



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE TECNOLOGIA**

MARIANA ROLIM GRANZOTO

**TOXICIDADE DO FIPRONIL SOBRE *Enchytraeus crypticus* EM
SOLO NATURAL TROPICAL: TESTE MULTIGERACIONAL**

Limeira – SP

2018

Mariana Rolim Granzoto

**TOXICIDADE DO FIPRONIL SOBRE *Enchytraeus crypticus* EM
SOLO NATURAL TROPICAL: TESTE MULTIGERACIONAL**

*Dissertação apresentada à Faculdade de
Tecnologia da Universidade Estadual de
Campinas como parte dos requisitos exigidos
para a obtenção do título de Mestre em
Tecnologia, na área Ambiente.*

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Cassiana Maria Reganhan Coneglian

Este exemplar corresponde à versão final da
dissertação defendida por Marina Rolim Granzoto
e orientada pela Prof.^a Dr.^a Cassiana Maria
Reganhan Coneglian.

Limeira

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Tecnologia
Felipe de Souza Bueno - CRB 8/8577

G767t Granzoto, Mariana Rolim, 1988-
Toxicidade do fipronil sobre *Enchytraeus crypticus* em solo natural tropical : teste multigeracional / Mariana Rolim Granzoto. – Limeira, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Cassiana Maria Reganhan Coneglian.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Tecnologia.

1. Toxicidade. 2. Agrotóxicos. 3. Bioindicador. I. Reganhan-Coneglian, Cassiana Maria, 1970-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Tecnologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Toxicity of fipronil on *Enchytraeus crypticus* in natural tropical soil: multigerational test

Palavras-chave em inglês:

Toxicity

Pesticides

Bioindicator

Área de concentração: Ambiente

Titulação: Mestra em Tecnologia

Banca examinadora:

Cassiana Maria Reganhan Coneglian [Orientador]

Marta Siviero Guilherme Pires

Regina Teresa Rosim Monteiro

Data de defesa: 11-12-2018

Programa de Pós-Graduação: Tecnologia

FOLHA DE APROVAÇÃO

Abaixo se apresentam os membros da comissão julgadora da sessão pública de defesa de dissertação para o Título de Mestrado em Tecnologia na área de concentração de Ambiente, a que submeteu a (o) aluna (o) Mariana Rolim Granzoto, em 11 de dezembro de 2018 na Faculdade de Tecnologia- FT/ UNICAMP, em Limeira/SP.

Prof. (a). Dr (a) Cassiana Maria Reganhan Coneglian

Presidente da Comissão Julgadora

Prof. (a). Dr (a) Marta Siviero Guilherme Pires

Faculdade de Tecnologia - Unicamp

Prof. (a). Dr (a) Regina Teresa Rosim Monteiro

CENA/USP

Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria de Pós-Graduação da FT.

DEDICATÓRIA

Dedico esse projeto aos meus pais, Roseli Aparecida Rolim Granzoto e Luis Adriano Granzoto, por toda paciência, amor, carinho, e apoio durante todo o tempo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida, por me conceder força e luz durante toda a realização desse projeto.

Aos meus pais, Roseli Aparecida Rolim Granzoto e Luis Adriano Granzoto, pela paciência e principalmente apoio nesses dois anos.

As minhas amigas, Débora Luiza da Silva, Stela Saes, Maria Elisa Moreno, Marília Camargo Araújo e Heloíza Feltrin Bandeira, pelo incentivo e pelas palavras de conforto nas horas mais difíceis.

As pessoas sensacionais que tive a honra e o prazer de conhecer durante esses dois anos de estudo e aprendizado para concretizar esse mestrado, Dayane Oliveira, Ana Carolina Giatti Callegaro, Beatriz Maria Ohl do Nascimento, Amadeu Junior de Carvalho, Bruna Carlotti, Maraline Zanatta e Henrique Dias Figueiredo, o meu mais sincero agradecimento pela ajuda, amizade, dedicação e parceria.

Ao Gilberto de Almeida, biólogo e técnico do Laboratório de Microbiologia, por toda a ajuda prestada, pela paciência e amizade.

A todos os professores que de forma direta ou indireta me ajudaram nas pesquisas e nas orientações.

Por fim, a minha orientadora Dr^a Cassiana Maria Reganhan Coneglian por toda a paciência, dedicação, orientação e apoio. Muito obrigada por ter aceito me orientar e por toda sua atenção nesses dois anos de trabalho e estudo.

Muito Obrigada!

“Fale apenas quando o que for dito, for mais bonito do que o silêncio”

Buda

Resumo

O Brasil é um dos maiores produtores agrícolas, com significativa evolução tecnológica nas últimas décadas e incentivos para o aumento na produção de alimentos, entretanto, esta evolução promoveu o aumento na utilização de agrotóxicos para o controle das pragas agrícolas. A aplicação dessas moléculas químicas se mostra eficiente principalmente no controle de plantas daninhas e de insetos alvo, porém pode afetar organismos não alvo no ecossistema como um todo. Dentre os mais variados grupos de agrotóxicos estão os inseticidas. O fipronil é um inseticida utilizado no controle de insetos em plantações de cana-de-açúcar, soja, milho, algodão, batata, tratamento de sementes de diversas culturas e no controle de pulgas, carrapatos e piolhos em animais domésticos. O presente projeto de pesquisa teve como finalidade avaliar a toxicidade de uma formulação comercial do fipronil (Regent ® 800 WG), em solo natural mediante teste multigeracional com organismo *Enchytraeus crypticus*, importantes representantes da mesofauna do solo, realizando teste de fuga (avoidance) como experimento complementar. Os enquitreídeos são organismos de fácil cultivo em laboratório, e desempenham importantes funções no solo, mantendo a estrutura do mesmo e sua porosidade, principalmente quando as minhocas não estão em números consideráveis no ambiente. Estes organismos têm sido considerados bons bioindicadores da qualidade do solo e são amplamente utilizados em testes de toxicidade, entretanto, a maioria deles avaliando apenas uma geração do organismo em relação ao composto tóxico, não permitindo que o composto testado fique exposto durante todo o ciclo de vida do bioindicador. Assim, faz-se necessário a avaliação multigeracional para verificar se o fipronil (Regent ® 800 WG) pode causar efeitos nas gerações futuras, garantindo a exposição do inseticida durante todo o ciclo de vida. As concentrações do fipronil (Regent ® 800 WG) avaliadas no teste de toxicidade com *Enchytraeus crypticus* foram aquelas recomendadas pelo fabricante em seu uso para cultura de cana-de-açúcar. Devido à alta persistência do fipronil (Regent ® 800 WG) no solo, avaliou-se a toxicidade do inseticida para duas gerações do organismo teste. Realizou-se também ensaio de biodegradação no solo do mesmo, mediante a avaliação da atividade microbiana pela técnica de respirometria. Diante dos resultados obtidos verificou-se que o fipronil (Regent ® 800 WG) é um inseticida que apresenta baixa biodegradabilidade no solo e *E. crypticus* não foram sensíveis ao mesmo em duas gerações, visto que, não houve toxicidade aguda, entretanto, foi possível observar a redução do tamanho dos animais, principalmente na primeira geração, indicando que nas próximas gerações eles não irão sobreviver. No teste de fuga, na concentração mais elevada, os bioindicadores tiveram preferência pelo solo não contaminado com inseticida.

Abstract

Brazil is one of the largest agricultural producers, with significant technological evolution in the last decades and incentives for the increase in food production, however, this evolution is promoting the increase in the use of pesticides for the control of agricultural pests. The application of these chemical molecules proves to be efficient mainly in controlling weeds and target insects, but it can affect non-target organisms in the ecosystem as a whole. Among the most varied groups of pesticides are insecticides. Fipronil is an insecticide used to control insects in sugarcane, soybean, corn, cotton, potato, crop cultivation and control of fleas, ticks and lice in domestic animals. The present research project aimed at the toxicity of a commercial species, in natural soil through the multigenerational test with the culture *Enchytraeus crypticus*, important representatives of the soil mesofauna, performing avoidance test as a complementary experiment. The enchytraeids are grouped in laboratory, and they play important functions in the soil, maintaining a structure of the same and its porosity, especially when the earthworms are not in considerable numbers in the environment. These organisms have been considered good soil quality bioindicators and are widely used in toxicity tests, however, not allowing the test to be exposed throughout the bioindicator's life cycle. Thus, multigenerational assessment is required to verify that fipronil (Regent ® 800 WG) can have effects on future generations, ensuring exposure of the insecticide throughout the life cycle. The concentrations of fipronil (Regent ® 800 WG) evaluated in the toxicity test with *Enchytraeus crypticus* were those recommended by the manufacturer in its use for sugar cane cultivation. Due to the high persistence of fipronil (Regent ® 800 WG) in the soil, the toxicity of the insecticide was evaluated for two generations of the test organism. A biodegradation test was also carried out in the soil, by means of the evaluation of the microbial activity by the technique of respirometry. In view of the results obtained, it was verified that fipronil (Regent ® 800 WG) is an insecticide that presents low biodegradability in the soil and *E. crypticus* were not sensitive to it in two generations, since, there was no acute toxicity, however, it was possible observe the reduction of the size of the animals, especially in the first generation, indicating that in the next generations they will not survive. In the avoidance test, at the highest concentration, the bioindicators had preference for soil not contaminated with insecticide.

Lista de Figuras

Figura 1 - Venda de agrotóxico por cultura no Brasil (2015)	18
Figura 2 - Consumo de agrotóxicos no Brasil nos anos de 2000 a 2014 (tonelada de ingrediente ativo)	19
Figura 3 - Processos que afetam o destino ambiental dos agrotóxicos	20
Figura 4 - Estrutura química do fipronil	22
Figura 5 - Esquema de um anelídeo (a) e aspecto geral de <i>Enchytraeus crypticus</i> (b)	26
Figura 6 - Rotas de degradação do fipronil (Regent ® 800 WG) no ambiente	30
Figura 7 - Fluxograma da contaminação do solo e introdução dos organismos clitelados em cada geração	38
Figura 8 - Esquema de um Respirômetro de Bartha e Pramer	40
Figura 9 - Teste de fuga (avoidance) realizado em laboratório com duração de 48 horas e fotoperíodo de 16h/8h (luz/escuro)	41
Figura 10 - Reprodução de <i>E. crypticus</i> após exposição as concentrações do ácido bórico, durante 21 dias à temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16h/8h	42
Figura 11 - Resultados da quantificação do número de organismos expostos ao fipronil (Regent ® 800 WG) durante 21, a temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16h/8h (teste 1)	43
Figura 12 - Resultados da quantificação do número de organismos da primeira geração (G1) expostos ao fipronil (Regent ® 800 WG) durante 63 dias, a temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16h/8h	44
Figura 13 - Resultados da quantificação do número de organismos da segunda geração (G2) expostos ao fipronil (Regent ® 800 WG) durante 105 dias, a temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$	45
Figura 14 - Resultado da reprodução de <i>E. crypticus</i> no solo controle SAT no teste inicial, primeira (G1) e segunda Geração (G2)	47
Figura 15 – Resultado da reprodução de <i>E. crypticus</i> no solo natural tropical controle (Broa) no teste inicial, primeira (G1) e segunda Geração (G2)	48
Figura 16 – Resultado da reprodução de <i>E. crypticus</i> no solo natural tropical contaminado com fipronil (Regent ® 800 WG) na concentração de 0,32 mg/kg de solo seco no teste inicial, primeira (G1) e segunda Geração (G2)	48
Figura 17 – Resultado da reprodução de <i>E. crypticus</i> no solo natural tropical contaminado com fipronil (Regent ® 800 WG) na concentração de 0,65 mg/kg de solo seco no teste inicial, primeira (G1) e segunda Geração (G2)	49

Figura 18 – Resultado da reprodução de <i>E. crypticus</i> no solo natural tropical contaminado com fipronil (Regent ® 800 WG) na concentração de 1,3 mg/kg de solo seco no teste inicial, primeira (G1) e segunda Geração (G2)	49
Figura 19 – Resultado da reprodução de <i>E. crypticus</i> no solo natural tropical contaminado com fipronil (Regent ® 800 WG) na concentração de 2,6 mg/kg de solo seco no teste inicial, primeira (G1) e segunda Geração (G2)	50
Figura 20 – Resultado da reprodução de <i>E. crypticus</i> no solo natural tropical contaminado com fipronil (Regent ® 800 WG) na concentração de 5,2 mg/kg de solo seco no teste inicial, primeira (G1) e segunda Geração (G2)	50
Figura 21 – Resultado do teste de fuga realizado com <i>E. crypticus</i> exposto ao fipronil (Regent ® 800 WG) em solo natural tropical (Broa), avaliados durante 48 horas com temperatura de 20±2°C e fotoperíodo de 16/8h (claro/escuro)	53
Figura 22 – Produção acumulada de CO ₂ no solo contaminado com fipronil (Regent ® 800 WG) em diferentes concentrações, incubados em estuda BOD a 22 ± 2°C	55

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Principais mudanças previstas com a proposta da nova Lei dos Agrotóxicos, destacando a lei atual e a proposta de mudança	21
Tabela 2 - Valores máximos permitidos para fipronil (Regent ® 800 WG) de acordo com o estabelecido pela ANVISA e FAO	24
Tabela 3 - Características físico-químicas do solo natural tropical (Broa)	35
Tabela 4 - Quantificação de bactérias heterotróficas e fungos, avaliados em Unidade Formadora de Colônia por grama de solo (UFC/g), em amostras de solo natural tropical (Broa) e na areia utilizada para fazer o solo artificial (SAT) no início dos testes de toxicidade	51
Tabela 5 - Quantificação de bactérias heterotróficas e fungos, avaliados em Unidade Formadora de Colônia por grama de solo (UFC/g), em amostras de solo natural e na areia utilizada para fazer o solo artificial (SAT), no final dos testes de toxicidade	51
Tabela 6 - Resultado do teste de fuga realizado com dez organismos de <i>E. crypticus</i> exposto ao fipronil (Regent ® 800 WG) em solo natural tropical (Broa), avaliado durante o período de 48 horas, a temperatura de 20±2°C e fotoperíodo de 16/8h (claro/escuro)	52

Lista de Abreviações e Siglas

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

FAO - Food and Agriculture Organization

GABA - Ácido Gama Amido Butírico

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LAECOS - Laboratório de Ecotoxicologia de Solos

LOEC - Lowest observed effect concentration

LVdf - Latossolo Vermelho Distroférico típico

NOEC - No Observed effect concentration

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development

OCDE - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico

ONU - Organização das Nações Unidas

SAT - Solo Artificial Tropical

Sumário

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1. Agrotóxicos no Brasil	17
2.2. Fipronil	22
2.3. Qualidade do solo: aspectos biológicos e <i>Enchytraeus crypticus</i> como bioindicador.....	25
2.4. Biodegradação do fipronil em solo	29
3. OBJETIVO	33
3.1. Objetivo geral	33
3.2. Objetivo específico	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1. MATERIAIS	34
4.1.1. Organismo teste	34
4.1.2. Cultivo de <i>E. crypticus</i>	34
4.1.3. Amostras de Solo	35
4.1.4. Fipronil (Regent ® 800 WG)	36
4.1.5. Equipamentos e vidrarias	36
4.2. MÉTODOS	36
4.2.1. Teste de sensibilidade	36
4.2.2. Contaminação do solo	36
4.2.3. Teste de toxicidade multigeracional	37
4.2.4. Quantificação de fungos e bactérias heterotróficas	38
4.2.5. Quantificação de CO ₂ por Respirimetria de Bartha	39
4.2.6. Teste Avoidance (teste de fuga)	40
4.2.7. Análise dos resultados	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
5.1. Resultado do teste de sensibilidade	42
5.2. Resultado do teste de toxicidade multigeracional	43
5.3. Resultados da quantificação de fungos e bactérias heterotróficas	51
5.4. Resultados do teste de Avoidance (teste de fuga)	52
5.5. Resultados do ensaio de Respirimetria de Bartha e Pramer	54
6. CONCLUSÕES	57
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

1. INTRODUÇÃO

A chamada Revolução Verde ocorrida nas décadas de 60 e 70, impulsionou no Brasil a produção agrícola em grande escala, alterando o cenário de produção com o desenvolvimento tecnológico e quebra da agricultura familiar, seguida do êxodo rural. O incentivo a agricultura levou ao aumento no uso de agrotóxicos para controle das pragas, trazendo assim algumas desvantagens ao meio ambiente, destacando consequências drásticas, especialmente para o solo, que possui organismos com funções primordiais para a manutenção do ecossistema.

O crescimento populacional urbano levou a maior demanda de produtos alimentícios exigindo cada vez mais o uso de produtos químicos para acelerar a produção agrícola. O uso de pesticida em larga escala e sem controle não apenas atinge os organismos alvo, mas também contamina o solo, expondo outros organismos não alvos.

Como consequências dessas práticas destaca-se o acúmulo de compostos químicos indesejáveis no meio ambiente, evidenciados no Brasil pela comprovação do aumento de inúmeros passivos ambientais registrados e o aumento do número de áreas contaminadas, registrados pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) nos relatórios de áreas contaminadas no estado de São Paulo (CETESB, 2018).

Tem sido crescente a utilização de substâncias sintéticas na produção de alimentos, colocando o Brasil em posição de destaque na utilização de pesticidas, sendo inegável a utilização desses compostos para manter a produção e suprir a demanda alimentar, mas também é importante avaliar o comportamento dessas moléculas no ambiente, sendo necessário estudos que avaliem o impacto no ambiente, afetando diretamente a qualidade do solo.

A qualidade do solo pode ser avaliada em suas características físicas, químicas e biológicas. Na avaliação biológica, os invertebrados têm sido utilizados como bioindicadores, cada qual com maior ou menor sensibilidade, podendo avaliar a qualidade do mesmo antes e após atividades antrópicas e podem ainda identificar a toxicidade de compostos químicos, por serem importantes representantes da biota do solo.

Os *Enchytraeus crypticus*, importantes representantes da mesofauna do solo, são anelídeos terrestres encontrados em diferentes ecossistemas, possibilitando comparações em diferentes ambientes. Os enquitreídeos têm sido amplamente utilizados em testes de toxicidade, devido a sua grande representatividade e importância no ecossistema terrestre e por serem facilmente cultivados em laboratório. Testes laboratoriais envolvendo uma única espécie permite entender o que acontece a nível individual para poder propagar respostas a níveis mais baixos de organizações biológicas e adotar medidas de avaliação para níveis superiores de

organização ecológica, ou seja, população, comunidades e ecossistemas. Nos ensaios de toxicidade crônica com o *E. crypticus*, o mesmo é exposto durante 21 dias ao composto químico a ser avaliado. Utilizando este procedimento, os organismos de teste não estão expostos durante todo um ciclo de vida e, portanto, a análise de toxicidade da substância pode ser subestimada. Sendo assim, testes multigeracionais auxiliam no entendimento do efeito que um composto químico possa causar nas gerações e em todo o ciclo de vida do organismo teste.

