	3	•	•	5	5	•	2	7	•	0
08/mar	•	7	•	4	•	•	6	•	•	2	0
09/mar	5	2	8	6	5	5	7	9	5	8	0
Total	14	17	14	15	16	15	15	16	16	17	0
Média	15,5										

Data	7,5 mg.L^{-1} DEET										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
02/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
03/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
04/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/mar	•	5	•	•	•	•	•	•	•	•	0
06/mar	4	3	4	3	2	2	4	4	4	4	0
07/mar	5	•	4	•	4	4	4	•	4	4	0
08/mar	•	2	•	5	•	•	•	2	•	•	0
09/mar	6	5	8	6	8	7	7	10	8	8	0
Total	15	15	16	14	14	13	15	16	16	16	0
Média	15										

Data	15 mg.L^{-1} DEET										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
02/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
03/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
04/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
06/mar	4	5	5	4	5	5	3	5	4	4	0
07/mar	2	•	•	4	4	4	2	2	2	3	0
08/mar	3	1	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/mar	•	4	5	7	5	4	8	9	9	8	0
Total	9	10	10	15	14	13	13	16	15	15	0
Média	13										

Data	30 mg.L^{-1} DEET										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
02/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
03/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
04/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
06/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
07/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Média	0										

Data	60 mg.L^{-1} DEET										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
02/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
03/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
04/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
05/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
06/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
07/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
08/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
09/mar	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Média	0										

Ensaio 2 **– Organismos irradiados e expostos ao DEET**

Início: 2 mar 2012 Término: 9 mar 2012

Data	Controle										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
15/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
16/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
17/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
18/jun	•	•	•	•	•	•	3	•	•	4	0
19/jun	5	6	•	2	2	•	•	5	7	•	0
20/jun	2	•	3	3	•	4	4	•	•	2	0
21/jun	•	2	3	4	1	4	5	•	2	•	0
22/jun	8	8	10	4	8	8	7	8	9	8	0
Total	15	16	16	13	11	16	19	13	18	14	0
Média	15,1										

Data	Controle (organismos irradiados)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
15/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
16/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
17/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
18/jun	•	•	•	•	•	2	•	•	2	•	0
19/jun	5	8	4	5	6	•	5	3	•	3	0
20/jun	•	•	2	4	3	6	•	•	3	•	0
21/jun	3	2	•	1	•	2	3	•	4	4	0
22/jun	8	9	2	7	6	6	4	5	12	11	0
Total	16	19	8	17	15	16	12	8	21	18	0
Média	15										

Data	3,75 mg.L^{-1} DEET										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
15/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
16/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
17/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
18/jun	3	•	3	•	•	•	•	•	•	•	0
19/jun	6	4	•	3	7	3	4	6	6	3	0
20/jun	2	•	3	•	•	2	3	2	1	•	0
21/jun	3	4	•	3	•	•	7	1	3	•	0
22/jun	6	11	10	7	8	-	•	9	6	9	0
Total	20	19	16	13	15	5	14	18	16	12	0
Média	14,8										

Data	7,5 mg.L^{-1} DEET										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
15/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
16/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
17/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
18/jun	•	•	•	•	•	3	•	•	•	3	0
19/jun	6	6	6	3	4	•	5	5	5	•	0
20/jun	•	•	•	•	•	3	2	1	•	4	0
21/jun	1	3	•	2	2	5	•	•	•	4	0
22/jun	7	8	4	9	12	3	6	5	6	•	0
Total	14	17	10	14	18	14	13	11	11	11	0
Média	13,3										

Data	15 mg.L^{-1} DEET										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
15/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
16/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
17/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
18/jun	•	•	•	•	•	3	3	•	•	•	0
19/jun	4	6	5	4	5	•	•	2	3	2	0
20/jun	•	2	4	3	3	2	4	•	•	•	0
21/jun	1	•	•	•	•	4	6	2	5	•	0
22/jun	11	6	1	5	7	7	2	12	7	•	0
Total	16	14	10	12	15	16	15	16	15	2	0
Média	13,1										

Data	30 mg.L^{-1} DEET										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
15/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
16/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
17/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
18/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
19/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
20/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
21/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
22/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Média	0										

Data	60 mg.L^{-1} DEET										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
15/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
16/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
17/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
18/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
19/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
20/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
21/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
22/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Média	0										

***Ensaio 3* – Organismos irradiados e expostos ao DEET**

Início: 22 jun 2012 Término: 29 jun 2012

Data	Controle										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
22/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
23/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
24/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
25/jun	4	3	2	6	3	3	5	3	†	4	1
26/jun	•	7	•	•	•	•	6	•	-	•	0
27/jun	4	12	5	4	3	4	•	5	-	4	0
28/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	-	•	0
29/jun	10	6	5	8	11	13	10	9	-	8	0
Total	18	28	12	18	17	20	21	17	0	16	1
Média	16,7										

Data	Controle (organismos irradiados)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
22/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
23/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
24/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
25/jun	•	4	5	5	4	2	4	1	3	4	0
26/jun	3	•	•	5	•	1	2	•	6	3	0
27/jun	3	2	9	4	2	•	•	4	10	•	0
28/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
29/jun	7	8	10	9	7	5	9	12	1	9	0
Total	13	14	24	23	13	8	15	17	20	16	0
Média	16,3										

Data	3,75 mg.L^{-1} DEET										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
22/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
23/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
24/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
25/jun	•	•	•	2	•	•	•	•	•	•	0
26/jun	4	4	3	2	2	3	4	3	4	•	0
27/jun	2	•	•	•	•	•	•	3	•	4	0
28/jun	1	2	6	3	3	1	3	•	4	6	0
29/jun	5	†	11	9	5	8	10	13	4	9	1
Total	12	6	20	16	10	12	17	19	12	19	1
Média	14,3										

Data	7,5 mg.L^{-1} DEET										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
22/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
23/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
24/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
25/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
26/jun	•	•	3	3	2	•	2	2	1	•	0
27/jun	4	5	5	•	3	5	6	•	4	3	0
28/jun	7	2	•	4	4	2	•	5	4	7	0
29/jun	2	8	9	8	5	6	7	7	8	5	0
Total	13	15	17	15	14	13	15	14	17	15	0
Média	14,8										

Data	15 mg.L^{-1} DEET										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
22/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
23/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
24/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
25/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
26/jun	3	•	3	3	3	2	•	2	3	3	0
27/jun	•	•	4	•	•	•	•	5	•	•	0
28/jun	1	2	•	6	4	2	2	•	7	7	0
29/jun	•	7	7	9	11	5	2	7	8	8	0
Total	4	9	14	18	18	9	4	14	18	18	0
Média	12,6										

Data	30 mg.L^{-1} DEET										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
22/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
23/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
24/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
25/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
26/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
27/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
28/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
29/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Média	0										

Data	60 mg.L^{-1} DEET										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Mortos
22/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
23/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
24/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
25/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
26/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
27/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
28/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
29/jun	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	0
Total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Média	0										

APÊNDICE H – Análises físico-químicas dos ensaios com radiação ionizante e princípios ativos

Organismos irradiados e expostos ao OE

***Ensaio 1* – Início: 29 jun 2012 Término: 6 jul 2012**

Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)		Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
		ini	fin	ini	fin	ini	fin			ini	fin	ini	fin	ini	fin
29/jun		7,4	7,5	133,3	131,2	-	-	29/jun		7,4	7,5	133,4	131,5	-	-
02/jun	Controle	7,3	7,5	125,4	124,8	-	-	02/jun	Controle Radiação	7,3	7,4	125,6	124,7	-	-
04/jun		7,0	7,4	142,8	140,5	-	-	04/jun		7,0	7,4	142,6	140,7	-	-
29/jun		7,4	7,6	133,6	130,4	-	-	29/jun		7,4	7,6	130,5	130,1	-	-
02/jun	1,0	7,3	7,4	126,2	124,9	-	-	02/jun	2,0	7,3	7,4	124,7	124,1	-	-
04/jun		7,0	7,2	140,6	140,8	-	-	04/jun		7,0	7,3	138,9	138,7	-	-
29/jun		7,2	7,4	132,9	129,6	-	-	29/jun		7,2	7,3	132,7	129,7	-	-
02/jun	4,0	7,3	7,4	124,3	122,4	-	-	02/jun	8,0	7,3	7,4	123,7	122,3	-	-
04/jun		6,9	7,0	138,4	138,1	-	-	04/jun		6,9	7,0	138,1	137,6	-	-
29/jun		7,2	7,2	131,8	129,7	-	-	29/jun		7,5	7,7	135,2	132,0	-	-
02/jun	16,0	7,3	7,3	123,4	122,0	-	-	02/jun	DMSO	7,4	7,5	125,4	124,7	-	-
04/jun		6,9	7,0	137,5	134,2	-	-	04/jun		7,4	7,5	140,8	139,8	-	-
29/jun		7,5	7,7	135,1	132,6	-	-								
02/jun	DMSO Radiação	7,4	7,5	125,3	124,8	-	-								
04/jun		7,4	7,5	140,1	139,7	-	-								

***Ensaio 2* – Início: 6 jul 2012 Término: 13 jul 2012**

Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)		Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
		ini	fin	ini	fin	ini	fin			ini	fin	ini	fin	ini	fin
06/jul		7,2	7,3	123,5	122,6	-	-	06/jul		7,2	7,3	123,6	122,1	-	-
09/jul	Controle	7,0	7,2	110,1	109,7	-	-	09/jul	Controle Radiação	7,0	7,1	110,2	109,7	-	-
12/jul		7,5	7,6	120,0	119,7	-	-	12/jul		7,5	7,6	120,3	119,6	-	-
06/jul		7,2	7,3	123,7	122,8	-	-	06/jul		7,2	7,3	124,1	122,7	-	-
09/jul	1,0	7,1	7,2	110,4	109,8	-	-	09/jul	2,0	7,1	7,2	110,1	108,5	-	-
12/jul		7,5	7,5	120,2	119,3	-	-	12/jul		7,5	7,5	119,7	118,6	-	-
06/jul		7,2	7,3	124,8	122,8	-	-	06/jul		7,5	7,6	124,7	122,1	-	-
09/jul	4,0	7,2	7,3	109,8	108,9	-	-	09/jul	8,0	7,2	7,3	109,4	108,2	-	-
12/jul		7,6	7,7	119,4	118,4	-	-	12/jul		7,6	7,7	118,9	118,1	-	-
06/jul		7,5	7,6	125,2	120,9	-	-	06/jul		7,2	7,3	123,7	123,4	-	-
09/jul	16,0	7,3	7,4	108,7	107,6	-	-	09/jul	DMSO	7,5	7,6	112,7	110,4	-	-
12/jul		7,6	7,6	118,7	117,5	-	-	12/jul		7,1	7,3	121,2	119,8	-	-
06/jul		7,2	7,3	123,6	123,1	-	-								
09/jul	DMSO Radiação	7,5	7,7	112,4	100,7	-	-								
12/jul		7,1	7,3	121,4	119,7	-	-								

