



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA
CAMPUS CHAPECÓ

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**TOXICIDADE DE IMIDACLOPRIDO PARA COLÊMBOLOS *Folsomia candida*:
EFEITOS INDIVIDUAIS E DE MISTURAS COM FIPRONIL OU CLOTIANIDINA**

RAFAEL SOARES DE ARAÚJO

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roger Lopes Alves

RAFAEL SOARES DE ARAÚJO

TOXICIDADE DE IMIDACLOPRIDO PARA COLÊMBOLOS *FOLSOMIA CANDIDA*: EFEITOS INDIVIDUAIS E DE MISTURAS COM FIPRONIL OU CLOTIANIDINA

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roger Lopes Alves

CHAPECÓ

2021

RAFAEL SOARES DE ARAUJO

TOXICIDADE DE IMIDACLOPRIDO PARA COLÊMBOLOS
***Folsomia candida*: EFEITOS INDIVIDUAIS E DE MISTURAS COM**
FIPRONIL OU CLOTIANIDINA

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

Orientador: **Prof. Dr. Paulo Roger Lopes Alves**

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em: 20/05/2021

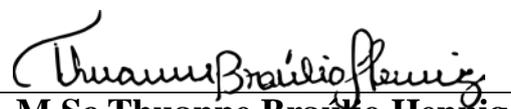
BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. Paulo Roger Lopes Alves – UFFS

Marlon Luiz
Neves da Silva

Digitally signed by Marlon Luiz Neves da Silva
DN: OU=Engenharia Ambiental e Sanitária,
O=Universidade Federal da Fronteira Sul,
CN=Marlon Luiz Neves da Silva,
E=marlon.silva@uffs.edu.br
Reason: I am approving this document
Location: Chapecó-SC
Date: 2021.05.21 16:25:24-0300

Prof. Dr. Marlon Luiz Neves da Silva - UFFS


M.Sc Thuanne Braulio Hennig

TOXICIDADE DE IMIDACLOPRIDO PARA COLÊMBOLOS *Folsomia candida*: EFEITOS INDIVIDUAIS E DE MISTURAS COM FIPRONIL OU CLOTIANIDINA

Rafael Soares de Araújo ¹
Paulo Roger Lopes Alves ²

RESUMO

Os contaminantes são geralmente encontrados como misturas químicas no ambiente terrestre. No entanto, poucas informações estão disponíveis sobre os efeitos combinados de defensivos agrícolas em organismos do solo. No presente estudo, objetivou-se avaliar a toxicidade individual e de misturas binárias de imidacloprido com fipronil ou clotianidina para colêmbolos *Folsomia candida*. Os parâmetros reprodução e crescimento foram avaliados, por meio de ensaios ecotoxicológicos, afim de identificar os efeitos individuais e de compreender se a presença simultânea (binária) de doses subletais (toxicidade crônica) de fipronil ou clotianidina podem causar alterações no potencial tóxico da molécula imidacloprido para a espécie *F. candida*. Para os ensaios individuais, imidacloprido teve valores de CE₅₀ de 0,85 mg kg⁻¹ e 0,76 mg kg⁻¹ em 2 testes individuais realizados, enquanto que o fipronil e a clotianidina tiveram valores de CE₅₀ de 0,80 e 0,10 mg kg⁻¹, respectivamente. Os efeitos da toxicidade de misturas foram avaliados usando o método de Abbott e do Índice de Aditividade (IA). Para reprodução, foi observado um efeito sinérgico para as misturas binárias de imidacloprido e fipronil com CE₅₀ = (0,320 mg kg⁻¹ de imidacloprido + 0,316 mg kg⁻¹ de fipronil), e efeito antagônico para as misturas binárias de imidacloprido e clotianidina, com CE₅₀ = (0,584 mg kg⁻¹ de imidacloprido + 0,051 mg kg⁻¹ de clotianidina). Sobre o crescimento, em ambos os ensaios realizados, foram observados efeitos antagônicos de ambas as misturas para a espécie, no entanto, o crescimento se mostrou um parâmetro menos sensível, sendo utilizado como complemento dos efeitos adversos que a mistura dos contaminantes pode provocar. Nossas descobertas demonstram que a presença simultânea de inseticidas no solo pode levar a alterações no potencial de toxicidade do imidacloprido para organismos não-alvo, demonstrando a necessidade de se incluir novas metodologias de avaliação para a regulamentação do uso de pesticidas no país.

Palavras chave: Ecotoxicologia Terrestre; Fauna Edáfica; Inseticidas; Toxicidade Combinada; Neonicotinoides.

¹ Acadêmico do curso de graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul; rafael_soares90@hotmail.com

² Professor do curso de graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul; paulo.alves@uffs.edu.br

**TOXICITY OF IMIDACLOPRID TO COLLEMBOLANS *Folsomia candida*:
INDIVIDUAL AND MIXTURE EFFECTS WITH FIPRONIL OR CLOTHIANIDIN**

ABSTRACT:

The contaminants are usually found as chemical mixtures in the terrestrial environment. However, little information is available about the joint effects of pesticides on soil organisms. The present study aimed to assess the toxicity of individual and binary mixtures of imidacloprid with fipronil or clothianidin on *Folsomia candida*. Reproduction and growth rates were assessed by ecotoxicological tests, to understand whether the individual and simultaneous (binary) presence of sublethal doses of fipronil (experiment 1) or clothianidin (experiment 2) can cause changes in the toxic potential of imidacloprid to *F. candida*. For the individual exposures, imidacloprid had EC₅₀ values of 0.85 mg kg⁻¹ and 0.76 mg kg⁻¹ in 2 individual tests performed, whereas for fipronil and clothianidin the EC₅₀ values were 0.80 and 0.10 mg kg⁻¹, respectively. Mixture toxicity effects were assessed by using the Abbott and Additive Index (AI) method. For the reproduction endpoint, a synergistic effect was observed on binary mixtures of imidacloprid + fipronil (EC₅₀ = 0.320 mg kg⁻¹ of imidacloprid + 0.316 mg kg⁻¹ of fipronil) and antagonistic effect for the binary mixtures of imidacloprid and clothianidin (EC₅₀ = 0.584 mg kg⁻¹ of imidacloprid + 0.051 mg kg⁻¹ of clothianidin). On the growth, both tests showed antagonistic effects of both mixtures were observed for the species, however, growth proved to be a less sensitive parameter, being used as a complementary endpoint to assess the adverse effects that the mixtures of contaminants can cause. Our findings demonstrate that the simultaneous presence of insecticides in the soil can lead to changes in the potential toxicity of imidacloprid to non-target organisms, demonstrating the need to include new assessment methodologies for regulating the use of pesticides in the country.

Keywords: Terrestrial Ecotoxicology; Edaphic Fauna; Insecticide; Combined Toxicity; Neonicotinoids

1 INTRODUÇÃO

Doenças e pragas agrícolas associadas às sementes estão dentre os fatores que mais causam danos aos cultivos agrícolas (MACHADO, 2006), sendo uso de agrotóxicos (ex. inseticidas) uma prática destinada a esse controle, e o Brasil, o terceiro maior consumidor no mundo, ficando atrás apenas de China e Estados Unidos no ano de 2018 (FAO, 2021).

Contudo, é crescente a preocupação a respeito dos riscos ambientais de inseticidas de amplo espectro de ação, como algumas moléculas utilizadas frequentemente no tratamento de sementes, tal como é o caso do imidacloprido, clotianidina e do fipronil. Estes defensivos agrícolas podem atingir uma grande variedade de insetos não-alvo e podem deixar resíduos difíceis de serem detectados no solo (IMPERATRIZ-FONSECA, 2012).

Em 2013, a Comissão Europeia publicou o Regulamento (EU) N° 485/2013 que proibiu qualquer uso externo de imidacloprido e clotianidina, e o (EU) N° 781/2013 com a proibição de utilização e de venda de sementes tratadas com fipronil, por apresentarem riscos crônicos para as abelhas em exposição a pequenas quantidades, bem como potencial acumulativo, porém, no Brasil, a legislação não prevê revisão periódica do registro de agrotóxicos e, ainda hoje, estes a.i. tem uso autorizado na agricultura (FRIEDRICH et al., 2021).

