

Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz  
Escola Nacional de Saúde Pública



Danielli Gundes do Espírito Santo

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO INSETICIDA ACETAMIPRIDA  
ANTES E APÓS FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA POR TiO<sub>2</sub>/UV**

Rio de Janeiro  
2018

Danielli Gundes do Espírito Santo

**AValiação ECOTOXICOLÓGICA DO INSETICIDA ACETAMIPRIDA  
ANTES E APÓS FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA POR TiO<sub>2</sub>/UV**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, do Departamento de Toxicologia, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Saúde Pública e Meio Ambiente. Subárea de concentração: Toxicologia Ambiental.

Orientador: Dr. Fábio Veríssimo Correia  
Coorientador: Dr. Enrico Mendes Saggioro

Rio de Janeiro  
2018

Catálogo na fonte  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde  
Biblioteca de Saúde Pública

S237a Santo, Danielli Gundes do Espírito  
Avaliação ecotoxicológica do inseticida acetamiprida antes e após fotocatalise heterogênea por TiO<sub>2</sub>/UV / Danielli Gundes do Espírito Santo. -- 2018.  
83 f. : il. color. ; graf. ; tab.

Orientadores: Fábio Veríssimo Correia e Enrico Mendes Saggio.

Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2018.

1. Neonicotinóides. 2. Agroquímicos. 3. Ecotoxicologia.  
4. Saúde. 5. Meio Ambiente. 6. Inseticidas. 7. Acetamiprida.  
8. *Eisenia andrei*. I. Título.

CDD – 22.ed. – 632.9517

Danielli Gundes do Espírito Santo

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO INSETICIDA ACETAMIPRIDA  
ANTES E APÓS FOTOCATÁLISE HETEROGÊNEA POR TiO<sub>2</sub>/UV**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, do Departamento de Toxicologia, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de Saúde Pública e Meio Ambiente. Subárea de concentração: Toxicologia Ambiental.

Aprovada em: 29/05/2018

Banca examinadora

---

Dr. André Luís de Sá Salomão – Universidade do Estado do Rio de Janeiro

---

Dra. Rachel Ann Hauser Davis – Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca

---

Dr. Fábio Veríssimo Correia – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro  
(Orientador)

---

Dr. Enrico Mendes Saggioro – Fundação Oswaldo Cruz - Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca (Coorientador)

Rio de Janeiro  
2018

*Aos profissionais rurais, que são  
expostos a riscos diários para  
alimentarem o próximo. Que este  
trabalho se some a muitos outros e se  
reverta em melhores condições de  
trabalho para a classe.*

## ***Agradecimentos***

*Aos meus pais, Isaac e Lubete, que sempre proporcionaram um ambiente de estímulo a aprendizagem e foram responsáveis e zelosos, contribuindo para o ser humano que me tornei.*

*Ao meu cônjuge, Maurício Canedo, pelo amor, compreensão, conselhos, longas e prazerosas conversas reflexivas sobre o sentido da vida e por sempre me ajudar nos momentos de desespero.*

*Aos meus familiares, amigos e a todos os bons professores que tive a sorte de ter durante toda minha trajetória acadêmica, pela dedicação, carinho e apoio.*

*Aos meus amigos, graduados e oficiais, e aos meus superiores hierárquicos do Hospital de Força Aérea do Galeão, pela torcida, incentivo, trocas e remanejamento de horários.*

*Ao corpo docente e colegas de turma da ESNP, pelo aprendizado, disponibilidade e trocas de experiências. Especialmente, à Ariane Larentis, pela gentileza em me responder quando quis visitar e conhecer a Escola e por fazer a ponte de comunicação entre mim e meus orientadores.*

*Aos meus orientadores, Fábio Veríssimo e Enrico Saggiaro, pelo direcionamento e aperfeiçoamento na construção deste trabalho.*

*À toda equipe, colaboradores e colegas do CESTEJ, por me ajudarem nos experimentos e sanarem minhas dúvidas.*

*À banca examinadora, pela disponibilidade, atenção e compreensão.*

*“Em algum lugar, algo incrível está  
esperando para ser descoberto.”*

*(Carl Sagan)*

## Resumo

Dentre os diversos tipos de agrotóxicos, uma classe que vem ganhando destaque é a dos neonicotinóides, que atua como agonista seletivo de receptores nicotínicos de acetilcolina em insetos, com consequente hiperatividade nervosa e colapso do sistema nervoso. Apesar de melhorarem a produção agrícola, os agrotóxicos proporcionam impactos diretos à saúde humana e ao meio ambiente. Uma alternativa para a remediação ambiental de locais contaminados com este composto seria o tratamento com fotocatalise heterogênea com  $\text{TiO}_2$ , uma vez que este processo tem se destacado pela sua elevada capacidade destrutiva de moléculas orgânicas. Concomitantemente, ensaios ecotoxicológicos com organismos-modelo podem ser realizados para indicarem se o tratamento resultará na redução da toxicidade do composto. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade do inseticida acetamiprida antes e depois da fotocatalise heterogênea por  $\text{TiO}_2/\text{UV}$  no organismo terrestre *Eisenia andrei*. O estudo consistiu na degradação do acetamiprida por fotocatalise heterogênea com  $\text{TiO}_2/\text{UV}$  em diferentes tempos da reação. Na sequência, ensaios ecotoxicológicos com minhocas *Eisenia andrei* (ensaio de contato em papel de filtro, teste de fuga e ensaio da toxicidade aguda e crônica em solo natural) foram realizados para avaliação da atividade enzimática da GST e CAT e do quantitativo de GSH, relacionados ao estresse oxidativo, além de análises celulares, bem como determinação da variação de biomassa e taxa reprodutiva. Nos ensaios de contato, a  $\text{CL}_{50}$  foi  $1,12 \text{ mg L}^{-1}$ , todas as minhocas morreram na maior concentração ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) após 24 horas de exposição e, as que sobreviveram em concentrações intermediárias, apresentaram alterações morfológicas, como inchaço, nódulos, partição e deformações clitelares, antes e após o tratamento com  $\text{TiO}_2/\text{UV}$ . Nos tempos zero e quinze minutos da reação de degradação, todos os indivíduos morreram após 72 horas, indicando uma possível toxicidade dos fotoprodutos gerados durante a degradação. No ensaio crônico com o acetamiprida, houve redução no número de ovos em 100 % para a concentração  $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$  e em 33,3% para a concentração  $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$  e, no número de filhotes, redução de 91,3% para a concentração  $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$  e em 50 % para a concentração  $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$  em comparação com o controle. A atividade enzimática da catalase aumentou em relação ao controle após 45 dias na concentração  $0,05 \text{ mg kg}^{-1}$ . Quanto ao ensaio crônico com os fotoprodutos, os tempos 0 e 15 minutos apresentaram inibição de 100 % no quantitativo



de ovos e o tempo 0 minuto apresentou inibição de 100 % no número de filhotes. Nos testes de fuga, obtiveram-se respostas líquidas positivas nas maiores concentrações, ou seja, as minhocas apresentaram uma tendência de fugirem do lado do solo contaminado com o composto. No teste de fuga com o acetamiprida, as concentrações 0,1 e 1 mg kg<sup>-1</sup> apresentaram respostas líquidas de 0,8667 e 0,6, respectivamente. Já no ensaio com os fotoprodutos, os tempos 10 e 30 minutos tiveram respostas líquidas de 0,433 e 0,1667, respectivamente. Também foram observadas alterações morfológicas na maior concentração (1 mg kg<sup>-1</sup>) após 48 horas no ensaio com o inseticida. Logo, o composto mostrou ser tóxico para as minhocas *Eisenia andrei*, o que levanta discussões acerca dos limites seguros para exposição humana e ambiental.

**Palavras-chave:** acetamiprida; agrotóxico; *Eisenia andrei*; ecotoxicologia; saúde; meio ambiente.

## Abstract

Among the various types of pesticides, a class that has been gaining prominence is the neonicotinoids, which act as a selective agonist of nicotinic acetylcholinergic receptors in insects, with consequent nervous hyperactivity and collapse of the nervous system. Despite improving agricultural production, agrochemicals have a direct impact on human health and the environment. An alternative for the environmental remediation of sites contaminated with this compound would be the treatment with heterogeneous photocatalysis with  $\text{TiO}_2$ , since this process has been highlighted by its high destructive capacity of organic molecules. Concomitantly, ecotoxicological tests with model organisms may be performed to indicate whether the treatment will result in the reduction of toxicity of the compound. Thus, the objective of this work was to evaluate the toxicity of acetamiprid insecticide before and after heterogeneous  $\text{TiO}_2/\text{UV}$  photocatalysis in the *Eisenia andrei* terrestrial organism. The study consists of the degradation of acetamiprid by heterogeneous photocatalysis with  $\text{TiO}_2/\text{UV}$  at different reaction times. Following, ecotoxicological tests with *Eisenia andrei* earthworms (filter paper contact test, avoidance test and acute and chronic toxicity test in natural soil) were performed to evaluate the enzymatic activity of GST and CAT and the quantitative of GSH, related to oxidative stress, in addition to cellular analysis, as well as determination of biomass variation and reproductive rate. In the contact tests,  $\text{LC}_{50}$  was  $1.12 \text{ mg L}^{-1}$ , all worms died at the highest concentration ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) after 24 hours of exposure, and those that survived at intermediate concentrations showed morphological changes, such as swelling, nodules, partition and clitoral deformations before and after treatment with  $\text{TiO}_2/\text{UV}$ . At zero and fifteen minutes of the degradation reaction, all individuals died after 72 hours, indicating a possible toxicity of the photoproducts generated during the degradation. In the chronic test with acetamiprid, there was a reduction in the number of eggs at 100 % for the concentration  $0.05 \text{ mg kg}^{-1}$  and in 33.3 % at the concentration  $0.1 \text{ mg kg}^{-1}$  and, in the number of pups, at 91.3 % for the concentration  $0.05 \text{ mg kg}^{-1}$  and 50 % for the concentration  $0.1 \text{ mg kg}^{-1}$  as compared to the control. The enzymatic activity of the catalase increased in relation to the control after 45 days at the concentration  $0.05 \text{ mg kg}^{-1}$ . As for the chronic test with the photoproducts, the 0 and 15 minute times showed 100 % inhibition in the egg quantitative and the time 0 minute showed 100 % inhibition in the number of juveniles.