Dentre as classes de agrotóxicos estão os inseticidas, e entre eles o fipronil (Regent ® 800 WG), composto utilizado no controle de formigas e outros insetos invasores em várias culturas, e também no combate de pragas urbanas como pulgas e carrapatos em animais domésticos.

O fipronil (Regent ® 800 WG), composto considerado altamente tóxico pela ANVISA e persistente no solo por ser de baixa solubilidade em água, tem sido objetivo de vários estudos no mundo em decorrência de sua toxicidade a insetos não alvos. Em alguns países da Europa sua utilização foi proibida em decorrência da alta toxicidade, causando a morte de abelhas, responsáveis pela polinização. Sendo assim, faz-se necessários estudos que avaliem o seu destino no solo e conseqüentemente em todo ecossistema, assim como a sua toxicidade nos indicadores biológicos do solo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Agrotóxicos no Brasil

De acordo com Lei Nº 7.802, de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto Nº 4.074/2002, os agrotóxicos são definidos como:

“Os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos” (BRASIL, 1898; BRASIL, 2002).

O Brasil é um dos maiores produtores agrícolas do mundo, logo, para garantir o fornecimento de alimentos em todo o território nacional, o uso de agrotóxicos tem sido há muitos anos a estratégia de manejo no controle de pragas mais utilizado (JARDIM *et al.*, 2011).

Os agrotóxicos foram regulamentados no Brasil mediante o Decreto Nº 24.114 de 1934. Nele estão estabelecidas instruções para importação, exportação, produção e comercialização no país (BRASIL, 1934).

O Congresso Brasileiro aprovou a Lei Federal Nº 7.802, no ano de 1989, que regulamenta todos os aspectos que dizem respeito aos pesticidas, incluindo: produção, armazenamento, transporte, eliminação e pesquisa. De acordo com a referida lei um pesticida só pode ser comercializado no país se o mesmo estiver registrado. A obtenção do registro envolve o Ministério da Saúde, o Ministério da Agricultura e o Ministério do Meio Ambiente. Ainda de acordo com a lei, um pesticida só pode ser vendido para uso agrícola se apresentar prescrição agrônômica escrita por profissional técnico depois de fazer uma visita técnica e avaliar a área em que o produto será aplicado (CALDAS, 2011).

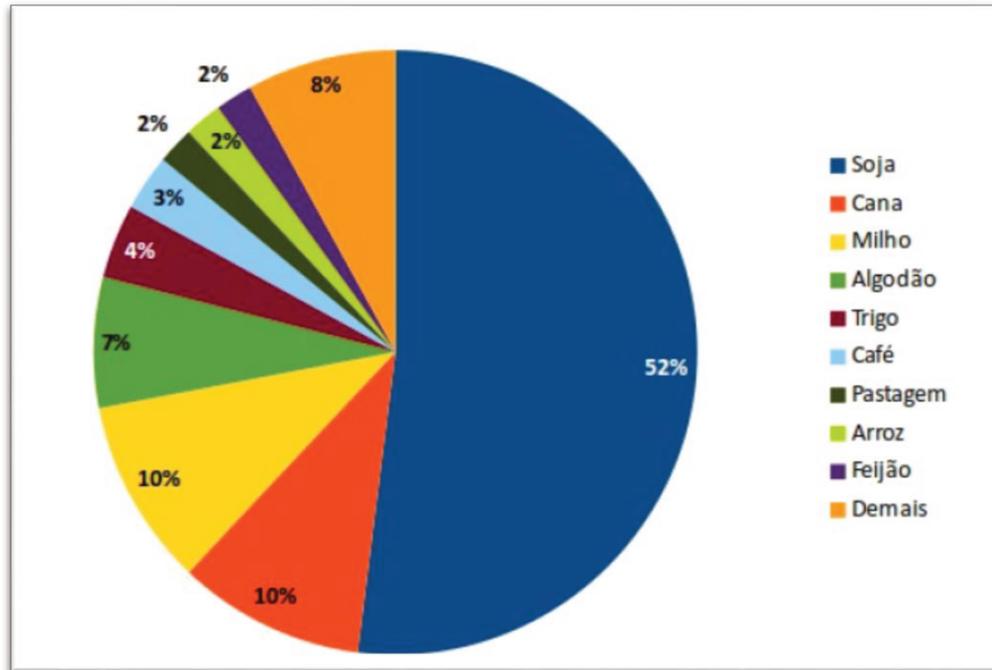
A produção agrícola no Brasil se tornou dependente do uso desses agroquímicos e para assegurar a rentabilidade da cultura, faz-se necessário o uso cada vez mais elevado desses compostos sintéticos, entretanto o uso intenso tem favorecido a proliferação de pragas, ervas daninhas e doenças, devido a fatores de resistência dos organismos alvos (VIEIRA *et al.*, 2016).

No Brasil, segundo IBGE (2015) ocorreu aumento de 2,7 quilos por hectare em 2002 para 6,9 quilos por hectare em 2012 no uso de agrotóxico, crescimento de 155% em 10 anos, e dos produtos utilizados, 64,1% foram considerados perigosos e 27,7% muito perigosos.

De todo o agrotóxico comercializado mundialmente, o Brasil consome cerca de 20% (PELAEZ *et al.*, 2015) e esse consumo tem aumentado substancialmente com o passar dos anos.

A Figura 1 apresenta a quantidade de agrotóxico vendida por cultura no Brasil.

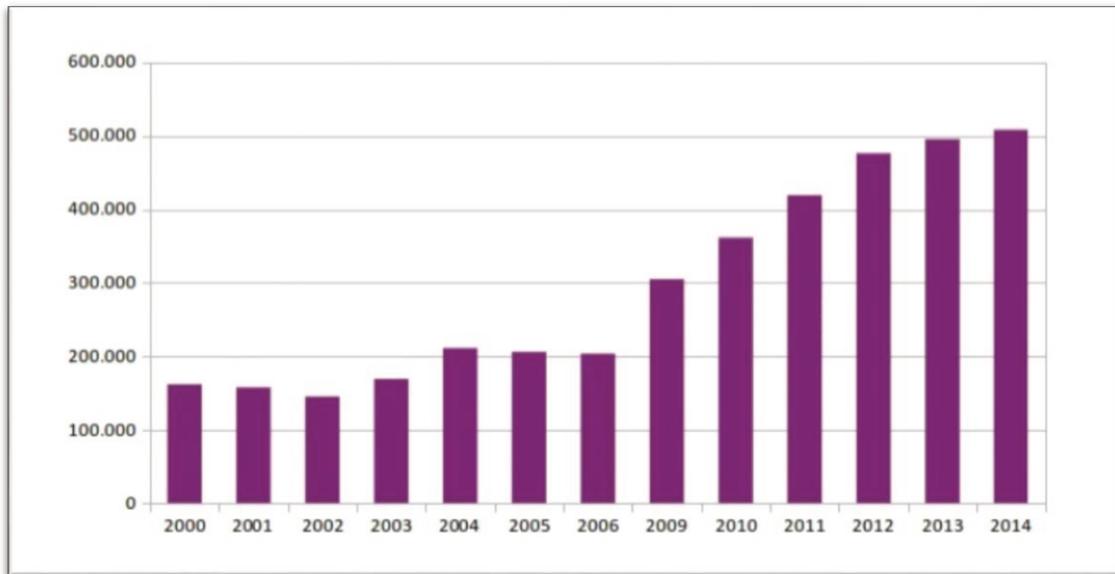
Figura 1 - Venda de agrotóxico por cultura no Brasil (2015)



Fonte: SINDIVEG / Org. Rosangela Vieira – DIEESE (2017)

Na Figura 2 nota-se que o consumo total de agrotóxicos aumentou cerca de 135% em um período de apenas 15 anos.

Figura 2 - Consumo de agrotóxicos no Brasil nos anos de 2000 a 2014
(tonelada de ingrediente ativo)



Fonte: IBAMA, 2016

Muitos dos insumos químicos (fertilizantes, herbicidas, inseticidas e fungicidas) são aplicados diretamente no solo ou pulverizados sobre as plantas podem ter entre os destinos o transporte para áreas fora dos campos de aplicação e até mesmo atingir os corpos d'água (NOLDIN *et al.*, 2012).

Algumas moléculas de agrotóxicos apresentam formulações para uso nos seres humanos no controle de ácaros e piolhos. Essa exposição crônica pode apresentar riscos à saúde humana e em casos mais graves, pode ser fatal se a exposição for aguda (CALDAS, 2011). O maior risco à saúde humana ocorre na exposição dos trabalhadores agrícolas aos pesticidas, sendo este o mais importante risco ocupacional a nível mundial (GUNNEL *et al.*, 2007).

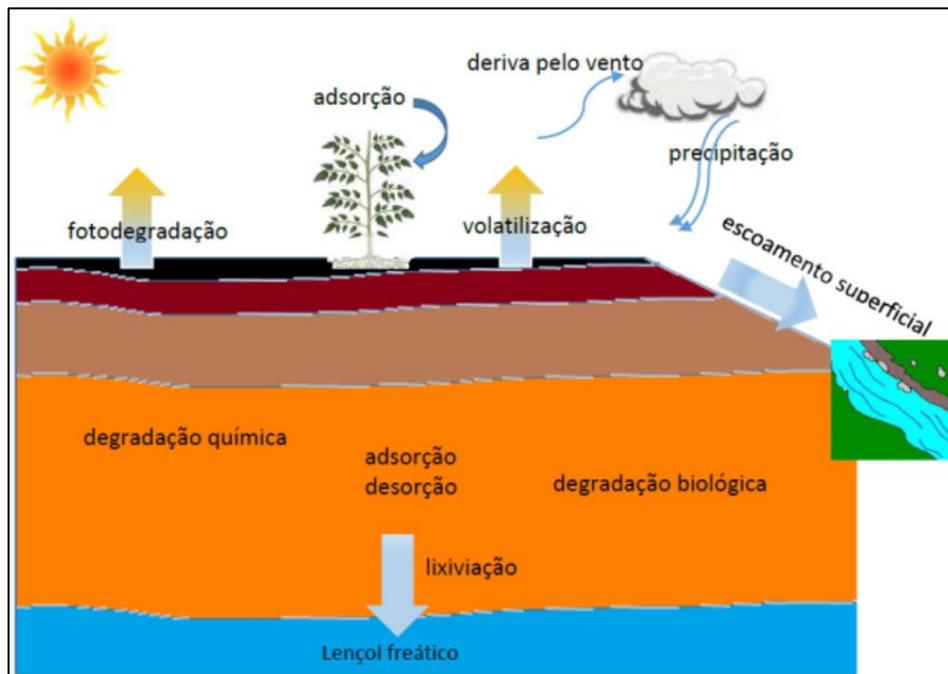
A contaminação do solo e, conseqüentemente da água, por agrotóxicos pode atingir cursos d'água alterando o ciclo de nutrientes que são importantes para a sobrevivência de muitos micro-organismos, provocando desequilíbrio nas comunidades microbianas e conseqüentemente impacto ambiental.

O destino dos agrotóxicos no ambiente depende das suas propriedades físico-químicas e maneiras de aplicação, das características do solo e das condições ambientais (SPADOTTO *et al.*, 2010).

Após a aplicação do agrotóxico, o mesmo pode sofrer três destinos: transformação (física, química e biológica); retenção (sorção/dessorção) e transporte (volatilização, escoamento superficial, lixiviação).

A transformação pode ser química, com degradação do agrotóxico no meio ou biológica do contaminante, mediante a atividade biológica, com papel primordial dos micro-organismos. A retenção pode ser por sorção, em que envolve os processos de adsorção, dessorção e absorção, onde adsorção é a transferência de uma fase líquida ou gasosa para uma fase sólida (ou partículas), sendo a dessorção o processo inverso. A absorção é a retenção de partículas internamente a matrizes biológicas (CHIOU *et al.*, 1983; FAY e SILVA, 2004). O transporte pode ser por lixiviação, consistindo na movimentação da molécula do agrotóxico pelo perfil do solo, podendo levar à contaminação do lençol freático. Também pode ocorrer por escoamento superficial, que consiste na perda do agrotóxico aplicado no local através do fluxo de água na superfície, sendo assim tem potencial de contaminação dos reservatórios, lagos e rios, expondo muitos organismos aos agrotóxicos que muitas vezes podem ser tóxicos, atingindo toda a cadeia ecológica ou por volatilização (FAY e SILVA, 2004; SPADOTTO *et al.*, 2010) (Figura 3).

Figura 3 – Processos que afetam o destino ambiental dos agrotóxicos



Fonte: Adaptado de SPADOTTO *et al.*, (2010).

No Brasil está em tramitação um Projeto de Lei (PL) já aprovado pela câmara dos deputados que prevê sérias mudanças na lei atual, o que poderá levar a maior flexibilidade no

registro de novos agrotóxicos no país. Na Tabela 1 estão expressos algumas das mudanças previstas no PL.

Tabela 1 – Principais mudanças previstas com a proposta da nova Lei dos Agrotóxicos, destacando a lei atual e a proposta de mudança

	Atual	Proposta
Concessão de novos registros	Três órgãos são responsáveis pela análise: Anvisa, Ibama e Ministério da Agricultura.	Centralização do registro dos produtos no Ministério da Agricultura.
Agrotóxicos x Pesticidas	A Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989 tratou os produtos químicos relacionados a agricultura como agrotóxicos.	A nova lei prevê mudança do termo “agrotóxico” para “pesticida”.
Perigo x Risco	Produtos químicos perigosos são avaliados, proibindo substâncias que tenham características teratogênicas, carcinogênicas ou mutagênicas. A avaliação leva em conta o princípio ativo da molécula.	Inclusão de avaliação de risco. Isso significa não considerar só o princípio da molécula, mas também a exposição, sendo negadas as de risco inaceitável para saúde ou ambiente.
Registro Provisório	Não é possível obter registro temporário de um novo produto. A autorização para comercialização só é permitida quando o pedido passa pelos três órgãos reguladores: Anvisa, Ibama e Ministério da Agricultura. O tempo de análise varia, em média, de cinco anos a oito anos.	Concessão de registro provisório caso não haja análise do pedido no prazo de 24 meses. Para isso, o novo produto precisa ter sido autorizado em três países da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE).
Reavaliação de registro	Não há prazo para reavaliação de produtos registrados.	A reanálise dos riscos poderá ser provocada quando organizações internacionais, das quais o país seja membro, alertarem para riscos ou desaconselharem o uso.

Fonte: adaptado de COLUSSI (2018).

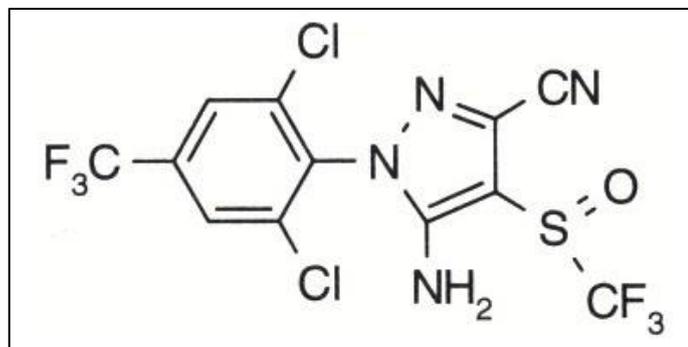
Essas mudanças estão sendo muito discutidas por ativistas ambientais e membros políticos, destacando pontos positivos e negativos. Há necessidade de mudança, pois a atual lei é antiga, mas deve haver um consenso entre saúde humana, saúde animal e a economia relacionada ao uso e comércio dos agrotóxicos.

2.2. Fipronil

O fipronil, 5-amino-1- (2,6-dicloro-R, R, -trifluoropropil) -4- (trifluorometil) sulfonil] pirazole-3-carbonitrilo (Figura 2), é um poderoso inseticida fenilpirazol usado na agricultura para controle de uma gama de pragas de insetos, principalmente em culturas de arroz, trigo, algodão, manga, cana-de-açúcar, milho, cereais, girassol, entre outras (BOBE *et al.*, 1997). Tem sido ainda comercializado para controle de pulgas, carrapatos e piolhos em animais domésticos na forma de loções ou de aerossóis para controle de animais sinantrópicos, como baratas e mosquitos.

Pode-se observar a venda de agrotóxicos no Brasil por agricultura. Dos produtos comercializados, 10% são para cana-de-açúcar, uma das agriculturas que mais se utiliza o pesticida fipronil. A Figura 4 representa a estrutura química complexa do fipronil.

Figura 4 - Estrutura química do fipronil



Fonte: ANVISA (2016).

Sendo utilizado para controle de pragas em agricultura e conhecido em mais de 70 países (AMARAL, 2012; ZHAO e SALGADO, 2010), sua comercialização foi suspensa na França, desde 2004, por causa da mortalidade das abelhas e em outros países da Europa ele também foi proibido pela descoberta do seu alto grau de toxicidade (OLIVEIRA, 2010). O fipronil é um dos inseticidas mais utilizados no Brasil para combater pragas, principalmente em culturas alimentícias. Estudos crônicos com ratos utilizando o fipronil mostraram alterações como: alterações dos hormônios da tireóide, diminuição do ganho de peso, ansiedade e alterações no colesterol, proteínas e cálcio (USEPA, 1996).

O fipronil (Regent ® 800 WG) causa a morte dos insetos mediante o bloqueio dos canais de cloreto mediados pelos aceptores do ácido gama amino butírico (GABA), promovendo paralisia, convulsões e morte (COLE *et al.*, 1993).

No solo o composto pode ser degradado mediante os processos de fotólise, pela radiação ultravioleta, e/ou degradação microbiana originando subprodutos, que muitas vezes são mais tóxicos do que a molécula original (CONNELLY, 2001). O dessulfínil é um dos metabólitos originado a partir da fotólise do fipronil (Regent ® 800 WG) que apresenta maior atividade toxicológica (HAINZL *et al.*, 1996). Por ser um produto fotodegradável, ele deve ser protegido do sol, principalmente em na sua forma comercial.

O fipronil (Regent ® 800 WG) é um composto altamente persistente no solo quando não exposto a luz (EFSA, 2006), possuindo de baixa a moderada solubilidade em água (JACKSON *et al.*, 2009), garantindo ainda mais sua persistência no solo (RÖMBKE *et al.*, 2017).