Os neonicotinoides (ex. imidacloprido e clotianidina) estão entre os inseticidas mais utilizados no planeta (GOULSON, 2013). No Brasil, o imidacloprido foi o oitavo ingrediente ativo (a.i.) mais vendido no ano de 2018, com uma estimativa de dez mil toneladas de a.i. vendidos (IBAMA, 2019).

Independentemente de sua via de aplicação, boa parte do ingrediente ativo dos agrotóxicos acaba chegando ao solo, estando assim sujeitos a processos de sorção de suas moléculas (GOULSON, 2013; PINHEIRO, 2015), sendo que estes processos, que irão alterar suas características químicas ou promoverem sua dissipação vão determinar o tempo de persistência destes compostos no solo (SILVEIRA, 2007).

De acordo com Gazziero (2015), 97% dos profissionais que lidam cotidianamente com tratamentos fitossanitários no Brasil realizam a mistura de defensivos agrícolas, essa prática, em muitos casos, se deve pela economia de dinheiro e um possível efeito sinérgico das moléculas no controle de pragas, desconsiderando possíveis efeitos negativos advindos desta prática. Entretanto, assim como é possível haver um suposto benefício do efeito sinérgico das moléculas no controle de pragas, essa sinergia também pode trazer problemas quando se tratam dos organismos não-alvo do solo, diante disso, é importante entender o efeito destes inseticidas sobre invertebrados do solo.

Alguns estudos ecotoxicológicos avaliaram efeitos letais e e sobre a reprodução destas espécies “não-alvo” (ALVES et al., 2013; ALVES et al., 2014; BONMATIN et al., 2014; PISA et al., 2015), porém, sua maioria, até o momento, tem realizado análises ecotoxicológicas dos a.i. considerando a presença das moléculas individualmente no solo, e assim subestimando muitas vezes o que acontece na realidade, onde as substâncias químicas geralmente ocorrem simultaneamente e misturadas nas matrizes ambientais (CANG et al., 2017). Contudo, quando combinadas, as moléculas podem ocasionar efeitos adversos distintos, e inclusive superiores à sua presença isolada (UWIZEYIMANA et al., 2017). Neste sentido, estudos que levam em conta ações combinadas de a.i. refletem de maneira mais realista o impacto existente das exposições ambientais do que as avaliações que avaliam a toxicidade de substâncias individuais (NATAL-DA-LUZ, 2011; e SCHNUG et al., 2015).

Em um estudo envolvendo misturas de imidacloprido e fipronil realizado com uma espécie de cupins *Coptotermes formosanus*, Luo (2010) concluiu que os seus diferentes modos de ação indicam que podem existir efeitos sinérgicos se ambos os compostos são adicionados juntos. Por outro lado, para uma espécie de baratas (*Blattella germanica*) a mistura de fipronil x imidacloprido nas proporções de 1:1, 2:1 e 1:2 levaram a um efeito antagonista (AHMED, 2015). Até o momento, não foram encontrados estudos que indiquem o efeito de misturas de clotianidina x fipronil e/ou clotianidina x imidacloprido, sobre colêmbolos, evidenciando a importância de se entender o comportamento destas misturas em organismos do solo.

A partir deste contexto, neste estudo foram analisados os efeitos ecotoxicológicos individuais e de misturas binárias dos neonicotinoides imidacloprido e/ou clotianidina, e/ou do fenilpirazol fipronil, encontrados nas formulações comerciais Much 600 FS®, Inside FS® e Shelter®, respectivamente, que são empregadas no tratamento químico de sementes. Foram medidos os efeitos sobre a reprodução (número) e crescimento (tamanho) de juvenis da espécie *Folsomia candida* em solo artificial. A hipótese principal do estudo é a de que quando em mistura com os inseticidas clotianidina ou fipronil o imidacloprido altera o potencial tóxico para a reprodução ou crescimento de *F. candida*. Conhecer a toxicidade de compostos individuais e de misturas de contaminantes poderá fornecer uma base científica que contribui para a criação de políticas ambientais adequadas, que demonstram os impactos ao meio ambiente de maneira mais realista.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para testar as hipóteses deste estudo, foram realizados dois ensaios ecotoxicológicos distintos, com colêmbolos *F. candida*, em Solo Artificial Tropical (SAT), conforme a seguir especificado:

Ensaio 1: Toxicidade crônica individual de imidacloprido e fipronil, além da toxicidade crônica da mistura de ambas as moléculas.

Ensaio 2: Toxicidade crônica individual de imidacloprido e clotianidina, além da toxicidade crônica da mistura de ambas as moléculas.

2.1 ESPÉCIE TESTE

Os colêmbolos da espécie *F. candida* foram criados conforme as diretrizes da ISO 11267 (ISO, 2014), em laboratório. Os organismos foram cultivados em recipientes circulares de plástico contendo uma mistura de carvão ativado em pó, água destilada e gesso (10:7:1, respectivamente), sob regime controlado de temperatura e fotoperíodo ($20 \pm 2^\circ \text{C}$ e 12:12 horas claro/escuro), e receberam alimento duas vezes por semana (*Saccharomyces cerevisiae*).

2.2 SOLO TESTE

O SAT utilizado é uma versão modificada do solo da Organization for Economic Cooperation and Development – (OECD, 1984), proposta por Garcia (2004). O SAT foi constituído por 75% de areia fina (0,05 mm e 0,2 mm de diâmetro), 20% de argila caulínica (caulim) e 5% de fibra de coco, e teve o pH corrigido com CaCO_3 para valores de $6,0 \pm 0,5$. Os testes foram montados na condição de umidade de 60% de capacidade de retenção de água (CRA) deste solo, e os parâmetros físicos e químicos do solo são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Caracterização física e química do solo SAT.

Parâmetro	valor medido
pH água (1:1)	$6,2 \pm 0,1$
MO % (m/v)	$1,4 \pm 0,0$
CRA (%)	$46,3 \pm 1,7$
CTC (cmolc dm^{-3})	$3,3 \pm 0,2$
Saturação por bases (%)	$65,0 \pm 6,6$
Argila (%)	$14,3 \pm 0,0$
Silte (%)	$18,5 \pm 0,0$
Areia (%)	$67,2 \pm 0,0$

Os valores são expressos pela média \pm desvio padrão; n=2

2.3 SUBSTÂNCIAS TESTE

Os efeitos ecotoxicológicos dos a.i. imidacloprido, clotianidina (neonicotinoides) e fipronil (fenilpirazol) foram analisados por meio das formulações comerciais Much 600 FS® (600 g a.i. L⁻¹), Inside FS® (600 g a.i. L⁻¹) e Shelter® (250 g a.i. L⁻¹), respectivamente, as quais são utilizadas no tratamento químico de sementes.

As concentrações (expressas em mg de a.i. kg⁻¹ de solo seco - mg kg⁻¹) adotadas nos ensaios crônicos (Tabela 2) individuais e em misturas foram determinadas com base no estudo na literatura, sendo os valores de CE₅₀ para o imidacloprido, clotianidina, e fipronil de 0,80, 0,07 e 0,79 mg kg⁻¹, respectivamente (BANDEIRA et al., 2019; HENNIG, 2021; RITCHIE et al., 2019). As concentrações dos ensaios em misturas binárias foram estabelecidas com base no conceito de unidades tóxicas (UT) de Sprague & Ramsay (1965), as quais representaram as concentrações previamente estimadas que causaram redução na reprodução de *F. candida* em 50% (1 UT = CE₅₀) em SAT. imidacloprido

Tabela 2 - Concentrações expressas em mg de a.i. kg⁻¹ de solo seco (mg kg⁻¹) e em unidades tóxicas UT, utilizadas nos ensaios que avaliaram a toxicidade crônica (individual e em misturas binárias), de imidacloprido, fipronil e clotianidina para *F. candida* em SAT.

