

ROSICLER PRESOTTO

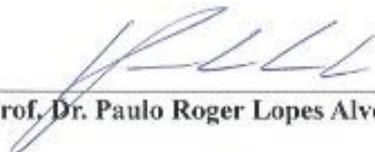
AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE FLUAZURON NO SOLO:
EFEITOS SOBRE A ESPÉCIE *FOLSOMIA CANDIDA*.

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito
para obtenção de grau de Bacharel em Engenharia Ambiental da
Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientadora: **Prof. Paulo Roger Lopes Alves**

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e
aprovado pela banca em: 02 / 12 / 2016

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Paulo Roger Lopes Alves – UFFS


Prof. Dr. Dilmar Baretta – UDESC


Prof. Dr. Jorge Luis Mattias - UFFS

Chapecó, 02/12/2016

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE FLUAZURON NO SOLO: EFEITOS SOBRE A ESPÉCIE *Folsomia candida*

Rosicler Presotto*

Paulo Roger Lopes Alves**

Resumo

O fluazuron é um medicamento utilizado no controle de parasitas bovinos, sendo este um inibidor da síntese da quitina em insetos, altamente eficaz no controle estratégico em carrapatos bovinos. Após a administração do fluazuron em animais, altos índices de excreção do ingrediente ativo (i.a.) na sua forma inalterada podem ocorrer através de fezes e urina, constituindo-se potencial contaminante do solo. Quando depositados no solo, os xenobióticos (ex. fluazuron) podem causar efeitos adversos à fauna e, conseqüentemente, aos serviços ecossistêmicos a ela associados. O presente trabalho teve o objetivo de avaliar os impactos do acaricida fluazuron sobre uma espécie de invertebrados da fauna do solo. Para tal foram realizados ensaios ecotoxicológicos terrestres a fim de determinar os impactos da utilização deste fármaco sobre a sobrevivência, reprodução e comportamento de colêmbolos *Folsomia candida*. Os ensaios foram realizados em Solo Artificial Tropical (SAT), em laboratório com condições de temperatura e luminosidade controladas. Os colêmbolos foram expostos a concentrações de 0,5; 1,0; 3,0; 5,0 e 10,0 mg de fluazuron kg⁻¹ de solo seco, bem como a dois controles: água deionizada e solvente (acetona). Efeitos negativos na reprodução dos colêmbolos foram verificados a partir da concentração de 5,0 mg kg⁻¹ e, além disso, verificou-se que os organismos evitaram os solos contaminados com todas as concentrações testadas, sendo estimado um valor de AC₅₀ (concentração que causa fuga de 50% dos organismos) igual a 1,78 mg kg⁻¹. Os resultados demonstraram efeitos negativos sobre a reprodução e comportamento dos colêmbolos expostos ao medicamento veterinário fluazuron em solo artificial, evidenciando o potencial tóxico do fármaco sobre organismos edáficos.

Palavras-chave: Ecotoxicologia Terrestre; Benzoilfeniluréias; Colêmbolos.

ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF FLUAZURON IN THE SOIL: EFFECTS ON THE SPECIES *Folsomia candida*

Abstract

Fluazuron is used in the control of bovine parasites, the drug is an inhibitor of chitin synthesis in insects, highly effective in the strategic control of bovine ticks. Following

*Acadêmica do curso de Engenharia Ambiental, da Universidade Federal da Fronteira Sul, e-mail: rosicler_presotto@hotmail.com

** Professor do curso de Engenharia Ambiental, da Universidade Federal da Fronteira Sul, e-mail: paulo.alves@uffs.edu.br

administration of fluazuron in animals, high levels of excretion of the active ingredient (i.a.) in its unchanged form may occur through faeces and urine, constituting a potential contaminant of the soil. When deposited in the soil, xenobiotics (example fluazuron) may cause adverse effects on fauna and, consequently, ecosystem services associated with it. The present work had the objective of evaluating the impacts of the acaricide fluazuron on a species of invertebrates of the fauna of the soil. For this, terrestrial ecotoxicological tests were carried out in order to determine the impacts of the use of this drug on the survival, reproduction and behavior of *Folsomia candida*. The tests were carried out in Tropical Artificial Soil (SAT), in a laboratory with controlled temperature and luminosity conditions. Collembolans were exposed to concentrations of 0.5; 1.0; 3.0; 5.0 and 10.0 mg of fluazuron kg⁻¹ dry soil, as well as two controls: deionized water and solvent (acetone). Negative effects on collembolans reproduction were verified from the concentration of 5.0 mg kg⁻¹. In addition, it was verified that the organisms had an avoidance behavior of contaminated soils with all the concentrations tested, being estimated a value of AC₅₀ (Concentration that causes a 50% leakage of organisms) equal to 1.78 mg kg⁻¹. The results showed negative effects on the reproduction and behavior of the exposed fluazuron collembolans in artificial soil, evidencing the toxic potential of the drug on edaphic organisms.

Keywords: Terrestrial Ecotoxicology; Benzoylphenylureas; Collembolans.

1. Introdução

A pecuária no Brasil tem destaque mundial devido alta produtividade. O rebanho efetivo de bovinos no país é expressivo, com números que lhe confere o título de segundo maior produtor mundial, com cerca de 212,3 milhões de cabeças em 2014, e também a posição de país com maior exportação de carne bovina no mundo (BRASIL, 2016).

O desenvolvimento da bovinocultura, o qual está relacionado ao melhoramento genético, à incorporação de tecnologias, segurança e qualidade em produção, é irrefutável no Brasil. Todavia, também devem ser considerados os prejuízos da atividade, entre os quais se destacam aqueles decorrentes do parasitismo causado por espécies que persistem no corpo do animal durante seu desenvolvimento. De acordo com Farias (2014), os prejuízos causados pela ocorrência de espécies parasitárias, tal como são os carrapatos, devem-se à redução de peso, a queda na produtividade leiteira, às falhas reprodutivas, lesões na pele, transmissão de patógenos, além do aumento de despesas com medicamentos curativos.

Atualmente, a forma mais eficaz de combater os carrapatos é através do controle químico, que se dá pelo uso de formulações comerciais de diferentes classes (inseticidas, acaricidas e carrapaticidas) e princípios ativos. Estas substâncias são frequentemente administradas nos animais quando os carrapatos estão na fase parasitária. Além da toxicidade dos compostos antiparasitários para os carrapatos, Souza (2008) alerta sobre o potencial tóxico destes produtos aos humanos expostos e aos animais tratados, além dos riscos ambientais advindos da permanência das substâncias ativas nos compartimentos ambientais, as quais também são potencialmente prejudiciais às demais populações dos ecossistemas.