Como já citado anteriormente o destino dos agrotóxicos depende das características do solo, entre elas da microbiana, responsável pela sua biodegradação

Muitos estudos já demonstraram a toxicidade do fipronil para uma variedade de insetos (CHATON *et al.* 2001; KOLACZINZKI e CURTIS. 2001; TIECHER *et al.* 2003; OVERMYER *et al.* 2005), crustáceos (KEY *et al.* 2003; BEJARANO *et al.* 2005; KONWICK *et al.* 2005), peixes e outros invertebrados (COX, 2005).

Roche e Tidou (2009) realizaram estudos da bioacumulação do pesticida em dois peixes (tilápia e peixe-gato) e um tipo de camarão do lago Taabo na Costa do Marfim, evidenciando biomagnificação do fipronil e outros pesticidas organoclorados na cadeia alimentar, das algas até os peixes. O estudo destaca que a contaminação por agrotóxicos foi simultânea a relatos de doenças infecciosas na população ao redor do lago.

Gupta *et al.* (2009) realizaram estudos da eficácia e da persistência dos inseticidas fipronil, bifentrina e indoxacarbe em frutas de quiabo da Índia. Na análise de eficácia, realizada através de uma quantificação por cromatografia gasosa, todos os inseticidas foram eficazes contra a cigarrinha e a broca-do-fruto. O fipronil foi eficaz no controle das pragas, observando-se sua persistência nas frutas por um período de 3 dias.

Muitos estudos realizados com o fipronil em solo detectaram que ele tem vasta afinidade com elevada concentração de matéria orgânica devido as suas características hidrofóbicas (BOBE *et al.*, 1997; MUKHERJEE, 2006). Bobe *et al.* (1997) observaram que os fatores que alteram a absorção do pesticida no solo são temperatura; a razão de quantidade solo/água, a absorção aumenta quando essa razão diminui, entre outras.

Os pesticidas podem prejudicar os organismos não-alvo no comportamento, na reprodução, no ciclo de vida e indiretamente pode modificar as interações entre indivíduos e populações (RÖMBKE *et al.*, 2017).

De acordo com a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2016), o fipronil pertence à classe dos inseticidas, cupinidas e formicidas, sendo classificado toxicologicamente como classe II, ou seja, altamente tóxico. Sua toxicidade já foi comprovada, sendo proibido em diversos países da Europa. Assim, a ANVISA estabelece os valores de limite máximo para cada tipo de agricultura, assim como a Food and Agriculture Organization (FAO), órgão das Organizações das Nações Unidas (ONU) (Tabela 2).

Tabela 2 - Valores máximos permitidos para fipronil de acordo com o estabelecido pela ANVISA e FAO

Culturas	ANVISA (mg/kg)	FAO (mg/kg)
Algodão	0,01	-
Arroz	0,01	0,01
Batata	0,05	0,02
Cana-de-açúcar	0,03	-
Cevada	0,01	0,002
Feijão	0,01	-
Milho	0,01	0,01
Soja	0,01	-
Trigo	0,01	0,002

Fonte: ANVISA (2016) e FAO (2003).

De acordo com Coutinho *et al.* (2005), o fipronil em condições aeróbias é degradado lentamente.

Estudos relatam a dificuldade da biodegradação de pesticidas no solo. Parâmetros ambientais que aceleram a atividade e o funcionamento microbiano são desejáveis para uma degradação bem-sucedida, esses fatores incluem: textura do solo, pH, aeração, temperatura e atividade catabólica (HUSSAIN *et al.*, 2016).

Sendo o solo o compartimento destino dos pesticidas, sua qualidade tem sido frequentemente e crescentemente afetada, de modo a causar o desequilíbrio nos serviços ecossistêmicos.

2.3. Qualidade do solo: aspectos biológicos e *Enchytraeus crypticus* como bioindicador

Com os impactos decorrentes do uso inadequado do solo e aumento excessivo da aplicação de agrotóxicos, tem levado nos últimos anos a mudanças na concepção do uso e recuperação do mesmo, baseado nos processos de utilização natural e sustentável.

O conceito de qualidade do solo surgiu na década de 70 e durante alguns anos ficou associado à fertilidade (KARLEN *et al.*, 2003), presumindo que a qualidade do solo estava somente ligada a capacidade de produção agrícola. Porém, há alguns anos, percebeu-se que o conceito compreende o equilíbrio entre os parâmetros geológicos, hidrológicos, físicos e biológicos (BRUGGEN e SEMENOV, 2000; SPOSITO e ZABEL, 2003).

A qualidade do solo pode então ser avaliada em seus parâmetros físicos, químicos e biológicos. O indicador biológico é definido como a possibilidade de um organismo estar presente ou ausente, podendo ser uma espécie, planta ou animal, em determinada área. Uma espécie representativa da área é selecionada e as alterações observadas são um indicativo das condições biológicas do ecossistema (TURCO e BLUME, 1999).

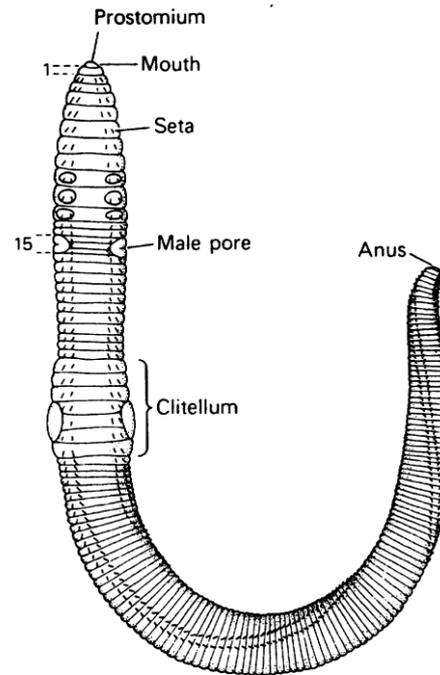
O *Enchytraeus crypticus*, classe Oligochaeta e família Enchytraeidae, são anelídeos majoritariamente terrestre que desempenham papel importante na decomposição da matéria orgânica do solo (DIDDEN, 1993). São organismos da mesofauna do solo, sendo hermafroditas, apresentando poucas cerdas sobre o corpo metamérico (DIDDEN *et al.*, 1997). Geralmente incolores, tem pele lisa e úmida que são usadas para a respiração, alcançam um tamanho de 2 a 40 mm (Figura 5 a e b). Na sua estrutura, parecida as de uma minhoca, possuem um cinturão glandular em forma de anel na cor branca chamado de clitelo (clitellum), sua pele é permeável à água, portanto preferem locais úmidos, sendo assim a maioria vive em camadas superiores do solo, entre 12 e 20 centímetros (JÄNSCH *et al.*, 2005). Considerados organismos tipicamente florestais, mas são encontrados em outras regiões temperadas do mundo, influenciam na estrutura do solo e são de extrema importância na cadeia de alimentos do mesmo (RÖMBKE *et al.*, 2017).

Figura 5 - Aspecto geral de *Enchytraeus crypticus* em cultura (a) e esquema de um anelídeo (b)



(a)

Fonte: Autor, 2018.



(b)

Fonte: NEMAPLEX, 2018.

Os enquitreídeos apresentam uma dieta baseada em 80% de micro-organismos e 20% de matéria orgânica morta, alimentando-se de restos de plantas e de micro-organismos como bactérias e fungos (STANDEN, 1973; DIDDEN, 1993), sendo encontrados em solo úmidos, mas também podendo serem encontrados em água doce e marinha (DIDDEN, 1993).

A maioria dos *E. crypticus* se reproduzem de forma sexuada, por deposição de óvulos e fertilização, porém existem outras formas de reprodução como partenogênese, autofertilização ou fragmentação, onde um indivíduo se divide em várias partes e cada umas dessas se regenera em novo indivíduo completo (JÄNSCH *et al.* 2005).

Enquitreídeos são considerados bons indicadores da qualidade do solo, por atenderem a alguns requisitos importantes, como: serem identificados em diferentes ecossistemas para possibilitar ampla comparação; serem fáceis de cultivar em condições laboratoriais e de campo; exercerem papel de extrema importância no funcionamento do ecossistema habitado; terem ampla disponibilidade do ecossistema e ser de fácil resposta quando utilizados em ensaios de toxicidade (PELOSI *et al.* 2016).

O papel desses organismos no solo para a manutenção dos serviços ecossistêmicos tem sido amplamente estudado na última década (MULDER *et al.* 2011) por serem organismos que ocorrem em todos os solos do mundo com significativa quantidade de oxigênio, umidade e nutrientes (RÖMBKE *et al.* 2017).

Os *E. crypticus* são de extrema importância nas funções do solo, pois mantêm a estrutura do mesmo e sua porosidade, principalmente quando as minhocas não estão em números consideráveis no ambiente (RÖMBKE *et al.* 2017).

Os enquitreídeos tem sido amplamente utilizado em testes de toxicidade do solo. Novais *et al.* (2010) realizaram três testes utilizando *Enchytraeus albidus*, analisando a toxicidade de vários pesticidas para o organismo em solo natural. Os autores avaliaram efeitos sobre a sobrevivência e a reprodução, investigando se a resposta dos organismos a diferentes substâncias tóxicas pode ser agrupada nas respectivas classes químicas. Os pesticidas selecionados foram os herbicidas fenmedipham e atrazina; os fungicidas carbendazim e pentaclorofenol; e os inseticidas dimetoato e lindano. Todos os pesticidas testados causaram efeitos na sobrevivência e reprodução de *E. albidus* e os compostos que apresentaram maior toxicidade foram carbendazim, dimetoato e atrazina. As concentrações do efeito não eram dependentes da classe química. Em geral, a sobrevivência e a reprodução apresentaram padrões de resposta semelhantes.

Römbke (2003) propôs um teste conhecido como Enchytraeid Reproduction Test (ERT) ou Teste de Reprodução de Enchytraeus, teste este validado nacional e internacionalmente e atualmente padronizado pelas Normas ISO (2002) e OECD (2003). Nos testes utilizou-se *Enchytraeus albidus* com o objetivo de avaliar a importância que esses organismos representam na ecotoxicologia terrestre. No total, participaram vinte e nove laboratórios governamentais, acadêmicos e do setor privado de quinze países. Vinte e cinco produtos químicos foram testados no ERT, incluindo fungicidas, metais e outros, nos anos de 1997 a 2002 por vários autores diferentes. Quase todos os resultados dos testes revelaram valores de EC₁₀ menores que o respectivo valor NOEC (no observed effect concentration), ou seja, concentração de efeito não observado. Além disso, os dados provaram que, em geral, os enquitreídeos são menos sensíveis do que as minhocas ou colêmbolos e indicaram que eles são úteis como organismos de teste ecotoxicológico, bem como para a avaliação da qualidade do solo.

Leitão *et al.* (2014) realizaram ensaio ecotoxicológico com três pesticidas, azoxistrobina, clorotalonil e etopropas utilizando três espécies não-alvo: *Folsomia candida*, *Eisenia andrei* e *E. crypticus*, em solo natural. O fungicida azoxistrobina apresentou maior

toxicidade para as minhocas ($EC_{50} = 42,0$ mg/Kg de solo), os colêmbolos apresentaram as taxas mais sensíveis em termos de efeitos subletal de clorotalonil com EC_{50} de 31,1 mg/Kg de solo, seguido pelas minhocas com CE_{50} de 40,9 mg/Kg de solo. Os enquitreídeos foram os menos sensíveis das três espécies testadas para efeitos a longo prazo, com valor EC_{50} de 68, mg/Kg de solo. Eles foram afetados pelos três produtos químicos em comparações, com os valores de EC_{50} de 2,46 e $2,83 \times 10^{-4}$ mg/Kg de solo para azoxistrobina e etoprofos, respectivamente, que é aproximadamente metade do clorotalonil ($4,25 \times 10^{-4}$ mg/Kg de solo).

Os testes multigeracionais tem sido realizado para verificar a influência dos fatores abióticos na reprodução e densidade populacional dos organismos bioindicadores. Menezes-Oliveira *et al.* (2013) realizaram estudo sobre a interação da densidade de organismos e exposição ao cobre (Cu), avaliando duas gerações utilizando *E. crypticus*. Essa interação mostrou que a densidade teve impacto na população e no crescimento individual, mas a interação entre densidade e a toxicidade do Cu não foi significativa. Porém, os resultados mostraram que a interação entre densidade e Cu foi significativa na reprodução na segunda geração, mostrando menor toxicidade para maior densidade de organismo, enquanto na primeira geração ocorreu o oposto. Houve interação também ao longo da primeira geração para a segunda geração, ou seja, animais com densidade 50 na primeira geração quando expostos a densidade 50 na segunda geração apresentaram menor toxicidade de Cu em comparação ao período de exposição posterior a densidade 10, mostrando que toxicidade ao longo das gerações podem ser diferentes dependendo da densidade.

Estudo multigeracional foi realizado por Lock e Janssen (2002) avaliando a exposição ao zinco, cádmio, cobre e chumbo para duas gerações subsequentes para *Enchytraeus albidus*. Os metais foram adicionados juntos ao solo, no momento do ajuste da umidade. Realizou-se a quantificação dos metais no início e no final do teste, mediante espectrometria de absorção atômica de chama. Após três semanas de exposição, os adultos foram removidos e os organismos sobreviventes foram fixados com etanol, corados com rosa de Bengala e quantificados. Decorridos três semanas de exposição, os juvenis foram quantificados. Após o teste de reprodução de 42 dias (geração inicial), a primeira geração foi transferida para o solo e exposta a mesma concentração de metal da geração inicial. Quando a primeira geração chegou à maturidade, ou seja, depois de aproximadamente três meses, esses organismos foram usados para dar continuidade aos testes. Desta forma, os organismos foram expostos à mesma concentração de metal por mais de uma geração. A EC_{50} de 42 dias de geração inicial e da primeira geração de *Enchytraeus albidus* foi de 130 e 58 mg / kg de peso seco, respectivamente. Estes resultados indicaram que o cádmio tem maior efeito sobre a reprodução de *E. albidus*, o

que seria esperado no teste de reprodução de 42 dias. Consequentemente, os dados obtidos com esta espécie e o procedimento de teste crônico podem ser considerados como ecologicamente relevantes para exercícios de risco ambiental e derivação padrão de qualidade do solo. Considerando a variabilidade dos dados de toxicidade do metal relatados na literatura, concluiu-se que o ensaio de duas gerações não aumentou acentuadamente a sensibilidade do teste padrão de *E. albidus* para os metais testados.

Barmentlo *et al.* (2017) realizaram estudo com o objetivo de avaliar os efeitos do aumento da temperatura e da diminuição da umidade do solo na toxicidade de múltiplas gerações dos *E. crypticus* em solo contaminado por resíduos de metais. Os organismos foram expostos a várias concentrações de metais em mg/kg: 640 (As), 21 (Cd), 9 (Co), 180 (Cu), 3000 (Mn), 16 (Ni), 6100 (Pb) e 8100 (Zn); temperatura do ar de 20 e 25°C; e teor de umidade do solo (50 e 30% da capacidade de retenção de água do solo) sobre três gerações. Os resultados obtidos no teste de toxicidade indicaram que o aumento da temperatura e do teor de umidade, influencia no tempo de geração dos organismos, ou seja, quanto maior a temperatura e umidade, menor é o tempo de geração.

Em meados de 2004 o fipronil (Regent ® 800 WG) foi proibido na França e em vários países da Europa, acusado de provocar a mortalidade das abelhas, inseto primordial para polinização, e por acelerar a perda da biodiversidade local, porém, no Brasil o contaminante é utilizado de forma descontrolada podendo atingir organismos não-alvo.

Diante da importância desses agrotóxicos e de sua vasta utilização no Brasil, é necessário verificar o impacto do fipronil (Regent ® 800 WG) no solo. O teste multigeracional, proposto nesse trabalho, irá avaliar o efeito do fipronil (Regent ® 800 WG) na reprodução e nas gerações dos enquitreídeos, garantindo que o contaminante ficará exposto no ciclo de vida completo do *E. crypticus*.

2.4. Biodegradação do fipronil em solo

Avaliar o comportamento ambiental de um agrotóxico é de suma importância, pois pode-se prever assim como minimizar as contaminações dos recursos naturais (IBAMA, 2010). A avaliação da degradabilidade de um agrotóxico tem como função, verificar o grau de persistência do mesmo no solo. Seu destino está diretamente relacionado às características físico-químicas da molécula, assim como de fatores como umidade, temperatura e tipo de solo, microbiota e condições ambientais (WANG *et al.*, 2010).

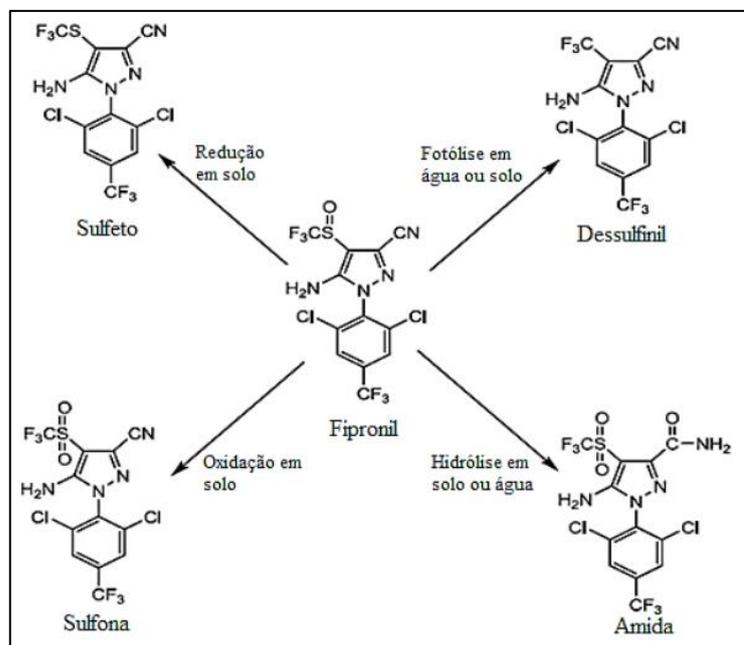
O fipronil se degrada lentamente mediante oxidação, hidrólise (meio alcalino) ou redução. Em solo argilo-arenoso o fipronil possui meia vida de 122-128 dias e de 3-7 meses em

outros tipos de solo (USEPA, 1996; BOBE *et al.*, 1998; TINGLE *et al.*, 2003). O composto sofre fotodegradação quando exposto a luz e sua meia vida em solo argiloso é de 34 dias (NPIC, 2018).