Identificação	UT	Concentrações (mg kg ⁻¹)								
		Ensaio individuais			Mistura ensaio 1			Mistura ensaio 2		
		Imi	Fip	Clo	Imi	Fip	Imi	Clo		
C0	0	0	0	0	0	+	0	0	+	0
C1	0,1	0,08	0,079	0,007	0,04	+	0,04	0,04	+	0,004
C2	0,2	0,16	0,158	0,014	0,08	+	0,079	0,08	+	0,007
C3	0,4	0,32	0,316	0,028	0,16	+	0,158	0,16	+	0,014
C4	0,8	0,64	0,632	0,056	0,32	+	0,316	0,32	+	0,028
C5	1,6	1,28	1,264	0,112	0,64	+	0,632	0,64	+	0,056

UT= unidade tóxica; Imi = imidacloprido; Fip = fipronil; Clo = clotianidina.

Fonte: elaborado pelo autor (2021).

2.4 ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

2.4.1 Contaminação do solo

O solo SAT recebeu 5 concentrações de cada a.i. de maneira individual, de suas misturas binárias e um tratamento controle. A contaminação ocorreu por meio de solução aquosa, cujo volume foi calculado para atingir 60% da CRA do solo. Cada tratamento era composto por 5 réplicas, e o tratamento controle teve 8 réplicas.

2.4.2 Ensaio de toxicidade crônica

Os ensaios de toxicidade crônica para se determinar o CE_{50} para a redução na reprodução e CE_{20} para redução no tamanho dos colêmbolos foram baseados nas diretrizes ISO 11267 (ISO, 2014) onde os recipientes cilíndricos de vidro, com fechamento hermético (4 cm de diâmetro e 9 cm de altura) receberam 30 g de solo úmido (contaminado ou solo controle), 2 mg de levedura (alimento) e 10 colêmbolos com idade sincronizada entre 10 a 12 dias. Os colêmbolos foram alimentados no início do ensaio e após 14 dias. A manutenção da umidade e a troca gasosa também foram realizadas 2 vezes por semana, e as réplicas mantidas em temperatura controlada de 25°C em câmara BOD. Após 28 dias do início do teste, o conteúdo dos vidros foi submerso em água com algumas gotas de tinta preta nanquim e os sobreviventes adultos (que flutuaram) foram contados e fotografados em ângulo superior, permitindo a contagem dos juvenis por meio do software ImageJ® conforme Alves et al. (2014).

2.4.3 Análise do crescimento de *F. candida*

Após a análise do ensaio de toxicidade crônica, foram utilizadas as mesmas imagens inseridas no software ImageJ® para a análise do crescimento dos colêmbolos, por meio da avaliação do tamanho dos juvenis gerados. Para isso, as imagens foram divididas em retângulos de áreas equivalentes e 30 organismos foram selecionados aleatoriamente em todas as réplicas do estudo. Foi estabelecida uma escala de tamanhos da seguinte forma: os indivíduos menores que 3 mm como pequenos, considerados médios aqueles entre 3 e 4,5 mm, e grandes os indivíduos que apresentavam tamanho superior a 4,5 mm (HENNIG, 2021). Após estes procedimentos foi realizada a análise estatística e avaliação do crescimento da espécie.

2.4.4 Análise estatística

Os dados de reprodução e crescimento foram submetidos à análise de variância (One-way ANOVA) seguida pelo teste de Dunnett, para comparar as médias dos diferentes tratamentos testados com a média obtida no tratamento controle, verificando se houve diferença significativa entre as médias e se os fatores exerciam influência em alguma variável dependente (número de juvenis ou tamanho). Com estes resultados foi possível determinar os valores de CENO (maior concentração testada sem efeito observado) e CEO (menor concentração testada com efeito observado).

As concentrações de efeito que causaram redução de 50% na reprodução dos colêmbolos (CE_{50}) foram calculadas utilizando modelos de regressões não lineares que se adequaram aos dados em questão (exponencial, gompertz, hormesis ou logístico). Para os dados

de crescimento foram estimados apenas os valores de CE₂₀. Essas análises foram feitas utilizando o software STATISTICA 7.0.

Os valores de CE₅₀ e CE₂₀ ± desvio padrão foram utilizados para os cálculos no modelo de IA e as porcentagens de redução na reprodução e no tamanho ± desvio padrão foram utilizadas no modelo de Abbott.

2.4.5 Avaliação da toxicidade em misturas binárias

Foram utilizados dois modelos para avaliar os efeitos tóxicos combinados das moléculas imidacloprido, fipronil e clotianidina, baseadas em UT, permitindo a comparação e comprovação dos resultados obtidos.

O primeiro modelo utilizado foi o de Abbott (1925), que inicialmente foi desenvolvido para avaliar a eficiência de pesticidas, e atualmente é utilizado para avaliar efeitos ecotoxicológicos (LIU et al., 2019). Este modelo compara inibições esperadas e observadas (ISWARYA et al., 2016), o efeito interativo é estimado com base na relação da redução do número de juvenis pelo tratamento com compostos individuais, em relação ao efeito da junção destas moléculas (efeito esperado) conforme a equação 1:

$$T_{exp} = A + B - \left(\frac{AB}{100}\right) \quad \text{Equação 1}$$

Onde os parâmetros A e B indicam a porcentagem da redução do número de juvenis em relação ao tratamento controle de cada molécula.

Estes resultados são comparados aos tratamentos com misturas binárias (efeito observado), esta relação é chamada de razão de inibição (RI), conforme a equação 2:

$$RI = \frac{\text{toxicidade observada } (T_{obs})}{\text{toxicidade esperada } (T_{exp})} \quad \text{Equação 2}$$

O efeito interativo da mistura binária é considerado antagônico, quando o valor RI é menor que 1 (<1), ao passo que, é dito ser sinérgico quando RI > 1, e aditivo, quando RI = 1 (ISWARYA et al., 2016).

A segunda metodologia utilizada foi a do Índice de aditividade (IA), que foi proposta por Marking & Dawson (1975), é um modelo empregado em vários estudos de toxicidade combinada de inseticidas para minhocas *Eisenia andrei* (YU et al., 2019, CANG et al., 2017,

WANG et al., 2016). Esse modelo expressa a soma da aditividade de diferentes substâncias (S) e o índice de aditividade (IA), conforme a equação 3:

$$S = \frac{A_m}{A_i} + \frac{B_m}{B_i} \quad \text{Equação 3}$$

Onde:

S = soma da toxicidade biológica

A_m = concentração da substância A na mistura que causa x% de efeito (ECx);

B_m = concentração da substância B na mistura que causa x% de efeito (ECx);

A_i = concentração da substância A que, isolada, provoca x% de efeito (ECx da substância A);

B_i = concentração da substância B que, isolada, provoca x% de efeito (ECx da substância B).

Sendo que o x representa as concentrações de efeito que se deseja determinar índice de aditividade, como por exemplo CE₂₀ e CE₅₀. Com base no valor de S calcula-se o Índice de aditividade (IA) na mistura:

Se $S < 1$, IA é calculado conforme a equação 4:

$$IA = \frac{1}{S-1} \quad \text{Equação 4}$$

Se $S \geq 1$, IA é calculado conforme a equação 5:

$$IA = 1 - S \quad \text{Equação 5}$$

Através do valor de IA é possível determinar o efeito interativo das substâncias:

Se $IA > 0$ Sinergismo

Se $IA = 0$ Aditivo

Se $IA < 0$ Antagonismo

O IA irá indicar o quão maior ou menor a toxicidade conjunta da mistura é comparada com a soma das substâncias testadas individualmente.