Ensaio 3 **– Início: 13 jul 2012 Término: 20 jul 2012**

Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)		Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
		ini	fin	ini	fin	ini	fin			ini	fin	ini	fin	ini	fin
13/jul		7,3	7,3	103,4	102,9	-	-	13/jul		7,3	7,3	103,5	103,1	-	-
16/jul	Controle	7,0	7,1	114,2	113,9	-	-	16/jul	Controle Radiação	7,0	7,2	114,5	114,1	-	-
18/jul		7,2	7,2	100,4	99,9	-	-	18/jul		7,2	7,2	100,5	99,7	-	-
13/jul		7,3	7,3	103,9	103,8	-	-	13/jul		7,3	7,3	102,8	103,7	-	-
16/jul	1,0	7,1	7,2	114,1	113,7	-	-	16/jul	2,0	7,1	7,2	114,0	113,8	-	-
18/jul		7,2	7,3	100,3	99,4	-	-	18/jul		7,2	7,3	99,2	99,1	-	-
13/jul		7,3	7,3	102,7	102,1	-	-	13/jul		7,3	7,4	101,5	102,0	-	-
16/jul	4,0	7,2	7,3	113,8	113,2	-	-	16/jul	8,0	7,1	7,2	113,7	112,9	-	-
18/jul		7,3	7,4	99,7	99,2	-	-	18/jul		7,2	7,3	99,3	98,9	-	-
13/jul		7,5	7,5	100,2	99,2	-	-	13/jul		7,4	7,5	102,5	101,5	-	-
16/jul	16,0	7,2	7,3	113,6	112,7	-	-	16/jul	DMSO	7,5	7,6	117,5	116,9	-	-
18/jul		7,2	7,3	98,7	98,1	-	-	18/jul		7,5	7,5	100,2	99,7	-	-
13/jul		7,4	7,5	102,8	101,6	-	-								
16/jul	DMSO Radiação	7,5	7,5	117,2	116,7	-	-								
18/jul		7,5	7,6	100,4	98,8	-	-								

Organismos irradiados e expostos ao DEET

Ensaio 1 **– Início: 2 mar 2012 Término: 9 mar 2012**

Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)		Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
		ini	fin	ini	fin	ini	fin			ini	fin	ini	fin	ini	fin
02/mar		7,0	7,0	132,4	130,1	-	-	02/mar		7,0	7,0	132,8	130,1	-	-
05/mar	Controle	7,2	7,1	112,8	112,3	-	-	05/mar	Controle Radiação	7,2	7,1	112,8	112,4	-	-
07/mar		7,3	7,1	100,2	98,6	-	-	07/mar		7,3	7,2	100,4	98,7	-	-
02/mar		7,0	7,0	132,5	130,3	-	-	02/mar		6,9	6,9	131,4	130,0	-	-
05/mar	3,75	7,1	7,0	112,6	112,0	-	-	05/mar	7,5	7,1	7,0	112,5	111,9	-	-
07/mar		7,3	7,2	100,6	98,5	-	-	07/mar		7,2	7,1	100,5	97,8	-	-
02/mar		6,9	6,9	131,5	130,2	-	-	02/mar		6,9	6,8	130,0	129,4	-	-
05/mar	15,0	7,0	7,0	111,7	111,7	-	-	05/mar	30,0	7,0	6,9	111,8	111,2	-	-
07/mar		7,2	7,0	99,7	97,6	-	-	07/mar		7,2	7,1	97,5	96,4	-	-
02/mar		6,8	6,8	129,7	129,5	-	-								
05/mar	60,0	6,9	6,9	111,1	108,7	-	-								
07/mar		7,1	7,0	97,6	96,5	-	-								

***Ensaio 2* – Início: 2 mar 2012 Término: 9 mar 2012**

Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)		Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
		ini	fin	ini	fin	ini	fin			ini	fin	ini	fin	ini	fin
02/mar		7,5	7,4	121,3	121,7	-	-	02/mar		7,4	7,4	121,5	121,9	-	-
05/mar	Controle	7,1	7,0	135,2	134,4	-	-	05/mar	Controle Radiação	7,1	7,0	135,6	134,6	-	-
07/mar		7,0	7,0	114,7	114,1	-	-	07/mar		7,0	7,0	114,6	114,2	-	-
02/mar		7,5	7,3	121,3	120,2	-	-	02/mar		7,6	7,5	120,7	119,8	-	-
05/mar	3,75	7,1	7,0	135,1	134,7	-	-	05/mar	7,5	7,1	7,0	134,4	133,5	-	-
07/mar		7,1	7,0	113,5	112,5	-	-	07/mar		7,1	6,9	113,7	111,7	-	-
02/mar		7,6	7,4	119,7	117,4	-	-	02/mar		7,6	7,5	119,4	115,2	-	-
05/mar	15,0	7,2	7,3	130,2	129,8	-	-	05/mar	30,0	7,2	7,1	130,5	129,5	-	-
07/mar		7,3	7,2	112,8	110,8	-	-	07/mar		7,1	7,0	111,9	110,9	-	-
02/mar		7,7	7,5	119,5	115,1	-	-								
05/mar	60,0	7,2	7,1	129,4	128,6	-	-								
07/mar		7,3	7,2	109,8	108,6	-	-								

***Ensaio 3* – Início: 22 jun 2012 Término: 29 jun 2012**

Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)		Data	mg.L^{-1}	pH		Cond. (µS/cm)		OD (mg/L)	
		ini	fin	ini	fin	ini	fin			ini	fin	ini	fin	ini	fin
22/jun		7,3	7,3	139,5	138,5	-	-	22/jun		7,3	7,2	139,7	138,2	-	-
25/jun	Controle	7,2	7,2	240,5	239,4	-	-	25/jun	Controle Radiação	7,1	7,1	240,8	239,1	-	-
27/jun		7,0	7,0	155,2	153,2	-	-	27/jun		7,2	7,2	155,8	153,6	-	-
22/jun		7,3	7,2	137,8	137,1	-	-	22/jun		7,3	7,2	137,0	136,8	-	-
25/jun	3,75	7,1	7,0	240,1	239,0	-	-	25/jun	7,5	7,1	7,0	239,3	239,0	-	-
27/jun		7,2	7,2	155,3	152,6	-	-	27/jun		7,3	7,1	154,9	154,1	-	-
22/jun		7,4	7,4	138,5	136,7	-	-	22/jun		7,5	7,4	138,6	136,9	-	-
25/jun	15,0	7,1	7,0	238,1	236,7	-	-	25/jun	30,0	7,1	7,0	237,0	236,1	-	-
27/jun		7,3	7,2	153,0	150,7	-	-	27/jun		7,3	7,2	151,0	150,4	-	-
22/jun		7,5	7,4	137,5	135,8	-	-								
25/jun	60,0	7,1	6,9	236,7	236,2	-	-								
27/jun		7,3	7,1	150,8	148,9	-	-								

APÊNDICE I – Sumário estatístico do programa *Trimmed Spearman-Karber* para os ensaios de ecotoxicidade aguda com OE e DEET

Ecotoxicidade aguda do OE Lote 180 para *D. similis*

```
DATE:                          TEST NUMBER:                    DURATION:   48 H
CHEMICAL:  OLEO                                                SPECIES: D.SIMILIS

RAW DATA:
  CONCENTRATION(MG/L)          3.80   5.40   7.60  10.70  15.00
  NUMBER EXPOSED:               20     20     20     20     20
  MORTALITIES:                   0      0     13     17     20
  SPEARMAN-KARBER TRIM:                0.00%

 SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:     EC50:            7.60
                95% LOWER CONFIDENCE:            6.94
                95% UPPER CONFIDENCE:            8.32
```

```
DATE:   7 AGO 20            TEST NUMBER: 2                  DURATION:   48 H
CHEMICAL:  OLEO L180                                        SPECIES:  D.SIMILIS

RAW DATA:
  CONCENTRATION(MG/L)          3.80   5.40   7.60  10.70  15.00
  NUMBER EXPOSED:               20     20     20     20     20
  MORTALITIES:                   0      3     16     20     20
  SPEARMAN-KARBER TRIM:                0.00%

 SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:     EC50:            6.51
                95% LOWER CONFIDENCE:            6.00
                95% UPPER CONFIDENCE:            7.07
```

```
DATE:   7 AGO 20            TEST NUMBER: 3                  DURATION:   48 H
CHEMICAL:  OLEO L180                                        SPECIES:  D.SIMILIS

RAW DATA:
  CONCENTRATION(MG/L)          3.80   5.40   7.60  10.70  15.00
  NUMBER EXPOSED:               20     20     20     20     20
  MORTALITIES:                   0      0      0     19     20
  SPEARMAN-KARBER TRIM:                0.00%

 SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:     EC50:            9.17
                95% LOWER CONFIDENCE:            8.87
                95% UPPER CONFIDENCE:            9.48
```

Ecotoxicidade aguda do OE Lote 180 para *C. silvestrii*

```
DATE:   9 JUN               TEST NUMBER: 1                  DURATION:   48 H
CHEMICAL:  OLEO                                             SPECIES:  CS

RAW DATA:
  CONCENTRATION(MG/L)          1.80   3.00   5.20   8.80  15.00
  NUMBER EXPOSED:               20     20     20     20     20
  MORTALITIES:                   1      0     18     20     20
  SPEARMAN-KARBER TRIM:                2.50%

 SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:     EC50:            4.10
                95% LOWER CONFIDENCE:            3.80
                95% UPPER CONFIDENCE:            4.43
```

```
DATE:                          TEST NUMBER: 2                  DURATION:   48 H
CHEMICAL:  OLEO                                             SPECIES:  CS

RAW DATA:
  CONCENTRATION(MG/L)          1.80   3.00   5.20   8.80  15.00
  NUMBER EXPOSED:               20     20     20     20     20
  MORTALITIES:                   1      1     13     19     20
  SPEARMAN-KARBER TRIM:                5.00%

 SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:     EC50:            4.73
                95% LOWER CONFIDENCE:            4.13
                95% UPPER CONFIDENCE:            5.40
```

DATE: TEST NUMBER: 3 DURATION: 48 H

CHEMICAL: OLEO SPECIES: CS

RAW DATA:

CONCENTRATION(MG/L)	1.80	3.00	5.20	8.80	15.00
NUMBER EXPOSED:	20	20	20	20	20
MORTALITIES:	0	1	14	20	20

SPEARMAN-KARBER TRIM: 0.00%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES: EC50: 4.52
95% LOWER CONFIDENCE: 4.00
95% UPPER CONFIDENCE: 5.11

Ecotoxicidade aguda do lote 183 para *D. similis*

DATE: 4 AGO 20 TEST NUMBER: 1 DURATION: 48 H 1 H

CHEMICAL: OLEO L183 SPECIES: D.SIMILIS

RAW DATA:

CONCENTRATION(MG/L)	3.80	5.40	7.60	10.70	15.00
NUMBER EXPOSED:	20	20	20	20	20
MORTALITIES:	0	3	17	20	20

SPEARMAN-KARBER TRIM: 0.00%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES: EC50: 6.40
95% LOWER CONFIDENCE: 5.92
95% UPPER CONFIDENCE: 6.92

DATE: 4 AGO 20 TEST NUMBER: 2 DURATION: 48 H

CHEMICAL: OLEO L183 SPECIES: D.SIMILIS

RAW DATA:

CONCENTRATION(M/L)	3.80	5.40	7.60	10.70	15.00
NUMBER EXPOSED:	20	20	20	20	20
MORTALITIES:	2	4	17	20	20

SPEARMAN-KARBER TRIM: 10.00%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES: EC50: 6.22
95% LOWER CONFIDENCE: 5.64
95% UPPER CONFIDENCE: 6.87

DATE: 5 AGO 20 TEST NUMBER: 3 DURATION: 48 H

CHEMICAL: OLEO L183 SPECIES: D.SIMILIS

RAW DATA:

CONCENTRATION(MG/L)	3.80	5.40	7.60	10.70	15.00
NUMBER EXPOSED:	20	20	20	20	20
MORTALITIES:	0	4	8	19	20

SPEARMAN-KARBER TRIM: 0.00%

SPEARMAN-KARBER ESTIMATES: EC50: 7.46
95% LOWER CONFIDENCE: 6.74
95% UPPER CONFIDENCE: 8.27

Ecotoxicidade aguda do lote 183 para *C. silvestrii*

```
DATE:   29 JUL 2          TEST NUMBER: 1                DURATION:   48 H

CHEMICAL:  OLEO L183                                    SPECIES:  C.SILVESTRI
[

RAW DATA:
  CONCENTRATION(MG/L)        1.80   3.00   5.20   8.80  15.00
  NUMBER EXPOSED:              20     20     20     20     20
  MORTALITIES:                  6     16     20     20     20
  SPEARMAN-KARBER TRIM:            30.00%

 SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:     EC50:          2.21
                95% LOWER CONFIDENCE:          1.91
                95% UPPER CONFIDENCE:          2.55
```

```
DATE:   5 AGO 20          TEST NUMBER: 2                DURATION:   48 H

CHEMICAL:  OLEO L183                                    SPECIES:  C.SILVESTRI
[

RAW DATA:
  CONCENTRATION(MG/L)        1.80   3.00   5.20   8.80  15.00
  NUMBER EXPOSED:              20     20     20     20     20
  MORTALITIES:                  0      1     20     20     20
  SPEARMAN-KARBER TRIM:            0.00%

 SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:     EC50:          3.85
                95% LOWER CONFIDENCE:          3.65
                95% UPPER CONFIDENCE:          4.05
```

```
DATE:                     TEST NUMBER: 3                DURATION:   48 H

CHEMICAL:  OLEO 183                                     SPECIES:  CS

RAW DATA:
  CONCENTRATION(MG.L)        1.80   3.00   5.20   8.80  15.00
  NUMBER EXPOSED:              20     20     20     20     20
  MORTALITIES:                  2      7     17     20     20
  SPEARMAN-KARBER TRIM:            10.00%

 SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:     EC50:          3.42
                95% LOWER CONFIDENCE:          2.89
                95% UPPER CONFIDENCE:          4.06
```

Ecotoxicidade aguda do DEET para *D. similis*

```
DATE:   14 SET 2          TEST NUMBER: 1                DURATION:   48 H

CHEMICAL:  DEET                                         SPECIES:  DAPHNIA
[LIS

RAW DATA:
  CONCENTRATION(MG.L)        9.37  18.75  37.50  75.00 150.00
  NUMBER EXPOSED:              20     20     20     20     20
  MORTALITIES:                  0      2      2     17     10
  SPEARMAN-KARBER TRIM:            32.50%

 SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:     EC50:         60.74
                95% LOWER CONFIDENCE:         50.61
                95% UPPER CONFIDENCE:         72.89
```

```
DATE:   27 SET 2          TEST NUMBER:                  DURATION:   48 H
                                     2
CHEMICAL:  DEET                                         SPECIES:  DAPHNIA
[LIS

RAW DATA:
  CONCENTRATION(MG.L)        9.37  18.75  37.50  75.00 150.00
  NUMBER EXPOSED:              20     20     20     20     20
  MORTALITIES:                  2      2      2     12     20
  SPEARMAN-KARBER TRIM:            10.00%

 SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:     EC50:         66.58
                95% LOWER CONFIDENCE:         54.90
                95% UPPER CONFIDENCE:         80.74
```

```
DATE:   6 OUT 20          TEST NUMBER: 3                  DURATION:   48 H

CHEMICAL:  DEET                                           SPECIES:  DAPHNIA SIM
LIS

RAW DATA:
  CONCENTRATION(MG.L)         9.37  18.75  37.50  75.00 150.00
  NUMBER EXPOSED:               20     20     20     20     20
  MORTALITIES:                   0      0      4     11     18
  SPEARMAN-KARBER TRIM:             10.00%

 SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:     EC50:          67.30
                95% LOWER CONFIDENCE:          52.80
                95% UPPER CONFIDENCE:          85.79
```

Ecotoxicidade aguda do DEET para *C. silvestrii*

```
DATE:   20 SET 2          TEST NUMBER: 1                  DURATION:   48 H

CHEMICAL:  DEET                                           SPECIES:  CERIODAPHNI
 SILVESTRI

RAW DATA:
  CONCENTRATION(MG.L)         4.68   9.37  15.75  37.50  75.00 150.00
  NUMBER EXPOSED:               20     20     20     20     20     20
  MORTALITIES:                   0      0      0      1     19     20
  SPEARMAN-KARBER TRIM:             0.00%

 SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:     EC50:          52.80
                95% LOWER CONFIDENCE:          47.69
                95% UPPER CONFIDENCE:          58.46
```

```
DATE:   27 SET 2          TEST NUMBER: 2                  DURATION:   48 H

CHEMICAL:  DEET                                           SPECIES:  AGUDO DEET

RAW DATA:
  CONCENTRATION(MG.L)         9.37  18.75  37.50  75.00 150.00
  NUMBER EXPOSED:               20     20     20     20     20
  MORTALITIES:                   1      1      2     16     20
  SPEARMAN-KARBER TRIM:             5.00%

 SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:     EC50:          56.46
                95% LOWER CONFIDENCE:          47.49
                95% UPPER CONFIDENCE:          67.11
```

```
DATE:   27 SET 2          TEST NUMBER: 3                  DURATION:   48 H

CHEMICAL:  DEET                                           SPECIES:  CERIODAPHNI
 SILVESTRI

RAW DATA:
  CONCENTRATION(MG.L)         9.37  18.75  37.50  75.00 150.00
  NUMBER EXPOSED:               20     20     20     20     20
  MORTALITIES:                   1      1      3     17     20
  SPEARMAN-KARBER TRIM:             5.00%

 SPEARMAN-KARBER ESTIMATES:     EC50:          52.36
                95% LOWER CONFIDENCE:          44.03
                95% UPPER CONFIDENCE:          62.26
```

APÊNDICE J – Sumário estatístico do programa TOXSTAT 3.4 para os ensaios de ecotoxicidade crônica dos princípios ativos

Ecotoxicidade crônica do lote 180 de óleo essencial para *C. silvestrii*

Ensaio 1

```
TESTE CRONICO OLEO 180
File: O 180          Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----------------------------------------------------------------------------

INTERVAL      <-1.5      -1.5 to <-0.5      -0.5 to 0.5      >0.5 to 1.5      >1.5
              ------     -------------      -----------      -----------      ----
EXPECTED      4.690        16.940             26.740           16.940         4.690
OBSERVED      3            22                 24               18             3
-----------------------------------------------------------------------------
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic =   3.0765
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.
```

```
TESTE CRONICO OLEO 180
File: O 180          Transform: NO TRANSFORMATION                    Mini

-----------------------------------------------------------------------------
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic =   42.75

-----------------------------------------------------------------------------
Table Chi-square value =   16.81  (alpha = 0.01, df =   6)
Table Chi-square value =   12.59  (alpha = 0.05, df =   6)

Data FAIL B1 homogeneity test at 0.01 level. Try another transformation.
```

```
L183
File: TESTE 1          Transform: NO TRANSFORM

          STEEL'S MANY-ONE RANK TEST        -        Ho:Control<Treatment
-----------------------------------------------------------------------------
                                TRANSFORMED     RANK      CRIT.
GROUP    IDENTIFICATION           MEAN          SUM      VALUE      df     SIG
-----  --------------------     ----------     -------   ------    -----   ---
  1                CONTROLE      16.500
  2                       1      19.900        130.50     75.00    10.00
  3                       2      16.500        106.00     75.00    10.00
  4                       4       6.700         60.00     75.00    10.00    *
  5                       8       0.600         55.00     75.00    10.00    *
  6                      16       0.300         55.00     75.00    10.00    *
-----------------------------------------------------------------------------
  Critical values use k = 5, are 1 tailed, and alpha = 0.05
```

Ensaio 2

```
oleo
File: teste 2          Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----------------------------------------------------------------------------

INTERVAL      <-1.5      -1.5 to <-0.5      -0.5 to 0.5      >0.5 to 1.5      >1.5
              ------     -------------      -----------      -----------      ----
EXPECTED      4.690        16.940             26.740           16.940         4.690
OBSERVED      3            12                 32               20             3
-----------------------------------------------------------------------------
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic =   4.2460
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.
```

```
oleo
File: teste 2          Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's test for homogeneity of variance
Bartlett's test for homogeneity of variance
-----------------------------------------------------------------------------

These two tests can not be performed because at least one group has
zero variance.

Data FAIL to meet homogeneity of variance assumption.
```

```
L183
File: TESTE 2          Transform: NO TRANSFORM

          STEEL'S MANY-ONE RANK TEST        -        Ho:Control<Treatment
-----------------------------------------------------------------------------
                                TRANSFORMED     RANK      CRIT.
GROUP    IDENTIFICATION           MEAN          SUM      VALUE      df     SIG
-----  --------------------     ----------     -------   ------    -----   ---
  1                CONTROLE      18.800
  2                       1      18.900        101.50     75.00    10.00
  3                       2      16.800         99.00     75.00    10.00
  4                       4      14.800         78.00     75.00    10.00
  5                       8       7.000         57.00     75.00    10.00    *
  6                      16       0.000         55.00     75.00    10.00    *
-----------------------------------------------------------------------------
  Critical values use k = 5, are 1 tailed, and alpha = 0.05
```

Ensaio 3

```
oleo
File: teste 3        Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----------------------------------------------------------------------------

INTERVAL     <-1.5     -1.5 to <-0.5     -0.5 to 0.5     >0.5 to 1.5     >1.5

EXPECTED     4.489        16.214            25.594          16.214        4.489
OBSERVED     2            18                30              12            5

-----------------------------------------------------------------------------
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic =   3.4887
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.
```

```
oleo
File: teste 3        Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's test for homogeneity of variance
Bartlett's test for homogeneity of variance
-----------------------------------------------------------------------------

These two tests can not be performed because at least one group has
zero variance.

Data FAIL to meet homogeneity of variance assumption.
```

```
L183
File: TESTE 3        Transform: NO TRANSFORM

WILCOXON'S RANK SUM TEST W/ BONFERRONI ADJUSTMENT   -   Ho:Control<Treatment
-----------------------------------------------------------------------------
                                TRANSFORMED    RANK     CRIT.
GROUP    IDENTIFICATION            MEAN         SUM     VALUE    REPS   SIG
-----  --------------------     -----------   -------   ------   -----  ---
  1                CONTROLE        25.333
  2                       1        28.889      101.50    59.00      9
  3                       2        27.000      102.00    71.00     10
  4                       4        22.000       66.00    59.00      9
  5                       8        11.100       60.00    71.00     10   *
  6                      16         0.000       55.00    71.00     10   *
-----------------------------------------------------------------------------
  Critical values use k = 5, are 1 tailed, and alpha = 0.05
```