O fipronil possui alta degradabilidade no solo, principalmente por fotodegradação, entretanto, esta via de degradação pode gerar subprodutos mais tóxicos do que a própria molécula original (CONNELLY, 2001).

A Figura 6 expressa as rotas de degradação do fipronil no solo e na água.

Figura 6 – Rotas de degradação do fipronil no ambiente.



Fonte: Adaptado de Bodé *et al.*, (1998).

Estudos foram realizados avaliando a biodegradação do fipronil no solo. Scorza Junior e Franco (2013) avaliaram a influência da temperatura e umidade na degradação do fipronil em solo do Mato Grosso e concluíram que, para Latossolo Vermelho Distroférico típico (LVdf), a meia vida do composto foi de 19-47 dias e que o aumento da temperatura e da umidade aceleram a degradação do mesmo, avaliando-o como agrotóxico de baixa e média persistência.

Masutti e Mermut (2007) estudaram a biodegradação do fipronil em solos de canaviais em Pernambuco no Nordeste do Brasil. As comunidades microbianas presentes no solo degradam o composto, porém, a biodegradação parece depender da biodisponibilidade do fipronil e da meia-vida. A degradação do fipronil variou de 83 dias a 200 dias. Essa taxa inicial

mais lenta seguida de uma taxa mais rápida após 90 dias de incubação pode levar a uma meia vida mais curta.

A degradação microbiana do fipronil foi avaliada por Mandal *et al.* (2013). Os autores isolaram *Bacillus firmus* de amostras de solo coletadas de campos de cultivo de cana de açúcar com histórico conhecido de uso de pesticidas e avaliaram a metabolização do fipronil em solo franco-argiloso. O *B. firmus* foi capaz de biodegradar o fipronil, porém, apenas no solo em que haviam concentrações mais altas do mesmo. Sendo assim, a biodegradação foi dependente da concentração. No processo de biodegradação observou-se a geração dos metabólitos: sulfureto de fipronil, (principal metabólito encontrado), seguido de fipronil sulfona e fipronil amida.

Zhu *et al.* (2004) avaliaram a biodegradação microbiana para determinar a taxa de degradação do fipronil e seus metabólitos, comparando dois solos, argiloso estéril e não estéril. No solo argiloso não estéril a meia vida do composto foi de 9,75 e 8,78 a 25 e 35°C respectivamente, e no solo estéril de 33,51 e 32,07 dias a 25 e 35°C. Essa degradação resultou no metabólito sulfeto (MB45950) pela redução do dessulfínil.

O processo de biodegradação de um agrotóxico no solo pode ser avaliado mediante a técnica de respirometria, no qual pode-se quantificar o consumo de oxigênio (O₂) ou a geração de gás carbônico (CO₂). O ensaio respirométrico tem como principal objetivo determinar o tempo de estabilização de xenobióticos inserido no solo e identificar a toxicidade ou não do composto ao micro-organismo, mediante a taxa de respiração de micro-organismos presentes no solo (NUVOLARI, 1996).

Estima-se que 99% das espécies de bactérias que estão presentes no solo são viáveis mas não cultiváveis, ou seja, não pode ser extraído, isolado e cultivado em laboratórios (GEERDINK *et al.*, 2002). Sendo assim, a melhor forma de realizar a respirometria é utilizando solo natural.

A lenta biodegradação do fipronil em solo pelo método de respirometria de Bartha e Pramer foi avaliada por Ferreira *et al.* (2016), também reafirmando a alta toxicidade do inseticida.

O respirômetro desenvolvidos por Bartha e Pramer (1965) pode ser utilizado tanto para avaliar a tratabilidade de resíduos, quanto para inferir a atividade microbiana, frente a um composto orgânico de origem antropogênica.

O método de respirométrico (OEDC, 2002) pode estimar a taxa de aplicação ótima de um determinado composto e também o tempo de adequação do mesmo. Essas descobertas

são importantes para desenvolver melhorias nas técnicas de manejo do solo (FIÚZA e VILA 2004; MONTAGNOLLI *et al.* 2009; WU *et al.* 2004).

Ensaio de toxicidade e biodegradação estão interligados, pois a biodegradação avalia se o composto degradado teve sua toxicidade reduzida, aumentada ou inalterada (mesma (CRUZ *et al.* 2014; GYURICZA *et al.* 2010; HUBÁLEK *et al.* 2007; SOBRERO e RONCO, 2004).

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

A proposta desse trabalho é avaliar o comportamento do inseticida fipronil na sua formulação comercial Regent ® 800 WG em solo natural.

3.2. Objetivo específico

- Avaliar a toxicidade do inseticida fipronil, na sua formulação comercial Regent ® 800 WG em solo natural utilizando o bioindicador *Enchytraeus crypticus* mediante ensaio toxicológico multigeracional analisando 2 gerações;
- Avaliar o comportamento de fuga (Avoidance) de *Enchytraeus crypticus* em solo contaminado com fipronil (Regent ® 800 WG);
- Avaliar a atividade microbiana do solo contaminado com fipronil, mediante a técnica de respirometria de Bartha e Pramer.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Organismo teste

O organismo-teste *Enchytraeus crypticus* (classe Oligochaeta, família Enchytraeidae) foi utilizado para avaliar a toxicidade do fipronil (Regent ® 800 WG) no solo. Os organismos estão em cultivo no Laboratório de Ecotoxicologia de Solos (LAECOS) da Faculdade de Tecnologia - Unicamp.

4.1.2. Cultivo de *E. crypticus*

Os organismos são cultivados em ágar nutritivo, seguindo a norma ABNT – NBR 16387 (2012), constituído de 13,9 gramas de ágar bacteriológico; 6 ml de solução 0,1M de NaHCO₃; 6,4 ml de solução 0,001M de KCl e 772 ml de água ultrapura (para 800 ml de meio).

O frasco de Erlenmeyer é aquecido em chapa aquecedora a temperatura de 250°C até que se torne translúcida. Após a completa dissolução do ágar, o meio é autoclavado a 120°C por 20 minutos. Após o resfriamento até 60°C adicionam-se 8 ml de solução CaCl₂.2H₂O e 8 ml de MgSO₄. Após o preparo, o meio é vertido em placas de Petri para solidificação. As placas são embaladas em papel alumínio e armazenadas sob refrigeração a 4°C, até o recebimento das culturas do organismo.

O cultivo dos *E. crypticus* é realizado em estufa de 20 ± 2°C com fotoperíodo de 16h/8h (claro/escuro). Os organismos são alimentados duas vezes por semana com farinha de aveia e a umidade do meio é corrigida com água destilada.

A cada três meses os organismos são transferidos para novos meios de cultivos, renovando a cultura e garantindo a sobrevivência da espécie.

Para o processo de padronização dos testes e avaliação da saúde dos organismos, são realizados teste de sensibilidade com os mesmos utilizando ácido bórico como substância de referência. O ácido bórico apresenta características ideais de substância de referência, sendo considerado um produto quimicamente estável durante o teste (AMORIM *et al*, 2012). Segundo Zagatto e Bertoletti (2006), as substâncias de referências são utilizadas em ensaios toxicológicos para garantir a qualidade do estudo e avaliar se há alterações na sensibilidade dos organismos. Essas substâncias devem ter alto grau de pureza, ser solúvel em água e ter toxicidade não específica para diferentes grupos de organismos.

O teste de sensibilidade tem por finalidade avaliar as condições dos organismos cultivados, a estabilidade da cultura, sendo importante para fazer comparações com dados de literatura.

4.1.3. Amostras de Solo

Utilizou-se o Solo Artificial Natural (SAT), uma adaptação do solo artificial OECD (ABNT – NBR 16387 (2012), preparado em laboratório constituído por 72,5% de areia, 22,5% de caulim e 5% de fibra de coco.

Realizou-se teste de toxicidade com o solo SAT como controle para fins de comparação com o solo natural, descartando desta forma, qualquer influência das características físico químicas do mesmo.

A utilização de solo SAT como substrato para adição de substâncias tóxicas é um procedimento padrão utilizado em testes de toxicidade com organismos edáficos, com o objetivo de eliminar qualquer interferente externo (BIANCHI, 2013).

Utilizou-se ainda solo natural tropical nos testes de toxicidade, coletado no campus da Universidade de São Paulo (USP), localizado no município de Itirapina/Broa, SP. A escolha deste solo foi baseada na localização do mesmo, por ser uma área sem grande circulação de pessoas, preservada e por ser um solo com características físicas e químicas conhecidas.

Tabela 3 – Características físico-químicas do solo natural tropical (Broa)

Parâmetros	Solo Natural Tropical (Broa)
pH (H₂O)	5,52
pH (KCl)	5,94
Matéria Orgânica (%)	11,06
Capacidade de Retenção Hidrica (%)	69,8
Capacidade de troca catiônica (meq/100g)	3,52
Granulometria (%)	
Argila	35
Silte	21
Areia	-
Areia fina	22
Areia média	20
Areia grossa	2

4.1.4. Fipronil (Regent ® 800 WG)

O fipronil utilizado neste estudo é a molécula em sua formulação comercial Regent ® 800 WG, da BASF, registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA sob nº 005794, que apresenta em sua composição 80% de fipronil e 20% de ingredientes inertes, empregado no controle de pragas agrícolas.

O produto foi adquirido comercialmente com peso líquido de um quilograma, sob LOTE: 021-16-05760. Data de fabricação: abril de 2016. Validade: abril de 2020.

4.1.5. Equipamentos e vidrarias

Foram utilizados equipamentos e vidrarias usuais de laboratório de Microbiologia, do Laboratório de Ecotoxicologia do Solo e Laboratório de Análises Físico-químicas.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Teste de sensibilidade

Para o teste de sensibilidade utilizou-se o solo SAT, que foi contaminado com as seguintes concentrações do ácido bórico: 25,0; 50,0; 100,0; 200,0; e 400,0 mg/kg. Contaminou-se aproximadamente 150 gramas de solo para cada concentração utilizada, visando quantidade suficiente para 30 g de solo em cada réplica (4 réplicas para cada concentração), para os controles (4 réplicas) e uma quantidade de solo para análise do pH no início e no fim do teste.

Em cada réplica adicionou-se 10 *E. crypticus* clitelados, que ficaram expostos ao contaminante durante 21 dias, a temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, alimentados uma vez por semana com farinha de aveia e fotoperíodo de 16h:8h (luz/escuro). A umidade foi verificada semanalmente, e corrigida quando necessário. Decorridos os 21 dias, adicionou-se álcool etílico comercial e o corante rosa de bengala ao solo com os organismos, após 12 ou 24 horas depois iniciou-se a contagem dos mesmos. O teste foi realizado de acordo com a NBR-ISO 16387/2012 com algumas adaptações.

4.2.2. Contaminação do solo

O solo foi contaminado com 5 concentrações do inseticida fipronil (Regent ® 800 WG), sendo estas definidas de acordo com a concentração recomendada pelo fabricante para o uso na agricultura. Definiu-se duas concentrações abaixo e duas concentrações acima da recomendada, sendo elas: 1,3 mg/kg (dose recomendada), 0,65 mg/kg (metade da dose recomendada), 0,32 mg/kg (um quarto da dose recomendada), 2,6 mg/kg (o dobro da dose recomendada) e 5,2 mg/kg (quatro vezes a dose recomendada).

A contaminação foi realizada apenas no começo do teste (Figura 7) em quantidade de solo suficiente para avaliar as demais gerações, garantindo assim a estabilidade durante todo o teste multigeracional.

Contaminou-se aproximadamente 630 gramas de solo, visando quantidade suficiente para 30 g de solo em cada réplica (4 réplicas de cada concentração testada), para os controles (4 réplicas), além de uma quantidade de solo para a quantificação de bactérias heterotróficas e fungos e a quantificação do fipronil (Regent ® 800 WG).

4.2.3. Teste de toxicidade Multigeracional

Realizou-se o teste multigeracional que consistiu em expor 10 organismos adultos clitelados durante 21 dias ao fipronil (Regent ® 800 WG) de acordo com a norma ABNT – NBR 16387 (2012) em duas gerações de *Enchytraeus crypticus*. Assim, decorridos os 21 dias do primeiro teste, foram separados dos 10 organismos juvenis sobreviventes de cada concentração e réplica e transferidos para novo teste (Figura 7), nas mesmas concentrações de fipronil (Regent ® 800 WG) e condições do teste e assim sucessivamente, por 2 gerações.

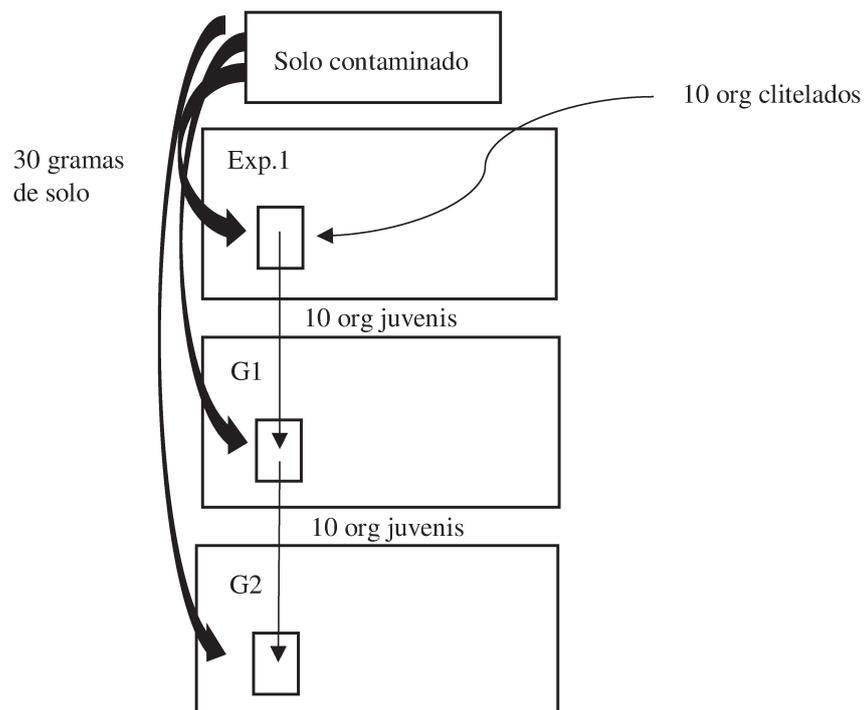
Após 21 dias do início do 1º teste, os organismos foram retirados em duas etapas (G1 e G2), uma para recuperação dos dez organismos juvenis, que deram continuidade ao experimento e a outra para a quantificação do número total de organismos sobreviventes. O primeiro passo foi transferir uma porção de solo para um recipiente com água destilada e usando microscópio estereoscópio, coletou-se 10 organismos juvenis com aproximadamente o mesmo tamanho e transferiu-se para a próxima etapa do teste (1ª geração). No segundo passo, o restante do solo foi colocado em outro recipiente com água de torneira e fixado com álcool etílico comercial. O mesmo foi corado com rosa de Bengala para quantificação após pelo menos 12 horas, de acordo com a metodologia usual para a contagem dos organismos (ABNT, 2012).

Os 10 juvenis resultantes do primeiro teste, separados com aproximadamente o mesmo tamanho, foram utilizados para fazer o teste da primeira geração nas mesmas condições do primeiro teste, e avaliados após 6 semanas, pois segundo estudos, a primeira semana são colocados ovos pelos organismos; a terceira semana ocorre a incubação de ovos/juvenis; e a quinta semana são formados os juvenis sexualmente maduros. Assim, o período de 6 semanas foi selecionado realização do teste da primeira geração de acordo com Menezes-Oliveira *et al.* (2013). Ao final do período do 2º teste, realizou-se o mesmo procedimento para o teste da segunda geração.

Durante os testes de toxicidade os organismos foram alimentados uma vez por semana com farinha de aveia, mantidos a temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16h:8h

(luz/escuro), verificando-se a umidade semanalmente, e corrigida quando necessário. O solo contaminado inicialmente foi mantido nas mesmas condições de temperatura e luz que os testes geracionais.

Figura 7 – Fluxograma da contaminação do solo e introdução dos organismos clitelados em cada geração



4.2.4. Quantificação de fungos e bactérias heterotróficas

Para a quantificação de fungos e bactérias heterotróficas realizou-se o plaqueamento *Pour Plate*, baseada na norma CETESB (2006), no início do teste multigeracional e no fim do mesmo teste.

No começo do teste, pesou-se 10 gramas do mesmo solo utilizado no teste multigeracional e 10 gramas da areia utilizada para fazer o SAT.

Ao final do teste multigeracional (2 gerações), armazenou-se quantidade do solo natural tropical da menor concentração (0,32 mg/kg) e da maior concentração (5,2 mg/kg), assim como quantidade de solo SAT, suficientes para a quantificação de bactérias heterotróficas e fungos, semelhante ao realizado no início, para fins de comparação entre o início e o final do teste de toxicidade multigeracional.

Para a quantificação utilizou-se a metodologia de diluição em série e o plaqueamento em triplicata em meio Sabouraud para fungos e Plate Counter Ágar (PCA) para bactérias heterotróficas, ambos avaliados em Unidades Formadoras de Colônia por grama de solo (UFC/g), em duplicata.

4.2.5. Quantificação de CO₂ por Respirimetria de Bartha

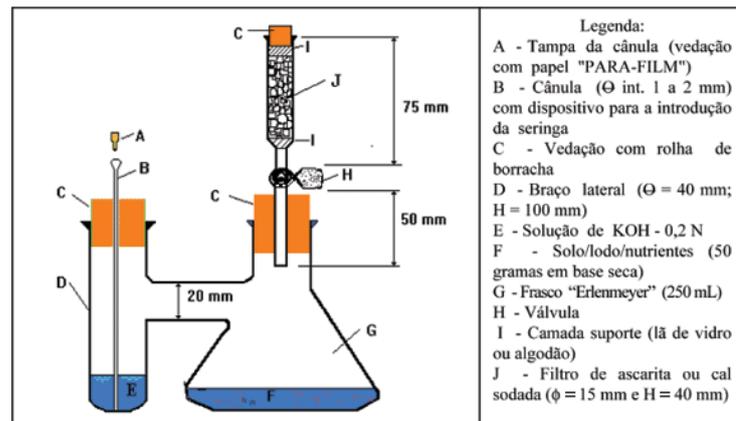
Baseado na OECD 307 (2002) realizou-se a quantificação da geração de CO₂ pelo método de respirometria de Bartha e Pramer com duração de 28 dias. Primeiramente determinou-se a umidade do solo, pesando-se uma placa de Petri, e adicionando-se 10 gramas do solo a mesma. Pesou a placa com o solo, deixando-a aberta e sob luz durante o período de 1 hora. Decorrido o período, pesou-a a mesma novamente, e verificou-se que o solo apresentava 6% de umidade.