In the avoidance tests, positive net responses were obtained at the highest concentrations, that is, the worms showed a tendency to flee from the soil side contaminated with the compound. In the avoidance test with acetamiprid, concentrations of 0.1 and 1 mg kg<sup>-1</sup> showed net responses of 0.8667 and 0.6, respectively. In the test with the photoproducts, times 10 and 30 minutes had net responses of 0.433 and 0.1667, respectively. Morphological changes were also observed at the highest concentration (1 mg kg<sup>-1</sup>) after 48 hours in the test with the insecticide. Therefore, the compound proved to be toxic to the *Eisenia andrei* worms, which raises discussions about the safe limits for human and environmental exposure.

**Key words:** acetamiprid; agrotoxic; *Eisenia andrei*; ecotoxicology; health; environment.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Dispersão de agrotóxicos no meio ambiente .....	13
Figura 2 - Fórmula estrutural do agrotóxico acetamiprida .....	17
Figura 3 - Esquema do mecanismo antioxidante celular .....	27
Figura 4 – Lâminas de microscopia contendo células de defesa do organismo <i>E. andrei</i> .....	28
Figura 5 - Esquema da formação do radical hidroxila, comum em todos os POAs e dos processos fotocatalíticos .....	30
Figura 6 - Tipos de sistemas de POAs que são utilizados em descontaminações .....	31
Figura 7 - Mecanismo de ativação do TiO <sub>2</sub> .....	32
Figura 8 - Reator com lâmpada de vapor de mercúrio utilizada nos experimentos de fotodegradação do agrotóxico acetamiprida .....	36
Figura 9 - Gráfico da curva analítica do acetamiprida com algumas concentrações e suas respectivas áreas de pico no HPLC-DAD .....	37
Figura 10 - Experimento ecotoxicológico de contato em papel de filtro com minhocas <i>Eisenia andrei</i> .....	39
Figura 11 - Experimento ecotoxicológico de comportamento (teste de fuga) com minhocas <i>E. andrei</i> .....	41
Figura 12 - Esquema da coleta de fluido celômico de minhocas expostas ao acetamiprida para análises celulares .....	45
Figura 13 - Gráfico da fotodegradação do acetamiprida na concentração de 5 mg L <sup>-1</sup> com TiO <sub>2</sub> /UV.....	46
Figura 14 - Alterações morfológicas (inchaço e nódulos) apresentadas por organismos <i>E. andrei</i> após 24 horas na concentração de acetamiprida de 0,16 µg.cm <sup>-2</sup> no ensaio de contato .....	47

Figura 15 - Gráfico com a curva de dose-resposta do acetamiprida para o organismo <i>E. andrei</i> no ensaio de contato com papel de filtro após 72 horas de exposição .....	48
Figura 16 - Gráfico comparativo de biomassa dos organismos <i>E. andrei</i> no ensaio de contato com papel de filtro .....	48
Figura 17 - Médias da viabilidade e densidade das células imunes no ensaio de contato com o acetamiprida .....	49
Figura 18 - Distribuição da população das células imunes no ensaio de contato com o acetamiprida .....	49
Figura 19 - Variação da atividade da GST e CAT e quantitativo de GSH no ensaio de contato com o acetamiprida .....	50
Figura 20 - Alterações morfológicas (nódulos) observadas após 72h no T60, durante o ensaio de contato com o acetamiprida tratado com TiO <sub>2</sub> .....	51
Figura 21 - Médias da viabilidade e densidade das células imunes no ensaio de contato com o acetamiprida tratado com TiO <sub>2</sub> .....	51
Figura 22 - Distribuição da população das células imunes no ensaio de contato com o acetamiprida tratado com TiO <sub>2</sub> .....	52
Figura 23 - Variação da atividade da GST (A) e CAT (B) e quantitativo de GSH (C) no ensaio de contato com o acetamiprida tratado com TiO <sub>2</sub> .....	53
Figura 24 - Alterações morfológicas (inchaço e nódulos) apresentadas pelos organismos <i>E. andrei</i> após 48 horas de exposição na concentração de acetamiprida de 1 mg kg <sup>-1</sup> no teste de fuga .....	54
Figura 25 - Variação da biomassa das minhocas <i>Eisenia andrei</i> no ensaio de toxicidade em solo com o acetamiprida .....	55
Figura 26 - Médias da viabilidade e densidade das células imunes no ensaio de toxicidade em solo com o acetamiprida .....	56
Figura 27 - Distribuição da população das células imunes no ensaio de toxicidade em solo com o acetamiprida .....	57

Figura 28 - Variação da atividade da GST e CAT e quantitativo de GSH no ensaio de toxicidade em solo com o acetamiprida .....	58
Figura 29 - Variação da biomassa no ensaio de toxicidade em solo com diferentes tempos de fotodegradação com TiO <sub>2</sub> .....	59
Figura 30 - Médias da viabilidade e densidade das células imunes no ensaio de toxicidade em solo com o acetamiprida tratado com TiO <sub>2</sub> .....	60
Figura 31 - Distribuição da população das células imunes no ensaio de toxicidade em solo com o acetamiprida tratado com TiO <sub>2</sub> .....	60
Figura 32 - Variação da atividade da GST e CAT e quantitativo de GSH no ensaio de toxicidade em solo com o acetamiprida tratado com TiO <sub>2</sub> .....	61
Figura 33 - Recomendações para estudos futuros com o acetamiprida .....	68

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do acetamiprida .....	18
Tabela 2 - Uso do acetamiprida em monoculturas .....	19
Tabela 3 - Concentrações de acetamiprida previstas no solo em condições de uso real .....	24
Tabela 4 - Comparação do potencial oxidante dos agentes oxidantes .....	30
Tabela 5 - Valores das respostas líquidas obtidas no ensaio de comportamento utilizando três concentrações de acetamiprida .....	54
Tabela 6 - Valores das respostas líquidas obtidas no ensaio de comportamento utilizando 5 momentos da reação de degradação do acetamiprida por TiO <sub>2</sub> .....	55
Tabela 7 - Quantitativo de ovos e filhotes no ensaio de toxicidade em solo com o acetamiprida .....	56
Tabela 8 - Quantitativo de ovos e filhotes no ensaio de toxicidade em solo com o acetamiprida tratado com TiO <sub>2</sub> .....	59
Quadro 1 - Síntese das normatizações sobre agrotóxicos na União Europeia .....	7
Quadro 2 - Síntese das normatizações sobre agrotóxicos nos EUA .....	8
Quadro 3 - Síntese das normatizações sobre agrotóxicos no Brasil .....	11
Quadro 4 - Alguns estudos sobre detecção ambiental de agrotóxicos .....	14

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAT	Catalase
CCE	Comissão das Comunidades Européias
CEE	Comunidade Econômica Européia
CESTEH	Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – SP
CL <sub>50</sub>	Concentração Letal capaz de matar 50 % dos organismos testados
CE <sub>10</sub>	Concentração capaz de provocar efeito em 10 % dos organismos
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DNA	Ácido Desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
EUA	Estado Unidos da América
FEPCA	<i>Federal Environmental Pesticide Control Act</i>
FFDCA	<i>Federal Food, Drug and Cosmetic Act</i>
FIFRA	<i>Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FQPA	<i>Food Quality Protection Act</i>
GSH	Glutathione
GST	Glutathione S-transferases
HPLC-DAD Detection	<i>High Performance Liquid Chromatography with Diode Array</i>
IBAMA Renováveis	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais
INEA	Instituto Estadual do Ambiente – RJ
ISO	International Organization for Standardization
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LBSS	<i>Lumbricus Balanced Salt Solution</i>
LMR	Limite Máximo de resíduo