Os antiparasitários utilizados no controle dos carrapatos são classificados em dois maiores grupos de ação: de contato ou sistêmicos. Os antiparasitários de contato causam toxicidade de maneira direta no parasita, causam toxicidade nas células em que têm contato. Por outro lado, os produtos sistêmicos são distribuídos pela corrente sanguínea do animal tratado, até atingir os órgãos vitais do parasita, onde causam a toxicidade (FURLONG; MARTINS; PRATA, 2005). Os grupos químicos mais utilizados no controle de parasitas são: Organofosforados, Piretróides, Formamidinas, Avermectinas, Fenilpirazóis e as Benzoilfeniluréias, os quais podem ser aplicados nos animais por meio de pulverização, imersão, injeção ou *pour on* (aplicação sobre o dorso do animal) (FURLONG; SALES, 2007).

Dentre as substâncias utilizadas no controle dos carrapatos, Mendonça (2010) destaca o ingrediente ativo (i.a.) fluazuron, pertencente ao grupo químico das Benzoilfeniluréias. O fluazuron é um antiparasitário regulador de crescimento de artrópodes, pois interfere na produção de quitina - substância que enrijece a cutícula dos carrapatos - impossibilitando a mudança de estágio de desenvolvimento, o crescimento e, conseqüentemente, impedindo a sua reprodução. A administração de fluazuron nos animais é feita na forma de *pour on*, e sua recomendação técnica de tratamento consiste na dosagem entre 1,5 a 2,5 mg de ingrediente ativo por kg de peso corporal vivo, o qual pode ser repetido entre 3 a 6 meses (FURLONG e SALES, 2007; EMEA, 2006).

O fluazuron é altamente lipofílico, sendo depositado por semanas na gordura corporal do animal tratado, onde então é liberado lentamente para o sangue podendo atingir o parasita ou então ser excretado (EMEA, 2006). Este efeito de longa duração, além de características como elevada especificidade, baixa toxicidade para mamíferos e atividade em baixas concentrações, conferem ao

fluazuron um caráter de antiparasitário promissor no controle estratégico de carrapatos (VIEIRA, 2009).

Uma das formulações comerciais à base de fluazuron é o produto Acatak[®]. De acordo com as recomendações técnicas, este produto apresenta-se como adequado no controle estratégico de espécies parasitárias e a aplicação deve ser feita em todos os animais do rebanho, antes do início de infestações sazonais.

Após a aplicação do medicamento Acatak[®] no animal, parte do fluazuron pode ser metabolizado e outra parte, que não é transformada, pode ser excretada na forma de fezes e urina, posteriormente. Testes experimentais realizados em bovinos ressaltam os altos índices de excreção do fluazuron, ao se realizar a injeção subcutânea de doses de 1,5 mg kg⁻¹ de peso corporal de fluazuron em bovinos. Foi observado que cerca de 62 a 81% do fármaco foi excretado na sua forma inalterada (FAO, 1998), o que pode atribuir riscos ambientais ao uso deste medicamento.

De acordo com Melo et al. (2008), após o uso de fármacos em organismos vivos, seja em humanos ou em animais, a excreção do medicamento pode ocorrer parcialmente na sua forma original ou em seus metabólitos. Quantidades entre 40 a 90% da dose ingerida podem ser eliminadas e dispostas no ambiente, contudo, a rota dos fármacos nos compartimentos ambientais é de difícil determinação, pois depende de diferentes características e propriedades de cada local.

Considerando que a eliminação destes medicamentos pelos animais terá como destino final o solo, entre outros compartimentos ambientais e diante do alto índice de eliminação do fluazuron em fezes de animais tratados, torna-se questionável os impactos dessa substância aos indivíduos da fauna do solo. Sabe-se que estes organismos exercem funções essenciais na ciclagem de nutrientes e manutenção de processos que asseguram a conservação do sistema ativo e sustentável (ALVES & CARDOSO, 2012).

São poucos os estudos relacionados aos impactos de medicamentos veterinários nos organismos invertebrados do solo (NUNES, DAAM e ESPÍNDOLA, 2016; KRYGER et al., 2007; KRYGER, DESCHODT e SCHOLTZ, 2005; ZORTÉA, 2014). Zortéa (2014) desenvolveu testes ecotoxicológicos para determinar os efeitos da aplicação de diversos fármacos no solo. Os testes foram realizados em Solo Artificial Tropical (SAT) para verificar impactos sobre a reprodução de colêmbolos da espécie *Folsomia candida*, e os resultados deste demonstraram que os medicamentos com princípio ativo Fipronil e Ivermectina apresentaram redução

significativa da reprodução de colêmbolos nas menores doses testadas (0,3 e 2,0 mg de ingrediente ativos kg^{-1} de solo seco, respectivamente). Efeitos negativos na reprodução de colêmbolos expostos a doses crescentes de fluazuron foram observados a partir da dose 0,8 mg kg^{-1} , enfatizando o potencial tóxico aos colêmbolos, mesmo em doses baixas de diferentes fármacos empregados no controle de parasitas bovinos (ZORTÉA, 2014).

Segundo Alves e Cardoso (2016), considera-se uma das ferramentas mais relevantes de investigação de substâncias no ambiente a utilização de ensaios ecotoxicológicos laboratoriais padronizados com invertebrados terrestres. Estes ensaios podem auxiliar na avaliação dos perigos dos contaminantes no solo e, por vezes, são suficientes para determinar os níveis de risco ecológico e os limites aceitáveis de exposição dos contaminantes para a biota do solo e para os seres humanos (SHUGART, 2009 apud ALVES e CARDOSO, 2012).

De acordo com Alves e Cardoso (2016), os colêmbolos da espécie *Folsomia candida* são usualmente utilizados em testes ecotoxicológicos padronizados, pois esta espécie apresenta sensibilidade à presença de contaminantes no solo e as respostas obtidas nos ensaios podem apontar níveis de estresse ambiental e identificar o risco ecológico da substância teste.

Diante da vulnerabilidade reconhecida pelo uso indiscriminado de substâncias antiparasitárias no meio rural, torna-se necessário averiguar os riscos ecotoxicológicos da disposição do fluazuron no solo, a fim de determinar as concentrações limites de exposição para proteger os organismos da fauna do solo. Frente a isso, o objetivo deste estudo foi avaliar os impactos da formulação comercial Acatak[®] (i.a. fluazuron) sobre a sobrevivência, reprodução e comportamento de colêmbolos da espécie *Folsomia candida*, através de ensaios ecotoxicológicos terrestres.