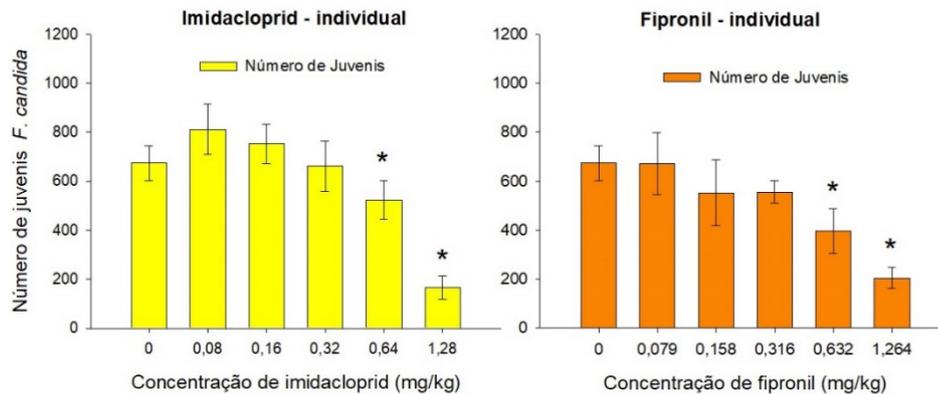
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISE DA TOXICIDADE CRÔNICA

Todos os ensaios ecotoxicológicos cumpriram os critérios de validação de acordo com a norma ISO 11267 (ISO, 2014). A taxa de sobrevivência dos colêmbolos adultos no solo controle foi \geq que 80% (média de 97,5%) para ambos os testes e o coeficiente de variação foi inferior a 30 % (CV = 10,58 para o ensaio 1 e CV = 11,78 para o ensaio 2).

Quando avaliadas as toxicidades de forma individual, reduções significativas ($p < 0,05$) no número de juvenis da espécie *F. candida* foram observadas somente nas maiores concentrações de imidacloprido e fipronil ($0,64$ e $0,632$ mg kg^{-1} , respectivamente) testadas no ensaio 1 (Figura 1), enquanto que, para o ensaio 2, os valores de CEO para imidacloprido e clotianidina foram $0,16$ mg kg^{-1} e $0,028$ mg kg^{-1} , respectivamente (Figura 2).

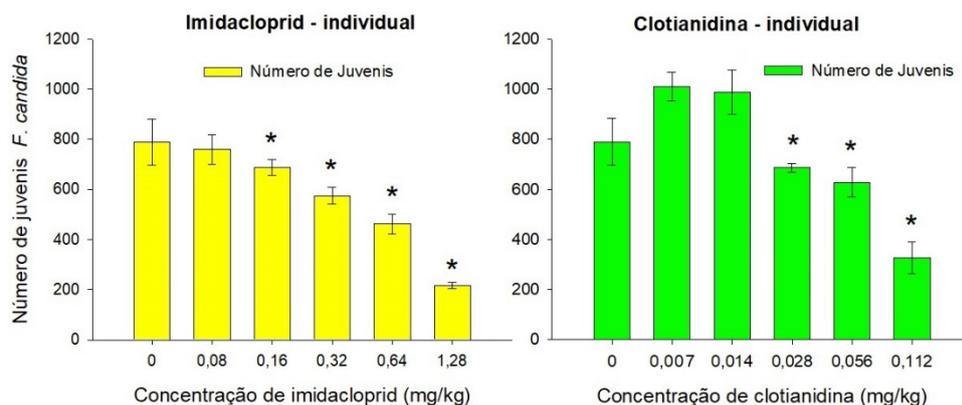
Figura 1 - Teste crônico (reprodução) individual de imidacloprido e fipronil (Ensaio 1).



Fonte: elaborado pelo autor (2021).

Nota: Número médio ($n = 8$ para o controle e $n = 5$ para réplicas, \pm desvio padrão) de juvenis de colêmbolos *F. candida* encontrados após 28 dias de exposição a diferentes concentrações de imidacloprido e fipronil individualmente. Asteriscos (*) indicam redução significativa na reprodução de colêmbolos em relação ao controle (teste de Dunnet, $p < 0,05$).

Figura 2 - Teste crônico (reprodução) individual de imidacloprido e clotianidina (Ensaio 2).



Fonte: elaborado pelo autor (2021).

Nota: Número médio ($n = 8$ para o controle e $n = 5$ para réplicas, \pm desvio padrão) de juvenis de colêmbolos *F. candida* encontrados após 28 dias de exposição a diferentes concentrações de imidacloprido e clotianidina individualmente. Asteriscos (*) indicam redução significativa na reprodução de colêmbolos em relação ao controle (teste de Dunnet, $p < 0,05$).

A clotianidina foi o inseticida mais tóxico para a espécie. A sua toxicidade (com base na reprodução) foi de $0,10$ mg kg^{-1} , sendo até 8,5 vezes maior, comparada ao imidacloprido ou fipronil. Ritchie et al. (2019), estimaram uma CE_{50} de clotianidina ($0,07$ mg kg^{-1}) em solo

natural arenoso para *F. candida*, a qual é próxima ao valor aqui obtido (Tabela 3). Outro estudo, envolvendo testes de toxicidade com a espécie *E. fetida* considerou a clotianidina como o pesticida mais tóxico dentre os 45 testados em solo SAT (WANG et al., 2012), o que alerta para uma maior preocupação com a clotianidina, pois mesmo em baixas concentrações, apresenta um perigo para as populações de invertebrados do solo, e ainda existem poucos estudo sobre a interação deste a.i. com outros contaminantes para estes organismos edáficos.

Para imidacloprido os valores de CE_{50} encontrados foram de $0,85 \text{ mg kg}^{-1}$ (0,72-0,98) para o ensaio 1 e $0,76 \text{ mg kg}^{-1}$ (0,64-0,87) para o ensaio 2 (Tabela 3), essa diferença pode estar associada a variabilidade que pode ocorrer em testes de toxicidade podendo ser atribuída a fatores como a saúde dos organismos testados e/ou a variabilidade do tamanho dos organismos selecionados (ENVIRONMENT CANADA, 1999), porém, como há uma sobreposição dos limites de confiança para as estimativas em ambos os testes, não é possível inferir que há diferenças estatísticas relevantes. Além disto, os valores encontrados estão próximos aos observados por Bandeira et al. (2019) em solo SAT $CE_{50} = 0,80$ (0,53–1,07) mg kg^{-1} .

Zortéa et al. (2018) encontrou valores 2,7 menores para CE_{50} de fipronil = $0,29 \text{ mg kg}^{-1}$ em SAT para *F. candida*, em comparação aos obtidos no presente estudo $CE_{50} = 0,80 \text{ mg kg}^{-1}$, esta diferença pode estar associada ao tipo de produto utilizado, visto que avaliaram o medicamento veterinário Top Line-Merial®, que contém uma mistura de a.i. com sulfadiazina de prata e alumínio, metais que podem estar relacionados a um sinergismo do efeito do a.i. em relação ao inseticida Shelter FS® utilizado neste estudo. Já o estudo de Hennig (2021) encontrou valores próximos ao do presente estudo nas mesmas condições de ensaio, com $CE_{50} = 0,70$ (0,42-0,94), confirmando os valores encontrados.

Os neonicotinoides (imidacloprido e clotianidina) são inseticidas de ação sistêmica e de contato, agindo como como agonistas da acetilcolina, levando ao acúmulo de acetilcolina e a consequente paralisia e/ou à morte dos insetos (DAI et al., 2019). Segundo Tingle (2003), o fipronil possui uma atividade de amplo espectro e atua diretamente no sistema nervoso central dos organismos, onde inibe o receptor do ácido gama-aminobutírico (GABA), um neurotransmissor responsável por regular a excitabilidade neuronal e impedir a estimulação excessiva dos nervos, o que confere sua alta seletividade a insetos. Além disso, esse inseticida apesar de não ter como alvo colêmbolos, são formulados para controlar espécies de insetos sugadores e mastigadores (LUO, 2010).