Como o solo utilizado já é padronizado, e sabendo-se que sua capacidade de retenção de água é de 69,8%, e de acordo com a norma OECD (2002), o solo a ser colocado nos respirômetros devem estar com teor de água de 40 a 60% da capacidade máxima de retenção de água, determinou-se a umidade do solo para avaliar a atividade microbiana mediante a técnica de respirometria.

O solo (50 g em base seca) foi contaminado com fipronil (Regent ® 800 WG) nas mesmas concentrações realizados no teste de toxicidade multigeracional. Porém, utilizou-se apenas a menor, a maior e a concentração recomendada (0,32; 5,2 e 1,3 mg/kg, respectivamente) e o teste controle, ou seja, solo sem adição de fipronil (Regent ® 800 WG), todos em triplicata. Os respirômetros de Bartha e Pramer foram incubados em BOD à 28 ± 2°C durante o período de 28 dias.

O CO₂ gerado mediante o método de respirometria de Bartha e Pramer (1965) foi capturado na solução de hidróxido de potássio Solução (0,2 N KOH) localizada na parte lateral do respirômetro de Bartha e Pramer (Figura 8). O KOH residual foi transferido para tubos Falcon e a vidraria lavada com 20 ml de H₂O isento de CO₂ e vertida junto com o KOH, após a transferência, realizou-se a leitura por condutividade, quantificando-se a de produção de CO₂ em função do tempo. Após a leitura, adicionou-se novamente 10 ml de KOH para capturar o CO₂ para a próxima leitura e realizou-se a aeração no respirômetro, garantindo desta forma oxigênio para o metabolismo dos micro-organismos do solo (RÉGO *et al.*, 2014). A leitura por condutividade foi realizada de acordo com Rodella e Saboya (1999).

Figura 8 - Esquema de um Respirometro de Bartha e Pramer



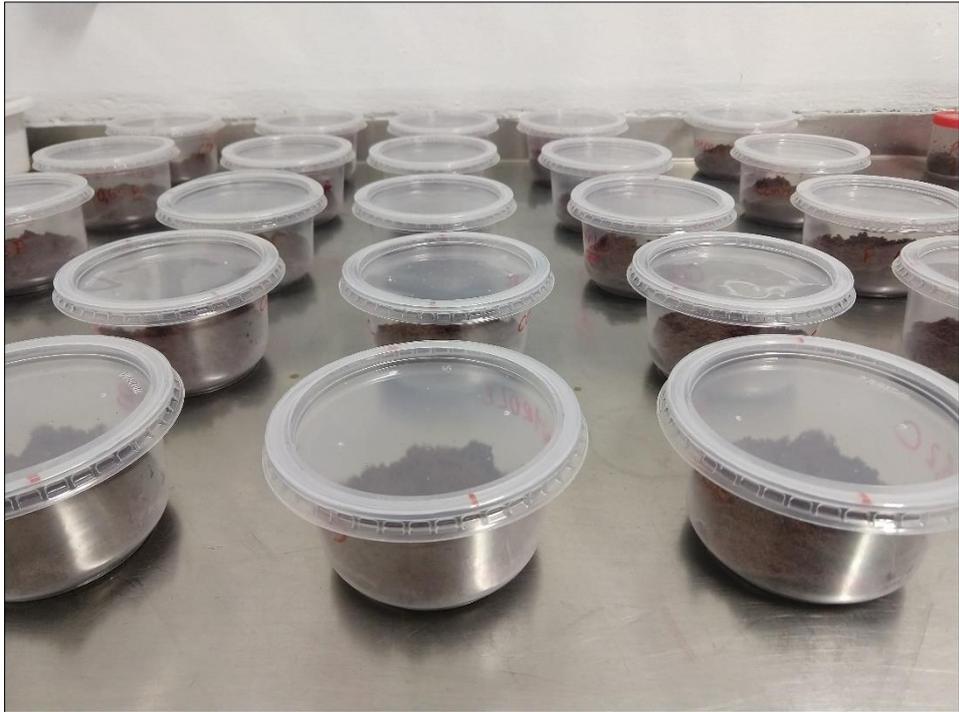
Fonte: ABNT (1999).

4.2.6. Teste Avoidance (teste de fuga)

O teste de fuga (avoidance) é utilizado com o objetivo de verificar se o organismo teste evita determinado local quando exposto a uma condição de estresse. Esse ensaio pode ser empregado em avaliação preliminar em testes de toxicidade, avaliando o deslocamento do organismo teste de um solo controle para um solo contaminado (NOVAIS *et al.*, 2009). O solo foi contaminado nas mesmas condições e concentrações das utilizados no teste multigeracional e de acordo com a norma ABNT – NBR 16387 (2012). Realizou-se o teste de fuga em recipientes de plástico de aproximadamente 10 centímetros de diâmetro, em 5 réplicas para cada tratamento (figura 9).

Com uma lâmina de vidro reparou-se o recipiente ao meio e colocou-se 50 gramas de solo, sendo 25 gramas solo controle e 25 gramas de solo contaminado com o fipronil (Regent ® 800 WG) nas concentrações já citadas. De um lado da lâmina adicionou-se 25 g de solo controle e do outro lado 25 g do solo contaminado, respeitando as concentrações. Em seguida a lâmina foi removida com cuidado e adicionado 10 enquitreídeos clitelados na linha de contato entre os dois solos. Como controle, preparou-se 5 réplicas em recipiente apenas com solo sem adição do contaminante, denominado de “controle duplo”, ou seja, ambos os lados foram adicionados apenas o solo controle. Os recipientes foram fechados com dois pequenos orifícios na tampa e mantidos durante o período de 48 horas a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16h/8h (claro/escuro). Decorrido o período da exposição, adicionou-se novamente a lâmina no centro do recipiente, separando os dois solos em recipientes diferentes. Após acrescentou-se ao solo álcool etílico comercial e gotas do corante rosa de bengala, após 24 horas realizou-se a quantificação dos organismos para a verificação da sua localização.

Figura 9 - Teste de fuga (avoidance) realizado em laboratório com duração de 48 horas e fotoperíodo de 16h/8h (luz/escuro)



4.2.7. Análise dos resultados

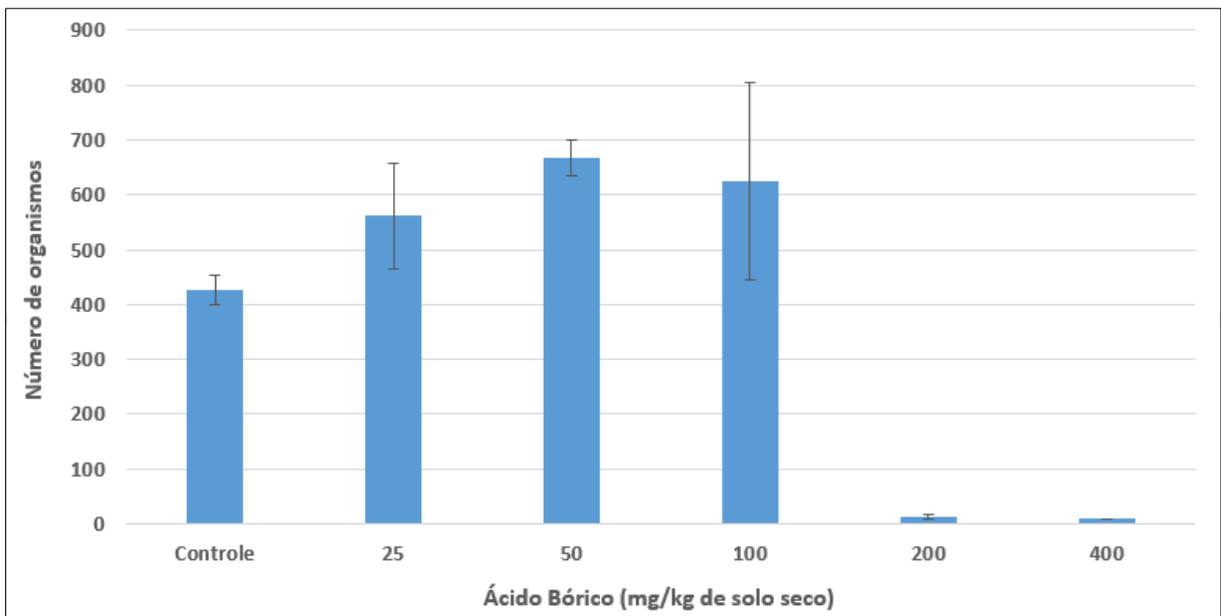
As análises de variância (ANOVA) foram realizadas no programa STATISTICA 7 através do teste de Levene's ($p < 0,05$). Para análise de Concentração de Efeito (CE_{50}) utilizou-se regressões lineares também realizados no programa STATISTICA 7.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Resultado do teste de sensibilidade

Realizou-se teste de sensibilidade com *E. crypticus* cultivados no Laecos da Faculdade de Tecnologia (FT) da Unicamp e utilizados no teste multigeracional. O teste de sensibilidade tem por finalidade avaliar as condições dos organismos, a estabilidade da cultura e fazer comparações com dados de literatura. A Figura 10 expressa a reprodução dos organismos em relação as diferentes concentrações do ácido bórico.

Figura 10 – Reprodução de *E. crypticus* após exposição as concentrações do ácido bórico, durante 21 dias à temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16h/8h (luz/escuro)



Os resultados obtidos no teste de toxicidade para avaliar a sensibilidade identificaram EC_{50} de 173 mg/kg, ou seja, a concentração em que ocorreu efeito em 50% dos organismos. Também foi possível determinar a menor concentração de efeito observada (LOEC) em 200 mg/kg e o também a concentração sem efeito observado (NOEC) em 100 mg/kg.

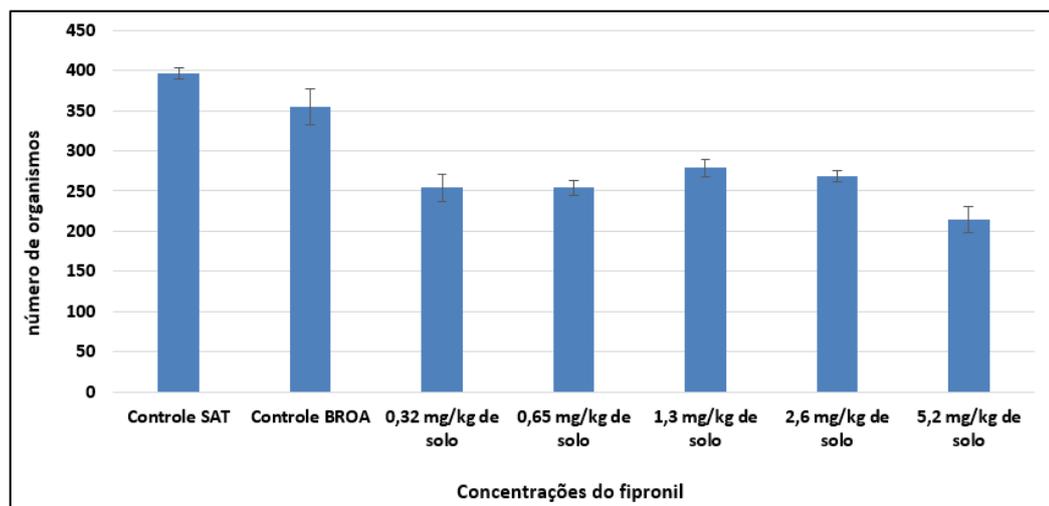
Esses dados evidenciam que os organismos estavam aptos a serem utilizados nos testes de toxicidade, sendo verificado EC_{50} semelhantes se comparado com as concentrações de ácido bórico utilizados. Becker *et al.* (2010) encontraram EC_{50} de 220 mg/kg de solo seco utilizando concentrações de 1,0; 10,0; 31,6; 100,0; 133,0; 178,0; 237,0; 316,0; 422,0; 562,0; 750,0 e 1000,0 mg/kg de solo seco. Niemeyer *et al.* (2018) encontraram EC_{50} de 165 mg/kg de

solo seco utilizando concentrações de 25,0; 50,0; 100,0; 200,0 e 400,0 mg/kg, as mesmas concentrações utilizadas nesse ensaio de sensibilidade, evidenciando que os organismos estão em condições de serem testados, pois os EC₅₀ estão em valores aproximados.

5.2. Resultado do teste de toxicidade Multigeracional

Avaliou-se a exposição de *E. crypticus* ao pesticida fipronil (Regent ® 800 WG) durante o período de 21 dias a temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 2 gerações. As Figuras 11, 12 e 13 expressam o número de organismos após sua exposição ao fipronil (Regent ® 800 WG) ao final do primeiro teste de toxicidade e ao final de cada geração avaliada (G1 e G2).

Figura 11 – Resultados da quantificação do número de organismos expostos ao fipronil (Regent ® 800 WG) durante 21 dias, a temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16h/8h (teste 1)

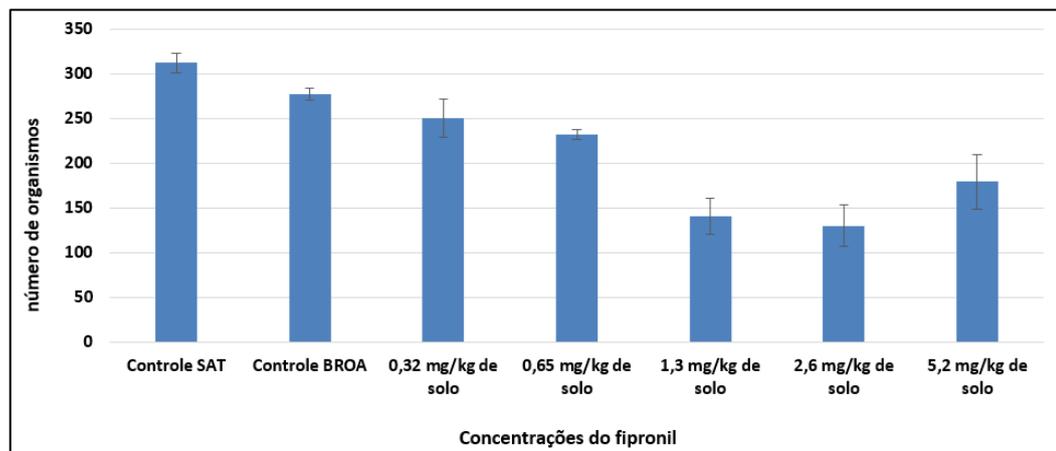


Os resultados obtidos neste primeiro ensaio demonstraram que os *Enchytraeus crypticus* não foram sensíveis quando exposto ao inseticida fipronil (Regent ® 800 WG) nas concentrações testadas, visto que não houve diferença significativa, ou seja, a variância é homogênea (Levene's $p > 0,05$) na reprodução dos organismos entre a concentração mais alta (5,2 mg/kg) e a mais baixa (0,32 mg/kg) da concentração do fipronil (Regent ® 800 WG) testadas.

Diante dos resultados obtidos na quantificação dos organismos decorridos os 21 dias de exposição, não foi possível determinar EC₅₀ e EC₂₀ na análise estatística utilizando o programa STATISTICA 7, sendo possível determinar a Menor Concentração de Efeito Observado (LOEC) de 0,32 mg/ Kg. Os resultados indicaram ainda que o solo não foi um

interferente na reprodução dos organismos, pois não houve diferença significativa na reprodução dos organismos nos dois tipos de solo utilizados como controle: o SAT e o solo natural tropical (Broa).

Figura 12 - Resultados da quantificação do número de organismos da primeira geração (G1) expostos ao fipronil (Regent ® 800 WG) durante 63 dias, a temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16h/8h



Os resultados obtidos com organismos da primeira geração demonstraram que os enquitreídeos *Enchytraeus crypticus* não foram sensíveis quando expostos ao inseticida fipronil (Regent ® 800 WG) nas concentrações testadas, assim como observado no primeiro teste, visto que não houve diferença na reprodução dos organismos entre as concentrações testadas, ou seja, a variância entre as concentrações testadas é homogênea (Levene's $p > 0,05$).

Notou-se que houve comportamento típico de uma curva dose-resposta, onde quanto mais elevada a concentração do fipronil (Regent ® 800 WG), menor a reprodução dos organismos. Observou-se esse comportamento até a concentração de 2,6 mg/kg de solo seco, e na concentração de 5,2 mg/kg ocorreu aumento significativo da reprodução dos organismos. Entretanto, houve diferença na reprodução, quando comparada à exposição dos grupos controle (SAT e BROA), sabendo que este remete as condições ideais de reprodução do organismo.

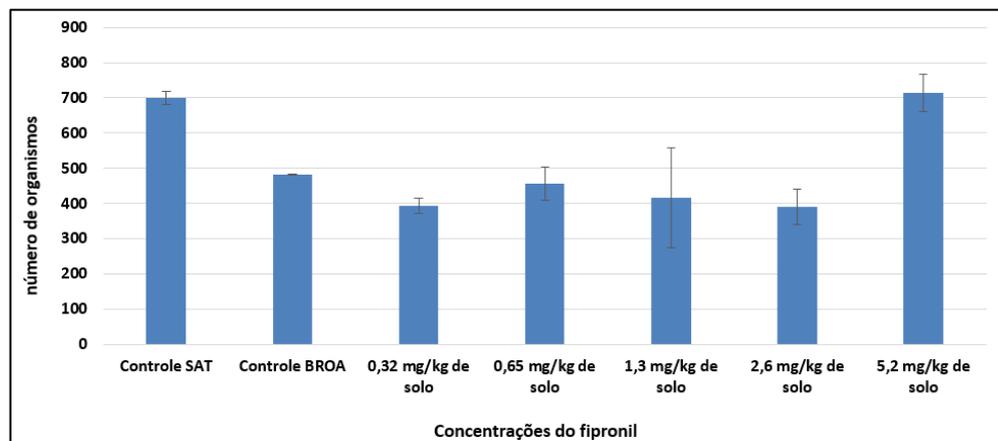
Com os resultados obtidos na quantificação dos organismos decorridos os 63 dias de exposição (G1), foi possível determinar a EC_{50} de 4,7 mg/kg mediante análise estatística utilizando o programa STATISTICA 7. Determinou-se a Menor Concentração de Efeito Observado (LOEC), na concentração de 0,65 mg/Kg e a Concentração de Efeito Não Observado (NOEC), na concentração de 0,32 mg/ Kg. Os resultados indicaram ainda que o solo não foi um interferente na reprodução dos organismos, pois não houve diferença significativa na

reprodução dos organismos nos dois tipos de solo utilizados como controle: o SAT e o solo natural tropical Broa.