2. Materiais e Métodos

A realização de testes ecotoxicológicos seguiram metodologias descritas pela ISO (*International Organization for Standardization*) para os ensaios de reprodução (toxicidade crônica) e comportamental (teste de fuga). Os organismos utilizados nos ensaios foram criados em ambiente laboratorial e a substância testada foi o produto

comercial Acatak[®], com princípio ativo fluazuron. Os ensaios foram realizados em solo artificial e mantidos em temperaturas controladas.

2.2. Organismos Teste

Os organismos utilizados nos testes ecotoxicológicos foram colêmbolos da espécie *Folsomia candida*, criados em laboratório em ambiente controlado. O ambiente de criação foi constituído de temperatura de $20 \pm 1^\circ \text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas.

O substrato de cultivo dos colêmbolos é composto por gesso e carvão ativado na proporção de 10:1, respectivamente. Para umidificar o meio foram adicionadas 60 g de água deionizada para cada 100 g da mistura. Os recipientes plásticos para a criação dos organismos tinham dimensões de 10 cm de diâmetro e 6 cm de altura e possuíam tampas com pequenas perfurações que permitam a troca gasosa. O alimento utilizado para a criação dos colêmbolos foi fermento biológico seco, oferecido aproximadamente 10 g aos organismos com frequência quinzenal juntamente com algumas gotas de água deionizada. Por recomendação da ISO (1999), foram retirados os restos de alimento antes de alimentar novamente, a fim de não deixar acumular alimento no recipiente.

Para realizar os testes de toxicidade crônica, foram utilizados organismos com idade sincronizada, com 10 a 12 dias de vida. Para isso, indivíduos adultos provenientes de placas selecionadas foram adicionados em um recipiente para oviposição durante dois dias, e então os adultos foram removidos. Após o início da eclosão dos ovos do recipiente de oviposição, foram retirados os demais ovos e contabilizada a idade dos organismos. Decorridos 10 dias do início da eclosão, os colêmbolos estavam aptos a serem empregados nos testes.

2.3. Solo Teste

O solo empregado nos testes foi uma adaptação do solo artificial OECD (1984), denominado Solo Artificial Tropical (SAT) por Garcia (2004). Este solo foi composto pela mistura de 75% de areia, 20% de argila branca (caulim) e 5% de fibra de coco.

Com base nas recomendações da ISO 11267 (1999), o pH do SAT foi corrigido para $6,0 \pm 0,5$ pela adição de carbonato de cálcio (CaCO_3). Além disso, a quantidade de água no solo foi ajustada para 65% da capacidade máxima de retenção de água no solo.

2.4. Substância Teste

Para realização dos testes ecotoxicológicos, o SAT foi contaminado com doses crescentes do fármaco Acatak[®], com princípio ativo fluazuron. As concentrações testadas foram de 0,5; 1,0; 3,0; 5,0 e 10,0 mg de fluazuron por kg^{-1} de solo seco (mg kg^{-1}), as quais foram selecionadas com base no estudo realizado por Zortéa (2014), que aferiu efeitos significativos de fluazuron em teste de reprodução com *Folsomia candida* em doses a partir de $0,8 \text{ mg kg}^{-1}$, através do uso produto comercial Acatak[®].

Considerando que fluazuron é uma substância insolúvel em água, foi empregada acetona pura (99%) para solubilização da substância teste, na proporção de 25 mL de acetona para cada 100 g da fração areia do SAT. Após a diluição do produto com a acetona, as adições da solução (acetona + fluazuron) ocorreram separadamente nas concentrações especificadas na fração areia do SAT. A mistura areia + tratamento foi homogeneizada. A seguir, a areia permaneceu em uma capela de exaustão durante 24 horas para deixar evaporar os resíduos de solvente e, em seguida, foram adicionados os volumes restantes da fração areia, o caulim e a fibra de coco, necessários para compor o SAT.

Além das concentrações especificadas, foram realizados dois tratamentos controles, nos quais não há a adição de fármaco. Em um dos controles foi adicionado somente água deionizada e no outro controle foi utilizado somente o solvente no solo, com a devida correção da umidade com água deionizada e em concentração igual à maior concentração de solvente utilizada para a diluição da concentração de 0,5 mg de fluazuron (24,93 mL de acetona), a fim de verificar a influência dessa substância nos resultados obtidos.

2.5. Teste de Reprodução

Testes de toxicidade crônica com colêmbolos da espécie *Folsomia candida* são padronizados pela ISO 11267 (1999), a qual descreve a metodologia a ser seguida para testar os efeitos de substâncias químicas na reprodução de colêmbolos em solo artificial.

A duração do teste foi de 28 dias e ocorreu em ambiente laboratorial com condições de temperatura controlada de $20 \pm 1^\circ \text{C}$ e fotoperíodo 12 h.

Para a realização dos ensaios, foram utilizados recipientes de plástico com tampa perfurada para entrada de ar. As dimensões do recipiente para os testes são: 7,5 cm de diâmetro e 6,0 cm de altura. Foram adicionados 30 g de solo úmido em cada recipiente com a respectiva concentração do produto a ser testado, juntamente com 10 colêmbolos juvenis (com idade entre 10 e 12 dias). Foram realizadas cinco repetições para cada dose testada e oito repetições para os controles.

Os organismos foram alimentados no momento da instalação do ensaio e após 14 dias do início do teste. Para tal, foram adicionadas quantidades aproximadas de 2 mg de fermento biológico seco em cada recipiente teste, juntamente com 10 gotas de água deionizada sobre o alimento.

Após 28 dias da montagem dos testes, foram realizadas as avaliações da reprodução e sobrevivência dos colêmbolos. Cada recipiente contendo o solo contaminado/controle foi preenchido com água para forçar a flutuação dos indivíduos vivos e então foram adicionadas algumas gotas de tinta preta para aumentar o contraste entre a água e organismos. A mistura foi revolvida cuidadosamente com o auxílio de uma espátula e, após a flutuação dos organismos, foi possível contabilizar visualmente o número de colêmbolos adultos sobreviventes. Para a contagem do número de juvenis, foram tiradas fotografias com vista superior do recipiente, com equipamento de alta resolução. A contagem do número de indivíduos juvenis gerados foi realizada com o auxílio de um software computacional (ALVES, 2015).