Uma das possíveis razões para estes efeitos observados sobre a reprodução é que, em resposta ao estresse, os organismos aumentam sua alocação de energia e recursos, com a finalidade de aumentar a probabilidade de sua sobrevivência, afetando negativamente seu

sistema endócrino, fundamentalmente ligado aos processos de reprodução dos organismos, fator determinante na diminuição dos parâmetros reprodutivos (LI et al., 2018; MACIEL, 2019). Outro problema ambiental, que põe em risco as espécies não-alvo do solo é que concentrações de neonicotinoides e fipronil podem persistir e, possivelmente, acumular-se por meses ou anos no solo. Para o imidacloprido, esta persistência pode variar entre 39 dias na superfície do solo, podendo superar 1.000 dias em solos mais secos e com alto teor de matéria orgânica (BARRIGOSSI et al., 2005; FOSSEN 2006). Quanto à clotianidina, o tempo de meia vida pode variar de 34 dias na superfície do solo até 1.000 dias em solo aeróbico (JONES et al., 2014; KRUPKE et al., 2012; LADOU et al., 2016). O fipronil tem meia-vida de 34 dias em solo argiloso (COUTINHO et al., 2005), de 19 a 74 dias em latossolo (SCORZA JUNIOR et al., 2013), podendo chegar a 97 dias em solos com condições tropicais e temperadas (SANCHEZ-BAYO et al., 2011). Devido ao tempo de persistência destas moléculas, é possível que estas ocorram em simultâneo nas matrizes ambientais, especialmente no solo, aumentando o risco de contaminação dos organismos do solo, como os colêmbolos (BONMATIN et al., 2014).

Cutler & Guedes (2017) destacam que quantidades baixas de agentes estressores podem estimular certos processos biológicos, que funcionam como um mecanismo de reparação e proteção contra subsequentes e, possivelmente, exposições mais intensas, entretanto se uma exposição em doses mais altas não acontece, a sobre produção de recursos para reparação do organismo pode ser aplicada em outras funções úteis, como crescimento adicional e reprodução (CALABRESE & BALDWIN, 2002). Esta resposta denominada "hormesis", foi observada em muitos insetos após exposição moderada a estressores, incluindo inseticidas neonicotinoides, efeitos possivelmente observados em nosso estudo, pois para imidacloprido e clotianidina, em concentrações mais baixas, foram observadas um aumento no número de juvenis (Figuras 1 e 2), quando comparado as amostras controles (efeitos observados para a reprodução e que não afetaram a análise do crescimento da espécie).

Tabela 3: Concentrações (expressas em mg kg⁻¹) e intervalos de confiança (inferior e superior) do valor estimado por causar um efeito de redução na reprodução em 50% (CE₅₀) nos ensaios de toxicidade crônica com *F. candida* de em Solo Artificial Tropical no Ensaio 1 e 2: efeitos individuais.

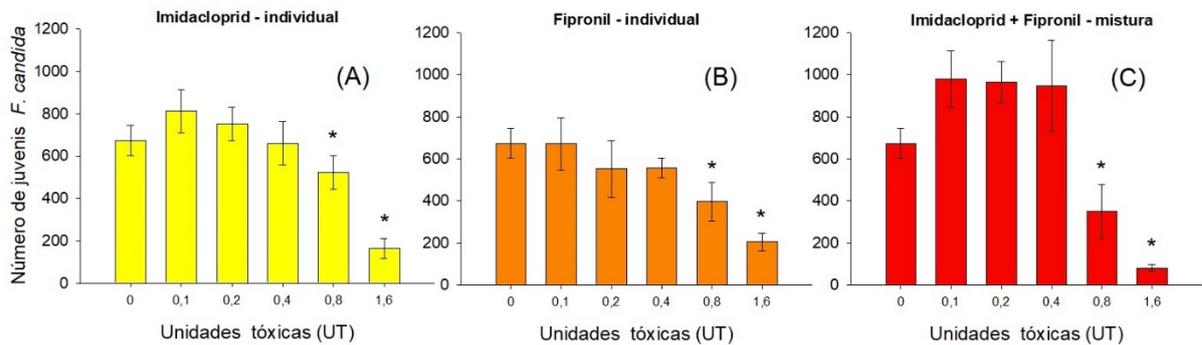
Ensaio	Contaminante	CE ₅₀ (mg kg ⁻¹)
1	Imidacloprido	0,85 (0,72-0,98)
	Fipronil	0,80 (0,59-1,01)
2	Imidacloprido	0,76 (0,64-0,87)
	Clotianidina	0,10 (0,07-0,13)

Fonte: elaborado pelo autor (2021).

3.2 ANÁLISE DOS EFEITOS DE MISTURAS PARA TOXICIDADE CRÔNICA

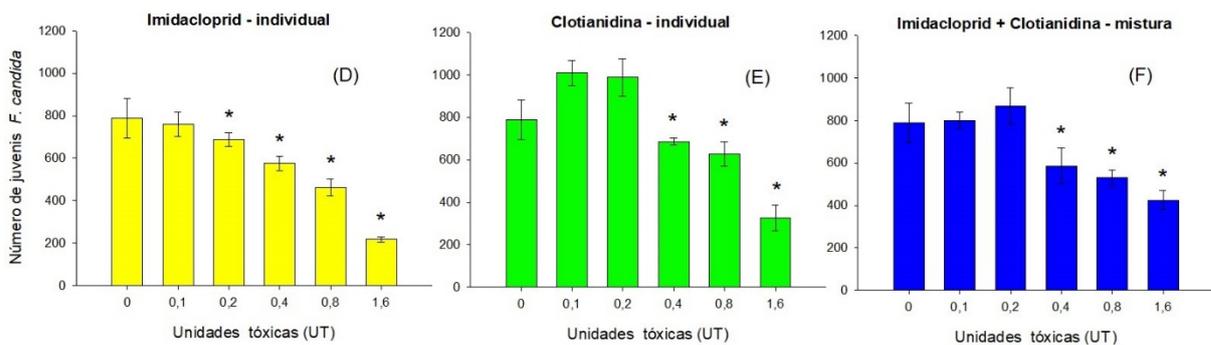
Para o ensaio 1, reduções significativas ($p < 0,05$) foram observadas em mistura a partir de (CEO = 0,8 UT – Figura 3). Para o ensaio 2 as reduções significativas ($p < 0,05$) foram observadas a partir de CEO = 0,4 UT (Figura 4).

Figura 3 – Número médio (\pm desvio padrão; $n = 8$ para o controle e $n = 5$ para réplicas) de juvenis de colêmbolos *F. candida* encontrados após 28 dias de exposição a diferentes concentrações de imidacloprido (A) e fipronil (B), individualmente, ou em mistura (C). Asteriscos (*) indicam redução significativa em relação ao controle (teste de Dunnet, $p < 0,05$).



Fonte: elaborado pelo autor (2021).

Figura 4 - Número médio (\pm desvio padrão; $n = 8$ para o controle e $n = 5$ para réplicas) de juvenis de colêmbolos *F. candida* encontrados após 28 dias de exposição a diferentes concentrações de imidacloprido (D) e clotianidina (E), individualmente, ou em mistura (F). Asteriscos (*) indicam redução significativa em relação ao controle (teste de Dunnet, $p < 0,05$).



Fonte: elaborado pelo autor (2021).

As metodologias aplicadas neste estudo possibilitaram uma melhor compreensão dos efeitos observados, em diferentes aspectos, pois Abbott permitiu interpretar a natureza do efeito combinado em diferentes proporções de mistura, enquanto que o método de IA permitiu uma observação global do efeito (CE_{50}) por exemplo. Devido ao efeito hormético citado no item anterior, foi impedido que analisássemos os efeitos de misturas em baixas concentrações, visto que o modelo de Abbott se baseia comparativamente ao controle (ABBOTT, 1925), quando se tem um número maior de colêmbolos em determinada concentração em relação ao controle, a

análise fica prejudicada pois sugere-se uma "redução negativa" da reprodução, e a interpretação da razão de inibição (RI) se torna mais complexa, podendo traduzir em respostas errôneas (falso sinergismo ou antagonismo), devido a isto, foram comparadas as interações entre 0,8 UT e 1,6 UT.