Nessa geração (G1) foi possível observar que os organismos tinham um comportamento de fuga dos potes. Em todas as concentrações, muitos deles ficavam aderidos nas paredes e mais perto da tampa. Esse comportamento pode significar uma tentativa de fugir do solo contaminado, evidenciando a fuga do solo contaminado.

Zortéa *et al.* (2018) avaliaram o efeito do fipronil (Regent ® 800 WG) e de compostos fitoterápicos a base de nim (*Azadiractha indica*) na forma de extrato de nim e torta de nim, sobre de minhocas *Eisenia andrei*, enquitreídeos *Enchytraeus crypticus* e colêmbolos *F. candida*, em Latossolo Vermelho distrófico (LVd) e SAT. Os autores utilizaram a substância Top Line - Merial®, um fármaco comercial do fipronil. As concentrações utilizadas foram de 0; 0,25; 0,50; 1; 2 e 5 mg kg⁻¹. Realizou-se um teste de reprodução com *E. crypticus* de 28 dias (pois os organismos testados apresentavam curto ciclo reprodutivo e tamanho pequeno). Zortéa *et al.* (2018) observaram que o fármaco do fipronil foi menos tóxico para enquitreídeos e minhocas e mais tóxicos para colêmbolos. Oliveira (2017) avaliando a toxicidade do fipronil, evidenciou que os colêmbolos foram mais sensíveis ao pesticida fipronil, quando utilizou as mesmas concentrações testadas no presente estudo. Zortéa *et al.* (2018) não encontrou EC₅₀ para *E. crypticus* na presença do fármaco comercial do fipronil, assim como não foi possível encontrar EC₅₀ na G0 e G2 nesse trabalho.

Figura 13 - Resultados da quantificação do número de organismos da segunda geração (G2) expostos ao fipronil (Regent ® 800 WG) durante 105 dias, a temperatura de 20 ± 2°C



Os resultados obtidos na segunda geração (G2) demonstraram que os enquitreídeos *Enchytraeus crypticus* não foram sensíveis à exposição do inseticida fipronil (Regent ® 800 WG) nas concentrações testadas, assim como observado no primeiro teste e na primeira

geração, porém em G2 ocorreu aumento do número de organismos, ultrapassando os valores do grupo controle. Houve efeito no tratamento (Levene's $p < 0,05$), porém o efeito não foi o esperado, já que a maior concentração do contaminante estimulou a reprodução, em relação ao primeiro teste, a G1 e ao grupo controle da G2. Entretanto, neste teste no grupo controle com o SAT, nota-se elevado aumento do número de organismos se comparado com teste anteriores (primeiro e G1). Esse aumento pode ser explicado observando-se os resultados da quantificação elevada de bactérias e fungos do solo, apresentados no item 5.3. Uma das fontes de alimento dos *E. crypticus* são micro-organismos como bactérias e fungos, com dieta baseada em 80% de micro-organismos (STANDEN, 1973; DIDDEN, 1993).

Nessa última geração (G2) ocorreu comportamento atípico, pois na maior concentração do fipronil (Regent ® 800 WG) encontrou-se mais organismos do que nas outras concentrações. Com os resultados obtidos na quantificação dos organismos decorridos os 105 dias de exposição, não foi possível determinar EC_{50} e EC_{20} . Os resultados indicaram que nessa geração o solo foi um interferente na reprodução dos organismos, pois houve diferença significativa na reprodução dos organismos nos dois tipos de solo utilizados como controle: o SAT e o solo natural tropical Broa.

Em G2 foi possível observar que os organismos eram muito menores do que os encontrados no teste inicial e G1, com ausência de organismos maiores, bem menor do que das gerações anteriores, sugerindo que provavelmente os *Enchytraeus crypticus* se reproduziram através de casulos para proteger os filhotes e por isso ocorreu um aumento na reprodução dos organismos na maior concentração. Sendo assim, nas próximas gerações os organismos irão morrer.

Gonçalves *et al.* (2017) relata que a densidade de organismos em um mesmo ambiente pode afetar o tamanho e o crescimento dos mesmos, ou seja, quando a quantidade de organismos for elevada, o seu desenvolvimento é afetado, com a redução do tamanho.

Há algumas evidências que relatam que a interação com a densidade pode variar com o aumento da concentração do contaminante, ou seja, quanto maior a concentração do contaminante maior a densidade populacional de organismos (LINKE-GAMENICK *et al.*, 1999). Menezes-Oliveira *et al.* (2013) relatam a respeito da relação entre densidade de organismo e toxicidade do contaminante, quanto maior a densidade de organismos menor a toxicidade, o que pode ser observado na última geração (G2), onde na maior concentração do fipronil (Regent ® 800 WG) (5,2 mg/kg) foram quantificados mais organismos do que a grupo controle. Essa relação pode ocorrer pois quando os organismos estão aglomerados diminui-se

sua exposição ao contaminante, assim há menos solo contaminado disponível por indivíduo, portanto menos exposição.

Estudos apontam que o fipronil, apesar de ser muito tóxico para peixes e invertebrados aquáticos, apresenta uma tendência para se ligar-se ao sedimento, com menor toxicidade para minhocas e micro-organismos do solo (NPIC, 2004), porém atualmente o inseticida é considerado tóxico para todos os organismos.

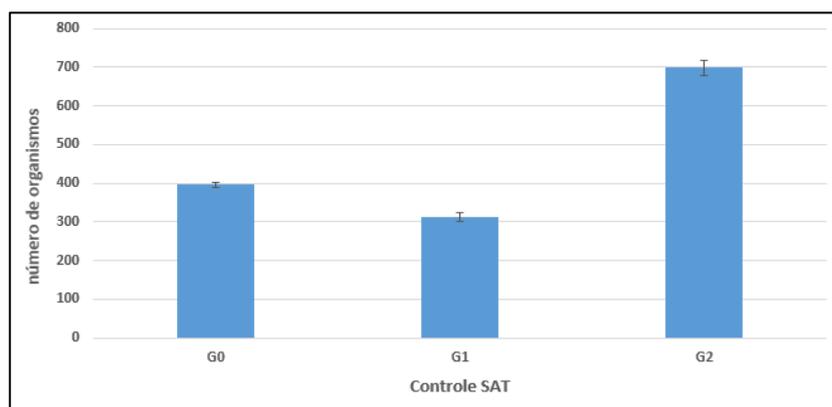
Vários estudos evidenciaram que os enquitreídeos são mais resistentes a compostos potencialmente tóxicos quando comparados com outros indicadores terrestres, como por exemplo o colêmbola *Folsomia candida*, inclusive em testes utilizando a mesma formulação comercial do fipronil (Regent ® 800 WG) (OLIVEIRA, 2017).

De Lima e Silva (2017) relatam sobre a menor sensibilidade dos *E. crypticus* em relação as minhocas e outros animais terrestres.

Os resultados também indicam que toxicidade sofreu alteração ao longo das gerações e que não houve mortalidade dos *E. crypticus*, enfatizando sua resistência comparada com outros organismos de solo.

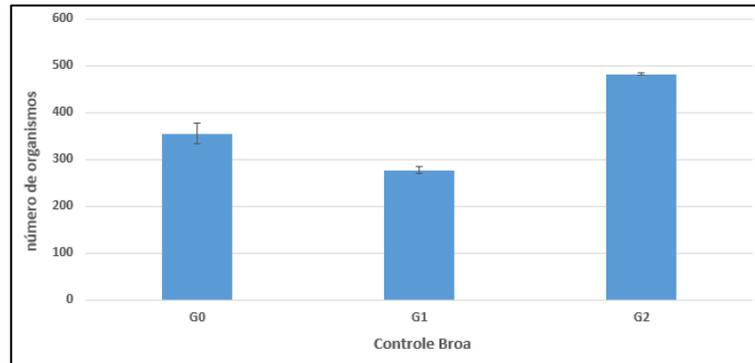
Nas Figuras 14 a 20 pode-se verificar as diferenças obtidas entre as concentrações comparando as gerações.

Figura 14 – Resultado da reprodução de *E. crypticus* no solo controle SAT no teste inicial, primeira (G1) e segunda Geração (G2)



Na Figura 14 nota-se que na última geração (G2) a reprodução foi mais acentuada, ocorrendo aumento significativo de organismos, provavelmente ocasionado pela disponibilidade de alimento, evidenciado pela quantificação de bactérias heterotróficas e fungos detectados no final do teste multigeracional.

Figura 15 – Resultado da reprodução de *E. crypticus* no solo natural tropical controle (Broa) no teste inicial, primeira (G1) e segunda Geração (G2)



No solo controle Broa também houve diferença na quantificação dos organismos em relação as gerações. Observa-se aumento na última geração (G2), porém não muito expressivo quanto no controle SAT.

Figura 16 – Resultado da reprodução de *E. crypticus* no solo natural tropical contaminado com fipronil (Regent ® 800 WG) na concentração de 0,32 mg/kg de solo seco no teste inicial, primeira (G1) e segunda Geração (G2)

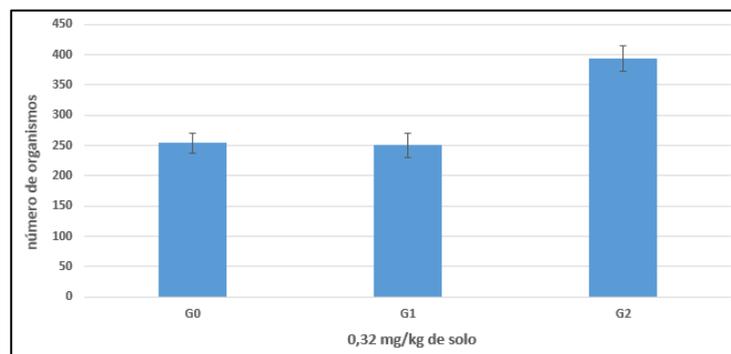
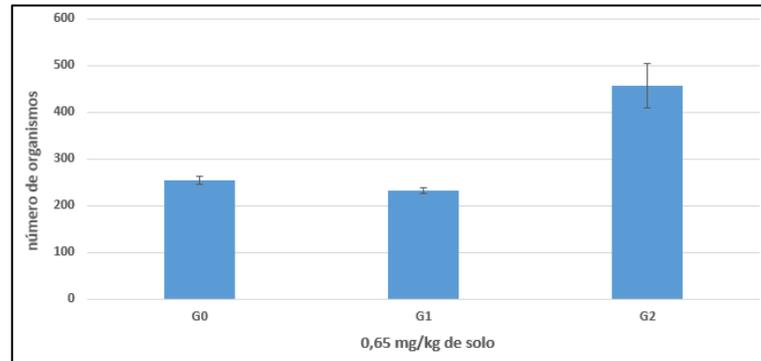


Figura 17 – Resultado da reprodução de *E. crypticus* no solo natural tropical contaminado com fipronil (Regent ® 800 WG) na concentração de 0,65 mg/kg de solo seco no teste inicial, primeira (G1) e segunda Geração (G2)



Nas concentrações de 0,32 e 0,65 mg/kg de solo seco (Figura 16 e 17, respectivamente) observa-se que não houve alteração entre as primeiras gerações (G0 e G1). Porém, como observado na Figura 16 a última geração (G2) mostrou aumento significativo no número de organismos.

Figura 18 – Resultado da reprodução de *E. crypticus* no solo natural tropical contaminado com fipronil (Regent ® 800 WG) na concentração de 1,3 mg/kg de solo seco no teste inicial, primeira (G1) e segunda Geração (G2)

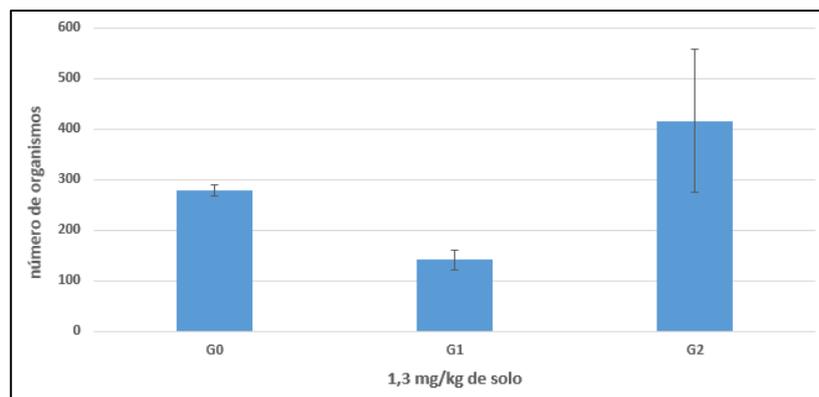
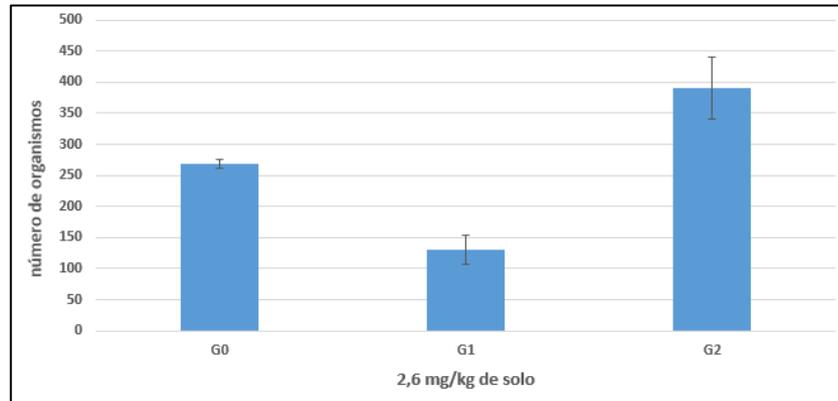
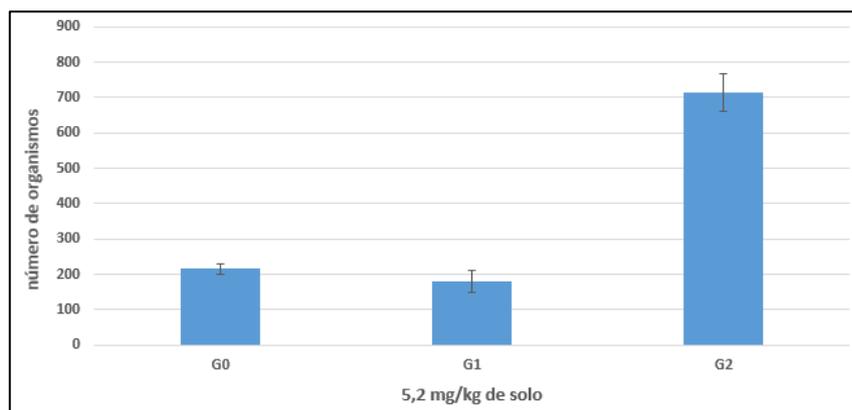


Figura 19 – Resultado da reprodução de *E. crypticus* no solo natural tropical contaminado com fipronil (Regent ® 800 WG) na concentração de 2,6 mg/kg de solo seco no teste inicial, primeira (G1) e segunda Geração (G2)



Os organismos expostos as concentrações 1,3 e 2,6 mg de fipronil (Regent ® 800 WG) por Kg de solo seco, nota-se um padrão no número de organismos quantificados nas primeiras gerações (G0 e G1), onde em G1 ocorreu diminuição do número de organismos, em G2, nas duas concentrações, há aumento considerável na reprodução.

Figura 20 – Resultado da reprodução de *E. crypticus* no solo natural tropical contaminado com fipronil (Regent ® 800 WG) na concentração de 5,2 mg/kg de solo seco no teste inicial, primeira (G1) e segunda Geração (G2)



Quando os organismos foram expostos a concentração de 5,2 mg de fipronil/kg de solo seco observa-se que nas primeiras gerações (G0 e G1) não há diferença significativa entre o número de organismos, porém por ser a maior concentração de fipronil (Regent ® 800 WG) utilizada no teste, na última geração (G2) ocorreu aumento relevante. Esse aumento pode estar

relacionado com a densidade de organismo e a concentração do contaminante fipronil (Regent ® 800 WG), já que alguns estudos apontam que quanto maior a concentração do contaminante, maior a probabilidade de aumentar a reprodução (LINKE-GAMENICK *et al.*, 1999; MENEZES-OLIVEIRA *et al.* 2013).

Neste estudo os resultados indicaram que nas concentrações avaliadas, o inseticida fipronil (Regent ® 800 WG) apresentou elevada toxicidade para os organismos avaliados, tendo em vista que o tamanho dos mesmos diminuiu consideravelmente com o avanço das gerações, evidenciando que na próxima geração, os organismos iriam morrer.

5.3. Resultados da Quantificação de fungos e bactérias heterotróficas

A quantificação de fungos e bactérias heterotróficas foi realizada no início do teste multigeracional e após o término do mesmo. Realizou-se a quantificação na areia utilizada no preparo do solo SAT e no solo natural.

Foram realizadas duas coletas do solo natural tropical (Broa) devido a necessidades de quantidades de solo e manutenção de suas características em curto espaço de tempo.

A Tabela 4 expressa a quantificação de bactérias heterotróficas e fungos de amostra do solo natural tropical, denominado Broa e a Tabela 5 a quantificação após o término do teste de toxicidade da última geração.

Tabela 4 – Quantificação de bactérias heterotróficas e fungos, avaliados em Unidade Formadora de Colônia por grama de solo (UFC/g), em amostras de solo natural tropical (Broa) e na areia utilizada para fazer o solo artificial (SAT) no início dos testes de toxicidade

Amostra de solo	Bactérias UFC/g	Fungos UFC/g
BROA	4,9 x10 ²	7,1 x10 ¹
BROA	4,1 x10 ²	6,1 x10 ¹
SAT	2,7 x10 ²	0,2 x10 ¹

Tabela 5 – Quantificação de bactérias heterotróficas e fungos, avaliados em Unidade Formadora de Colônia por grama de solo (UFC/g), em amostras de solo natural e na areia utilizada para fazer o solo artificial (SAT), no final dos testes de toxicidade

Amostra de solo	Bactérias UFC/g	Fungos UFC/g
5,2 mg/kg A	3,1 x10 ²	6,1 x10 ¹
0,32 mg/kg A	4,4 x10 ²	9,7 x10 ¹
SAT	>6500	2,4 x10 ¹

Observando as Tabelas 4 e 5 observa-se pouco crescimento das colônias, mas pode-se perceber que no solo SAT foi onde ocorreu o maior crescimento. Esse crescimento pode explicar a diferença significativa entre a contagem do controle na segunda geração entre o solo BROA e o SAT, em que nesse último a reprodução dos organismos foi maior do que no solo BROA. São testados os dois tipos de solo no controle para efeito de observação da reprodução. Se houver diferença, pode significar que o solo interfere na reprodução no organismo, já que um solo é preparado em laboratório de acordo com norma padronizada e outro solo é coletado na natureza. Com o decorrer do teste multigeracional, houve formação de colônias de micro-organismos que serviram de alimento para os enquitreídeos, assim ocorreu aumento na reprodução dos mesmos, principalmente no solo SAT.