De acordo com a ISO 11267 (1999), devem ser cumpridos os seguintes critérios para validação dos testes de toxicidade crônica: a taxa de reprodução deve atingir um mínimo de 100 juvenis por recipiente do tratamento controle, a letalidade dos adultos não deve exceder 20% nos recipientes controles e o coeficiente de variação da reprodução no controle não deve ser maior do que 30%.

2.6. Teste de Fuga

O teste de fuga foi realizado seguindo a metodologia da ISO 17512-2 (2008). O recipiente plástico utilizado tinha dimensões de 7,5 cm de diâmetro e 6 cm de altura, e foi dividido em duas partes iguais por um divisor plástico introduzido no centro. Em um dos lados do recipiente, foram adicionados 30 g de solo contaminado e do outro lado 30 g de solo controle (sem adição de contaminante ou solvente). Para o tratamento controle, foram adicionados 30 g de solo úmido em cada lado (sem adição de contaminante ou solvente). Para os controles contendo solvente, em um dos lados do recipiente foram adicionados 30 g de solo controle e do outro lado 30 g de solo contendo apenas solvente e água deionizada para correção do pH. Foram realizadas quatro repetições para cada tratamento e cinco repetições para os controles.

Após a adição do solo nos compartimentos, a divisória plástica foi removida e, sobre a linha de separação visual das partes, foram adicionados 20 colêmbolos adultos. Os organismos não foram alimentados durante o ensaio e os recipientes foram cobertos com tampa perfurada para permitir a entrada de ar.

O teste de fuga teve duração de 48 horas. Decorrido o tempo do ensaio, o anteparo divisório foi colocado novamente e o solo de cada lado foi transferido cuidadosamente para recipientes individuais, para facilitar a contagem dos colêmbolos. Com o solo no recipiente individual, a amostra foi submergida com água e algumas gotas de tinta preta foram adicionadas para facilitar a contagem dos indivíduos vivos (que flutuaram). Com isso, foi possível determinar visualmente o número de indivíduos presentes em cada lado do recipiente, aferindo o efeito de fuga que os organismos tiveram diante do solo contaminado.

De acordo com a ISO 17512-2 (2008), devem ser cumpridos os seguintes critérios de validação dos testes de comportamento para os colêmbolos: a taxa de mortalidade deve ser inferior a 20%, e a distribuição dos organismos nos recipientes controles (com água) deverá estar entre de 40 a 60%, demonstrando não haver preferência significativa em um dos lados.

2.7. Análise dos Dados

Os resultados dos ensaios de reprodução foram testados através de análise de variância (ANOVA) e, em caso de diferença significativa, os valores médios dos tratamentos foram comparados com os controles pelo teste de Dunnett, por meio do software R 3.0.2., a fim de determinar as concentrações que causaram redução significativa no número de juvenis ($p < 0,05$), quando comparadas ao controle. A partir destes resultados, foram determinados os valores de NOEC (maior dose testada sem efeito observado) e LOEC (menor dose testada com efeito observado) dos ensaios de toxicidade crônica (reprodução). A sobrevivência dos colêmbolos ao final do teste de reprodução também foi avaliada estatisticamente, a fim de determinar efeitos e valores de NOEC e LOEC para a letalidade sobre os organismos adultos no final do teste de reprodução.

Para os ensaios de reprodução foram determinados ainda os valores de EC_x (concentração que reduz a reprodução dos organismos em X%, em relação ao controle). As concentrações de EC_{20} (concentração de efeito de 20% dos organismos) e EC_{50} (concentração de efeito de 50% dos organismos) foram estimadas através de regressão não linear com modelos pré-estabelecidos por Environment Canadá (2007), com o uso do software Statistica 7.0[®].

Os percentuais de fuga dos ensaios comportamentais foram determinados através da equação (1) (ISO 17512-2, 2008):

$$A = \left(\frac{C - T}{N} \right) * 100 \quad (1).$$

onde A é a porcentagem de fuga, C é o número de indivíduos no solo controle, T é o número de indivíduos no solo teste e N é o número total de indivíduos no ensaio.

Os resultados obtidos foram analisados, de modo a obter significância das respostas de fuga, por meio do *Fisher's exact test*, utilizando o teste de duas caudas para o duplo controle, e o teste de uma cauda para os tratamentos com solo contaminado (ZAR, 1999). Com os resultados do teste de fuga, foi possível determinar a AC_{50} (concentração que causa fuga de 50% dos organismos), através do software PriProbit[®] 1.63 (SAKUMA, 1999).

3. Resultados

3.1. Teste de Reprodução

No ensaio de toxicidade crônica com colêmbolos da espécie *F. candida*, a mortalidade média no recipiente controle foi de 17,14%, além disso, o número médio de juvenis por recipiente controle foi de 223 juvenis. O coeficiente de variação no controle apresentou valor de 29,2%. Portanto, todos os critérios exigidos para validação do teste foram cumpridos, conforme recomendados pela ISO 11267 (1999).

A diferença entre os valores de pH do SAT, no início e final do ensaio de reprodução com colêmbolos *F. candida*, foi relativamente baixa, uma vez que se observou variação máxima de 0,2 unidades, considerando todos os tratamentos e controles, como apresentado a Tabela 1.

Tabela 1 – Valores de pH do SAT no início e final do ensaio (após 28 dias) de toxicidade crônica (reprodução) com colêmbolos *Folsomia candida*.

Tratamento	pH inicial	pH final
Controle	5,6	5,7
Controle Solvente	5,5	5,7
0,5*	5,6	5,7
1,0*	5,5	5,5
3,0*	5,6	5,6
5,0*	5,5	5,6
10,0*	5,5	5,7

*Concentrações em mg de fluazuron kg⁻¹ solo seco.

Reduções sobre a reprodução dos colêmbolos foram observadas somente nas maiores concentrações de fluazuron testadas, sendo significativa ($p < 0,05$) a diferença entre o controle com água e as concentrações de 5,0 e 10,0 mg kg⁻¹, onde verificou-se um valor de LOEC igual a 5,0 mg kg⁻¹ (Tabela 2). Nas concentrações mais baixas de fluazuron (0,5; 1,0 e 3,0 mg kg⁻¹) não houve redução significativa ($p < 0,05$) na reprodução dos colêmbolos, quando comparadas ao controle e, portanto, o valor de NOEC foi de 3,0 mg kg⁻¹. Além disso, não houve efeito observado sobre a reprodução dos organismos nos recipientes contendo tratamento controle solvente. A Figura 1 ilustra os resultados do ensaio de reprodução.