Por meio do cálculo da razão de inibição (RI), para o ensaio 1 foram identificadas associações sinérgicas para a interação de imidacloprido com fipronil, a partir da combinação testada de 0,8 UT equivalente a $RI = 2,52$ em 1,6 UT foi identificado uma redução neste efeito, com $RI = 1,62$ (Tabela 4). Para o ensaio 2 foram identificadas associações antagônicas entre as misturas binárias de imidacloprido e clotianidina a partir da combinação testada de 0,8 UT equivalente a $RI = 0,90$ e em 1,6 UT com $RI = 0,86$.

Tabela 4: Modelo de Abbott representando a interação entre imidacloprido e fipronil (ensaio 1) e imidacloprido e clotianidina (ensaio 2) em uma mistura binária sob diferentes exposições de UT.

	UT	Toxicidade Observada (%)	Toxicidade Esperada (%)	Razão de Inibição (RI)	Efeito
Ensaio 1	0,8	48,12	19,12	2,52 (1,79 a 2,52)	Sinérgico
	1,6	87,98	54,36	1,62 (1,29 a 2,43)	Sinérgico
Ensaio 2	0,8	32,88	53,45	0,90 (0,89 a 0,91)	Antagônico
	1,6	46,2	88,64	0,86 (0,85 a 0,90)	Antagônico

Fonte: elaborado pelo autor (2021).

O método de IA indicou as mesmas interações observadas no modelo de Abbott, sendo efeitos sinérgicos para o Ensaio 1, onde esperava-se um efeito de redução de 50% na reprodução em 1,03 UT, porém observou-se o CE_{50} em 0,80 UT, e o valor obtido de $IA = 0,30$. Para o ensaio 2 observou-se o CE_{50} em 1,46 UT, com $IA = -0,30$, indicando efeito antagônico, conforme a tabela 5.

Tabela 5: Modelo de Índice de Aditividade (IA) representando a interação entre imidacloprido e fipronil (ensaio 1), e imidacloprido e clotianidina (ensaio 2) em misturas binárias no ensaio de toxicidade crônica com *F. candida* (reprodução).

	Inseticida	CE_{50} (UT)	CE_{50} Mistura (UT)	IA	Efeito
Ensaio 1	Imidacloprido	1,06 (0,90-1,23)	0,80 (0,68-0,94)	0,30 (0,19-0,33)	Sinérgico
	Fipronil	1,01 (0,74-1,27)			
Ensaio 2	Imidacloprido	0,96 (0,80-1,09)	1,46 (0,98-1,94)	-0,30 (-0,43 a -0,13)	Antagônico
	Clotianidina	1,38 (0,95-1,80)			

Fonte: elaborado pelo autor (2021).

Estes resultados confirmam a hipótese deste trabalho de interações entre os contaminantes, demonstrando que ambas apresentam alteração no potencial tóxico, sendo que a mistura binária de imidacloprido e fipronil apresentaram interações sinérgicas e a a mistura binária de imidacloprido e clotianidina apresentaram interações antagônicas na redução da reprodução dos colêmbolos *F. candida*.

Alguns estudos indicam que possíveis desequilíbrios nas funções biológicas das espécies, como modificações nas enzimas responsáveis pelo metabolismo de agentes tóxicos, por exemplo o citocromo P450 (CYP) e a glutathione-S-transferase (GST), que podem ter diferentes padrões de respostas após a exposição à mistura de contaminantes, pode ser uma das principais razões para a ocorrência de efeitos adversos, já que um composto da mistura pode alterar a ativação ou desintoxicação do outro composto, afetando a reprodução, crescimento ou resultando na morte do organismo (ANDERSON & LYDY, 2002; SANTOS et al., 2010; SCHNUG et al., 2014).

3.3 ANÁLISE DOS EFEITOS SOBRE O CRESCIMENTO DE *F. candida*

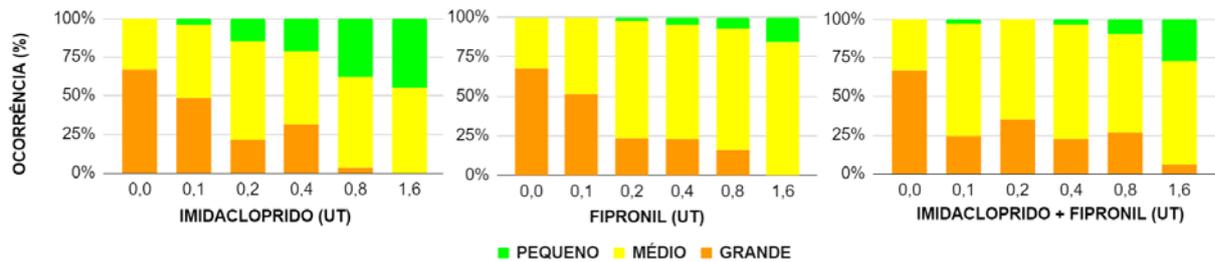
Para o ensaio 1 (imidacloprido e fipronil), foram observadas reduções no tamanho médio dos colêmbolos conforme o aumento das concentrações (Figura 5), sendo que os valores de CE₂₀ indicaram que imidacloprido foi cerca de 2 vezes mais tóxico para o crescimento (tamanho) de *F. candida*, quando os compostos são aplicados individualmente (Tabela 6). Para o ensaio 2 (imidacloprido e clotianidina “individual” – Figura 6), os valores de CE₂₀ indicaram que imidacloprido foi cerca de 3,4 vezes menos tóxico para o crescimento (tamanho) de *F. candida* do que a clotianidina.

Tabela 6: Concentrações de efeito de redução no tamanho médio em 20% (CE₂₀ - mg kg⁻¹) determinadas com base nos testes com *F. candida* aos inseticidas imidacloprido, fipronil e clotianidina, de forma individual, em SAT.

	Inseticida	CE₂₀ (mg kg⁻¹)
Ensaio 1	Imidacloprido	0,21 (0,09-0,32)
	Fipronil	0,41 (0,07-0,75)
Ensaio 2	Imidacloprido	0,34 (0,04-0,64)
	Clotianidina	0,10 (0,05-0,16)

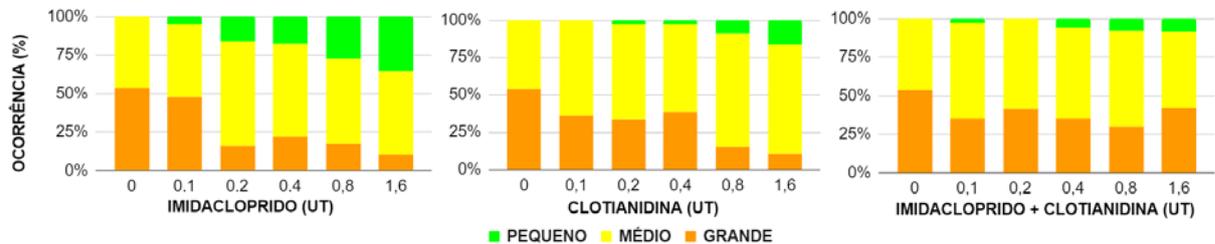
Fonte: elaborado pelo autor (2021).

Figura 5 - Ocorrência de juvenis de colêmbolos *F. candida* encontrados após 28 dias de exposição a diferentes concentrações de UT de imidacloprido (individual), fipronil (individual) e imidacloprido + fipronil (mistura).



Fonte: elaborado pelo autor (2021).

Figura 6 - Ocorrência de juvenis de colêmbolos *F. candida* encontrados após 28 dias de exposição a diferentes concentrações de UT de imidacloprido (individual), clotianidina (individual) e imidacloprido + clotianidina (mistura).



Fonte: elaborado pelo autor (2021).

As análises das misturas dos contaminantes no Ensaio 1 e no Ensaio 2 indicaram efeito antagônico, efeito comprovado nos 2 modelos utilizados conforme a tabela 7 (método de Abbott) e tabela 8 (método de IA), sendo possível observar as diferenças nas figuras 5 e 6.

Tabela 7: Modelo de Abbott representando a interação entre imidacloprido e fipronil (ensaio 1) e imidacloprido e clotianidina (ensaio 2) em uma mistura binária sob diferentes exposições de UT.