5.4. Resultados do teste de Avoidance (teste de fuga)

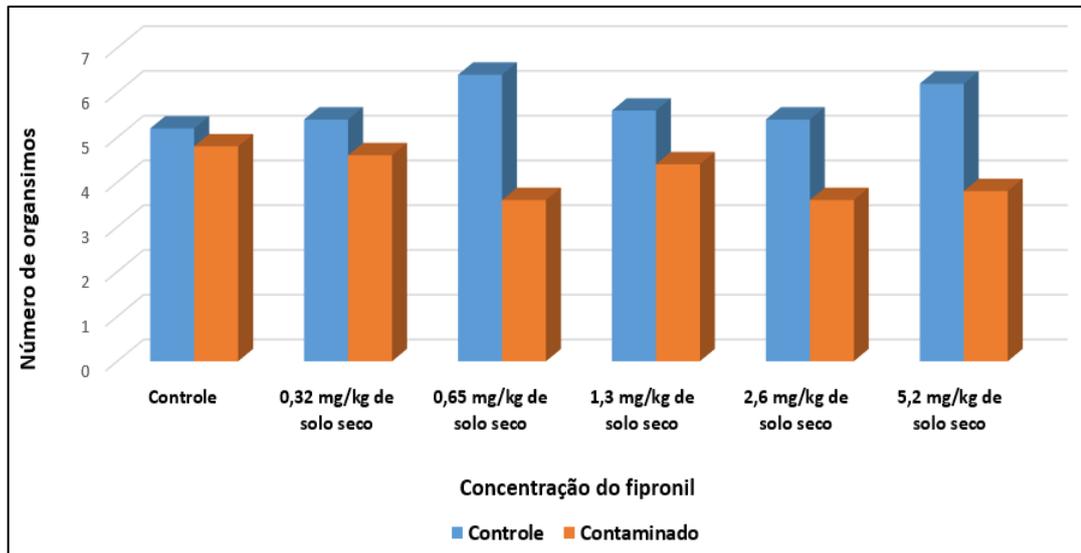
O teste de fuga (avoidance) é utilizado como teste preliminar para avaliar a toxicidade de um composto no solo usando como parâmetro o comportamento do organismo teste, ou seja, observar para qual tipo de solo o organismo se desloca. É considerado um teste fácil e de rápida execução, porém não é um teste utilizado como parâmetro único de toxicidade, sendo este complementar a outros testes agudos ou crônicos.

A Tabela 6 e figura 21 expressam o teste de fuga (avoidance) realizado expondo 10 organismos clitelados de *E. crypticus* em solo natural tropical (Broa), contaminado com o pesticida fipronil (Regent ® 800 WG) em diferentes concentrações, durante o período de 48 horas, a temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16/8h (claro/escuro).

Tabela 6 – Resultado do teste de fuga realizado com dez organismos de *E. crypticus* exposto ao fipronil (Regent ® 800 WG) em solo natural tropical (Broa), avaliado durante o período de 48 horas, a temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16/8h (claro/escuro)

Concentração de fipronil (mg/kg)	Número de organismos no solo controle	Número de organismos no solo contaminado
Controle	5,2	4,8
0,32	5,4	4,6
0,65	6,4	3,6
1,3	5,6	4,4
2,6	5,4	3,6
5,2	6,2	3,8

Figura 21 – Resultado do teste de fuga realizado com *E. crypticus* exposto ao fipronil (Regent ® 800 WG) em solo natural tropical (Broa), avaliados durante 48 horas com temperatura de $20\pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16/8h (claro/escuro)



O teste de fuga vem se tornando frequente com organismos da fauna edáfica, pois permite resposta em curto período de tempo, indicando a existência de condições desfavoráveis em um determinado ambiente.

Os resultados indicam que o teste pode ser considerado válido, tendo em vista que no “controle duplo” não houve diferença na distribuição dos organismos entre os dois lados do recipiente.

O teste evidenciou o comportamento significativo de fuga (evitamento) ao solo contaminado. Notou-se que houve comportamento típico de curva dose-resposta, onde quanto mais elevada à concentração do fipronil (Regent ® 800 WG), mais os organismos se deslocaram para o solo controle. Comportamento semelhante foi observado por Novais *et al.* (2010) analisando o evitamento de *E. albidus*, na presença na presença de pesticidas, onde em todas as concentrações houve evitamento do solo contaminado, porém, na última concentração essa observação foi mais evidente.

Em relação a menor e a maior concentração (0,32 e 5,2 mg de fipronil (Regent ® 800 WG) por quilo de solo seco, respectivamente) observou-se diferença de comportamento, onde na maior concentração houve maior fuga do solo contaminado, pois os organismos foram encontrados no solo controle. Nas concentrações mais baixas, houve fuga, porém não tão acentuada.

De acordo com Amorim *et al.* (2012) não ocorreu nenhuma resposta clara de evitamento em nenhum dos diferentes compostos testados, quando os autores realizaram o teste de avoidance com *E. albidus*, na exposição aos seguintes compostos químicos: cloreto de cobre (CuCl_2), cloreto de zinco (ZnCl_2) e cloreto de cádmio (CdCl_2); os herbicidas fenmedifam e atrazina; os fungicidas benomil, carbendazim, pentaclorofenol e óxido de tributilestanho (TBTO); os inseticidas dimetoato, lindano, chlor-pirifos e ácido bórico. Os organismos mostraram elevado evitamento aos solos contaminados com os dois pesticidas, o fenmedifam e o dimetoato, em todos os tempos de amostragem. A resposta do *E. albidus* ao fungicida carbendazim foi de comportamento típico de dose-resposta, ocorrendo evitamento mais evidente nas concentrações mais elevadas.

Novais *et al.* (2010) realizaram três testes utilizando *Enchytraeus albidus*, analisando a toxicidade de vários pesticidas em solo natural. Os autores avaliaram efeitos sobre a sobrevivência, reprodução e fuga e concluíram que o comportamento de fuga foi menos sensível que a reprodução. Este comportamento significa que se o organismo não foge do solo contaminados no campo, a probabilidade do efeito do pesticida é maior na reprodução.

Houve um comportamento de fuga evidente, principalmente na primeira geração, em que os animais foram observados nas paredes dos potes, próximos a tampa, evidenciando uma conduta de toxicidade aos bioindicadores, fazendo com que eles tentassem fugir do solo contaminado.

5.5. Resultados do ensaio de Respirimetria de Bartha e Pramer

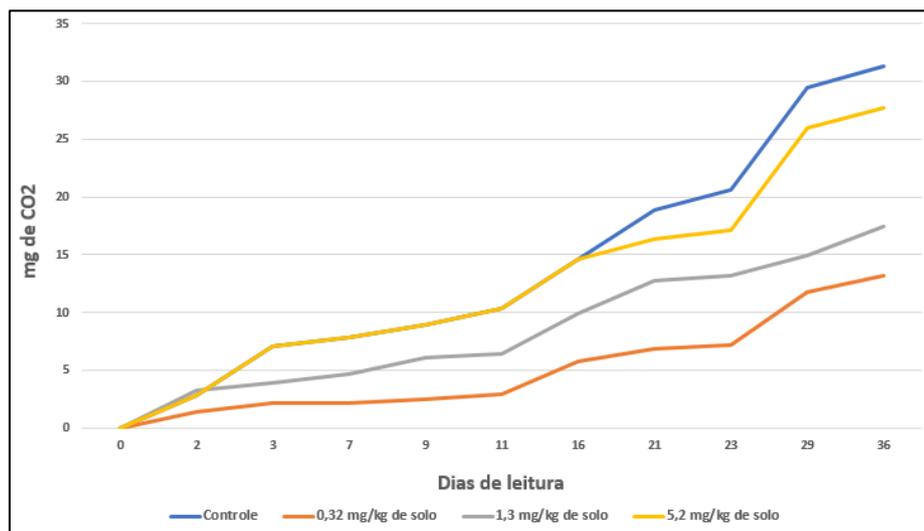
O fipronil possui baixa degradação no solo, tendo o processo de fotodegradação como maior forma de transformação da molécula do pesticida. A fotodegradação pode resultar em subprodutos muitas vezes mais tóxicos que o composto químico original, entre eles o dissulfenil, um composto estável e de nove a dez vezes mais tóxico para mamíferos do que a molécula original do fipronil (HAINZL, COLE e CASIDA, 1998; NPIC, 2018).

Vários métodos podem ser utilizados para avaliar a biodegradação de um composto no solo, entre eles o método respirométrico de Bartha e Pramer, em que a taxa de biodegradação (atividades realizadas pelos micro-organismos) é determinada pela quantidade de dióxido de carbono (CO_2) liberada (BERNARDES e SOARES, 2005).

Ensaio de toxicidade e biodegradação estão interligados, pois a biodegradação avalia se o composto degradado teve sua toxicidade reduzida, aumentada ou permaneceu a mesma (SOBRERO e RONCO 2004; HUBÁLEK *et al.* 2007; GYURICZA *et al.* 2010; CRUZ *et al.* 2014).

A Figura 22 expressa a produção acumulada de CO₂ obtida no processo de biodegradação do fipronil (Regent ® 800 WG) em solo natural tropical (Broa), avaliados em processo de respirometria de Bartha e Pramer, durante o período de 28 dias a temperatura de 22 ± 2°C.

Figura 22 – Produção acumulada de CO₂ no solo contaminado com fipronil (Regent ® 800 WG) em diferentes concentrações, incubados em estufa BOD a 22 ± 2°C



O processo de biodegradação microbiana é uma das mais significativas vias para a degradação do fipronil no solo (VÍLCHEZ *et al.*, 2001). De acordo com os resultados obtidos neste estudo, nota-se que a geração de CO₂ no solo contaminado com fipronil (Regent ® 800 WG) é menor do que aquela gerada no solo sem o pesticida (solo controle), evidenciando que sua biodegradação é lenta no solo e que o inseticida se mostra persistente e com grande impacto no solo, pois nenhuma das concentrações ultrapassa o valor do controle.

Quanto maior a concentração do fipronil (Regent ® 800 WG) (5,2 mg/kg de solo) maior foi a geração de CO₂, ou seja, houve mais respiração dos micro-organismos. Essa conclusão acompanha o teste multigeracional, principalmente na última geração, em que na maior concentração do fipronil (Regent ® 800 WG), maior foi a reprodução dos organismos. Esse resultado sugere que o fipronil (Regent ® 800 WG) pode ser uma fonte de carbono para o metabolismo dos micro-organismos presentes no solo, assim como no estudo de Araújo *et al.* (2002) sugerindo que nessas mesmas condições o glifosato foi fonte de carbono, aumentando a geração de CO₂ nas concentrações mais altas do glifosato analisadas.

Cappellini (2018) descreve sobre a degradação do fipronil por um organismo extraído do solo com longo histórico de cultivo de cana-de-açúcar. Os resultados mostraram que o método foi eficiente e foi possível identificar bactérias com potencial de degradação do

fipronil e seus metabólitos, revelando que, no solo, é possível isolar micro-organismos capazes de degradá-lo a formas tóxicas, que podem ser mais agressivas que a formulação inicial, exatamente o que acontece quando ele é fotodegradado, formando subprodutos muitas vezes mais tóxicos que sua formulação química original.

6. CONCLUSÕES

As concentrações analisadas do inseticida fipronil, formulação comercial Regente ® 800 WG, mediante ensaio de toxicidade multigeracional, analisando duas gerações do indicador biológico *Enchytraeus crypticus* mostraram-se pouco sensíveis em relação a reprodução até a segunda geração, porém indicando que os dados são relevantes, evidenciando que o tamanho dos organismos diminuiu significativamente, sendo assim, na próxima geração os organismos irão morrer.

O teste de fuga (avoidance) mostrou que os *E. crypticus* tendem a evitar o solo contaminado, assim como na primeira geração, em que foi observado um comportamento de fuga dos organismos nos potes, onde eles ficaram fixados nas paredes e mais perto da tampa, comprovando a toxicidade do fipronil (Regent ® 800 WG).

Pode-se avaliar a taxa de persistência do fipronil no solo mediante a quantificação da produção de CO₂ dos micro-organismos presentes no solo utilizando o método de respirométrico de Bartha e Pramer, de forma simples e eficaz. A biodegradação avaliada pela metodologia respirométrica, mostrou o mesmo padrão encontrado na literatura, evidenciando a lenta biodegradação do pesticida no solo. O ensaio de respirometria seguiu o padrão do teste multigeracional, onde quando mais alta a concentração do composto, maior foi a quantificação da microbiota e maior a geração de CO₂, com o fipronil (Regent ® 800 WG) servido como fonte de carbono para os micro-organismos.

Neste estudo avaliou-se a toxicidade do fipronil (Regent ® 800 WG) para o *E. crypticus*, que se mostrou pouco sensível ao pesticida, mas com um comportamento de fuga observada tanto durante os ensaios geracionais nas paredes dos potes como no teste de fuga (avoidance). Entretanto, são necessárias mais avaliações de toxicidade do efeito do fipronil, tendo em vista sua toxicidade, persistência, baixa degradação, analisadas em vários estudos de toxicidade que comprovam sua periculosidade e sua proibição em vários países da Europa. As legislações brasileiras devem reavaliar sua utilização e comercio evitando assim mais exposição a esse produto comprovadamente perigoso.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, R.B. **Investigação do comportamento eletroquímico do inseticida fipronil e desenvolvimento de metodologia eletroanalítica.** São Carlos, 2012. 124f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.

AMORIM M. J. B.; NATAL-DA-LUZ T.; SOUSA J. P.; LOUREIRO S.; BECKER L.; RÖMBKE J.; SOARES A. M. V. M. Boric acid as reference substance: pros, cons and standardization. *Ecotoxicology* 21:919-924, 2012.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Consulta Pública nº 201, de 07 de julho de 2016. Diário Oficial da União.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>. Acesso em 17 de jun. de 2017.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Monografia de agrotóxicos:** F43. 2005. Fipronil. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/f43.pdf/cee42727-46ab-44a2-b88e-10ea4e8faab9>>. Acesso em: 19 mar. 2017.

ARAÚJO, A. S. F. **Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solo.** Dissertação – Microbiologia Agrícola ESALQ/SP, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14283:** Resíduos em solos: determinação da biodegradação pelo método respirométrico. Rio de Janeiro, 1999.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT, 2012 – Qualidade do solo – Efeito de poluentes em Enchytraeidae (Enchytraeus sp.) – Determinação de efeitos sobre reprodução e sobrevivência. **NBR ISO nº 16387:**2012. 29 p.

BARMENTLO, S. H.; VAN GESTEL, C. A. M.; ALVAREZ-ROGEL, J.; GONZALEZ-ALCARAZ, M. N. Influence of climate change on the multi-generational toxicity to *Enchytraeus crypticus* of soils polluted by metal/metalloid mining wastes. **Environmental Pollution**, vol. 222pp. 101-108, 2017.

BARTHA, R.; PRAMER, D. Features of flask and method for measurement the persistence and biological affects of pesticides in soil. **Soil Sci. Baltimore**, v.100, n.1, p.68-70, 1965.

BECKER, L.; SCHEFFCZYK, A.; FORSTER, B.; OOEHLMANN, J.; PRINCZ, J.; ROMBKE, J.; MOSER, T. Effects of boric acid on various microbes, plants, and soil invertebrates. **Journal of Soil and Sediments**. Vol. 11 p 238-248, 2010.

BEJARANO, A.C.; CHANDLER, G. T.; DECHO, A. W. Influence of natural dissolved organic matter (DOM) on acute and chronic toxicity of the pesticides chlorothalonil, chorpifos, and fipronil on the meiobenthic estuarine copepod *Amphiascus tenuiremis*. **J Exp Mar Biol Ecol** 321:43–57, 2005.

BERNARDES, R.S e SOARES, S. R. A. Fundamentos da Respirimetria no controle de poluição da água e do solo. Editora Universidade de Brasília: **Finatec**, Brasília, DF. 164p, 2005.

BIANCHI, M. O. **Ensaio Ecotoxicológicos como Ferramenta para Avaliação do Impacto Ambiental de Resíduos de Mineração Sobre o Solo**. Dissertação de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio De Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 91p, 2013

BOBE, A.; COOPER, J.; COSTE, C.M.; MULLER, M.A. Behaviour of fipronil in soil under Sahelian plain field conditions. **Pestic. Sci.** 52, 275–281, 1998.

BOBE, A.; COSTE, C. M.; COOPER, J. F. Factors influencing the adsorption of fipronil on soils, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45(12), pp. 4861–4865, 1997.

BRUGGEN, A. H. C.; SEMENOV, A. M. In search of biological indicators for soil health and disease suppression. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 15, n.1, p. 13-24, 2000.

CAPPELINI, L. T. D.; ALBERICE, J. V.; EUGÊNIO, P. F. M.; POZZI, E.; URBACZEK, A. C.; DINIZ, L. G. R.; CARRILHO, E. N. V. M.; CARRILHO, E.; VIEIRA, E. M. *Burkholderia thailandensis*: the Main Bacteria Biodegrading Fipronil in Fertilized Soil with Assessment by a QuEChERS/GC-MS Method. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 29, No. 9, 1934-1943, 2018

CARVALHO, J. G. (Org.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS ; Lavras: UFLA/DCS p. 529-549, 1999.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. 2006 - Contagem de bactérias heterotróficas : método de ensaio. Norma Técnica N° L5.201, 15p, 2006.

CHATON, P. F.; RAVANEL, P.; MEYRAN, J.C.; TISSUT, M.; The toxicological effects and bioaccumulation of fipronil in larvae of the mosquito *Aedes aegypti* in aqueous medium. **Pestic Biochem Physiol** 69:183–188, 2001.

CHIOU, C. T.; PORTER, P. E.; FREED, V. H. Partition equilibria of nonionic organic compounds between soil organic matter and water. **Environmental Science and Technology**. 1983.

COLE, L. M.; NICHOLSON, R. A.; CASIDA, J. E. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 46(1), pp. 47–54, 1993.

COLUSSI, J. **Conheça as cinco principais mudanças previstas no projeto de lei dos agrotóxicos**. Disponível em: <https://gauchazh.clicrbs.com.br/economia/campo-e-lavoura/noticia/2018/05/conheca-as-cinco-principais-mudancas-previstas-no-projeto-de-lei-dos-agrotoxicos-cjhma4zbb0bel01qoyg12lc3n.html>. Acesso em 14 out. 2018.