Ecotoxicidade crônica do lote 183 de óleo essencial para *C. silvestrii*

Ensaio 1

```
oleo 183
File: TESTE1         Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----------------------------------------------------------------------------

INTERVAL     <-1.5     -1.5 to <-0.5     -0.5 to 0.5     >0.5 to 1.5     >1.5

EXPECTED     4.556        16.456            25.976          16.456        4.556
OBSERVED     2            17                34              11            4

-----------------------------------------------------------------------------
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic =   5.8074
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.
```

```
oleo 183
File: TESTE1         Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's test for homogeneity of variance
Bartlett's test for homogeneity of variance
-----------------------------------------------------------------------------

These two tests can not be performed because at least one group has
zero variance.

Data FAIL to meet homogeneity of variance assumption.
```

```
L 183
File: teste 1        Transform: NO TRANSFORM

WILCOXON'S RANK SUM TEST W/ BONFERRONI ADJUSTMENT   -   Ho:Control<Treatment
-----------------------------------------------------------------------------
                                TRANSFORMED    RANK     CRIT.
GROUP    IDENTIFICATION            MEAN         SUM     VALUE    REPS   SIG
-----  --------------------     -----------   -------   ------   -----  ---
  1            CONTROLE RAD        15.500
  2                       1        16.100      105.50    74.00     10
  3                       2        10.000       66.50    74.00     10   *
  4                       4         9.300       70.00    74.00     10   *
  5                       8         3.333       45.00    61.00      9   *
  6                      16         0.000       55.00    74.00     10   *
-----------------------------------------------------------------------------
  Critical values use k = 5, are 1 tailed, and alpha = 0.05
```

Ensaio 2

```
TESTE 2 OLEO 183
File: TESTE 2        Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----------------------------------------------------------------------------

INTERVAL     <-1.5     -1.5 to <-0.5     -0.5 to 0.5     >0.5 to 1.5     >1.5

EXPECTED     4.690        16.940            26.740          16.940        4.690
OBSERVED     4            12                37              14            3

-----------------------------------------------------------------------------
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic =   6.5980
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.
```

```
TESTE 2 OLEO 183
File: TESTE 2        Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's test for homogeneity of variance
Bartlett's test for homogeneity of variance
-----------------------------------------------------------------------------

These two tests can not be performed because at least one group has
zero variance.

Data FAIL to meet homogeneity of variance assumption.
```

```
L183
File: TESTE 2        Transform: NO TRANSFORM

          STEEL'S MANY-ONE RANK TEST        -        Ho:Control<Treatment
-----------------------------------------------------------------------------
                                  TRANSFORMED     RANK      CRIT.
GROUP    IDENTIFICATION             MEAN          SUM      VALUE      df     SIG
-----  --------------------      -----------    -------    ------    -----   ---
  1                CONTROLE        18.200
  2                       1        16.300        79.50     75.00    10.00
  3                       2        14.900        67.00     75.00    10.00    *
  4                       4        14.800        67.00     75.00    10.00    *
  5                       8         5.500        55.00     75.00    10.00    *
  6                      16         0.000        55.00     75.00    10.00    *
-----------------------------------------------------------------------------
  Critical values use k = 5, are 1 tailed, and alpha = 0.05
```

Ensaio 3

```
TESTE 3 OLEO 183
File: TESTE 3        Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----------------------------------------------------------------------------

INTERVAL     <-1.5     -1.5 to <-0.5     -0.5 to 0.5     >0.5 to 1.5     >1.5

EXPECTED     4.690        16.940            26.740          16.940        4.690
OBSERVED     2            19                32              12            5

-----------------------------------------------------------------------------
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic =   4.2892
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.
```

```
TESTE 3 OLEO 183
File: TESTE 3        Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's test for homogeneity of variance
Bartlett's test for homogeneity of variance
-----------------------------------------------------------------------------

These two tests can not be performed because at least one group has
zero variance.

Data FAIL to meet homogeneity of variance assumption.
```

```
L183
File: TESTE 3        Transform: NO TRANSFORM

WILCOXON'S RANK SUM TEST W/ BONFERRONI ADJUSTMENT   -   Ho:Control<Treatment
-----------------------------------------------------------------------------
                                  TRANSFORMED     RANK      CRIT.
GROUP    IDENTIFICATION             MEAN          SUM      VALUE     REPS    SIG
-----  --------------------      -----------    -------    ------    -----   ---
  1                CONTROLE        17.000
  2                       1        17.000       109.50     74.00      10
  3                       2        14.300        82.00     74.00      10
  4                       4        11.600        73.00     74.00      10     *
  5                       8         2.556        45.00     61.00       9     *
  6                      16         0.000        55.00     74.00      10     *
-----------------------------------------------------------------------------
  Critical values use k = 5, are 1 tailed, and alpha = 0.05
```

Ecotoxicidade crônica do DEET para *C. silvestrii*

Ensaio 1

```
TESTE 1 DEET
File: TESTE 1 DEET        Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----------------------------------------------------------------------------

INTERVAL      <-1.5      -1.5 to <-0.5      -0.5 to 0.5      >0.5 to 1.5      >1.5
              ------     -------------      -----------      -----------      ----
EXPECTED      2.412        8.712              13.752           8.712          2.412
OBSERVED      3            6                  16               10             1

-----------------------------------------------------------------------------
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic =   2.3721
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.
```

```
TESTE 1 DEET
File: TESTE 1 DEET        Transform: NO TRANSFORMATION
-----------------------------------------------------------------------------
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic =   14.14
-----------------------------------------------------------------------------
Bartlett's test using average degrees of freedom
Calculated B2 statistic =   13.57
   Based on average replicate size of   8.00
-----------------------------------------------------------------------------
Table Chi-square value =   11.34  (alpha = 0.01, df =   3)
Table Chi-square value =    7.81  (alpha = 0.05, df =   3)

Data FAIL B1 homogeneity test at 0.01 level. Try another transformation.
```

SUMMARY OF FISHER'S EXACT TESTS

GROUP	IDENTIFICATION	NUMBER EXPOSED	NUMBER DEAD	SIG (P=.05)
	CONTROL	9	0	
1	3,75	10	1	
2	7,5	10	0	
3	15	10	0	
4	30	10	10	*
5	60	10	10	*

```
TESTE 1 DEET
File: TESTE 1 DEET        Transform: NO TRANSFORM

WILCOXON'S RANK SUM TEST W/ BONFERRONI ADJUSTMENT   -   Ho:Control<Treatment
-----------------------------------------------------------------------------
```

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	RANK SUM	CRIT. VALUE	REPS	SIG
1	CONTROLE AGUA	24.111				
2	3,75 MG.L	23.700	96.00	71.00	10	
3	7,5 MG.L	23.286	59.50	37.00	7	
4	15 MG.L	18.100	85.00	71.00	10	
5	30 MG.L	0.000	55.00	71.00	10	*
6	60 MG.L	0.000	55.00	71.00	10	*

```
Critical values use k = 5, are 1 tailed, and alpha = 0.05
```

Ensaio 2

```
DEET
File: TESTE 2        Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----------------------------------------------------------------------------

INTERVAL      <-1.5      -1.5 to <-0.5      -0.5 to 0.5      >0.5 to 1.5      >1.5
              ------     -------------      -----------      -----------      ----
EXPECTED      3.819        13.794             21.774           13.794         3.819
OBSERVED      5            10                 22               18             2

-----------------------------------------------------------------------------
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic =   3.5600
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.
```

```
DEET
File: TESTE 2        Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's test for homogeneity of variance
-----------------------------------------------------------------------------

Calculated H statistic (max Var/min Var) =    9.28
Closest, conservative, Table H statistic =   12.1   (alpha = 0.01)

Used for Table H ==>      R (# groups) =   6,     df (# reps-1) =        9
Actual values    ==>      R (# groups) =   6,     df (# avg reps-1) =    8.50
                                                  (average df used)

-----------------------------------------------------------------------------

Data PASS homogeneity test. Continue analysis.
```

SUMMARY OF FISHER'S EXACT TESTS

GROUP	IDENTIFICATION	NUMBER EXPOSED	NUMBER DEAD	SIG (P=.05)
	CONTROL	10	0	
1	3,75 mg.l	10	0	
2	7,5 mg.l	10	1	
3	15 mg.l	10	0	
4	30 mg.l	10	0	
5	60 mg.l	10	0	

TESTE 2 DEET
File: TESTE 2 DEET Transform: NO TRANSFORMATION

BONFERRONI t-TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	CONTROLE AGUA	16.625	16.625		
2	3,75 MG.L	19.700	19.700	-1.280	
3	7,5 MG.L	15.667	15.667	0.389	
4	15 MG.L	18.000	18.000	-0.572	
5	30 MG.L	18.125	18.125	-0.592	
6	60 MG.L	4.125	4.125	4.936	*

Bonferroni t table value = 2.42 (1 Tailed Value, P=0.05, df=40,5)

Ensaio 3

TESTE 3 DEET
File: TESTE 3 DEET Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	3.216	11.616	18.336	11.616	3.216
OBSERVED	3	9	20	13	3

Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic = 0.9341
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.

TESTE 3 DEET
File: TESTE 3 DEET Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic = 21.12

Bartlett's test using average degrees of freedom
Calculated B2 statistic = 20.25
Based on average replicate size of 8.60

Table Chi-square value = 13.28 (alpha = 0.01, df = 4)
Table Chi-square value = 9.49 (alpha = 0.05, df = 4)

Data FAIL B1 homogeneity test at 0.01 level. Try another transformation.
Data FAIL B2 homogeneity test at 0.01 level. Try another transformation.

TESTE 3 DEET
File: TESTE 3 DEET Transform: NO TRANSFORM

WILCOXON'S RANK SUM TEST W/ BONFERRONI ADJUSTMENT - Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	RANK SUM	CRIT. VALUE	REPS	SIG
1	CONTROLE AGUA	16.800				
2	3,75	19.600	125.50	74.00	10	
3	7,5	18.125	79.00	49.00	8	
4	15	15.000	89.00	74.00	10	
5	30	0.300	55.00	74.00	10	*
6	60	0.000	55.00	74.00	10	*

Critical values use k = 5, are 1 tailed, and alpha = 0.05

APÊNDICE K – Sumário estatístico do programa TOXSTAT 3.4 para os ensaios de radiação gama com *C. silvestrii*

Ensaio 1

```
CRONICO RADIACAO 1
File: CRONICO RAD 1        Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----------------------------------------------------------------------------

INTERVAL      <-1.5      -1.5 to <-0.5      -0.5 to 0.5      >0.5 to 1.5      >1.5
              -----      -------------      -----------      -----------      ----
EXPECTED      3.953        14.278             22.538           14.278         3.953
OBSERVED      5             9                 28               13             4
-----------------------------------------------------------------------------
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic =   3.6670
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.
```

```
CRONICO RADIACAO 1
File: CRONICO RAD 1        Transform: NO TRANSFORMATION

-----------------------------------------------------------------------------
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic =   65.35

-----------------------------------------------------------------------------
Bartlett's test using average degrees of freedom
Calculated B2 statistic =   64.38
   Based on average replicate size of   8.83

-----------------------------------------------------------------------------
Table Chi-square value =   15.09  (alpha = 0.01, df =   5)
Table Chi-square value =   11.07  (alpha = 0.05, df =   5)

Data FAIL B1 homogeneity test at 0.01 level. Try another transformation.
Data FAIL B2 homogeneity test at 0.01 level. Try another transformation.
```

SUMMARY OF FISHER'S EXACT TESTS

GROUP	IDENTIFICATION	NUMBER EXPOSED	NUMBER DEAD	SIG (P=.05)
	CONTROL	10	0	
1	100 GY	10	2	
2	50 GY	10	0	
3	25 GY	10	2	
4	12,5 GY	10	0	
5	6,25 GY	10	0	

```
CRONICO RADIACAO 1
File: CRONICO RAD 1        Transform: NO TRANSFORMATION

WILCOXON'S RANK SUM TEST W/ BONFERRONI ADJUSTMENT   -   Ho:Control<Treatment
-----------------------------------------------------------------------------
```