LOEL	<i>Lowest Observed Effect Level</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NADH	Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
NADPH	Fosfato de Dinucleotídeo de Adenina e Nicotinamida
NBR	Norma Brasileira Regulamentadora
NOEL	<i>No Observed Effect Level</i>
OECD	<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>
pH	Potencial de Hidrogênio
PNDA	Programa Nacional de Defensivos Agrícolas
POA	Processo Oxidativo Avançado
RL	Resposta Líquida
RNA	Ácido Ribonucleico, do inglês <i>ribonucleic acid</i>
SINDAG	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola
SNCR	Sistema Nacional de Crédito Rural
UE	União Européia
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
UV	Ultravioleta
UV-VIS	Ultravioleta Visível

# SUMÁRIO

1. Introdução .....	1
2. Objetivos .....	4
2.1 Geral .....	4
2.2 Específicos .....	4
3. Referencial teórico .....	4
3.1 Uso de agrotóxicos no mundo .....	4
3.2 Uso de agrotóxicos no Brasil .....	8
3.3 Os agrotóxicos e o meio ambiente .....	12
3.3.1 Problemas de saúde associados aos agrotóxicos .....	14
3.3.2 Efeitos ecotoxicológicos associados aos agrotóxicos .....	15
3.4 O agrotóxico acetamiprida .....	17
3.4.1 Efeitos à saúde humana e ao meio ambiente .....	20
3.4.2 Ocorrência e comportamento no meio ambiente .....	22
3.5 Ecotoxicologia terrestre .....	24
3.6 Processos Oxidativos Avançados .....	29
3.6.1 TiO <sub>2</sub> /UV.....	31
4. Metodologia .....	34
4.1 Reagentes e compostos químicos .....	34
4.2 Degradação do acetamiprida por fotocatalise heterogênea com TiO <sub>2</sub> /UV .....	35
4.3 Análise cromatográfica .....	36
4.4 Ensaios ecotoxicológicos com minhocas <i>Eisenia Andrei</i> .....	37
4.4.1 Características do solo e cultivo das minhocas .....	37
4.4.2 Ensaio de contato em papel de filtro .....	38
4.4.3 Ensaio de Comportamento (Teste de Fuga) .....	40
4.4.4 Ensaio de toxicidade aguda e crônica em solo natural .....	41
4.4.5 Alterações morfológicas .....	42
4.4.6 Avaliação da atividade enzimática relacionada ao estresse oxidativo .....	43
4.4.7 Extração e quantificação de GSH .....	43
4.4.8 Coleta do fluido celômico para análises de células .....	44
4.4.9 Análises estatísticas .....	45
5. Resultados .....	46
5.1 Experimento de fotodegradação .....	46
5.2 Ensaios ecotoxicológicos .....	46

5.2.1 Ensaio de contato com papel de filtro com o acetamiprida .....	46
5.2.2 Ensaio de contato com papel de filtro com o acetamiprida tratado com TiO <sub>2</sub> .....	50
5.2.3 Ensaio de comportamento (teste de fuga) com o acetamiprida .....	53
5.2.4 Ensaio de comportamento (teste de fuga) com o acetamiprida tratado com TiO <sub>2</sub> .....	54
5.2.5 Ensaio da toxicidade aguda e crônica em solo natural com o acetamiprida .....	55
5.2.6 Ensaio da toxicidade aguda e crônica em solo natural com o acetamiprida tratado com TiO <sub>2</sub> .....	58
6. Discussão .....	61
7. Conclusões .....	66
8. Recomendações futuras .....	67
Referências .....	68

## 1. Introdução

A grande demanda mundial por produção de alimentos tem na agricultura uma solução para o problema mundial da fome. Após a Segunda Guerra Mundial, a Revolução Verde – entrada em massa da tecnologia advinda da guerra na agricultura – proporcionou um acentuado aumento na produção de alimentos (COSTA, 2012). Porém, a monocultura ameaça ecossistemas e diminui a biodiversidade, o que torna o ambiente favorável para o desenvolvimento de pragas advindas do agronegócio (BERGAMIN *et al.*, 1995). Neste contexto, o uso de pesticidas surge como uma alternativa para a preservação de monoculturas como garantia de produção e lucro para o agronegócio, sendo o Brasil o país que mais consome agrotóxicos, por ser também um dos maiores produtores mundiais de alimentos (PIGNATI *et al.*, 2014).

A contaminação ambiental por agrotóxicos e, conseqüente contato humano com estas substâncias, se dá através de processos de fabricação, armazenamento, aplicação e manuseio dos pesticidas. Estes causam perda na biodiversidade, desequilíbrio ecológico e artificialização de áreas de produção, acarretando em um aumento de seu uso (CAPORAL, 2008). Outro problema também é o fato de as pragas estarem desenvolvendo resistência aos pesticidas, fator que aumenta ainda mais as doses a serem utilizadas. Na saúde humana, podem causar tanto efeitos agudos, segundo Mariconi (1980), como efeitos muscarínicos, nicotínicos e centrais, a crônicos, segundo Pingali *et al.* (1994).

No Brasil, a lei 7.802/89 define agrotóxicos como substâncias cuja finalidade é a alteração da composição da flora ou fauna, com o objetivo de preservá-las da ação danosa de espécies consideradas nocivas. Mais tarde, em 2002, o decreto 4.074 regulamenta esta lei, dando várias especificações sobre registro, monitoramento e fiscalização de agrotóxicos em vários aspectos, como fabricação, armazenagem e uso. A avaliação da eficiência agrônômica dos agrotóxicos e a concessão de registro são incumbências do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), segundo diretrizes e exigências dos Ministérios da Saúde e do Meio Ambiente. Enquanto que o Ministério da Saúde avalia e classifica toxicologicamente os agrotóxicos e o Ministério do Meio Ambiente realiza a avaliação ambiental, definindo o potencial de periculosidade ambiental. Sobre a avaliação ambiental feita pelo IBAMA, vale destacar os ensaios ecotoxicológicos, que são previstos no Manual para

Requerimento de Avaliação Ambiental: agrotóxico e afins. Estes ensaios avaliam os agrotóxicos quanto ao potencial de bioacumulação na cadeia alimentar e à toxicidade a diversos organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos. Neste referido manual, estão previstos ensaios ecotoxicológicos em algas, microcrustáceos, peixes, minhocas, abelhas, aves e mamíferos.

Produtos químicos são produzidos e utilizados em larga escala pela sociedade moderna, em várias aplicações. Essa grande produção e consumo geram grande quantidade de resíduos, sejam eles derivados diretamente das atividades industriais ou produzidos após seu consumo pela sociedade, o que pode impactar de forma negativa o meio ambiente trazendo prejuízo à saúde humana (SILVA e COLLINS, 2011). Com o desenvolvimento de métodos de avaliação mais eficazes e precisos, algumas substâncias químicas antes desconhecidas passaram a ser detectadas, identificadas e definidas quanto aos riscos que possam causar no meio ambiente e na saúde humana.

Essas substâncias podem ser chamadas “contaminantes emergentes”, ou seja, compostos potencialmente tóxicos que são continuamente lançadas no meio ambiente através de atividades industriais, agrícolas, domésticas e de bens de consumo, e que não estão incluídos em programas de monitoramento prioritários de órgãos ambientais e de saúde humana (BARCELÓ, PETROVIC, 2008). Com isso, devido ao seu grande potencial de contaminação, podem causar efeitos negativos à saúde humana sem que seja necessário que persistam no meio ambiente (PEDROSO, 2007; REIS FILHO *et al.*, 2007).

Há pelo menos 50 anos, esses compostos vêm sendo muito utilizados em atividades variadas, estando presentes em: agrotóxicos, esteroides naturais, fármacos e produtos químicos industriais; sendo parte deles liberados, como resíduo, no meio aquático. Como risco potencial à saúde humana e ao meio ambiente, oriundos da utilização de tais substâncias, pode-se citar a disfunção no sistema endócrino e reprodutivo de seres humanos e dos animais, abortos espontâneos, distúrbios metabólicos e incidência de neoplasias malignas, além da indução de bactérias mais resistentes (SANTANA *et al.*, 2002; REIS FILHO *et al.*, 2007; SILVA e COLLINS, 2011).

Como o uso destas substâncias, dentre elas, o acetamiprida – foco deste trabalho – é inevitável para o ritmo de produção e consumo que norteiam o atual padrão da presente sociedade, os Processos Oxidativos Avançados (POAs) podem ser uma

alternativa para a redução da toxicidade deste composto. Uma vez que, os POAs têm se destacado pela sua elevada capacidade destrutiva de moléculas orgânicas (MBOULA 2013) – fato promissor na tentativa de tratamento do composto-alvo. A degradação fotocatalítica de diversos compostos orgânicos pode gerar fotoprodutos mais tóxicos que a molécula original, desta forma a avaliação ecotoxicológica torna-se uma ferramenta útil nos estudos de degradação.

As Resoluções RE nº 144 de 18/01/10 (DOU de 19/01/10) e RE nº 2.140 de 13/05/10 (DOU de 17/05/10) da ANVISA regulamentaram o uso agrícola e profissional do acetamiprida – um inseticida do grupo dos neonicotinóides de toxicidade mediana (classe III). A exposição pode se dar através da ingestão de água ou alimentos contaminados, da inalação ou do contato dérmico (EPA, 2002). Outra maneira de exposição é através do processamento de alimentos através da indústria, os quais tiveram o uso de agrotóxicos em suas culturas, podendo conter resíduos, dentre eles, de acetamiprida (JIMENEZ *et al.*, 2015).