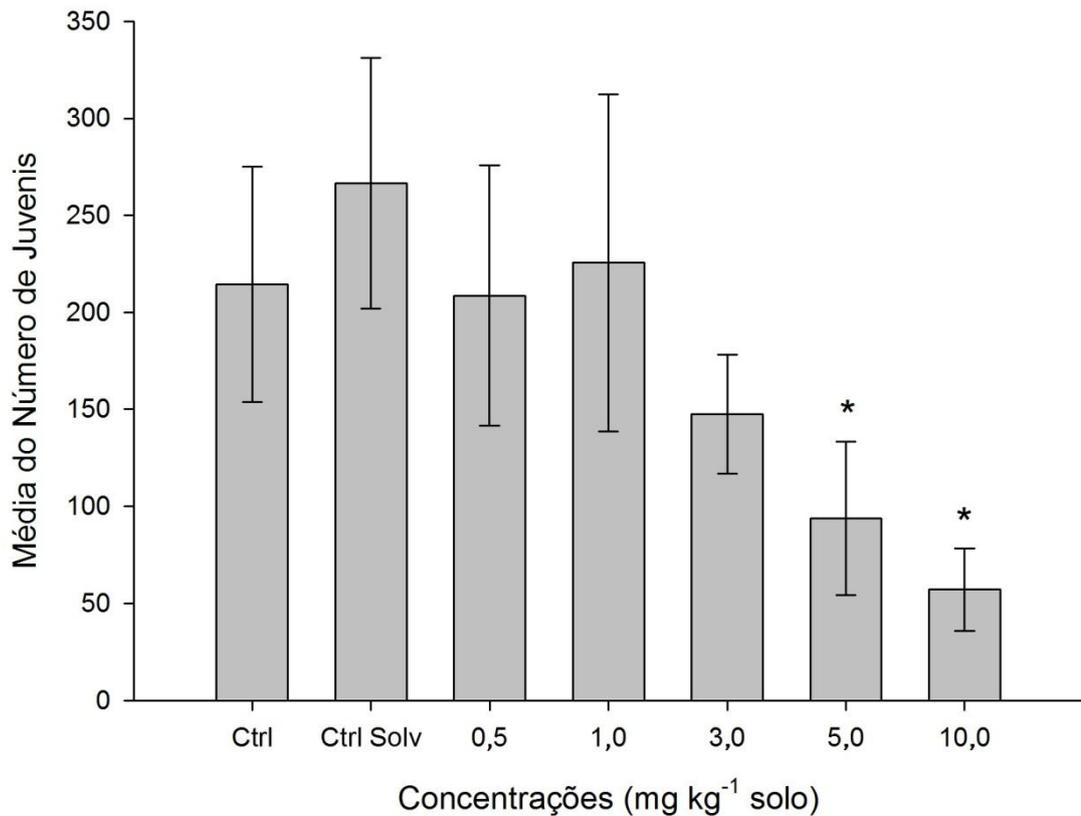


Figura 1 - Número médio de juvenis de colêmbolos *Folsomia candida* encontrados em Solo Artificial Tropical (SAT) exposto a concentrações crescentes de fluazuron, após 28 dias. Asterisco (*) indica redução significativa no número de juvenis, comparado ao controle ($p < 0,05$) pelo teste de Dunnett. (⊥) Desvio padrão. Controle (Ctrl); Controle com solvente acetona (Ctrl Solv). Concentrações em mg de fluazuron kg⁻¹ solo seco.

Os parâmetros EC₂₀ e EC₅₀ foram estimados com base na análise de regressão não linear, através de um Modelo Logístico (Environment Canada, 2007), que foi o que melhor se adaptou aos dados do ensaio. Os valores estimados para o EC₂₀ foi de 2,35 mg kg⁻¹ e para o EC₅₀ foi de 4,48 mg kg⁻¹ (Tabela 2).

A partir do ensaio de reprodução, também foi verificado a mortalidade dos colêmbolos adultos, observando o número de indivíduos adultos encontrados ao final deste ensaio (Figura 2). Somente na maior concentração testada é que número de organismos adultos encontrados ao final do ensaio foi significativamente reduzido, em relação ao controle, verificando-se um valor de LOEC igual a 10,0 mg kg⁻¹ (Tabela 2). Nas menores concentrações (0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 mg kg⁻¹), não houve efeito significativo sobre a sobrevivência dos indivíduos adultos, em relação ao controle. Neste caso, verificou-se um valor de NOEC igual a 5,0 mg kg⁻¹ (Tabela 2).

A Figura 2 ilustra os resultados da sobrevivência dos colêmbolos adultos no final do ensaio de toxicidade crônica, indicando que houve certa mortalidade.

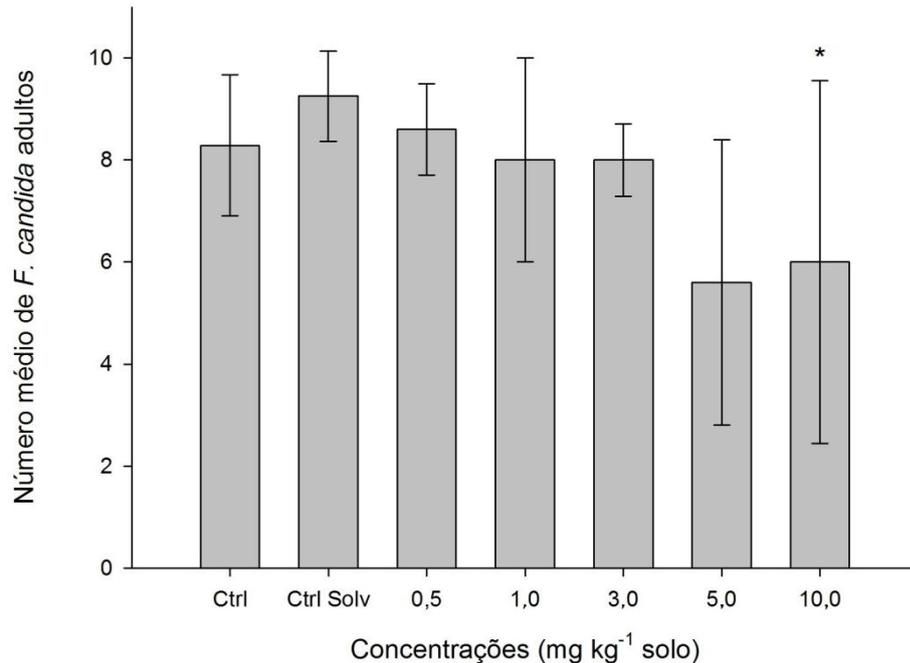


Figura 2 - Número médio de colêmbolos *Folsomia candida* adultos encontrados em Solo Artificial Tropical (SAT), após exposição a concentrações crescentes de fluazuron, decorridos 28 dias. Asterisco (*) indica redução significativa no número de adultos, comparado ao controle ($p < 0,05$) pelo teste de Dunnett. (┐) Desvio padrão. Controle (Ctrl); Controle com solvente acetona (Ctrl Solv). Concentrações em mg de fluazuron kg⁻¹ solo seco.