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	RANK SUM	CRIT. VALUE	REPS	SIG
1	CONTROLE	23.300				
2	100	0.100	55.00	74.00	10	*
3	50	4.300	66.00	74.00	10	*
4	25	21.100	89.00	74.00	10	
5	12,5	27.100	104.00	74.00	10	
6	6,25	23.111	80.00	61.00	9	

```
-----------------------------------------------------------------------------
  Critical values use k = 5, are 1 tailed, and alpha = 0.05
```

Ensaio 2

```
CRONICO RAD 2
File: CRONICO RAD 2        Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----------------------------------------------------------------------------

INTERVAL      <-1.5      -1.5 to <-0.5      -0.5 to 0.5      >0.5 to 1.5      >1.5
              -----      -------------      -----------      -----------      ----
EXPECTED      4.020        14.520             22.920           14.520         4.020
OBSERVED      3             9                 35               10             3
-----------------------------------------------------------------------------
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic =  10.3899
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.
```

```
CRONICO RAD 2
File: CRONICO RAD 2        Transform: NO TRANSFORMATION

Hartley's test for homogeneity of variance
Bartlett's test for homogeneity of variance
-----------------------------------------------------------------------

These two tests can not be performed because at least one group has
zero variance.

Data FAIL to meet homogeneity of variance assumption.
Additional transformations are useless.
```

SUMMARY OF FISHER'S EXACT TESTS

GROUP	IDENTIFICATION	NUMBER EXPOSED	NUMBER DEAD	SIG (P=.05)
	CONTROL	10	0	
1	100	10	7	*
2	50	10	0	
3	25	10	0	
4	12,5	10	0	
5	6,25	10	0	

```
CRONICO RAD 2
File: CRONICO RAD 2        Transform: NO TRANSFORMATION

WILCOXON'S RANK SUM TEST W/ BONFERRONI ADJUSTMENT   -   Ho:Control<Treatment
```

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	RANK SUM	CRIT. VALUE	REPS	SIG
1	CONTROLE H2O	19.000				
2	100	0.000	55.00	74.00	10	*
3	50	3.500	55.50	74.00	10	*
4	25	16.800	88.00	74.00	10	
5	12,5	18.700	101.50	74.00	10	
6	6,25	18.200	97.00	74.00	10	

Critical values use k = 5, are 1 tailed, and alpha = 0.05

Ensaio 3

```
CRONICO RAD 3
File: CRONICO RAD 3        Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
```

INTERVAL	<-1.5	-1.5 to <-0.5	-0.5 to 0.5	>0.5 to 1.5	>1.5
EXPECTED	4.020	14.520	22.920	14.520	4.020
OBSERVED	4	9	32	11	4

```
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic =   6.5492
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.
```

```
CRONICO RAD 3
File: CRONICO RAD 3        Transform: NO TRANSFORMATION

Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic =   31.85

Table Chi-square value =   15.09  (alpha = 0.01, df =   5)
Table Chi-square value =   11.07  (alpha = 0.05, df =   5)

Data FAIL B1 homogeneity test at 0.01 level. Try another transformation.
```

```
CRONICO RAD 3
File: CRONICO RAD 3        Transform: NO TRANSFORMATION

WILCOXON'S RANK SUM TEST W/ BONFERRONI ADJUSTMENT   -   Ho:Control<Treatment
```

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	RANK SUM	CRIT. VALUE	REPS	SIG
1	CONTROLE AGUA	16.800				
2	100	0.400	60.50	74.00	10	*
3	50	2.600	63.50	74.00	10	*
4	25	16.900	95.00	74.00	10	
5	12,5	22.500	144.50	74.00	10	
6	6,25	16.800	100.50	74.00	10	

Critical values use k = 5, are 1 tailed, and alpha = 0.05

APÊNDICE L – Sumário estatístico do programa TOXSTAT 3.4 para os ensaios de ecotoxicidade crônica dos princípios ativos com os organismos irradiados

Organismos irradiados e submetidos ao óleo essencial

Ensaio 1

```
OLEO+RAD
File: TESTE 1        Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----------------------------------------------------------------------------

INTERVAL     <-1.5     -1.5 to <-0.5     -0.5 to 0.5     >0.5 to 1.5     >1.5
             ------    -------------     -----------     -----------     ----

EXPECTED     4.020        14.520            22.920          14.520       4.020
OBSERVED     3             8                32              15           2

-----------------------------------------------------------------------------
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic =   7.8145
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.
```

```
OLEO+RAD
File: TESTE 1        Transform: NO TRANSFORMATION

-----------------------------------------------------------------------------
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic =   99.38

-----------------------------------------------------------------------------
Table Chi-square value =   15.09  (alpha = 0.01, df =   5)
Table Chi-square value =   11.07  (alpha = 0.05, df =   5)

Data FAIL B1 homogeneity test at 0.01 level. Try another transformation.
```

```
OE+RAD
File: T1         Transform: NO TRANSFORMATION

          STEEL'S MANY-ONE RANK TEST        -        Ho:Control<Treatment
-----------------------------------------------------------------------------
                                 TRANSFORMED     RANK      CRIT.
GROUP    IDENTIFICATION            MEAN          SUM      VALUE      df     SIG
-----  --------------------      ----------    -------    ------    -----   ---
  1          CONTROLE RAD         19.500
  2                     1         19.400       108.50     75.00    10.00
  3                     2         16.000       112.50     75.00    10.00
  4                     4         11.500        55.00     75.00    10.00    *
  5                     8          0.300        55.00     75.00    10.00    *
  6                    16          0.100        55.00     75.00    10.00    *
-----------------------------------------------------------------------------
  Critical values use k = 5, are 1 tailed, and alpha = 0.05
```

Ensaio 2

```
OLEO+RAD
File: TESTE 2        Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----------------------------------------------------------------------------

INTERVAL     <-1.5     -1.5 to <-0.5     -0.5 to 0.5     >0.5 to 1.5     >1.5
             ------    -------------     -----------     -----------     ----

EXPECTED     4.020        14.520            22.920          14.520       4.020
OBSERVED     3            10                29              16           2

-----------------------------------------------------------------------------
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic =   4.4446
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.
```

```
OLEO+RAD
File: TESTE 2        Transform: NO TRANSFORMATION

-----------------------------------------------------------------------------
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic =   52.55

-----------------------------------------------------------------------------
Table Chi-square value =   15.09  (alpha = 0.01, df =   5)
Table Chi-square value =   11.07  (alpha = 0.05, df =   5)

Data FAIL B1 homogeneity test at 0.01 level. Try another transformation.
```

```
OE+RAD
File: T2         Transform: NO TRANSFORM

          STEEL'S MANY-ONE RANK TEST        -        Ho:Control<Treatment
-----------------------------------------------------------------------------
                                 TRANSFORMED     RANK      CRIT.
GROUP    IDENTIFICATION            MEAN          SUM      VALUE      df     SIG
-----  --------------------      ----------    -------    ------    -----   ---
  1          CONTROLE RAD         17.500
  2                     1         18.100       125.00     75.00    10.00
  3                     2         13.500        76.00     75.00    10.00
  4                     4          9.400        55.00     75.00    10.00    *
  5                     8          3.200        55.00     75.00    10.00    *
  6                    16          0.500        55.00     75.00    10.00    *
-----------------------------------------------------------------------------
  Critical values use k = 5, are 1 tailed, and alpha = 0.05
```

Ensaio 3

```
OLEO+RAD
File: TESTE 3        Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----------------------------------------------------------------------------

INTERVAL     <-1.5     -1.5 to <-0.5     -0.5 to 0.5     >0.5 to 1.5     >1.5

EXPECTED     4.020        14.520            22.920          14.520        4.020
OBSERVED     1            17                28               9            5

-----------------------------------------------------------------------------
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic =   6.1557
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.
```

```
OLEO+RAD
File: TESTE 3        Transform: NO TRANSFORMATION

-----------------------------------------------------------------------------
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic =   32.42

-----------------------------------------------------------------------------
Table Chi-square value =   15.09  (alpha = 0.01, df =   5)
Table Chi-square value =   11.07  (alpha = 0.05, df =   5)

Data FAIL B1 homogeneity test at 0.01 level. Try another transformation.
```

```
OE+RAD L183
File: T3        Transform: NO TRANSFORM

          STEEL'S MANY-ONE RANK TEST        -        Ho:Control<Treatment
-----------------------------------------------------------------------------
                                  TRANSFORMED     RANK      CRIT.
GROUP    IDENTIFICATION             MEAN          SUM      VALUE      df     SIG
-----  --------------------      ----------     -------    -----     -----   ---
  1          CONTROLE RAD         15.100
  2                     1         15.500        113.00     75.00    10.00
  3                     2         12.100         69.50     75.00    10.00    *
  4                     4          9.400         56.50     75.00    10.00    *
  5                     8          3.200         55.00     75.00    10.00    *
  6                    16          0.500         55.00     75.00    10.00    *
-----------------------------------------------------------------------------
  Critical values use k = 5, are 1 tailed, and alpha = 0.05
```

Organismos irradiados e submetidos ao DEET

Ensaio 1

```
DEET+RAD
File: TESTE 1        Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----------------------------------------------------------------------------

INTERVAL     <-1.5     -1.5 to <-0.5     -0.5 to 0.5     >0.5 to 1.5     >1.5

EXPECTED     4.020        14.520            22.920          14.520        4.020
OBSERVED     2            10                33              14            1

-----------------------------------------------------------------------------
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic =   9.1425
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.
```

```
DEET+RAD
File: T1        Transform: NO TRANSFORMATION

-----------------------------------------------------------------------------
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic =   10.65

-----------------------------------------------------------------------------
Table Chi-square value =   11.34  (alpha = 0.01, df =   3)
Table Chi-square value =    7.81  (alpha = 0.05, df =   3)

Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
```

```
DEET+RAD
File: TESTE 1          Transform: NO TRANSFORM

      DUNNETT'S TEST   -   TABLE 1 OF 2              Ho:Control<Treatment
-----------------------------------------------------------------------------
                                  TRANSFORMED     MEAN CALCULATED IN
GROUP    IDENTIFICATION             MEAN          ORIGINAL UNITS     T STAT  SIG
-----  --------------------      -----------    -------------------  ------  ---
  1            CONTROLE RAD        16.200             16.200
  2                    3.75        15.500             15.500          1.225
  3                     7.5        15.000             15.000          2.101
  4                      15        13.000             13.000          5.602  *
  5                      30         0.000              0.000         28.360  *
  6                      60         0.000              0.000         28.360  *
-----------------------------------------------------------------------------
Dunnett table value =  2.31      (1 Tailed Value, P=0.05,  df=40,5)
```

Ensaio 2

```
DEET+RAD
File: TESTE 2          Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----------------------------------------------------------------------------

INTERVAL      <-1.5      -1.5 to <-0.5      -0.5 to 0.5      >0.5 to 1.5      >1.5
              -----      -------------      -----------      -----------      ----

EXPECTED      2.680          9.680             15.280           9.680         2.680
OBSERVED      4              7                 18               10            1

-----------------------------------------------------------------------------
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic =   2.9400
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.
```

```
DEET+RAD
File: TESTE 2          Transform: NO TRANSFORMATION

-----------------------------------------------------------------------------
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic =    2.58

-----------------------------------------------------------------------------
Table Chi-square value =   11.34  (alpha = 0.01, df =   3)
Table Chi-square value =    7.81  (alpha = 0.05, df =   3)

Data PASS B1 homogeneity test at 0.01 level. Continue analysis.
```

```
DEET+RAD
File: TESTE 2          Transform: NO TRANSFORM

      DUNNETT'S TEST   -   TABLE 1 OF 2              Ho:Control<Treatment
-----------------------------------------------------------------------------
                                  TRANSFORMED     MEAN CALCULATED IN
GROUP    IDENTIFICATION             MEAN          ORIGINAL UNITS     T STAT  SIG
-----  --------------------      -----------    -------------------  ------  ---
  1            CONTROLE RAD        15.000             15.000
  2                    3.75        14.800             14.800          0.137
  3                     7.5        13.300             13.300          1.165
  4                      15        13.100             13.100          1.302
  5                      30         0.000              0.000         10.282  *
  6                      60         0.000              0.000         10.282  *
-----------------------------------------------------------------------------
Dunnett table value =  2.31      (1 Tailed Value, P=0.05,  df=40,5)
```