As minhocas são organismos sensíveis a uma variedade de compostos orgânicos e inorgânicos, podendo sofrer bioacumulação, o que possibilita que estes organismos sirvam como um indicador rápido da presença de compostos tóxicos, permitindo com que sejam utilizadas para avaliação de risco de áreas sob suspeita de contaminação. Visto isso, a minhoca *Eisenia andrei* foi escolhida como uma espécie de monitoramento, porque se reproduz facilmente em laboratório, tendo sido aprovada pela União Européia e Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) para uso em ensaios de toxicidade, tendo sido usada pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos EUA como um teste amplo para avaliação de resíduos contaminantes em vários locais (SAGGIORO *et al.*, 2014).

Sendo assim, torna-se relevante estudar os impactos do inseticida acetamiprida no organismo terrestre *E. andrei*, visto que estudos com este organismo são escassos e o acetamiprida é um potencial contaminante ambiental (BARCELÓ, PETROVIC, 2008). Com isso, há uma necessidade também de estudar a eficiência de POAs na destruição desta molécula. Assim, a fotocatalise heterogênea com TiO<sub>2</sub>/UV foi empregada para degradar o inseticida e avaliar os potenciais efeitos dos seus produtos de degradação no organismo terrestre *E. andrei*

## **2. Objetivos**

### **2.1 Geral**

Avaliar, através de ensaios ecotoxicológicos com o organismo terrestre *Eisenia andrei*, a toxicidade do inseticida acetamiprida antes e depois do tratamento com fotocatalise heterogênea por TiO<sub>2</sub>/UV.

### **2.2 Específicos**

- 1- Verificar a eficiência da fotocatalise heterogênea com TiO<sub>2</sub>/UV na degradação do acetamiprida;
- 2- Realizar ensaio de contato, ensaios de fuga e ensaios de toxicidade aguda e crônica, com análise da variação de biomassa e reprodução, com o acetamiprida e seus produtos de oxidação;
- 3- Investigar os níveis de estresse oxidativo do acetamiprida e seus produtos de oxidação por meio de biomarcadores (CAT, GST e GSH) no organismo *Eisenia andrei*;
- 4- Avaliar a citotoxicidade do acetamiprida e seus produtos de oxidação por meio de viabilidade, densidade e tipagem celular no organismo *Eisenia andrei*.

## **3. Referencial Teórico**

### **3.1 Uso de agrotóxicos no mundo**

A descoberta da agricultura foi um marco que dividiu a história, separando o período neolítico da idade da pedra lascada, período anterior ao primeiro. Desta forma, foi observado que algumas plantas eram semeáveis, o que permitiu o abandono da vida nômade. Isso, sem dúvidas, foi decisivo para o estabelecimento humano no planeta, pois permitiu a aglomeração e aumento da densidade populacional – pontapé inicial para formação de sociedades cada vez maiores e mais organizadas ao redor de rios, como a Mesopotâmia, por exemplo. Sendo assim, a agricultura pode ser entendida como um conjunto de técnicas para cultivo de plantas de interesse humano e econômico, tanto

para alimentação, como para obtenção de matéria-prima, medicamentos e até mesmo energia (SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO DE JUNDIAÍ – SP, 2016).

Inicialmente, a colheita era feita por ferramentas manuais ou por tração animal – como pás, enxadas e o arado, por exemplo, o que acarretava em baixa produtividade. Na Idade Média, surgem os carros de boi e as charruas, o que aperfeiçoou a fertilização e, com isso, a produtividade e qualidade dos alimentos. No século, XIII, porém, o aumento populacional gerou excessiva exploração dos recursos naturais, afetando a produtividade agrícola. Assim, veio a fome e a vulnerabilidade do homem por meio das pestes da época. Mais tarde, na Revolução Industrial, com a produção de maquinário agrícola, aumenta-se a produtividade no campo (COSTA, 2012).

Com descobertas e aprimoramentos tecnológicos advindos da Segunda Guerra Mundial, a chamada Revolução Verde, em meados da década de 50, proporcionou um acentuado acríve da produção agrícola nos Estados Unidos e Europa. A grande promessa era a erradicação da fome e, com isto, estas tecnologias foram inseridas nas atividades agrícolas, entre elas, o uso de agrotóxicos em larga escala. Muitos destes foram usados como arma química nas guerras da Coréia e do Vietnã, como o conhecido “agente laranja”, desfolhante que dizimou milhares de soldados e civis, além de ter contaminado o meio ambiente (COSTA, 2012).

Tais tecnologias, além dos agrotóxicos, contavam também com fertilizantes, mecanização da produção, biotecnologia, como os transgênicos, e melhoramento genético. A produção agrícola realmente disparou, contudo, o problema da fome continua até os dias de hoje, e, segundo Lucchesi (2005), a razão é de fácil compreensão: o problema da fome no mundo está associado à distribuição política, econômica e social desigual de capital e não à escassez de alimentos propriamente dita.

Apesar de toda a propaganda sobre a eficiência agrícola dos agrotóxicos por parte do governo e até mesmo da Organização Mundial da Saúde com o objetivo de erradicação da malária – visto que estas tecnologias pós-guerra foram utilizadas em outras áreas, além do setor agrícola – não demorou muito para que os primeiros alertas sobre os riscos à saúde humana e ao meio ambiente começassem a vir à tona. Já na década seguinte, em 1962, a americana Rachel Carson, escreve o livro “*Silent Spring*” (Primavera Silenciosa), obra pioneira a detalhar os efeitos adversos dos pesticidas,



pontapé inicial para o debate acerca das implicações da atividade humana sobre o ambiente e o custo disso para a saúde humana (LUCCHESI, 2005).

Rachel Carson denunciou também a negligência em liberar o uso destes compostos sem estudo prévio: “nós permitimos que esses produtos químicos fossem utilizados com pouca ou nenhuma pesquisa prévia sobre seu efeito no solo, na água, animais selvagens e sobre o próprio homem”. A partir daí, devido às pressões por parte de ambientalistas e civis, o uso de agrotóxicos passaram a ser regulamentados. O DDT, em especial, após a constatação de que seus resíduos persistiam ao longo de toda cadeia alimentar, foi banido em vários países na década de 1970, com uso controlado pela Convenção de Estocolmo sobre poluentes Orgânicos Persistentes (COSTA, 2012).

Os regulamentos europeus dizem que a produção vegetal lhes é importante e que pesticidas são usados para melhorar tal produção. Dentre alguns destes regulamentos, podemos destacar alguns, como: Diretiva 91/414; Regulamento 1107/2009; Regulamento 396/2005 e Diretiva 128/2009. A Diretiva 91/414 tratava da aplicação de agrotóxicos e sua comercialização. Valendo ressaltar que em 2006 foi proposta uma estratégia para utilização sustentável dos agrotóxicos, reduzindo-se seus riscos para o ambiente e saúde humana. Por outro lado, o Regulamento 1107/2009 determina que os agrotóxicos somente poderão ser incluídos se estiverem provados seus benefícios para a produção agrícola, porém sem qualquer efeito prejudicial à saúde humana, animais ou meio ambiente. O Regulamento 396/2005 simplificou e unificou diretivas anteriores a ele, de meados dos anos 70, que tratavam dos limites máximos de resíduos de agrotóxicos em diferentes alimentos, com o objetivo de se reduzir os riscos à saúde humana. A Diretiva 128/2009 surge como uma revisão de leis anteriores e adota medidas de precauções mais rígidas, como proibição da pulverização aérea. Além disso, as substâncias passaram a ser descritas isoladamente, uma a uma, quanto ao seu potencial prejuízo à saúde humana e meio ambiente. Com isto, menos de 30 % dos pesticidas avaliados foram aprovados e todo o restante foi retirado de circulação (ROCHA e ESPINDOLA, 2014). O Quadro 1 agrupa o conjunto legislativo sobre agrotóxicos na União Européia:

**Quadro 1** – Síntese das normatizações sobre agrotóxicos na União Europeia. Fonte: Rocha e Espindola (2014).

<b>Diploma Legal/Ano</b>	<b>Descrição</b>	<b>Principais implicações ao meio ambiente e à política ambiental</b>	<b>Principais implicações à saúde humana e à política de saúde pública</b>
Regulamento 396/2005	Relativo aos limites máximos de resíduos de pesticidas nos gêneros alimentícios (de humanos e animais). Altera a Diretiva 91/414/CCE. Revoga quatro Diretivas anteriores que tratavam dos teores máximos de resíduos de agrotóxicos em diferentes gêneros alimentícios	Propõe que se verifique a quantidade de agrotóxicos despejada no ambiente à medida que exige a não extrapolação dos limites máximos de resíduos (LMR)	Verifica constantemente se os produtos comercializados estão dentro dos LMR a fim de não prejudicar a saúde humana
Regulamento 1107/2009	Relativo à colocação dos produtos fitofarmacêuticos no mercado. Revoga as Diretivas 79/117/CEE e 91/414/CEE	Coloca a necessidade de proteção ao meio ambiente à frente do desempenho agrônômico dos agrotóxicos	Coloca a necessidade de proteção à saúde humana à frente do desempenho agrônômico dos agrotóxicos
Diretiva 128/2009	Estabelece um quadro de ação a nível comunitário para uma utilização sustentável dos agrotóxicos	Coloca o meio ambiente como pauta central do processo decisão legal, fomentando a substituição dos agrotóxicos por alternativas menos impactantes	Coloca a saúde humana ao lado do meio ambiente como pauta central do processo decisão legal, fomentando a substituição dos agrotóxicos por alternativas menos impactantes

Na década de 70, os Estados Unidos, inicialmente, a *Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide Act* (FIFRA) incumbiu-se de introduzir as primeiras prerrogativas de regulamentação do uso de inseticidas. Foi um longo processo, passando

por diversas alterações e, posteriormente, com a criação da *Food Quality Protection Act* (FQPA) e da *Federal Environmental Pesticide Control Act* (FEPCA), a legislação americana explicitou a preocupação com a saúde humana e meio ambiente no que se refere ao uso de agrotóxicos. Com isto, a *Environmental Protection Agency* (EPA) e a *Federal Food, Drug and Cosmetic Act* (FFDCA) são responsáveis por regulamentar o uso de agrotóxicos no que se refere à saúde humana (ROCHA e ESPINDOLA, 2014). O Quadro 2 agrupa o conjunto legislativo sobre agrotóxicos nos EUA.