Tabela 2 - Parâmetros ecotoxicológicos (NOEC, LOEC, EC₂₀, EC₅₀) calculados com base em teste de reprodução com colêmbolos *Folsomia candida*, expostos a concentrações crescentes de fluazuron em solo artificial tropical (SAT). Concentrações em mg de fluazuron kg⁻¹ solo seco.

Característica observada	Parâmetro	Concentração (mg kg ⁻¹)
Mortalidade	NOEC	5,0
	LOEC	10,0
Reprodução	NOEC	3,0
	LOEC	5,0
	EC ₂₀	2,35 (0,58 - 4,13)*
	EC ₅₀	4,48 (2,55 - 6,4)*

*Limites de confiança (Inferior e Superior) dos valores estimados.

3.2. Teste de Fuga

No ensaio de fuga, os critérios de validação recomendados pela ISO 17512-2 (2008) foram atendidos. Os colêmbolos apresentaram distribuição uniforme nos controles duplos, sendo que esta distribuição foi em média de 54,63% e 45,37% para cada lado, demonstrando não haver preferência significativa para nenhum dos lados. Além disso, a taxa máxima de mortalidade de adultos nos tratamentos foi de 5%.

Os colêmbolos evitaram os solos contaminados em todas as concentrações testadas. Foi verificado o efeito de fuga significativo ($p < 0,05$) nos tratamentos controle solvente, 0,5; 1,0; 3,0; 5,0 e 10,0 mg kg⁻¹, conforme apresentado na Figura 3. O valor de AC₅₀ estimado para o teste de fuga foi de 1,78 mg kg⁻¹ e os limites não puderam ser determinados.

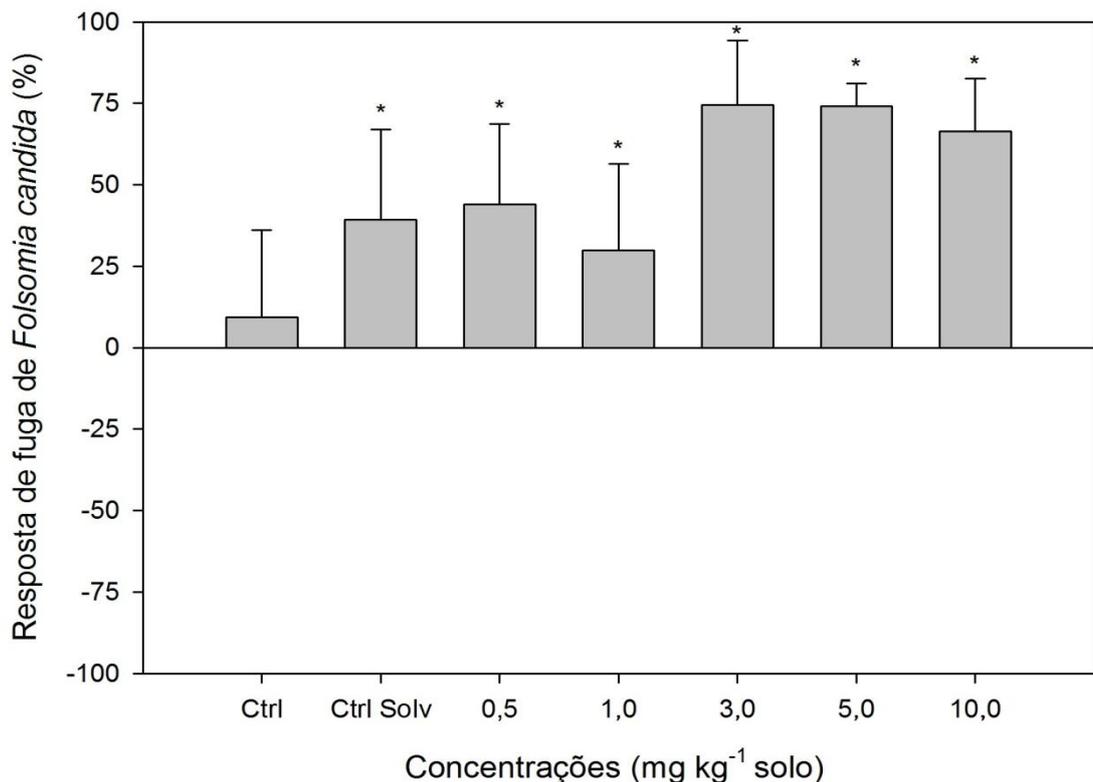


Figura 3 – Resposta de fuga de colêmbolos *Folsomia candida* em Solo Artificial Tropical (SAT) expostos a concentrações crescentes de fluazuron, após 48 horas. Valores expressos em média de porcentagem de fuga. Asterisco (*) indica fuga significativa dos colêmbolos dos solos contaminados ($p < 0,05$) pelo *Fisher's exact test*. (┐) Desvio padrão. Controle (Ctrl); Controle com solvente acetona (Ctrl Solvente). Concentrações em mg de fluazuron kg⁻¹ solo seco.

4. Discussão

Os resultados do presente estudo apontam para os impactos negativos que o emprego do medicamento Acatak[®], com princípio ativo fluazuron, representa à colêmbolos da espécie *Folsomia candida*, em ensaios padronizados realizados em ambiente controlado, em solo artificial tropical (SAT). A presença do fluazuron refletiu negativamente na reprodução e no comportamento dos colêmbolos, sendo este um indício de que, se os mesmos resultados se repetirem em situações naturais de campo, a utilização deste fármaco pode ser considerada um fator de risco para aos organismos edáficos, bem como para os serviços ecossistêmicos a eles associados.