Ensaio 3

```
DEET+RAD
File: TESTE 3          Transform: NO TRANSFORMATION

Chi-square test for normality: actual and expected frequencies
-----------------------------------------------------------------------------

INTERVAL      <-1.5      -1.5 to <-0.5      -0.5 to 0.5      >0.5 to 1.5      >1.5
              -----      -------------      -----------      -----------      ----

EXPECTED      4.020         14.520             22.920          14.520         4.020
OBSERVED      4              9                 34               10            3

-----------------------------------------------------------------------------
Calculated Chi-Square goodness of fit test statistic =   9.1208
Table Chi-Square value (alpha = 0.01) = 13.277

Data PASS normality test. Continue analysis.
```

```
DEET+RAD
File: TESTE 3          Transform: NO TRANSFORMATION

-----------------------------------------------------------------------------
Bartlett's test for homogeneity of variance
Calculated B1 statistic =   13.64

-----------------------------------------------------------------------------
Table Chi-square value =   11.34  (alpha = 0.01, df =   3)
Table Chi-square value =    7.81  (alpha = 0.05, df =   3)

Data FAIL B1 homogeneity test at 0.01 level. Try another transformation.
```

DEET+RAD
File: TESTE 3 Transform: NO TRANSFORM

DUNNETT'S TEST - TABLE 1 OF 2 Ho:Control<Treatment

GROUP	IDENTIFICATION	TRANSFORMED MEAN	MEAN CALCULATED IN ORIGINAL UNITS	T STAT	SIG
1	CONTROLE RAD	16.300	16.300		
2	3.75	14.300	14.300	1.226	
3	7.5	14.800	14.800	0.920	
4	15	12.600	12.600	2.269	
5	30	0.000	0.000	9.994	*
6	60	0.000	0.000	9.994	*

Dunnett table value = 2.31 (1 Tailed Value, P=0.05, df=40,5)

APÊNDICE M – Sumário estatístico do Teste *t* de *Student* do programa TOXSTAT 3.4

Ecotoxicidade crônica com OE - Controle de água e Controle de DMSO

Lote 180

Ensaio 1

```
TOXSTAT                                   t-Test Results
L180 1
File: TESTE 1          Transform: NO TRANSFORM

       t-test of Solvent and Blank Controls          Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
==============================================================================
 GRP1 (SOLVENT CRTL) MEAN =     16.5000      CALCULATED t VALUE =     -0.8945
 GRP2 (BLANK CRTL) MEAN   =     17.8000      DEGREES OF FREEDOM =     18
 DIFFERENCE IN MEANS      =     -1.3000
==============================================================================
TABLE t VALUE (0.05 (2),18) =  2.101     NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2),18) =  2.878     NO significant difference at alpha=0.01
```

Ensaio 2

```
TOXSTAT                                   t-Test Results
L180 2
File: TESTE 2          Transform: NO TRANSFORM

       t-test of Solvent and Blank Controls          Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
==============================================================================
 GRP1 (SOLVENT CRTL) MEAN =     18.8000      CALCULATED t VALUE =      0.8090
 GRP2 (BLANK CRTL) MEAN   =     17.6000      DEGREES OF FREEDOM =     18
 DIFFERENCE IN MEANS      =      1.2000
==============================================================================
TABLE t VALUE (0.05 (2),18) =  2.101     NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2),18) =  2.878     NO significant difference at alpha=0.01
```

Ensaio 3

```
TOXSTAT                                   t-Test Results
L180 3
File: TESTE 3          Transform: NO TRANSFORM

       t-test of Solvent and Blank Controls          Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
==============================================================================
 GRP1 (SOLVENT CRTL) MEAN =     25.3333      CALCULATED t VALUE =     -0.2779
 GRP2 (BLANK CRTL) MEAN   =     25.9000      DEGREES OF FREEDOM =     17
 DIFFERENCE IN MEANS      =     -0.5667
==============================================================================
TABLE t VALUE (0.05 (2),17) =  2.110     NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2),17) =  2.898     NO significant difference at alpha=0.01
```

Lote 180

Ensaio 1

```
TOXSTAT                                   t-Test Results
B3
File: TESTE 1          Transform: NO TRANSFORM

       t-test of Solvent and Blank Controls          Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
==============================================================================
 GRP1 (SOLVENT CRTL) MEAN =     15.5000      CALCULATED t VALUE =      0.3707
 GRP2 (BLANK CRTL) MEAN   =     15.0000      DEGREES OF FREEDOM =     17
 DIFFERENCE IN MEANS      =      0.5000
==============================================================================
TABLE t VALUE (0.05 (2),17) =  2.110     NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2),17) =  2.898     NO significant difference at alpha=0.01
```

Ensaio 2

```
TOXSTAT                                   t-Test Results
L183 2
File: TESTE 2          Transform: NO TRANSFORM

       t-test of Solvent and Blank Controls          Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
==============================================================================
 GRP1 (SOLVENT CRTL) MEAN =     18.2000      CALCULATED t VALUE =      2.1308
 GRP2 (BLANK CRTL) MEAN   =     15.6000      DEGREES OF FREEDOM =     18
 DIFFERENCE IN MEANS      =      2.6000
==============================================================================
TABLE t VALUE (0.05 (2),18) =  2.101**   SIGNIFICANT DIFFERENCE at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2),18) =  2.878     NO significant difference at alpha=0.01
```

Ensaio 3

```
TOXSTAT                                   t-Test Results
L183 2
File: TESTE 3          Transform: NO TRANSFORM

      t-test of Solvent and Blank Controls          Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
==============================================================================
 GRP1 (SOLVENT CRTL) MEAN =     17.0000     CALCULATED t VALUE =     -0.3471
 GRP2 (BLANK CRTL) MEAN   =     17.7000     DEGREES OF FREEDOM =     18
 DIFFERENCE IN MEANS      =     -0.7000
==============================================================================
TABLE t VALUE (0.05 (2),18) =  2.101    NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2),18) =  2.878    NO significant difference at alpha=0.01
```

Organismos irradiados e expostos ao OE - Controle de água e Controle de organismos irradiados

Ensaio 1

```
TOXSTAT                                   t-Test Results
OE+RAD
File: TESTE 1          Transform: NO TRANSFORM

      t-test of Solvent and Blank Controls          Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
==============================================================================
 GRP1 (SOLVENT CRTL) MEAN =     20.0000     CALCULATED t VALUE =      0.7454
 GRP2 (BLANK CRTL) MEAN   =     19.5000     DEGREES OF FREEDOM =     18
 DIFFERENCE IN MEANS      =      0.5000
==============================================================================
TABLE t VALUE (0.05 (2),18) =  2.101    NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2),18) =  2.878    NO significant difference at alpha=0.01
```

Ensaio 2

```
TOXSTAT                                   t-Test Results
OE+RAD
File: T1          Transform: NO TRANSFORM

      t-test of Solvent and Blank Controls          Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
==============================================================================
 GRP1 (SOLVENT CRTL) MEAN =     18.5000     CALCULATED t VALUE =      0.8847
 GRP2 (BLANK CRTL) MEAN   =     17.5000     DEGREES OF FREEDOM =     18
 DIFFERENCE IN MEANS      =      1.0000
==============================================================================
TABLE t VALUE (0.05 (2),18) =  2.101    NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2),18) =  2.878    NO significant difference at alpha=0.01
```

Ensaio 3

```
TOXSTAT                                   t-Test Results
OE+RAD
File: T3          Transform: NO TRANSFORM

      t-test of Solvent and Blank Controls          Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
==============================================================================
 GRP1 (SOLVENT CRTL) MEAN =     15.6000     CALCULATED t VALUE =      0.6623
 GRP2 (BLANK CRTL) MEAN   =     15.1000     DEGREES OF FREEDOM =     18
 DIFFERENCE IN MEANS      =      0.5000
==============================================================================
TABLE t VALUE (0.05 (2),18) =  2.101    NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2),18) =  2.878    NO significant difference at alpha=0.01
```

Organismos irradiados e expostos ao OE - Controle de água e Controle de DMSO

Ensaio 1

```
TOXSTAT                                   t-Test Results
OE+RAD
File: TESTE 1          Transform: NO TRANSFORM

      t-test of Solvent and Blank Controls          Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
==============================================================================
 GRP1 (SOLVENT CRTL) MEAN =     20.0000     CALCULATED t VALUE =      0.4482
 GRP2 (BLANK CRTL) MEAN   =     19.0000     DEGREES OF FREEDOM =     18
 DIFFERENCE IN MEANS      =      1.0000
==============================================================================
TABLE t VALUE (0.05 (2),18) =  2.101    NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2),18) =  2.878    NO significant difference at alpha=0.01
```

Ensaio 2

```
TOXSTAT                                t-Test Results
OE+RAD
File: T2          Transform: NO TRANSFORM

       t-test of Solvent and Blank Controls          Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
==============================================================================
 GRP1 (SOLVENT CRTL) MEAN =     18.5000      CALCULATED t VALUE =      1.5143
 GRP2 (BLANK CRTL) MEAN   =     16.5000      DEGREES OF FREEDOM =     18
 DIFFERENCE IN MEANS      =      2.0000
==============================================================================
TABLE t VALUE (0.05 (2),18) =  2.101     NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2),18) =  2.878     NO significant difference at alpha=0.01
```

Ensaio 3

```
TOXSTAT                                t-Test Results
OE+RAD
File: T3          Transform: NO TRANSFORM

       t-test of Solvent and Blank Controls          Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
==============================================================================
 GRP1 (SOLVENT CRTL) MEAN =     15.6000      CALCULATED t VALUE =      0.2433
 GRP2 (BLANK CRTL) MEAN   =     15.4000      DEGREES OF FREEDOM =     18
 DIFFERENCE IN MEANS      =      0.2000
==============================================================================
TABLE t VALUE (0.05 (2),18) =  2.101     NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2),18) =  2.878     NO significant difference at alpha=0.01
```

Organismos irradiados e expostos ao OE - Controle de DMSO e Controle de DMSO com organismos irradiados

Ensaio 1

```
TOXSTAT                                t-Test Results
OE+RAD
File: T1          Transform: NO TRANSFORM

       t-test of Solvent and Blank Controls          Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
==============================================================================
 GRP1 (SOLVENT CRTL) MEAN =     19.5000      CALCULATED t VALUE =      0.2250
 GRP2 (BLANK CRTL) MEAN   =     19.0000      DEGREES OF FREEDOM =     18
 DIFFERENCE IN MEANS      =      0.5000
==============================================================================
TABLE t VALUE (0.05 (2),18) =  2.101     NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2),18) =  2.878     NO significant difference at alpha=0.01
```

Ensaio 2

```
TOXSTAT                                t-Test Results
OE+RAD
File: T2          Transform: NO TRANSFORM

       t-test of Solvent and Blank Controls          Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
==============================================================================
 GRP1 (SOLVENT CRTL) MEAN =     17.4000      CALCULATED t VALUE =      0.4297
 GRP2 (BLANK CRTL) MEAN   =     16.5000      DEGREES OF FREEDOM =     18
 DIFFERENCE IN MEANS      =      0.9000
==============================================================================
TABLE t VALUE (0.05 (2),18) =  2.101     NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2),18) =  2.878     NO significant difference at alpha=0.01
```