**Quadro 2** – Síntese das normatizações sobre agrotóxicos nos EUA. Fonte: Rocha e Espindola (2014).

<b>Diploma Legal/Ano</b>	<b>Descrição</b>	<b>Principais implicações na política ambiental e no meio ambiente</b>	<b>Principais implicações na saúde humana e na política de saúde pública</b>
FIFRA/1947, atualizado diversas vezes, com destaque ao FEPCA/1972	Regula a produção e a comercialização dos agrotóxicos	Centraliza na EPA as funções de regular o uso e a comercialização dos agrotóxicos no país, a fim de preservar o meio ambiente. Fixa a validade dos registros em 15 anos e cobra altas taxas das empresas	Centraliza na EPA as funções de regular o uso e a comercialização dos agrotóxicos no país, a fim de proteger a saúde humana. Fixa a validade dos registros em 15 anos e cobra altas taxas das empresas
FQPA	Padronizou o modo como a EPA gere o uso de agrotóxicos, alterando o FIFRA e o FFDCA	Aumentou o rigor da avaliação de risco dos produtos com resíduos de agrotóxicos. Dá respaldo científico para processos de reavaliação, banimentos e aumento de embargo sobre países dos quais importam produtos	Aumentou o rigor da avaliação de risco dos produtos com resíduos de agrotóxicos. Dá respaldo científico para processos de reavaliação, banimentos e aumento de embargo sobre países dos quais importam produtos

### 3.2 Uso de agrotóxicos no Brasil

Como o lema de Revolução Verde, segundo Gómez (2006), era promover, nos países de Terceiro Mundo, um progresso econômico pela modernização da agricultura – que beneficiaria tanto estes países, no sentido de aumentar a produção de matérias-

primas que eram vendidas para países ricos, quanto para aumentar a produção de maquinário e insumos químicos dos países de Primeiro mundo que os destinariam para os países pobres – o Brasil entra neste cenário como um forte candidato a se tornar um dos maiores produtores mundiais de alimentos, devido sua vasta extensão territorial.

Entre as décadas de 40 a 70, houve grande estímulo por parte do governo brasileiro para a produção de agrotóxicos e modernização da agricultura, que foi, na verdade, uma mudança do foco econômico – do setor agrícola para o industrial, ou seja, a industrialização da própria agricultura. O Programa Nacional de Defensivos Agrícolas (PNDA) e Sistema Nacional de Crédito Rural (SNCR) são programas que nasceram deste estímulo do governo à modernização agrícola – isso permitiu com que pesticidas já obsoletos internacionalmente, conquistassem o mercado nacional (TERRA e PELAEZ, 2008). Este avanço tecnológico agrícola acelerado e incentivado por estes programas tinham o discurso de melhorar a qualidade de vida das populações rurais, aumentando seu poder aquisitivo. Contudo, o que aconteceu foi o crescimento latifundiário – o que centraliza o poder e promove distribuição econômica desigual – e a expulsão de milhares de famílias do campo, que migraram para as cidades (MATOS e PESSÔA, 2011).

Seguindo padrões internacionais de legislação de agrotóxicos, nas décadas seguintes o Brasil regulamenta o uso destas substâncias. A lei 7.802/89 define agrotóxicos como “produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos”.

Mais tarde, em 2002, o decreto 4.074 regulamenta esta lei, dando várias especificações sobre registro, monitoramento e fiscalização de agrotóxicos em vários aspectos, como fabricação, armazenagem e uso, por exemplo. Em seu artigo de número oito diz que “os agrotóxicos, seus componentes e afins só poderão ser produzidos, manipulados, importados, exportados, comercializados e utilizados no território nacional se previamente registrados no órgão federal competente, atendidas as diretrizes e exigências dos órgãos federais responsáveis pelos setores de agricultura, saúde e meio ambiente”. Ao abordar sobre as competências destes três Ministérios, o decreto diz que

além de fiscalização, monitoramento e estabelecimento de limites máximos de resíduos e intervalo de confiança, entre outras competências, cada um deles terá papel específico e decisivo do registro final de agrotóxicos.

Segundo o decreto 4.074 de 2002, ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) cabe o papel de avaliar a eficiência agronômica dos agrotóxicos, bem como conceder o registro, atendidas as diretrizes e exigências dos Ministérios da Saúde e do Meio Ambiente. Já o Ministério da Saúde fica incumbido de avaliar e classificar toxicologicamente os agrotóxicos e o Ministério do Meio Ambiente de realizar a avaliação ambiental, estabelecendo suas classificações quanto ao potencial de periculosidade ambiental. Valendo ressaltar que os órgãos responsáveis por fazer a classificação toxicológica e a avaliação ambiental nos respectivos Ministérios citados são a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). O Quadro 3 agrupa o conjunto legislativo sobre agrotóxicos no Brasil.

**Quadro 3** – Síntese das normatizações sobre agrotóxicos no Brasil. Fonte: Rocha e Espindola (2014).

<b>Diploma Legal/Ano</b>	<b>Regulamento/Alterações</b>	<b>Principais implicações à política ambiental e ao meio ambiente</b>	<b>Implicações à política de saúde pública e à saúde humana</b>
Lei nº 7.802/1989 - Lei dos Agrotóxicos	Regulamentada pelo Decreto nº 4.074/2002 e alterada pela Lei nº 9.974/2000	Incluiu o órgão ambiental como corresponsável pelos processos de registro e fiscalização de agrotóxicos; proibiu o registro de agrotóxicos cujas características causem danos ao meio ambiente	Incluiu o órgão ambiental como corresponsável pelos processos de registro e fiscalização de agrotóxicos; proibiu agrotóxicos que revelem características teratogênicas, carcinogênicas, mutagênicas ou que provoquem distúrbios hormonais
Decreto nº 4.074/2002	Não há	Legitimou o registro dos agrotóxicos por equivalência e a entrada de produtos de outros países com legislações mais brandas, induzindo uma maior dispersão de agrotóxicos no ambiente e maior mistura de substâncias	Legitimou o registro dos agrotóxicos por equivalência e a entrada de produtos de outros países com legislações mais brandas, induzindo maiores casos de intoxicações e maior mistura de substâncias
Decreto nº 5.981/2006	Não há	Facilitou o registro dos agrotóxicos por equivalência, auxiliando o processo que levou o Brasil a ser o maior consumidor de agrotóxicos no mundo	Facilitou o registro dos agrotóxicos por equivalência, auxiliando o processo que levou o Brasil a ser o maior consumidor de agrotóxicos no mundo
Lei nº 9.294/1996 – Lei Murad	Regulamentada pelo Decreto nº 2.018 (1996) e alterada pelo Decreto nº 8.262/2014	Procura alertar sobre os riscos dos agrotóxicos ao meio ambiente no âmbito da publicidade dos produtos	Procura alertar sobre os riscos dos agrotóxicos à saúde humana no âmbito da publicidade dos produtos
Lei nº 9.974/2000 – Altera a Lei nº 7.802/1989	Não há	Trata da destinação adequada das embalagens vazias de agrotóxicos, com vistas a reduzir seu impacto ambiental	Não há

Atualmente, o Brasil ostenta o título de ser um dos países que mais consomem agrotóxicos no mundo, justamente pelo fato de ser também um dos maiores produtores mundiais de alimentos (PIGNATI *et al*, 2014). Devido ao grande desempenho da agricultura nacional, o mercado brasileiro de agrotóxicos atingiu níveis recordes de faturamento da história – O SINDAG (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola) estima que, nos anos 2000, o lucro cresceu 96 % e o Brasil foi

responsável por quase 14 % da fatia de faturamento mundial no mercado de agrotóxicos (TERRA e PELAEZ, 2008).