De acordo com Khan et al. (2008), medicamentos ectoparasitas são altamente tóxicos para diferentes organismos do solo, devido ao modo de ação destes fármacos, que usualmente atingem o sistema nervoso de artrópodes, revelando o potencial tóxico aos organismos não alvo do solo. O fluazuron, em especial, atua na inibição da síntese da quitina na cutícula do inseto. Considerada a principal constituinte dos esqueletos de artrópodes, a quitina atua como componente estrutural destes organismos (MERZENDORFER, 2005 apud GOMES), sendo elemento fundamental no desenvolvimento de insetos. Uma vez que os colêmbolos são organismos pertencentes ao filo Arthropoda, que se caracteriza por animais invertebrados que possuem exoesqueleto rígido, os colêmbolos tem boa parte de seu esqueleto formado por quitina. Neste sentido, é provável que os indivíduos da espécie *F. candida* utilizados neste estudo tenham sido afetados diretamente pela inibição da síntese de quitina causada pelo fármaco fluazuron, o que pode ser a explicação para os efeitos tóxicos observados.

Na literatura consultada, poucos estudos avaliaram a toxicidade do fluazuron em organismos edáficos. Zortéa (2014) verificou efeitos negativos na reprodução de colêmbolos expostos a tratamentos crescentes dos fármacos: Ivermectina, Fipronil, Fluazuron e Closantel. Especificamente para o fluazuron, o estudo de Zortéa (2014) revelou efeitos negativos a partir da concentração de 0,8 mg de fluazuron kg⁻¹ de solo seco. Por outro lado, Kryger et al. (2007), avaliaram a sobrevivência e a reprodução de besouro *Onthophagus gazella* expostos a fluazuron e não verificaram efeitos negativos sobre o organismo testado. Outro estudo que relaciona o besouro *Onthophagus gazella* com medicamentos veterinários realizado por Kryger,

Deschodt e Scholtz (2005), avaliaram alterações na comunidade de besouros em campo diante de bovinos submetidos ao tratamento de fluazuron e ivermectina (em combinação), os resultados não verificaram nenhum efeito adverso sobre a espécie de besouros.

Além destes, estudos com outras substâncias químicas vêm sendo testados sobre a reprodução e mortalidade de colêmbolos. Rosa et al. (2015) avaliaram o efeito dos pesticidas Calda Bordalesa (considerado fungicida e bactericida) e óleo de Neem (inseticida) em solo artificial e verificaram que os pesticidas afetaram negativamente o potencial reprodutivo de colêmbolos da espécie *F. candida*. Bem como o estudo realizado por Nunes, Daam e Espíndola (2016) que avaliaram o ingrediente ativo abamectina sobre a sobrevivência, morfologia e reprodução de minhocas *Eisenia andrei* em condições tropicais e verificaram sensibilidade dos organismos expostos ao pesticida.

Estudos que avaliam o comportamento de fuga em SAT por colêmbolos *Folsomia candida* foi realizado por Zortéa et al. (2015), em que o inseticida cipermetrina, da família dos piretróides, também empregado no controle de ectoparasitas em animais e pragas na lavoura, causou efeito de fuga nos organismos, com um valor de AC_{50} igual a 6,47 mg de cipermetrina kg^{-1} de solo.

O comportamento de fuga observado em todas as concentrações testadas evidencia o potencial do fluazuron causar impacto sobre o comportamento dos organismos expostos. Em relação ao comportamento de fuga dos organismos verificado no tratamento controle solvente (Figura 3), atribui-se as alterações às variações obtidas no ensaio, já que este tratamento não afetou a reprodução dos organismos.

Com os resultados deste estudo, foi estimado o valor de EC_{20} , o qual permite inferir que na concentração 2,35 $mg\ kg^{-1}$ o efeito já seria observado em 20% da população de organismos. Por outro lado, o valor de NOEC para o ensaio de reprodução foi de 3,0 $mg\ kg^{-1}$. Neste caso, é possível verificar que a maior dose testada sem efeitos significativos (NOEC), já afetaria negativamente a reprodução de *F. candida* em aproximadamente 20%. Além disso, o valor estimado para o EC_{50} foi de 4,48 $mg\ kg^{-1}$, demonstrando que a concentração que causaria efeitos negativos em 50% da população foi inferior ao valor de LOEC (Tabela 2) para o teste de reprodução. Isto permite interpretar que, devido às variações atribuídas a condições não controladas do ensaio, as diferenças somente foram consideradas

significativas (ex. LOEC = 5,0 mg kg⁻¹) quando uma boa parte da população foi afetada (maior que 50 %), indicando que os valores dos EC_x devem ser fortemente considerados na elaboração dos limites de exposição de fluazuron nos solos.

Embora o verdadeiro risco do acaricida fluazuron esteja associado à sua presença em dejetos dos animais, neste estudo foi verificado apenas o potencial tóxico da substância em sua formulação comercial, quando adicionada diretamente no solo. Entretanto, há uma série de estudos que relaciona o potencial tóxico de dejetos animais aos organismos do solo, os quais vêm revelando impactos negativos pelo uso destes materiais como biofertilizantes aplicados diretamente no solo. Os efeitos prejudiciais aos organismos do solo, tais como: aumento da mortalidade, impactos na reprodução e no comportamento de colêmbolos e minhocas já foram verificados em estudos com exposição a tratamentos com dejetos suínos (MACCARI et al., 2016; SEGAT et al., 2015). Entretanto, devido ao fato dos dejetos serem matrizes orgânicas complexas, torna-se difícil identificar quais são os principais contaminantes que contribuem para este impacto e, em geral, as toxicidades vem sendo atribuídas à presença metais pesados (Segat et al., 2015), medicamentos veterinários (MACCARI et al., 2016), entre outros. Dessa forma, estudos com avaliação da toxicidade de medicamentos de forma isolada, tal como foi o objetivo deste trabalho, são necessários para a compreensão das respostas quando os mesmos forem associados à excreção, com a finalidade de proteger os organismos edáficos.

5. Conclusão

A reprodução dos colêmbolos *Folsomia candida* foi reduzida quando os organismos foram expostos a tratamentos crescentes de fluazuron em SAT, a partir da concentração de 5 mg kg⁻¹.

Além de afetar a reprodução, efeitos significativos na reação comportamental dos colêmbolos revelou evitação ao solo contaminado com todas as concentrações testadas, a partir de 0,5 mg kg⁻¹, evidenciando o impacto da substância testada sobre o comportamento de *F. candida*.

Estes resultados evidenciam o potencial tóxico de fluazuron em solo artificial tropical em laboratório, contudo, para se aumentar a relevância ecológica dos

resultados, recomenda-se a realização de novos ensaios com outras espécies, ensaios em solos naturais, bem como testes em condição de campo e semi-campo.