Ensaio 3

```
TOXSTAT                                t-Test Results
OE+RAD
File: T3          Transform: NO TRANSFORM

       t-test of Solvent and Blank Controls          Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
==============================================================================
 GRP1 (SOLVENT CRTL) MEAN =     15.0000      CALCULATED t VALUE =     -0.5242
 GRP2 (BLANK CRTL) MEAN   =     15.4000      DEGREES OF FREEDOM =     18
 DIFFERENCE IN MEANS      =     -0.4000
==============================================================================
TABLE t VALUE (0.05 (2),18) =  2.101     NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2),18) =  2.878     NO significant difference at alpha=0.01
```

Organismos irradiados e expostos ao DEET - Controle de água e Controle com organismos irradiados

Ensaio 1

```
TOXSTAT                                   t-Test Results
DEET
File: T1          Transform: NO TRANSFORM

      t-test of Solvent and Blank Controls          Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
==============================================================================
 GRP1 (SOLVENT CRTL) MEAN =     16.9000      CALCULATED t VALUE =      1.6348
 GRP2 (BLANK CRTL) MEAN   =     16.2000      DEGREES OF FREEDOM =     18
 DIFFERENCE IN MEANS      =      0.7000
==============================================================================
TABLE t VALUE (0.05 (2),18) =  2.101     NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2),18) =  2.878     NO significant difference at alpha=0.01
```

Ensaio 2

```
TOXSTAT                                   t-Test Results
DEET
File: T2          Transform: NO TRANSFORM

      t-test of Solvent and Blank Controls          Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
==============================================================================
 GRP1 (SOLVENT CRTL) MEAN =     15.1000      CALCULATED t VALUE =      0.0630
 GRP2 (BLANK CRTL) MEAN   =     15.0000      DEGREES OF FREEDOM =     18
 DIFFERENCE IN MEANS      =      0.1000
==============================================================================
TABLE t VALUE (0.05 (2),18) =  2.101     NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2),18) =  2.878     NO significant difference at alpha=0.01
```

Ensaio 3

```
TOXSTAT                                   t-Test Results
DEET
File: T3          Transform: NO TRANSFORM

      t-test of Solvent and Blank Controls          Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
==============================================================================
 GRP1 (SOLVENT CRTL) MEAN =     16.7000      CALCULATED t VALUE =      0.1457
 GRP2 (BLANK CRTL) MEAN   =     16.3000      DEGREES OF FREEDOM =     18
 DIFFERENCE IN MEANS      =      0.4000
==============================================================================
TABLE t VALUE (0.05 (2),18) =  2.101     NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2),18) =  2.878     NO significant difference at alpha=0.01
```

Organismos irradiados e não irradiados expostos ao OE

```
TOXSTAT                                   t-Test Results
OLEO
File: OLEO        Transform: NO TRANSFORM

      t-test of Solvent and Blank Controls          Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
==============================================================================
 GRP1 (SOLVENT CRTL) MEAN =     10.3333      CALCULATED t VALUE =     -0.0359
 GRP2 (BLANK CRTL) MEAN   =     10.4833      DEGREES OF FREEDOM =     10
 DIFFERENCE IN MEANS      =     -0.1500
==============================================================================
TABLE t VALUE (0.05 (2),10) =  2.228     NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2),10) =  3.169     NO significant difference at alpha=0.01
```

Organismos irradiados e não irradiados expostos ao DEET

```
TOXSTAT                                   t-Test Results
DEET
File: DEET        Transform: NO TRANSFORM

      t-test of Solvent and Blank Controls          Ho:GRP1 MEAN = GRP2 MEAN
==============================================================================
 GRP1 (SOLVENT CRTL) MEAN =     13.8333      CALCULATED t VALUE =      0.8099
 GRP2 (BLANK CRTL) MEAN   =     10.1000      DEGREES OF FREEDOM =     10
 DIFFERENCE IN MEANS      =      3.7333
==============================================================================
TABLE t VALUE (0.05 (2),10) =  2.228     NO significant difference at alpha=0.05
TABLE t VALUE (0.01 (2),10) =  3.169     NO significant difference at alpha=0.01
```

APÊNDICE N – Sumário estatístico do programa *Inhibition Concentration Porcentage* para o cálculo da CI25

Ecotoxicidade crônica do OE L180

Ensaio 1

```
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
Toxicant/Effluent: LOTE 180 OLEO
Test Start Date: 01.07.11   Test Ending Date: 08.07.11
Test Species: C.SILVESTRII
Test Duration:          7 DIAS
DATA FILE:
-----------------------------------------------------------------------
Conc.     Number     Concentration     Response      Std.       Pooled
 ID     Replicates         MG.L-1        Means       Dev.   Response Means
-----------------------------------------------------------------------
  1         10            0.000         16.500      3.689     18.200
  2         10            1.000         19.900      1.197     18.200
  3         10            2.000         16.500      4.601     16.500
  4         10            4.000          6.700      3.129      6.700
  5         10            8.000          0.600      0.966      0.600
  6         10           16.000          0.300      0.675      0.300
-----------------------------------------------------------------------
The Linear Interpolation Estimate:     2.5816   Entered P Value: 25
-----------------------------------------------------------------------
Number of Resamplings:   80   80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean:   2.5440 Standard Deviation:     0.2672
Original Confidence Limits:   Lower:     2.0443 Upper:     2.8763
Resampling time in Seconds:     0.00  Random_Seed: -107124340
```

Ensaio 2

```
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
Toxicant/Effluent: LOTE 180 OLEO
Test Start Date: 27.08.11   Test Ending Date: 03.07.11
Test Species: C.SILVESTRII
Test Duration:          7 DIAS
DATA FILE:
-----------------------------------------------------------------------
Conc.     Number     Concentration     Response      Std.       Pooled
 ID     Replicates         MG.L-1        Means       Dev.   Response Means
-----------------------------------------------------------------------
  1         10            0.000         18.800      2.300     18.850
  2         10            1.000         18.900      3.843     18.850
  3         10            2.000         16.800      7.969     16.800
  4         10            4.000         14.800      5.613     14.800
  5         10            8.000          7.000      5.312      7.000
  6         10           16.000          0.000      0.000      0.000
-----------------------------------------------------------------------
The Linear Interpolation Estimate:     4.3397   Entered P Value: 25
-----------------------------------------------------------------------
Number of Resamplings:   80   80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean:   4.0142 Standard Deviation:     0.9036
Original Confidence Limits:   Lower:     1.9000 Upper:     5.3450
Resampling time in Seconds:     0.00  Random_Seed: 145253427
```

Ensaio 3

```
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
Toxicant/Effluent: LOTE 180 OLEO
Test Start Date: 07.10.11   Test Ending Date: 14.10.11
Test Species: C.SILVESTRII
Test Duration:          7 DIAS
DATA FILE:
-----------------------------------------------------------------------
Conc.     Number     Concentration     Response      Std.       Pooled
 ID     Replicates         MG.L-1        Means       Dev.   Response Means
-----------------------------------------------------------------------
  1          9            0.000         25.333      5.958     27.111
  2          9            1.000         28.889      2.205     27.111
  3         10            2.000         27.000      3.887     27.000
  4          9            4.000         22.000      6.946     22.000
  5         10            8.000         11.100      4.202     11.100
  6         10           16.000          0.000      0.000      0.000
-----------------------------------------------------------------------
The Linear Interpolation Estimate:     4.6116   Entered P Value: 25
-----------------------------------------------------------------------
Number of Resamplings:   80   80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean:   4.5070 Standard Deviation:     0.6352
Original Confidence Limits:   Lower:     3.4474 Upper:     5.7829
Resampling time in Seconds:     0.00  Random_Seed: -6601868
```

Ecotoxicidade crônica do OE L180

Ensaio 1

```
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
Toxicant/Effluent: LOTE 183 OLEO
Test Start Date: 03.02.12   Test Ending Date: 10.02.12
Test Species: C.SILVESTRII
Test Duration:          7 DIAS
DATA FILE:
-----------------------------------------------------------------------
Conc.     Number     Concentration     Response      Std.       Pooled
 ID     Replicates         MG.L-1        Means       Dev.   Response Means
-----------------------------------------------------------------------
  1         10            0.000         15.500      3.274     15.800
  2         10            1.000         16.100      4.909     15.800
  3         10            2.000         10.000      3.266     10.000
  4         10            4.000          9.300      4.498      9.300
  5          9            8.000          3.333      1.414      3.333
  6         10           16.000          0.000      0.000      0.000
-----------------------------------------------------------------------
The Linear Interpolation Estimate:     1.6810   Entered P Value: 25
-----------------------------------------------------------------------
Number of Resamplings:   80   80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean:   1.7389 Standard Deviation:     0.4013
Original Confidence Limits:   Lower:     1.4426 Upper:     2.6389
Resampling time in Seconds:     0.00  Random_Seed: -164149450
```

Ensaio 2

```
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
Toxicant/Effluent: LOTE 183 OLEO
Test Start Date: 29.07.11   Test Ending Date: 05.08.11
Test Species: C.SILVESTRII
Test Duration:          7 DIAS
DATA FILE:
-----------------------------------------------------------------------
Conc.     Number     Concentration     Response      Std.       Pooled
 ID     Replicates        MG.L-1         Means       Dev.   Response Means
-----------------------------------------------------------------------
  1         10            0.000         18.200      2.098      18.200
  2         10            1.000         16.300      2.003      16.300
  3         10            2.000         14.900      1.969      14.900
  4         10            4.000         14.800      1.033      14.800
  5         10            8.000          5.500      4.197       5.500
  6         10           16.000          0.000      0.000       0.000
-----------------------------------------------------------------------
The Linear Interpolation Estimate:     4.4946   Entered P Value: 25
-----------------------------------------------------------------------
Number of Resamplings:   80   80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean:   4.4537 Standard Deviation:     0.3986
Original Confidence Limits:   Lower:     3.9091 Upper:     5.0230
Resampling time in Seconds:     0.00  Random_Seed: 12574143
```

Ensaio 3

```
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
Toxicant/Effluent: LOTE 183 OLEO
Test Start Date: 12.08.11   Test Ending Date: 19.08.11
Test Species: C.SILVESTRII
Test Duration:          7 DIAS
DATA FILE:
-----------------------------------------------------------------------
Conc.     Number     Concentration     Response      Std.       Pooled
 ID     Replicates        MG.L-1         Means       Dev.   Response Means
-----------------------------------------------------------------------
  1         10            0.000         17.000      3.464      17.000
  2         10            1.000         17.000      5.793      17.000
  3         10            2.000         14.300      2.359      14.300
  4         10            4.000         11.600      5.038      11.600
  5         10            8.000          2.300      2.359       2.300
  6         10           16.000          0.000      0.000       0.000
-----------------------------------------------------------------------
The Linear Interpolation Estimate:     3.1481   Entered P Value: 25
-----------------------------------------------------------------------
Number of Resamplings:   80   80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean:   2.9294 Standard Deviation:     0.8100
Original Confidence Limits:   Lower:     1.6915 Upper:     4.6195
Resampling time in Seconds:     0.00  Random_Seed: -129699015
```