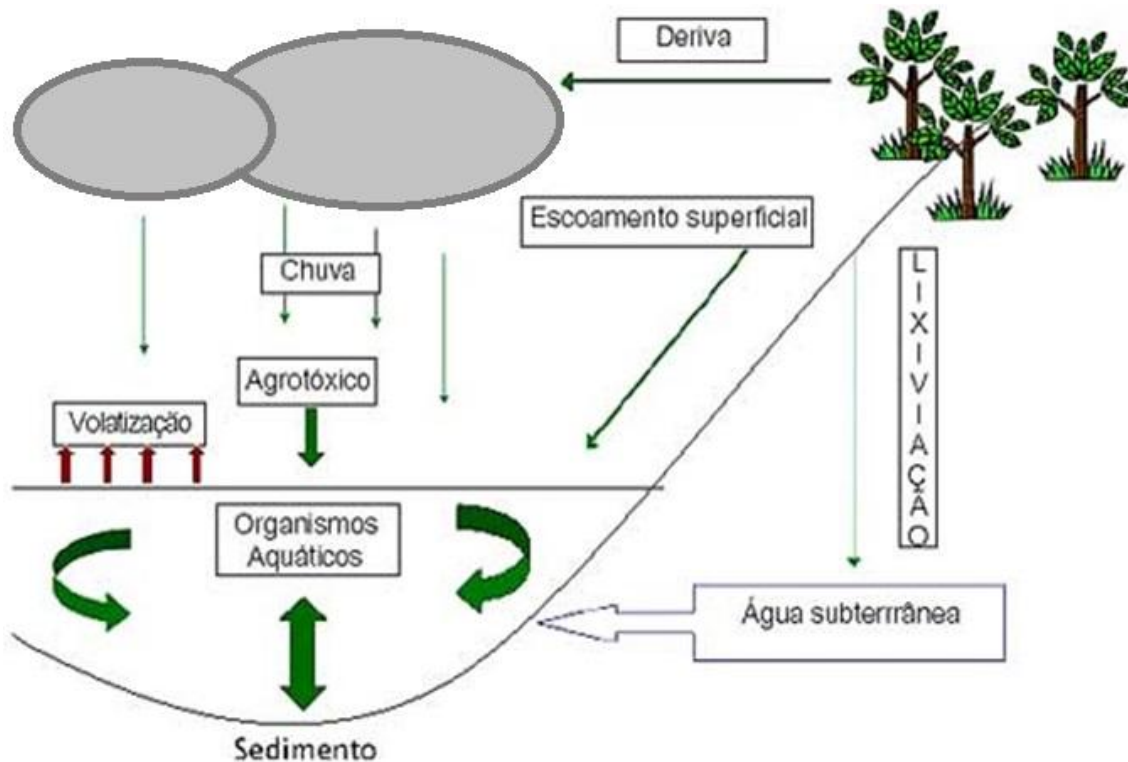
### **3.3 Os agrotóxicos e o meio ambiente**

O conceito de meio ambiente pode ser entendido, segundo Costa e Oliveira (2013), como um conjunto de unidades ecológicas que funcionam como um sistema natural, inclui toda a vegetação, animais, microrganismos, solo, água, atmosfera e fenômenos naturais que podem ocorrer em seus limites. Sendo assim, devido a suas propriedades químicas, os agrotóxicos interferem diretamente neste sistema natural. Por mais que certos agrotóxicos sejam menos persistentes, ou seja, mais solúveis em água, mais voláteis e menos aderentes ao solo, ainda assim, contribuem na contaminação e degradação ambiental e alterações nos ecossistemas (VEIGA *et al*, 2006).

Processos de produção, armazenamento e aplicação de agrotóxicos permitem que cheguem a diversos compartimentos ambientais, entre estes, efluentes de rios que servem para abastecer populações humanas. No meio ambiente, agrotóxicos causam diminuição da biodiversidade, desequilíbrio ecológico e de cadeias tróficas e artificialização de áreas de produção, levando a um aumento da necessidade de uso destes pesticidas (CAPORAL, 2008). Dentre os inúmeros problemas associados a presença de agrotóxicos no meio ambiente, podemos destacar: o desenvolvimento de resistência por parte das pragas; morte dos predadores e parasitas naturais, que controlam a taxa das populações consideradas alvo dos agrotóxicos, ameaçando a vida silvestre, como a já conhecida e estudada – síndrome de desaparecimento de abelhas (ALVES FILHO, 2002).

Ainda segundo Alves Filho (2002), apenas cerca de 10 % dos agrotóxicos pulverizados em monoculturas por via aérea ou terrestre chegam ao organismo alvo. O que é um dado preocupante sobre a mobilidade dos agrotóxicos no meio ambiente, uma vez que, dependendo da natureza química dos pesticidas (organoclorados, lipossolúveis ou de degradação lenta, por exemplo), suas concentrações podem ser biomagnificadas na cadeia alimentar. Os agrotóxicos, seus resíduos e metabólitos contaminam tanto águas superficiais como lençóis freáticos – que são de difícil tratamento – o que, dependendo das propriedades físico-químicas, pode gerar ligação ao material particulado em suspensão, depósito no sedimento ou acumulação por espécies

aquáticas, conforme ilustrado na Figura 1. Além de também poderem se volatilizar e retornarem à atmosfera, sendo encontrados em regiões distantes dos locais de aplicação e uso (TOMITA e BEYRUTH, 2002).



**Figura 1** – Dispersão de agrotóxicos no meio ambiente. Adaptado de Tomita e Beyruth (2002).

Tem-se multiplicado os estudos de avaliação ambiental que comprovam a contaminação de diversos ecossistemas por agrotóxicos (Quadro 4), bem como seus potenciais prejuízos ao meio ambiente (AMARANENI e PILLALA, 2001; BATISTELLA e VALLADARES, 2009; DORES e DE-LAMONICA-FREIRE, 2001; LAABS *et al*, 2002; SOARES e PORTO, 2007 e VEIGA *et al*, 2006), dados que alarmam sobre o risco destas substâncias químicas para diversos compartimentos ambientais e espécies.



**Quadro 4** – Alguns estudos sobre detecção ambiental de agrotóxicos.

<b>ESTUDO</b>	<b>AGROTÓXICO</b>	<b>MATRIZ</b>	<b>CONCENTRAÇÃO</b>	<b>LOCAL</b>
Bonmatin <i>et al.</i> (2003)	Imidacloprid	Flores de girasol	Entre 5 e 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$	França
Charvet <i>et al.</i> (2004)	Imidacloprid	Pólen de milho	3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em 80 % das amostras	França
Nguyen <i>et al.</i> (2009)	Imidacloprid	Ar	Menos de 0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ em 8,4 % das amostras	Bélgica
Wu <i>et al.</i> (2012)	Acetamiprid	Melancia, melão e solo	Até 0,01 $\text{mg kg}^{-1}$ em carne de melão e 0,3 $\text{mg kg}^{-1}$ em melancia inteira e solo	China
Yamamoto <i>et al.</i> (2012)	Acetamiprid, clothianidin, dinotefuran, imidacloprid, nitenpyram, e thiamethoxam	Água de rio	Os limites de detecção do método foram de 0,47 a 2,1 $\text{ng L}^{-1}$	Osaka (Japão)

### 3.3.1 Problemas de saúde associados aos agrotóxicos

Segundo Peres *et al.* (2005), os seres humanos podem ser afetados de forma direta pelos agrotóxicos, através do manuseio destes compostos, ou ainda, de maneira indireta, através de compartimentos ambientes, alimentos ou organismos contaminados com estes. A contaminação de espécies de áreas de plantio agrícola traz desequilíbrio ecológico e prejuízos à população local.

Segundo estimativas do Ministério da Saúde, no Brasil, o número provável de pessoas contaminadas anualmente por agrotóxicos passa dos quatrocentos mil. Porém, o número médio realmente notificado chega a ser cinco vezes menor do que isso, o que preocupantemente demonstra que casos de contaminação por agrotóxicos em todo o país são subnotificados (PERES *et al.*, 2005). Os impactos na saúde são tanto efeitos agudos, segundo Mariconi (1980), como efeitos muscarínicos, nicotínicos e centrais a crônicos, segundo Segundo Pingali *et al.* (1994), como efeitos adversos respiratórios, oculares, neurológicos, cardiovasculares, cutâneos e neurológicos podem estar associados ao constante contato com agrotóxicos.

Estudos associando efeitos danosos à saúde humana com a exposição a agrotóxicos têm se multiplicado. Kós *et al.* (2013) descreveram efeitos da exposição a

agrotóxicos sobre o sistema auditivo e concluíram que os pesticidas podem causar lesões em diversas áreas do sistema auditivo periférico e central. Ao estudar intoxicações por agrotóxicos no estado do Paraná na primeira década dos anos 2000, Neves e Bellini (2013) observaram que a tentativa de suicídio é ocorrência mais frequente em casos de intoxicação, mas que acaba mascarando efeitos crônicos devido aos anos de exposição, visto que efeitos crônicos incluem: problemas imunológicos, hematológicos, hepáticos, neurológicos, malformações congênitas, tumores, acarretando, por fim, a depressão, possível ocorrência dos altos níveis das tentativas de suicídios.