REFERÊNCIAS

ALVES, P. R. L. **Avaliação ecotoxicológica da vinhaça de cana-de-açúcar no solo**. 2015. 140 f. Tese (Doutorado). Área de Concentração: Solos e Nutrição de Plantas, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

ALVES, P. R. L.; CARDOSO, E. J. B. N. **Overview of the Standard Methods for Soil Ecotoxicology Testing**. In: LARRAMENDY, M. L.; SOLONESKI, S. (Org.). *Invertebrates - Experimental Models in Toxicity Screening*. 1ed. Rijeka: InTech, 2016, p. 35-56.

ALVES, P. R. L.; CARDOSO, E. J. B. N. **Soil Ecotoxicology**. In: Dr. Ghousia Begum (Ed.). *Ecotoxicology*. Rijeka: InTech, 2012. cap. 2, p. 27-50.

BRASIL. IBGE. **PPM 2014: rebanho bovino alcança 212,3 milhões de cabeças**. Disponível em: <<http://censo2010.ibge.gov.br/noticias-censo.html?view=noticia&id=1&idnoticia=3006&busca=1&t=ppm-2014-rebanho-bovino-alcanca-212-3-milhoes-cabecas>>. Acesso em: 22 abr. 2016.

EMEA (European Medicines Agency). **Committee for medicinal products for veterinary use: Fluazuron**. Summary Report, 5 p., London, UK, abr. 2006.

Disponível em:

<http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Maximum_Residue_Limits_-_Report/2009/11/WC500014284.pdf>. Acesso em: 20 abr. 2016.

ENVIRONMENTAL CANADA. **Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Test**. Environmental Protection Series, EPS 1/RM/46, 2005 with 2007 updates. Ottawa: Environmental Canada, 2007.

FAO. **Residues of some veterinary drugs in animal and foods**. 1998. Department of Pharmacology Faculty of Pharmaceutical Sciences Chulalongkorn, University Bangkok, Thailand. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/w8338e/w8338e09.htm>>. Acesso em: 22 abr. 2016.

FARIAS, J. A. **Efeito acaricida *in vitro* de extratos de *Baccharis trimera*, *Vernonia nudiflora* e *Eupatorium buniifolium* (Asterales: Asteraceae) em larvas e adultos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)**. 2014. 107 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2014.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R. de S.; PRATA, M. C. A. **Carrapato: problemas e soluções**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005.

FURLONG, J.; SALES, R. de O. Controle Estratégico de Carrapatos no Bovino de Leite: Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Ceará, v.

1, n. 2, p.44-72, mar. 2007. Disponível em:
<<http://www.higieneanimal.ufc.br/seer/index.php/higieneanimal/article/view/46>>.
Acesso em: 20 abr. 2016.

GARCIA, M.V.B. **Effects of pesticides on soil fauna**: development of ecotoxicological test methods for tropical regions. 291f. Tese (Doutorado) – Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät, Universidade de Bonn, Alemanha. 2004.

GOMES, D.S. **Metabolismo de quitina: síntese e degradação**. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Estadual de Santa Cruz.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 11267**: Soil quality – Inhibition of Reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by Soil Pollutants. Geneva, 1999. 16 p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 17512 - 2**: Soil quality – avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behavior. pt 2: test with collembolans (*Folsomia candida*). Geneva, 2008 b. 20 p.

KRYGER, U. et al. Effects of cattle treatment with a fluazuron pour-on on survival and reproduction of the dung beetle species *Onthophagus gazella* (Fabricius). **Veterinary Parasitology**, v. 143, p.380-384. 2007.

KRYGER, U.; DESCHODT, C.; SCHOLTZ, C. H. Effects os fluazuron and ivermectina treatment of cattle on the structure of dung beetle communities. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. v. 105, p. 649-656, 2005.

MACARRI, A.P. et al. Ecotoxicological effects of pig manure on *Folsomia candida* in subtropical Brazilian soils. **Journal of Hazardous Materials**, v.314, p. 113-120. 2016.

MELO, S.A.S., et. al. Degradação de fármacos residuais por processos oxidativos avançados. **Revista Química Nova**. vol. 32, n. 1, p. 188-197, 2008.

MENDONÇA, R. P. **Atividade endectocida, segurança clínica e farmacocinética de resíduos de uma nova alternativa terapêutica (fluazuron + abamectina) em bovinos**. 2010. 167 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2010.

NUNES, M. E. T; DAAM, M. A.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Survival, morphology and reproduction of *Eisenia Andrei* (Annelida, Oligochaeta) as affected by Vermitec[®] 18 EC (a.i. abamectina) in tests performed under tropical conditions. **Applied Soil Ecology**, v. 100, p. 18-26, 2016.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD-guideline for testing of chemicals. No. 207. Earthworm acute toxicity test. OECD, 1984. Paris.

ROSA, V. M. D. et al. Avaliação da toxicidade de pesticidas utilizados na agricultura orgânica sobre letalidade e reprodução de *Folsomia candida* e *Enchytraeus crypticus*. In: **Semana Científica Johanna Döbereiner**, 15 ed., out. 2015. Disponível

em: < <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/140439/1/Avaliacao-datoxicidade-de-pesticidas-utilizados2537-11656-1-PB.pdf>>. Acesso em: 28 maio 2016.

SAKUMA, M. Probit analysis of preference data. **Applied Entomology and Zoology**, Tokyo, v. 8, p. 339-347, 1998.

SEGAT, J. C. et al. Ecotoxicological evaluation of swine manure disposal on tropical soils in Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 122, p. 91-97, 2015.

SOUZA, L. A. D. **Concentrado emulsionável de *Melia azedarach* (Meliaceae) no controle de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae)**. 2008. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Escola de Veterinária, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

VIEIRA, V. P. da C. **Eficácia do regulador de crescimento de artrópodes fluazuron no controle da pulga *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835) (siphonaptera: pulicidae) em cães**. 2009. 61 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

ZAR, J.H. **Biostatistical analysis**. London: Prentice Hall International, 1999. 663 f.

ZORTÉA, T. **Impacto ambiental de medicamentos utilizados no controle de parasitas em bovinos sob a reprodução de colêmbolos *Folsomia cândida***. 2014. Chapecó: UDESC.

ZORTÉA, T. et. al. Comportamento de fuga de colêmbolos expostos a solos contaminados com cipermetrina. **Revista Scientia Agraria (SA)**, n. 4, v. 16, p.49-58, 2015.