CONNELLY, P. Environmental fate of fipronil. California Environmental Protection Agency. **Department of Pesticide Regulation**. EPA, p.2-10. 2001.

COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S.T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G. S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. Pesticidas: **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**. p 65-72, 2005.

COX, C. Insecticide factsheet: Fipronil. **Journal of Pesticide Reform**. V.25 p. 10-15. 2005.

CRUZ, J.M.; TAMADA, I. S.; LOPES, P. R. M.; MONTAGNOLLI, R. N.; BIDOIA, E. D. Biodegradation and phytotoxicity of biodiesel, diesel, and petroleum in soil. **Water, Air, & Soil Pollution**. 2014.

DECRETO Nº 24.114 de 12 de abril de 1934. DOU, 28/05/1934. Rio de Janeiro.

DE LIMA E SILVA, C.; BRENNAN, N.; BROUWER, J. M.; COMMANDEUR, D.; VERWEIJ, R. A.; VAN GESTEL, C. A. M. Comparative toxicity of imidacloprid and thiacloprid to diferente species of soil invertebrates. **Ecotoxicology**. Vol. 26 p 555-564, 2017.

DIDDEN, W. A. M. Ecology of terrestrial Enchytraeidae. **Pedobiologia** 37: 2-29, 1993.

DIDDEN, W. A. M.; FRUND, H. C.; GRAEFE, U. Enchytraeids. In: BENCKISER, G. (Ed.). **Fauna in Soil Ecosystems**. New York: Marcel Dekker, p. 135-172, 1997.

DIEESE. Departamento Intersindical de Estatísticas e Estudos Socioeconômicos. **Panorama Setorial de Complexo Industrial Químico no Brasil**. Boletim de Subsídio às Campanhas Salariais de Setor Químico. São Paulo, 2015.

EFSA (European Food Safety Authority). Conclusion regarding the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fipronil. Finalised on 3 March 2006, revised version of 12 April 2006. **EFSA Scientific report** (2006).

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em: http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/pestres/pesticide-detail/es/?p_id=202. Acesso em: 17 de jun. de 2017

FAY, E. F.; SILVA, C. M. M. de S.S. **Comportamento e destino de agrotóxicos no ambiente solo-água**. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/SilvaFay_ComportamentoDestinoAgrototoxicos_000fdrcas1102wx5eo0a2ndxysl4vpfn.pdf>. Acesso em 10 de jul de 2017. **Agrotóxicos e Ambient**. 2004.

FERREIRA, V. S.; SANTOS, A. F.; BERNINI, C.; MOURA, T. V. S.; REGANHAN-CONEGLIAN, C. M.; OLIVEIRA, G. Fipronil: biodegradação no solo e fototoxicidade. XXIV Congresso de Iniciação Científica da Unicamp, 2016.

FIÚZA, A. M. A.; VILA, M. C. C. An insight into soil bioremediation through respirometry. **Environment International**, 2004.

GEERDINK, R. B.; NILESSSEN, W. M. A.; BRINKMAN, U. A. T. H.; Trace-level determination of pesticides in water by means of liquid and gas chromatography. **J. Chromatogr. A** Vol. 970 p.65-93, 2002.

GONÇALVES, M. F. M.; GOMES, S. I. L.; SOARES, A. M. V. M.; SCOTT-FORDSMAND, J. S.; AMORIM, M. J. B. Enchytraeus crypticus fitness: effect of density on a two-generation study. **Ecotoxicology**. Vol. 26 p 570-575, 2017.

GUNNELL. D.; EDDLESTON. M.; PHILLIPS. M. R.; e KONRADSEN, F. The global distribution of fatal pesticide self-poisoning: Systematic review. **BMC Public Health** 7: 357—397, 2007.

GUPTA, S.; SHARMA, R. K.; GUPTA, R. K.; SINHA, S. R.; SINGH, R.; GAJBHIYE, V T. Persistence of New Insecticides and Their Efficacy Against Insect Pest of Okra. **Bullentin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, n. 2, p. 243-247, 2009.

GYURICZA, V.; FODOR, F.; SZIGETI, Z. Phytotoxic effects of heavy metal contaminated soil reveal limitations of extract based ecotoxicological tests. **Water, Air, and Soil Pollution**. V. 210, pp 113–122, 2010.

HAINZL, D.; COLE, L. M.; CASIDA, J. E. Mechanisms for Selective Toxicity of Fipronil Insecticide and Its Sulfone Metabolite and Desulfinyl Photoproduct. **Chemical Research In Toxicology**, [s.l.], v. 11, n. 12, p.1529-1535, 1998.

HAINZL, D.; CASIDA, J. E. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. **Agricultural Sciences**, v. 93, p. 12764-12767. 1996.

HUBÁLEK, T.; VOSÁHLOVÁ, S.; MATĚJŮ, V.; KOVÁČOVÁ, N.; NOVOTNÝ, C. Ecotoxicity monitoring of hydrocarbon contaminated soil during bioremediation: a case study. **Archives Environmental Contamination and Toxicology**. V. 52, pp 1–7, 2007.

HUSSAIN, S.; HARTLEY, C. J.; SHETTIGAR, M.; PANDEY, G. Bacterial biodegradation of neonicotinoid pesticides in soil and water systems. **Environmental microbiology**, V. 363, 2016.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores de Desenvolvimento Sustentável. Brasil, 2015. Disponível em: <<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv94254.pdf>>. Acesso em: 10 mar. 2017.

IBAMA. Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil. Brasília: Ibama, 2010. 84p. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br%2Fphocadownload%2FQualidade_Ambiental%2Fprodutos_agrot_oxicos_comercializados_brasil_2009.pdf>. Acesso em: 03 out. 2018.

JACKSON, D. et al. Fipronil. Technical Fact Sheet. **National Pesticide Information Center**, Oregon State University Extension Services. 2009. Disponível em: <http://npic.orst.edu/ingred/aifact.html>. Acesso em 11 de jun. de 2017.

JARDIM, A. N. O.; CALDAS, E. D. Brazilian monitoring programs for pesticide residues in food - Results from 2001 to 2010, **Food Control. Elsevier Ltd**, 25(2), pp. 607–616, 2011.

CALDAS, E. D. **Pesticide Poisoning in Brazil**, Universidade de Brasília. Brasília. 2011.

JÄNSCH, S.; RÖMBKE, J.; DIDDEN, W. The use of enchytraeids in ecological soil classification and assessment concepts. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, p.266-277, 2005.

KARLEN, D. L.; ANDREWS, S. S.; WEINHOLD, B. J.; DORAN, W. Soil quality: Humankind's foundation for survival. **Journal of Soil and Water Conservation**. V.58 p.171-179. 2003.

KEY, P. B.; CHUNG, K.W.; OPATKIEWICZ, A.D.; WIRTH, E.F.; FULTON, M.H. Toxicity of the insecticides fipronil and endosulfan to the selected life stages of the grass shrimp (*Palaemonetes pugio*). **Bull Environ Contam Toxicol** 70:533–540, 2003.

KOLACZINZKI J.; CURTIS, C. Laboratory evaluation of fipronil, a phenylpyrazole insecticide, against adult *Anopheles* (Diptera: Culicidae) and investigation of its possible cross-resistance with dieldrin in *Anopheles stephensi*. **Pest Manag Sci** 57:41–45, 2001.

KONWICK, B. J.; FISK, A. T.; GARRISON, A. W.; AVANTS, J. K.; BLACK, M. C. Acute enantioselective toxicity of fipronil and its desulfinyl photoproduct to *Ceriodaphnia dubia*. **Environ Toxicol Chem** 24:2350–2355, 2005.

LEITÃO, S.; CEREJEIRA, M.J.; VAN DE BRINK, P.J.; SOUZA, J.P. Effects of azoxytrobin, chlorothalonil, and ethoprophos on the reproduction of three terrestrial invertebrates using a natural Mediterranean soil. **Appl Soil Ecol**. V. 76, P. 124-131, 2014.

LINKE-GAMENICK, I.; FORBES, V.E.; SIBLY, R.M. Density-dependent effects of a toxicant on life-history traits and population dynamics of a capitellid polychaete. **Mar Ecol Prog Ser**; 184:139–48, 1999.

LOCK, K. JANSSEN, C.R. Multi-generation toxicity of zinc, cadmium, copper and lead to the potworm *Enchytraeus albidus*. **Ecotoxicol Environ Saf**. V. 117, p. 89-92, 2002.

MANDAL, K.; SINGH, B.; JARIYAL, M.; GUPTA, V. K. Bioremediation of fipronil by a *Bacillus firmus* isolate from soil. **Chemosphere**, v.101. p55-60, 2013.

MASUTTI, C. S. M.; MERMUT, A. R. **Degradation of fipronil under laboratory conditions in a tropical soil from Sirinhaém Pernambuco**. *Brazil. Journal of Environmental Science and Health Part B*, v.42, n.1, p.33-43, 2007. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/toc/lesb20/42/1>>. Acesso em: 03 out. 2018. doi: 10.1080/03601230601017981

MENEZES-OLIVEIRA, V.B.; DAMGAARD, C.; SCOTT-FORDSMAND, J.J.; AMORIM, M.J.B. Interaction between density and Cu toxicity for *Enchytraeus crypticus* - Comparing first and second generation effects. **Sci Total Environ.** V. 458-460, p. 361-366, 2013.

MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Applied models to biodegradation kinetics of lubricant and vegetable oils in wastewater. **International Biodeterioration & Biodegradation.** V. 63, p. 297-305, 2009.

MUKHERJEE, I. Sorption of fipronil in tropical soils. **Bullentin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 76, n. 2, p. 334-340, 2006.

MULDER, C., BOIT, A., BONKOWSKI, M., DE RUITER, P. C., MANCINELLI, G., VANDER HEIJDEN, M. G. A., *et al.* A belowground perspective on Dutch agroecosystems: how soil organisms interact to support ecosystem services. **Adv. Ecol. Res.** V. 44, p. 277–357, 2011.

NEMAPLEX. **Characteristics of Taxonomic Groups with Soil-inhabiting Forms.** Disponível em <http://nemaplex.ucdavis.edu/Kingdoms/Annelida.htm>. Acesso em 25 de setembro de 2018.

NIEMEYER, J. C.; CARNIEL, L. S. C.; DE SANTO, F. B.; SILVA, M.; KLAUBERG-FILHO, O. Boric acid as reference substance for ecotoxicity tests in tropical artificial soil. **Ecotoxicology.** Vol. 27 p 395-401, 2018.

NOLDIN, J.A., EBERHARDT, D.S., KNOBLAUCH, R. **Produção de arroz irrigado com baixo impacto ambiental.** In: Eberhardt, D.S., Schiocchet, M.A. (Eds.), *Recomendações para a produção de arroz irrigado em Santa Catarina (Sistema pré-germinado)*, Florianópolis, Epagri, pp. 71e74, 2012.

NOVAIS, S. C.; SOARES, A.M.V.M.; AMORIM, M. J. B. Can avoidance in *Enchytraeus albidus* be used as a screening parameter for pesticides testing? **Chemosphere.** V.79 p.233-237. 2010.

NOVAIS, S.; AMORIM, M. J. B.; ROMBKE, J.; SOARES, A. M. V. M. Teste de evitamento com enquitraídeos (*Enchytraeus albidus*): efeito de diferentes tempos de exposição, compostos químicos e propriedades do solo. **Captar, ciência e ambiente para todos**. vol. 1 p. 104-112, 2009.

NPIC. National Pesticide Information Center. Fipronil. Disponível em: <http://www.ace.orst.edu/info/nptn>. Acesso em: 03 out. 2018.

NPIC. National Pesticide Information Center. Fipronil 2004. Disponível em: <http://npic.orst.edu/reports/NPIC04AR.pdf>. Acesso em 12 out. 2018.

NUVOLARI, A. **Aplicação de lodos de esgotos municipais no solo: ensaios de respirometria para avaliar a estabilidade do lodo**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Civil, Área de Concentração: Recursos Hídricos e Saneamento, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, 158p, 1996.

OECD, 2002 - (Organization for Economic Co-operation and Development) - OECD Guideline for the Testing of Chemical N° 307. **Aerobic and Anaerobic Transformation in Soil**.

OECD, 2003 - (Organization for Economic Co-operation and Development) (2003) OECD - Guideline for Testing of Chemicals No. 220. **Enchytraeidae Reproduction Test**. Paris.

OLIVEIRA, P.R. **Avaliação dos efeitos do fipronil (ingrediente ativo do Frontline®) nos ovários de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) e no sangue periférico de roedores**. Rio Claro, 2010. 173f. Tese (Doutorado) – Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2010.

OLIVEIRA, D. **Toxicidade multigeracional do fipronil para *Folsomia candida* em solo natural tropical**. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Tecnologia – Unicamp, 2017.

OVERMYER, J.P.; MASON, B.N.; ARMBRUST, K.L. Acute toxicity of imidacloprid and fipronil to a nontarget aquatic insect, *Simulium vittatum* Zetterstedt cytospecies IS-7. **Bull Environ Contam Toxicol**. V. 74, p. 872–879, 2005.

PELAEZ, V.; SILVA, L. R. da; GUIMARÃES, T. A.; DAL RI.; F.; TEODOROVICZ, T. A. (des)coordenação de políticas para a indústria de agrotóxicos no Brasil. **Revista brasileira de inovação**. V.14 Campinas, SP, p.153-178, 2015.

PELOSI, C.; RÖMBKE, J. Are Enchytraeidae (Oligochaeta, Annelida) good indicators of agricultural management practices? **Soil Biol Biochem**. V. 100, p. 255-263, 2016.

RÉGO, A. P. J.; REGANHAN-CONEGLIAN, C. M.; MONTAGNOLLI, R.N.; BIDOIA, E. D. CO₂ Production of Soil Microbiota in the Presence of Ametryne and Biofertilizer. **Water, Air and Soil Pollution**. Vol 225, 2014.

ROCHE, H.; TIDOU, A. First Ecotoxicological Assessment Assay in a Hydroelectric Reservoir. The Lake Taabo (Côte d'Ivoire). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 82, n. 3, p. 322-326, 2009.

RODELLA, A. A.; SABOYA, L. V. Calibration for conductimetric determination of carbon dioxide. **Soil Biology and Biochemistry**. V.31, P. 2059-2060, 1999.

RÖMBKE, J., SCHMELZ, R. M.; PÉLOSI, C. Effects of Organic Pesticides on Enchytraeids (Oligochaeta) in Agroecosystems: Laboratory and Higher-Tier Tests. **Frontiers in Environmental Science**, 5(May), 2017.

RÖMBKE, J. Ecotoxicological laboratory tests with anchytraeids: A review. **Pedobiologia**. 2003.

SCORZA JUNIOR, R. P.; FRANCO, A. A. A temperatura e umidade na degradação de fipronil em dois solos de Mato Grosso do Sul. **Cienc. Rural**. vol.43, n.7, pp.1203-1209. Epub June 18, 2013. ISSN 1678-4596, 2013.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidade aguda comsementillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) In G. C.Morales (Ed.), Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas estandarización, intercalibración, resultados u aplicaciones (pp. 71–79). México: IMTA. 2004.

SPADOTTO, C. A.; SCORZA Jr., R. P.; DORES, E. F. G. C.; GLEBER, L.; MORAES, D. A. C.; **Embrapa Monitoramento por Satélite. Documentos**, 78, 46p, 2010.

SPOSITO, G.; ZABEL, A. The assessment of soil quality. **Geoderma**, Amsterdam, v. 114, n. 3/4, p. 143-144, 2003.

STANDEN, V. The production and respiration of an enchytraeid population in blanked bog. **J. Animal Ecol.** 42, 219–245, 1973.

TIECHER, H.B.; KOFOED-HANSEN, B.; JACOBSEN, N. Insecticidal activity of the enantiomers of fipronil. **Pest Manag Sci.** V. 59, p. 1273–1275, 2003.

TINGLE, C. C., ROTHER, J. A., DEWHUST, C. F., LAUER, S., KING, W. J., 2. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.** V. 176, p. 1–66, 2003.

TURCO, R. F.; BLUME, E. Indicators of soil quality. In: SIQUEIRA, J. O; MOREIRA, F. M. S.; LOPES, A. S.; GUILHERME, L. G. R.; FAQUIN, V.; FURTINI NETO, A. E.; CARVALHO, J. G. (Org.). **Inter-relação fertilidade, biologia do solo e nutrição de plantas**. Viçosa: SBCS ; Lavras: UFLA/DCS, p. 529-549, 1999.

USEPA, 1996. **New pesticide fact sheet**. PB96 - 181516. EPA 737 - F -96 -005. U.S. EPA Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances.

USEPA. U.S. **Environmental Protection Agency**. EPA/630/R-95/002F, Washington, DC, 1998.

VIEIRA, D.C.; NOLDIN, J.A.; DESCHAMPS, F.C.; JR, C.R. Ecological risk analysis of pesticides used on irrigated rice crops in southern Brazil. **Chemosphere**. Volume 162. Pages 48-54, 2016.

VÍLCHEZ, J. L.; PRIETO, A.; ARAÚJO, L.; NAVALÓN, A. Determination of fipronil by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**. Vol. 919 p 215, 2001.

WANG, W. et al. Influence of soil factors on the dissipation of a new pyrimidinyloxybenzoic herbicide ZJ0273. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n.5, p.3062-3067, 2010. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/toc/jafcau/58/5>>. Acesso em: 03 out. 2018.

WU, Y.; CHIANG, C.; LU, C. Respirometric evaluation by graphical analysis for microbial systems. **Environment Monitoring and Assessment**, 92(1-3), 137-152, 2004.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia aquática – Princípios e Aplicações. **Editora Rima**, São Carlos. 464 p., 2006.

ZORTÉA, T.; DA SILVA, A. S.; DOS REIS, T. R.; SEGAT, J. C.; PAULINO, A. T.; SOUSA, J. P.; BARETTA, D. Ecotoxicological effects of fipronil, neem cake and neem extract in edaphic organisms from tropical soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.166, p.207-214, 2018.

ZHU, G. et al. Microbial Degradation of Fipronil in Clay Loam Soil. **Water, Air, & Soil Pollution**, [s.l.], v. 153, n. 1-4, p.35-44, mar. Springer Nature. 2004.

ZHAO, X.; SALGADO, V.L. The role of GABA and glutamate receptors in susceptibility and resistance to chloride channel blocker insecticides. **Pest. Biochem. Physiol.**, v. 97, p. 153-160, 2010.