Ecotoxicidade crônica do DEET

Ensaio 1

```
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
Toxicant/Effluent: deet
Test Start Date: 7.10.11   Test Ending Date: 14.10.11
Test Species: C. SILVESTRII
Test Duration:          7 DIAS
DATA FILE:
-----------------------------------------------------------------------
Conc.     Number     Concentration     Response      Std.       Pooled
 ID     Replicates          MG.L         Means       Dev.   Response Means
-----------------------------------------------------------------------
  1          9            0.000         24.000      3.162      24.000
  2         10            3.750         23.700      3.773      23.706
  3          7            7.500         23.714      4.424      23.706
  4         10           15.000         18.100      9.860      18.100
  5         10           30.000          0.000      0.000       0.000
  6         10           60.000          0.000      0.000       0.000
-----------------------------------------------------------------------
The Linear Interpolation Estimate:    15.0829   Entered P Value: 25
-----------------------------------------------------------------------
Number of Resamplings:   80   80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean:  14.9320 Standard Deviation:     2.3123
Original Confidence Limits:   Lower:    11.3139 Upper:    18.7500
Resampling time in Seconds:     0.06  Random_Seed: -871111698
```

Ensaio 2

```
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
Toxicant/Effluent: DEET
Test Start Date: 04.11.11   Test Ending Date: 11.11.11
Test Species: C. SILVESTRII
Test Duration:          7 DIAS
DATA FILE:
-----------------------------------------------------------------------
Conc.     Number     Concentration     Response      Std.       Pooled
 ID     Replicates          MG.L         Means       Dev.   Response Means
-----------------------------------------------------------------------
  1          8            0.000         16.625      4.138      18.333
  2         10            3.750         19.700      5.250      18.333
  3          9            7.500         15.667      8.396      16.895
  4         10           15.000         18.000      3.432      16.895
  5         10           30.000          0.000      0.000       0.000
  6         10           60.000          0.000      0.000       0.000
-----------------------------------------------------------------------
The Linear Interpolation Estimate:    17.7921   Entered P Value: 25
-----------------------------------------------------------------------
Number of Resamplings:   80   80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean:  17.2155 Standard Deviation:     1.9234
Original Confidence Limits:   Lower:    15.3975 Upper:    18.7500
Resampling time in Seconds:     0.00  Random_Seed: 2008526128
```

Ensaio 3

```
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
Toxicant/Effluent: DEET
Test Start Date: 18.11.11   Test Ending Date: 25.11.11
Test Species: C. SILVESTRII
Test Duration:          7 DIAS
DATA FILE:
```

Conc. ID	Number Replicates	Concentration MG.L	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	10	0.000	16.800	3.967	18.200
2	10	3.750	19.600	4.169	18.200
3	8	7.500	18.125	3.944	18.125
4	10	15.000	15.000	3.590	15.000
5	10	30.000	0.300	0.675	0.300
6	10	60.000	0.000	0.000	0.000

```
The Linear Interpolation Estimate:    16.3776   Entered P Value: 25

Number of Resamplings:   80   80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean:  16.4516 Standard Deviation:     1.1244
Original Confidence Limits:   Lower:    13.6607 Upper:    17.9207
Resampling time in Seconds:     0.00  Random_Seed: 66178203
```

Radiação gama

Ensaio 1

```
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
Toxicant/Effluent: OLEO+RAD
Test Start Date: 21.01.12   Test Ending Date: 27.01.12
Test Species: C.SILVESTRII
Test Duration:          7 DIAS
DATA FILE:
```

Conc. ID	Number Replicates	Concentration Gy	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	10	0.000	23.300	11.304	24.552
2	9	6.250	23.111	10.031	24.552
3	10	12.500	27.100	2.424	24.552
4	10	25.000	21.100	7.937	21.100
5	10	50.000	4.300	5.012	4.300
6	10	100.000	0.100	0.316	0.100

```
The Linear Interpolation Estimate:    28.9973   Entered P Value: 25

Number of Resamplings:   80   80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean:  28.0975 Standard Deviation:     3.1447
Original Confidence Limits:   Lower:    21.6702 Upper:    32.7076
Resampling time in Seconds:     0.00  Random_Seed: -592752750
```

Ensaio 2

```
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
Toxicant/Effluent: RADIACAO
Test Start Date: 10.02.12   Test Ending Date: 17.02.12
Test Species: C.SILVESTRII
Test Duration:          7 DIAS
DATA FILE:
```

Conc. ID	Number Replicates	Concentration Gy	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	10	0.000	19.900	1.101	19.900
2	10	6.250	18.200	4.158	18.450
3	10	12.500	18.700	3.433	18.450
4	10	25.000	16.800	3.824	16.800
5	10	50.000	3.500	3.719	3.500
6	10	100.000	0.000	0.000	0.000

```
The Linear Interpolation Estimate:    28.5244   Entered P Value: 25

Number of Resamplings:   80   80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean:  28.7974 Standard Deviation:     1.9731
Original Confidence Limits:   Lower:    24.2953 Upper:    31.6201
Resampling time in Seconds:     0.05  Random_Seed: 36642570
```

Ensaio 3

```
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
Toxicant/Effluent: RADIACAO
Test Start Date: 02.03.12   Test Ending Date: 09.03.12
Test Species: C.SILVESTRII
Test Duration:          7 DIAS
DATA FILE:
```

Conc. ID	Number Replicates	Concentration Gy	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	10	0.000	16.800	6.663	18.700
2	10	6.250	16.800	4.733	18.700
3	10	12.500	22.500	1.509	18.700
4	10	25.000	16.900	3.143	16.900
5	10	50.000	2.600	2.547	2.600
6	10	100.000	0.100	0.316	0.100

```
The Linear Interpolation Estimate:    30.0262   Entered P Value: 25

Number of Resamplings:   80   80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean:  29.8360 Standard Deviation:     1.3769
Original Confidence Limits:   Lower:    27.3026 Upper:    32.1001
Resampling time in Seconds:     0.06  Random_Seed: -595479456
```

Organismos irradiados e expostos ao OE

Ensaio 1

```
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
Toxicant/Effluent: OLEO+RAD
Test Start Date: 29.06.12   Test Ending Date: 06.07.12
Test Species: C.SILVESTRII
Test Duration:          7 DIAS
DATA FILE:
```

Conc. ID	Number Replicates	Concentration MG.L-1	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	10	0.000	19.500	1.434	19.500
2	10	1.000	19.400	2.591	19.400
3	10	2.000	16.000	11.324	16.000
4	10	4.000	11.500	5.104	11.500
5	10	8.000	0.300	0.949	0.300
6	10	16.000	0.100	0.316	0.100

```
The Linear Interpolation Estimate:     2.6111   Entered P Value: 25

Number of Resamplings:   80   80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean:   2.5435 Standard Deviation:     0.6668
Original Confidence Limits:   Lower:     1.5774 Upper:     3.5625
Resampling time in Seconds:     0.00  Random_Seed: -319130240
```

Ensaio 2

```
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
Toxicant/Effluent: OLEO+RAD
Test Start Date: 06.07.12   Test Ending Date: 13.07.12
Test Species: C.SILVESTRII
Test Duration:          7 DIAS
DATA FILE:
```

Conc. ID	Number Replicates	Concentration MG.L-1	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	10	0.000	17.500	1.958	17.800
2	10	1.000	18.100	6.027	17.800
3	10	2.000	13.500	5.798	13.500
4	10	4.000	11.500	8.003	11.500
5	10	8.000	3.400	3.373	3.400
6	10	16.000	0.200	0.422	0.200

```
The Linear Interpolation Estimate:     2.1500   Entered P Value: 25

Number of Resamplings:   80   80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean:   2.6193 Standard Deviation:     0.9747
Original Confidence Limits:   Lower:     1.5231 Upper:     4.5413
Resampling time in Seconds:     0.00  Random_Seed: -113942123
```

Ensaio 3

```
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
Toxicant/Effluent: OLEO+RAD
Test Start Date: 13.07.12   Test Ending Date: 20.07.12
Test Species: C.SILVESTRII
Test Duration:          7 DIAS
DATA FILE:
```

Conc. ID	Number Replicates	Concentration MG.L-1	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	10	0.000	15.100	1.729	15.300
2	10	1.000	15.500	1.354	15.300
3	10	2.000	12.100	2.183	12.100
4	10	4.000	9.400	2.459	9.400
5	10	8.000	3.200	3.259	3.200
6	10	16.000	0.500	0.850	0.500

```
The Linear Interpolation Estimate:     2.4630   Entered P Value: 25

Number of Resamplings:   80   80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean:   2.4294 Standard Deviation:     0.3758
Original Confidence Limits:   Lower:     1.8444 Upper:     3.1786
Resampling time in Seconds:     0.00  Random_Seed: 49924875
```

Organismos irradiados e expostos ao DEET

Ensaio 1

```
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
Toxicant/Effluent: deet+radiacao
Test Start Date: 02.03.12   Test Ending Date: 09.03.12
Test Species: C. SILVESTRII
Test Duration:          7 DIAS
DATA FILE:
```

Conc. ID	Number Replicates	Concentration MG.L-1	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	10	0.000	18.200	3.293	18.200
2	10	3.750	18.000	4.082	18.000
3	10	7.500	14.200	5.245	14.350
4	10	15.000	14.500	2.915	14.350
5	10	30.000	0.000	0.000	0.000
6	10	60.000	0.000	0.000	0.000

```
The Linear Interpolation Estimate:    15.7317   Entered P Value: 25

Number of Resamplings:   80   80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean:  13.0592 Standard Deviation:     4.0786
Original Confidence Limits:   Lower:     6.1014 Upper:    17.0806
Resampling time in Seconds:     0.00  Random_Seed: -195030180
```

Ensaio 2

```
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
Toxicant/Effluent: DEET+RADIACAO
Test Start Date: 15.06.12   Test Ending Date: 22.06.12
Test Species: C.SILVESTRII
Test Duration:          7 DIAS
DATA FILE:
```

Conc. ID	Number Replicates	Concentration MG.L-1	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	10	0.000	15.000	4.397	15.000
2	10	3.750	14.800	4.290	14.800
3	10	7.500	13.300	2.669	13.300
4	10	15.000	13.100	4.358	13.100
5	10	30.000	0.000	0.000	0.000
6	10	60.000	0.000	0.000	0.000

```
The Linear Interpolation Estimate:    17.1183   Entered P Value: 25

Number of Resamplings:   80   80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean:  15.9654 Standard Deviation:     2.4521
Original Confidence Limits:   Lower:     9.1406 Upper:    18.7500
Resampling time in Seconds:     0.00  Random_Seed: 446882443
```

Ensaio 3

```
*** Inhibition Concentration Percentage Estimate ***
Toxicant/Effluent: DEET+RADIACAO
Test Start Date: 22.06.12   Test Ending Date: 29.06.12
Test Species: C.SILVESTRII
Test Duration:          7 DIAS
DATA FILE:
```

Conc. ID	Number Replicates	Concentration MG.L-1	Response Means	Std. Dev.	Pooled Response Means
1	10	0.000	16.300	4.900	16.300
2	10	3.750	14.300	4.596	14.550
3	10	7.500	14.800	1.398	14.550
4	10	15.000	12.600	5.719	12.600
5	10	30.000	0.000	0.000	0.000
6	10	60.000	0.000	0.000	0.000

```
The Linear Interpolation Estimate:    15.4464   Entered P Value: 25

Number of Resamplings:   80   80 Resamples Generated
The Bootstrap Estimates Mean:  13.8177 Standard Deviation:     3.9291
Original Confidence Limits:   Lower:     3.5526 Upper:    18.3333
Resampling time in Seconds:     0.00  Random_Seed: 364236510
```