Ensaio	UT	Toxicidade Observada (%)	Toxicidade Esperada (%)	Razão de Inibição (RI)	Efeito
1	0,2	12,37	17,20	0,72 (0,58 a 0,94)	Antagônico
	0,4	18,89	35,65	0,53 (0,43 a 0,60)	Antagônico
	0,8	32,88	53,45	0,56 (0,49 a 0,61)	Antagônico
	1,6	46,20	88,64	0,68 (0,64 a 0,71)	Antagônico
2	0,2	3,48	11,46	0,30 (0,01 a 0,56)	Antagônico
	0,4	9,07	26,55	0,34 (0,10 a 0,48)	Antagônico
	0,8	11,86	24,58	0,48 (0,45 a 0,59)	Antagônico
	1,6	6,22	36,88	0,17 (0,14 a 0,34)	Antagônico

Fonte: elaborado pelo autor (2021).

Tabela 8: Modelo de Índice de Aditividade representando a interação entre imidacloprido e fipronil (ensaio 1) e imidacloprido e clotianidina (ensaio 2) em uma mistura binária para CE₂₀ da avaliação do crescimento de *F. candida*.

Ensaio	Inseticida	CE ₂₀ (UT)	CE ₂₀ Mistura (UT)	IA (Índice de aditividade)	Efeito
1	Imidacloprido	0,26 (0,12-0,40)	0,50 (0,10-0,89)	-0,44 (-0,02 a -0,59)	Antagônico
	Fipronil	0,52 (0,09-0,94)			
2	Imidacloprido	0,43 (0,05-0,81)	1,6 (-)	-1,44 (-)	Antagônico
	Clotianidina	1,37 (0,69-2,07)			

Fonte: elaborado pelo autor (2021).

Segundo Crouau e Moïa (2006), o crescimento é um parâmetro menos sensível do que reprodução, mas precisa de menos juvenis e menos tempo para se analisar, fato comprovado em nosso trabalho, nossos resultados demonstraram que ocorreram efeito antagônicos nas misturas dos contaminantes e que estes afetaram dos colêmbolos, se mostrando útil para complementar os ensaios de reprodução, principalmente para demonstrar efeitos deletérios de contaminantes sobre os colêmbolos, pois muitos inseticidas podem ter efeitos a longo prazo que muitas vezes não são detectáveis usando métodos tradicionais de teste de toxicidade.

4 CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstraram que o potencial tóxico das misturas binárias de imidacloprido com fipronil e de imidacloprido com clotianidina para colêmbolos *F. candida* pode ser alterado, em comparação aos compostos aplicados individualmente. Para os parâmetros reprodutivos, os resultados indicaram efeitos sinérgicos para imidacloprido com fipronil e antagônicos para imidacloprido com clotianidina. Para o crescimento os resultados indicaram efeitos antagônicos para ambas as misturas, quando comparadas às suas toxicidades individuais.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, W. S.. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. **Journal Of Economic Entomology**, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 265-267, 1 abr. 1925. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>.
- AHMED, F.S. **Toxicological studies on boric acid, imacloprid and fipronil and their binary mixtures as inseticides on german cockroach *Blattella Germanica* (L.)**. Dissertação (Mestrado em Agricultural Sciences). Cairo University, 2015. Disponível em: <http://erepository.cu.edu.eg/index.php/cutheses/article/view/3594> . Acesso em: 13 jan. 2021.

ALVES, P.R.L.; CARDOSO, E.J.B.N.; MARTINES, A.M.; SOUSA, J.P.; PASINI, A. Earthworm ecotoxicological assessments of pesticides used to treat seeds under tropical conditions, **Chemosphere**, Volume 90, Issue 11, 2013, Pages 2674-2682, ISSN 0045-6535, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.11.046>.

ALVES, P. R. L. et al. Seed dressing pesticides on springtails in two ecotoxicological laboratory tests. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 105, p. 65-71, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.010>.

ANDERSON, T. D.; LYDY, M. J. Increased toxicity to invertebrates associated with a mixture of atrazine and organophosphate insecticides. **Environmental Toxicology And Chemistry**, [S.L.], v. 21, n. 7, p. 1507-1514, jul. 2002. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620210724>.

BANDEIRA, F.O et al. Toxicity of imidacloprido to the earthworm *Eisenia andrei* and collembolan *Folsomia candida* in three contrasting tropical soils. **Journal Of Soils and Sediments**, v. 20, 1997–2007, 2019. <http://dx.doi.org/10.1007/s11368-019-02538-6>

BARRIGOSI, J. A. F.; LANNA, A. C.; FERREIRA, E. Inseticidas registrados para a cultura do arroz e análise de parâmetros indicadores de seu comportamento no ambiente. **Embrapa - Circular Técnica** n. 74. Santo Antônio de Goiás, 2005. Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/193142>. Acesso em: 26 abr. 2020.

BONMATIN, J. M. et al. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 35-67, 7 ago. 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-014-3332-7>.

CALABRESE, E J; A BALDWIN, L. Defining hormesis. **Human & Experimental Toxicology**, [S.L.], v. 21, n. 2, p. 91-97, fev. 2002. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1191/0960327102ht2170a>.

CANG, T. et al. Combined toxicity of imidacloprido and three insecticides to the earthworm, *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 24, n. 9, p. 8722-8730, 16 fev. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-017-8627-z>.

COMISSÃO EUROPEIA, Commission implementing Regulation (EU) N.º 485/2013 da comissão de maio de 2013 que altera o Regulamento de Execução (EU) n.º 540/2011 no que se refere às condições de aprovação das substâncias ativas clotianidina, tiametoxame e imidacloprido e que proíbe a utilização e a venda de sementes tratadas com produtos fitofarmacêuticos que contenham essas substâncias ativas, 2013.

COMISSÃO EUROPEIA, Commission implementing Regulation (EU) N.º 781/2013 da comissão de 14 de agosto de 2013 que altera o Regulamento de Execução (EU) n.º 540/2011 no que se refere às condições de aprovação da substância ativa fipronil e que proíbe a utilização e a venda de sementes tratadas com produtos fitofarmacêuticos que contenham essa substância ativa, 2013.

COUTINHO, CLÁUDIA F. B. et al. PESTICIDAS: mecanismo de ação, degradação e toxicidade. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, [S.L.], v. 15, p. 1-1, 31 dez. 2005. Universidade Federal do Paraná. <http://dx.doi.org/10.5380/pes.v15i0.4469>.

CROUAU, Y.; MOÏA, C. The relative sensitivity of growth and reproduction in the springtail, *Folsomia candida*, exposed to xenobiotics in the laboratory: an indicator of soil toxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S.L.], v. 64, n. 2, p. 115-121, jun. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.06.002>.

CUTLER, G. C.; GUEDES, R. N. C. Occurrence and Significance of Insecticide-Induced Hormesis in Insects. **Acs Symposium Series**, [S.L.], p. 101-119, jan. 2017. American Chemical Society. <http://dx.doi.org/10.1021/bk-2017-1249.ch008>

DAI, P. et al. Chronic toxicity of clothianidin, imidacloprido, chlorpyrifos, and dimethoate to *Apis mellifera* L. larvae reared in vitro. **Pest Management Science**, [S.L.], v. 75, n. 1, p. 29-36, 4 set. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.5124>.

ENVIRONMENT CANADA. **Guidance document on application and interpretation of single-species tests in environmental toxicology**.1999. E.P.S 1/RM/34. p.203.

FAO - THE UNITED NATIONS FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (2021). Pesticides Use. Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize>. Acesso em: 21 mai. 2021.

FOSSEN, M. Environmental fate of imidacloprido. **Environmental Science**, California Department of Pesticide Regulation, 2006. Disponível em: <http://www.cdpr.ca.gov/docs/empm/pubs/fatememo/Imidclprdfate2.pdf>. Acesso em: 26 abr. 2020.