Cremonese *et al.* (2014) concluíram que seus achados sugerem que exposições crônicas a agrotóxicos interferem na regulação dos hormônios sexuais em adultos e na qualidade do sêmen de jovens da região rural do município de Farroupilha-RS. Os mesmos autores, em 2012, também na região sul do Brasil, ao analisarem seus achados, concluíram que a exposição intrauterina a agrotóxicos poderia acarretar em possível fator de risco a efeitos adversos durante a gestação, como maturação inadequada e parto prematuro.

Efeitos associados a propriedades mutagênicas, teratogênicas e carcinogênicas das substâncias presentes nos agrotóxicos, como DDT, dioxinas e furanos, por exemplo, também têm sido descritos. Koifman, Koifman e Meyer (2002) relataram altas taxas de mortalidade para neoplasias malignas de mama, próstata e ovário em amostras populacionais expostas a agrotóxicos entre 1985 e 1990 no Brasil. Além disso, na região serrana do estado do Rio de Janeiro, também foi relatado altos índices de mortalidade para câncer de esôfago, estômago e laringe, bem como câncer de boca e leucemias em trabalhadores rurais expostos a agrotóxicos (MEYER *et al.*, 2003).

### **3.3.2 Efeitos ecotoxicológicos associados aos agrotóxicos**

Em decorrência das diferentes e várias maneiras de aplicação dos agrotóxicos, estes podem contaminar solo, água ou estar suspenso no ar. Alves (2010) observou que o inseticida limonóide azadiractina pode ser tóxico para larvas e adultos de abelhas da espécie *Apis mellifera* e que colônias de áreas tratadas com este agrotóxico apresentam aumentos significativos na taxa de mortalidade das larvas no período de escassez de flores no campo. Isso porque o azadiractina tem ação repelente e antifagocitária

(impossibilita a alimentação dos insetos) e altera a capacidade olfativa dos insetos – responsável pela busca por alimentos (DECOURTYE e PHARM-DÈLEGUE, 2002; HAYNES, 1988). Também apresenta ação sobre o sistema hormonal de insetos, afetando o processo de ecdise – mudança de exoesqueleto – e causando infertilidade destes (SCHMUTTERER, 1990).

Da Silva Mansano *et al.* (2012) concluíram que o cladóceros nativo *Ceriodaphnia silvestrii* é altamente sensível ao agrotóxico carbamato carbofurano, tanto em 24 como em 48 horas de exposição ( $CE_{50} = 1,80 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $CE_{50} = 0,75 \mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente). A sensibilidade neste estudo levou em consideração a inibição de crescimento, imobilização e mortalidade. Nakagome *et al.* (2007) avaliaram a Concentração Letal capaz de matar 50 % dos organismos testados ( $CL_{50}$ ) após 48 horas em vários agrotóxicos. Estes autores conseguiram calcular a  $CL_{50}$  dos herbicidas oxifluorfem ( $1,2 \text{ mg L}^{-1}$ ) da classe dos éter difelínicos, oxadiazona ( $3,9 \text{ mg L}^{-1}$ ) da classe dos oxadiazolonas e clomazona ( $13,8 \text{ mg L}^{-1}$ ) da classe dos isoxazolidinonas e dos inseticidas lambdacialotrina ( $0,002 \text{ mg L}^{-1}$ ) e betaciflutrina ( $0,004 \text{ mg L}^{-1}$ ) da classe dos piretróides, carbofurano ( $1,3 \text{ mg L}^{-1}$ ) da classe dos carbamatos e fipronil da classe dos pirazol ( $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ ), os quais apresentam maior potencial de risco de impacto ecológico sobre o peixe *Danio rerio*.

Apesar de existirem poucos estudos ecotoxicológicos utilizando minhocas, alguns efeitos ecotoxicológicos relacionados aos agrotóxicos vêm sendo descritos para a espécie *Eisenia andrei* em ensaios agudos e crônicos de toxicidade, como estrangulamento, perda de segmentos, entre outros. Nunes (2010), em seu estudo sobre a toxicidade do inseticida avermectina abamectina, realizado no município de Bom Repouso – MG, observou que os organismos sobreviventes apresentaram alterações morfológicas, comportamentais e perda de biomassa, além de queda significativa na taxa de reprodução, calculando uma  $CL_{50}$  de  $7,64 \text{ mg kg}^{-1}$  após 14 dias de exposição.

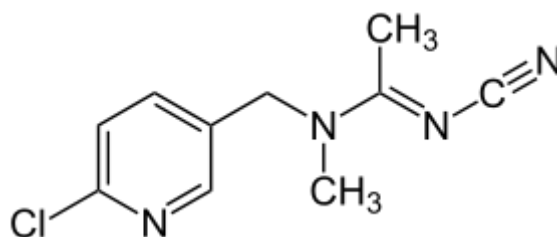
Zhang *et al.* (2014) pesquisaram o neonicotinóide imidacloprida e as alterações bioquímicas que este causava na *E. fetida*. Os biomarcadores que eles utilizaram tiveram suas atividades afetadas pela dose e tempo de exposição. Com isso, eles concluíram que o referido composto foi capaz de causar estresse oxidativo para a *E. fetida*, indicando um risco para o ambiente terrestre.

Um estudo, conduzido por El Hassani *et al.* (2008), analisou os efeitos comportamentais na locomoção, na sensibilidade gustativa à sacarose, na aprendizagem

olfativa e memória de abelhas (*Apis mellifera*), provocados com doses subletais dos neonicotinóides acetamiprida e tiametoxam administradas por via oral e tópica. A aplicação tópica de acetamiprida induziu um aumento da distância percorrida e diminuição significativa da duração da imobilidade das abelhas após 1 hora, bem como aumentou a sensibilidade gustativa à sacarose. Os resultados das experiências de aprendizagem indicaram que o tratamento com acetamiprida reduziu o desempenho da memória das abelhas, com atraso de retenção a longo prazo (48 horas após a administração). Os autores concluíram que a fisiologia e o comportamento das abelhas foram mais afetados pelo acetamiprida do que pelo tiametoxam.

### 3.4 O agrotóxico acetamiprida

A seguir, a Figura 2 e a Tabela 1 resumem as propriedades físico-químicas do composto a ser estudado. Já a Tabela 2, mostra exemplos do uso do acetamiprida em monoculturas.



**Figura 2** – Fórmula estrutural do agrotóxico acetamiprida. Fonte: PubChem (2016).

**Tabela 1** – Propriedades físico-químicas do acetamiprida. Fonte: PubChem (2016).

<b>PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS</b>	
<b>Nome químico (IUPAC)</b>	(E)-N <sup>1</sup> -[(6-cloro-3-piridil)metil]-N <sup>2</sup> -ciano-N <sup>1</sup> -metilacetamidina
<b>Fórmula química</b>	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> ClN <sub>4</sub>
<b>Estado físico</b>	Sólido (pó fino)
<b>Cor</b>	Branco
<b>Odor</b>	Inodoro
<b>Peso molecular</b>	222.676 g mol <sup>-1</sup>
<b>Massa monoisotópica</b>	222.067 g mol <sup>-1</sup>
<b>Densidade</b>	1,330g cm <sup>-3</sup> a 20°C
<b>Solubilidade</b>	Em água, 4,25x10 <sup>+3</sup> mg L <sup>-1</sup> a 25°C. Também solúvel em acetona, metanol, etanol, diclorometano, clorofórmio, acetonitrilo e tetra-hidrofurano.
<b>Estabilidade</b>	Estável em soluções tamponadas a pH 4, 5 e 7. Degradado lentamente a pH 9 e a 45°C. Estável sob luz solar.
<b>Ponto de fusão</b>	98,9°C
<b>Pressão de vapor estimada</b>	4.4x10 <sup>-5</sup> mmHg a 25°C

**Tabela 2** – Uso do acetamiprida em monoculturas. \* g p.c.: gramas de produto comercial / g i.a.: gramas de ingredientes ativo. Fonte: Bula Pirâmide (2016).