FRIEDRICH, K. et al. Situação regulatória internacional de agrotóxicos com uso autorizado no Brasil: potencial de danos sobre a saúde e impactos ambientais. **Cadernos de Saúde Pública**, [S.L.], v. 37, n. 4, p. 1-2, jan. 2021. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311x00061820>.

GARCIA, M.V. Effects of pesticides on soil fauna: development of ecotoxicological test methods for tropical regions. **Ecology and Development**, Series No. 19. University of Bonn, Germany, 281 pp, 2004.

GAZZIERO, D.L.P. Misturas de agrotóxicos em tanque nas propriedades agrícolas do Brasil. **Planta Daninha**, [S.L.], v. 33, n. 1, p. 83-92, mar. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-83582015000100010>.

GOULSON, D. REVIEW: an overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. **Journal Of Applied Ecology**, [S.L.], v. 50, n. 4, p. 977-987, 13 jun. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/1365-2664.12111>.

HENNIG, T. B. **Influências do tipo de solo, regime de umidade e temperatura no potencial tóxico de fipronil sobre a fauna edáfica**. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, Santa Catarina, 2021.

IMPERATRIZ-FONSECA, V.L. (org.). **Polinizadores no Brasil - contribuição e perspectivas para a biodiversidade, uso sustentável, conservação e serviços ambientais**. São Paulo: Usp, 2012. 490 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA. **Boletins anuais** de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil 2019, 2019. Brasília, DF. Disponível em:

<http://www.ibama.gov.br/relatorios/quimicos-e-biologicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais> Acesso em: 20 mar. 2020.

ISO 11267:2014. Soil quality — Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil contaminants. **ISO - International Standardization Organization**, 2014. 19 p.

ISWARYA, V.; BHUVANESHWARI, M.; CHANDRASEKARAN, N. Individual and binary toxicity of anatase and rutile nanoparticles towards *Ceriodaphnia dubia*. **Aquatic Toxicology**, [S.L.], v. 178, p. 209-221, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.08.007>.

JONES, A.; HARRINGTON, P.; TURNBULL, G. Neonicotinoid concentrations in arable soils after seed treatment applications in preceding years. **Pest Management Science**, [S.L.], v. 70, n. 12, p. 1780-1784, 9 jul. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ps.3836>.

KRUPKE, C. H. et al. Multiple Routes of Pesticide Exposure for Honey Bees Living Near Agricultural Fields. **Plos One**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 29-268, 3 jan. 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0029268>

LADOU, J.; HARRISON R. **CURRENT: Medicina Ocupacional e Ambiental (Lange): diagnóstico e tratamento**. 5. ed. Brasil: Mcgraw Hill Brasil, 2016. 928 p.

LI, D. et al. Individual and binary mixture effects of bisphenol A and lignin-derived bisphenol in *Daphnia magna* under chronic exposure. **Chemosphere**, v. 191, p.779–786, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.022>

LIU, N et al. Separate and combined effects of glyphosate and copper on growth and antioxidative enzymes in *Salvinia natans* (L.) All. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 655, p. 1448-1456, mar. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.11.213>

LUO, P. **Toxicity interaction of fipronil and imidacloprido against *Coptotermes formasanus***. Tese (Master of Science), China Agricultural University, 2010. https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_theses/1246

MACHADO, J. C.; WAQUIL, J. M.; SANTOS, J. P.; RESICHENBACH, J. W. Tratamento de sementes no controle de fitopatogenos e pragas. **Informe Agropecuario**, Belo Horizonte, v. 27, n. 232, p. 76-87, maio/jun. 2006.

MACIEL, C. F.; LOPES, Rubens Mendes. **Ecotoxicologia comportamental: uma revisão com enfoque na locomoção de invertebrados aquáticos**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências) Universidade de São Paulo, Sao Paulo, 2019.

MARKING, L; DAWSON V. Method for assessment of toxicity or efficacy of mixtures of chemicals. **Investigations in Fish Control**, [S.L.], p. 0-7, 1975.

NATAL-DA-LUZ, T. et al. Toxicity to *Eisenia andrei* and *Folsomia candida* of a metal mixture applied to soil directly or via an organic matrix. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 74, n. 6, p. 1715-1720, set. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.05.017>.

OECD, 1984. Guideline for Testing of Chemicals No. 207: Earthworm Acute Toxicity 245 Test. **Organization for Economic Co-operation and Development**, Paris.

PINHEIRO, J. H. P. A. **Toxicidade de imidacloprido e carbofuran para organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos**. 106 p. Tese (Doutorado em Aquicultura). Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal. 2015.

PISA, L. W. et al. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 22, n. 1, p. 68-102, set. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-014-3471-x>.

RITCHIE, E.E. et al. Lethal and Sublethal Toxicity of Thiamethoxam and Clothianidin Commercial Formulations to Soil Invertebrates in a Natural Soil. **Environmental Toxicology And Chemistry**, [S.L.], v. 38, n. 10, p. 2111-2120, ago. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.4521>

SANCHEZ-BAYO, F.; HYNE, R. V. Comparison of environmental risks of pesticides between tropical and nontropical regions. **Integrated Environmental Assessment And Management**, [S.L.], v. 7, n. 4, p. 577-586, 19 maio 2011. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ieam.189>.

SANTOS, M. J.G.; SOARES, A. M.V.M.; LOUREIRO, S. Joint effects of three plant protection products to the terrestrial isopod *Porcellionides pruinosus* and the collembolan *Folsomia candida*. **Chemosphere**, [S.L.], v. 80, n. 9, p. 1021-1030, ago. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.05.031>.

SCHNUG, L. et al. Responses of earthworms to repeated exposure to three biocides applied singly and as a mixture in an agricultural field. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 505, p. 223-235, fev. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.09.089>.

SCHNUG, L. et al. Synergistic sub-lethal effects of a biocide mixture on the springtail *Folsomia fimetaria*. **Environmental Pollution**, [S.L.], v. 186, p. 158-164, mar. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.12.004>.

SCORZA JÚNIOR, R. P.; FRANCO, A. A. A temperatura e umidade na degradação de fipronil em dois solos de Mato Grosso do Sul. **Ciência Rural**, [S.L.], v. 43, n. 7, p. 1203-1209, 18 jun. 2013. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-84782013005000083>.

SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S.S. **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**. Campinas: Instituto Agrônômico, 312 p. 2007.

SPRAGUE, J. B.; RAMSAY, B. Lethal Levels of Mixed Copper–Zinc Solutions for Juvenile Salmon. **Journal Of The Fisheries Research Board Of Canada**, [S.L.], v. 22, n. 2, p. 425-432, 1 fev. 1965. Canadian Science Publishing. <http://dx.doi.org/10.1139/f65-042>.

TINGLE, C. C. D. et al. Fipronil: environmental fate, ecotoxicology, and human health concerns. **Reviews Of Environmental Contamination And Toxicology**, [S.L.], p. 1-66, 2003. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4899-7283-5_1.

UWIZEYIMANA, H. et al. The eco-toxic effects of pesticide and heavy metal mixtures towards earthworms in soil. **Environmental Toxicology And Pharmacology**, [S.L.], v. 55, p. 20-29, out. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2017.08.001>.

WANG, Y. et al. Joint acute toxicity of the herbicide butachlor and three insecticides to the terrestrial earthworm, *Eisenia fetida*. **Environmental Science and Pollution Research**, [S.L.], v. 23, n. 12, p. 11766-11776, 5 mar. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-016-6347-4>.

WANG, Y. et al. Toxicity assessment of 45 pesticides to the epigeic earthworm *Eisenia fetida*. **Chemosphere**, [S.L.], v. 88, n. 4, p. 484-491, jul. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.086>.

YU, Y. et al. Joint toxic effects of cadmium and four pesticides on the earthworm (*Eisenia fetida*). **Chemosphere**, [S.L.], v. 227, p. 489-495, jul. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.064>.

ZORTÉA, T. et al. Ecotoxicological effects of fipronil, neem cake and neem extract in edaphic organisms from tropical soil. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [S.L.], v. 166, p. 207-214, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.061>.