CULTURAS	PRAGAS Nome Comum (Nome Científico)	DOSES		Número de Aplicações
		g p.c./100 kg de sementes	g i.a./100 kg de sementes	
ALGODÃO	<b>Pulgão-do-algodoeiro</b> ( <i>Aphis gossypii</i> )	300 a 400	210 a 280	01
AMENDOIM	<b>Tripes-do-bronzeamento</b> ( <i>Enneothrips flavens</i> )	300	210	01
ARROZ	<b>Lagarta-elasma</b> ( <i>Elasmopalpus lignosellus</i> )	200 a 300	140 a 210	01
	<b>Cupim-de-montículo</b> ( <i>Procornitermes triacifer</i> )	100 a 200	70 a 140	01
FEIJÃO	<b>Vaquinha-verde-amarela</b> ( <i>Diabrotica speciosa</i> )	200	210	01
MILHO	<b>Lagarta-do-cartucho</b> ( <i>Spodoptera frugiperda</i> )	200 a 300	140 a 210	01
SOJA	<b>Lagarta-elasma</b> ( <i>Elasmopalpus lignosellus</i> )	150 a 200	105 a 140	01
	<b>Tamanduá-da-soja</b> ( <i>Sternechus subsignatus</i> )	75 a 100	52,5 a 70	01
TRIGO	<b>Lagarta-elasma</b> ( <i>Elasmopalpus lignosellus</i> )	75 a 100	52,5 a 70	01
	<b>Pulgão-da-folha</b> ( <i>Metopolophium dirhodum</i> )	75 a 100	52,5 a 70	01
	<b>Pão-de-galinha</b> ( <i>Diloboderus abderus</i> )	200	140	01

O Acetaprimida, um inseticida do grupo dos neonicotinóides de classe III de toxicidade (mediana), autorizado pela ANVISA através das Resoluções RE nº 144 de 18/01/10 (DOU de 19/01/10) e RE nº 2.140 de 13/05/10 (DOU de 17/05/10) para uso agrícola através da aplicação foliar nas culturas de algodão, batata, eucalipto, feijão, maçã, mamão, melancia, melão, pinhão-manso, tomate e trigo; aplicação em sementes de algodão, arroz, milho, soja e trigo; aplicação no tronco de café e citros; como também o uso profissional por entidades especializadas ou órgãos públicos competentes, de modo e concentrações específicas. A exposição ao Acetamiprida pode ocorrer por via oral pela ingestão de alimentos contaminados, através da inalação, contato dérmico com este composto em locais de trabalho onde é produzido ou nos sítios onde é usado (EPA, 2002). Além disso, as indústrias que processam alimentos nos quais tiveram o uso de agrotóxicos em suas culturas geram resíduos nos quais contêm dentre outros agrotóxicos, o acetamiprida (JIMENEZ *et al.*, 2015).

O acetamiprida atua como agonista seletivo de receptores nicotínicos de acetilcolina em insetos, mimetizando sua ação sem ser degradado pela enzima acetilcolinesterase. Ele se encaixa no receptor da acetilcolina na membrana das células pós-sinápticas, abrindo seus canais de sódio, causando hiperatividade nervosa e colapso

do sistema nervoso. Em mamíferos, é eficientemente absorvido e rapidamente excretado, principalmente através da urina, e, como todos os nicotínicos, é metabolizado em duas fases – citocromo P450 (idêntica em animais e plantas) e formação de conjugados (produtos diferem entre animais e plantas) – sendo a N-dimetilação a principal via metabólica de acordo com o *California Department of Pesticide Regulation* (CDPR-Cal/EPA, 2004). Em um resumo, Simon-Delso *et al.* (2015) disse que o metabólito principal do acetamiprida é o IM1-4 (*N-methylchloropyridinylmethylamine*) e que o mesmo possui metabólitos menores, conhecidos como ACE-ureia (*6-chloro-3-pyridylmethyl*) e 6-CNA (*6-chloronicotinic acid*).

Brunet *et al.* (2008) estudaram a biodisponibilidade e o mecanismo de absorção intestinal do acetamiprida em vertebrados utilizando culturas celulares da linhagem clonal (Caco-2-14, derivada de Caco-2). Um resultado importante deste estudo foi que o acetamiprida passou, em grandes quantidades, a barreira celular por transporte transepitelial, com aparente eficiência no coeficiente de permeabilidade – o que o classifica como altamente absorvível. Foi constatado também que o composto entra na célula, principalmente, por transporte passivo, mas um transportador ativo de atividade fraca também está envolvido na captação de acetamiprida. Todos estes resultados sugerem absorção completa e expressa do acetamiprida *in vivo*, com transporte envolvendo tanto mecanismos internos como externos, passivos e ativos. Assim, o acetamiprida ou os seus metabólitos podem representar riscos para a saúde humana após a sua ingestão nos alimentos.

#### **3.4.1 Efeitos à saúde humana e ao meio ambiente**

Apesar de não ser considerada uma substância cancerígena para humanos (USEPA, 2006), Sano *et al.* (2016) verificaram que o acetamiprida pode ser tóxico para o cérebro de mamíferos ao analisarem mudanças no comportamento social e sexual de camundongos. Kimura-Kuroda *et al.* (2016) perceberam uma ligeira perturbação na arborização dendrítica das células de Purkinje e alteração da transcrição de RNA para exposições crônicas em ratos, semelhante aos efeitos da nicotina em mamíferos em desenvolvimento cerebral, como o embrião por exemplo.

Çavas *et al.* (2012) estudaram a citotoxicidade e a genotoxicidade do acetamiprida nas células intestinais humanas do tipo CaCo-2 *in vitro* através de testes,

como método clonogênico, ensaio cometa e micronúcleo. Eles constataram que, tanto em concentrações citotóxicas quanto em não citotóxicas, o acetamiprida foi capaz de aumentar significativamente a quebra de cadeias de DNA de fita simples. Isso indica que os achados apontam para um potencial citotóxico e genotóxico do acetamiprida para as células, de acordo com os autores.

Vehovszky *et al* (2015) avaliaram como alguns neonicotinóides, dentre eles o acetamiprida, inibem a neurotransmissão colinérgica no molusco *Lymnaea stagnalis*. Eles concluíram que esta classe de agrotóxicos age sobre os receptores de acetilcolina nicotínicos, o que pode causar a intoxicação deste caracol. Fato preocupante, segundo eles, pois indica a contaminação do ambiente aquático por neonicotinóides e seus potenciais riscos para animais não-alvo.

Prosser *et al* (2016) examinaram os efeitos das exposições de neonicotinóides, dentre eles o acetamiprida, e de butenolídeos nos estágios iniciais de vida de espécies de moluscos (*Planorbella pilsbryi* e *Lampsilis fasciola*) de água doce. Este estudo mencionou o monitoramento da concentração destes agrotóxicos para a avaliação de risco destas espécies, constatando que, em determinados momentos e em alguns pontos, a concentração deles ultrapassavam o limite máximo crônico permitido pelos órgãos fiscalizados. Fato que poderia constituir em perigo para as formas juvenis dos moluscos, principalmente pela inibição de crescimento, caso estas concentrações fossem mantidas por um período de 28 dias. Os dados do estudo indicaram que os inseticidas neonicotinóides e butenolídeos representam menos riscos com relação à mortalidade das duas espécies de moluscos em comparação com o risco potencial para outras espécies não-alvo insetos aquáticos.

Testes com abelhas demonstraram a vulnerabilidade de bioindicadores em ambientes expostos a neonicotinóides. Blacquièrre *et al* (2012), fez uma revisão dos dados de 15 anos de publicações sobre concentrações de neonicotinóides em plantas, abelhas e seus produtos em diferentes países – onde foram analisados os efeitos tóxicos destes inseticidas, dentre eles o acetamiprida, em diferentes espécies de abelhas. Efeitos reprodutivos subletais, efeitos no comportamento de forrageamento, na capacidade de memória/aprendizagem e sucesso de hibernação também foram considerados na avaliação progressiva de risco, analisando-se a escala campo realista e os efeitos em abelhas (larvas e adultas) e colônias. Foram detectados níveis residuais de neonicotinóides em néctar e pólen, bem como determinado a  $CL_{50}$  ( $7,07 \mu\text{g abelha}^{-1}$ ).



Christen *et al.* (2016) estudaram os efeitos moleculares de quatro neonicotinóides, entre eles o acetamiprida, sobre abelhas da espécie *Apis mellifera*. Estes autores observaram que a exposição a estes agrotóxicos provocou mudanças na expressão de oito genes, como os que têm múltiplas funções, os que controlam o sistema imune e relacionados ao estresse oxidativo. Dentre os genes mais afetados estão os relacionados ao forrageamento e memória a longo prazo – fato que implica no declínio das populações de abelhas, como lembraram os autores, uma vez que estes mecanismos estão diretamente ligados à capacidade de busca de alimento, sobrevivência e reprodução do inseto.

Ao estudarem a toxicidade de vários agrotóxicos, Wang *et al.* (2012) contataram que o acetamiprida foi o mais tóxico dentre os neonicotinóides para a *E. fetida* nos ensaios de contato em papel de filtro e em solo. Os resultados apresentaram uma relação de dependência com a concentração e a mortalidade aumentou conforme aumentou o período de exposição no ensaio em solo. Eles concluíram que seus dados são relevantes para avaliações de risco ambiental.

### **3.4.2 Ocorrência e comportamento no meio ambiente**

A produção do acetamiprida e seu uso como inseticida causa contaminação ambiental. Na atmosfera, existirá tanto como vapor como particulado – na primeira, é degradado por reação com radicais hidroxilas produzida fotoquimicamente, apresentando meia-vida de 5 horas; já na segunda, é removido da atmosfera por deposição úmida e seca. Uma vez no solo, sua mobilidade esperada é de moderada a alta; sua volatilização a partir de solos úmidos não é muito significativa e, em solos secos, não é esperada devido à sua pressão de vapor; apresentando meia-vida que variam de 1 a 8 dias, dependendo do tipo de solo; apresentando baixa lixiviação em camadas mais profundas (CDPR-Cal/EPA, 2004).

Na água, não é esperado adsorção em sólidos suspensos e sedimentos; sua volatilização no meio aquoso não é significativa; sua bioconcentração em organismos aquáticos é considerada baixa, possui meia-vida de 34 dias em aerobiose e, em anaerobiose, o acetamiprida tem uma meia-vida estimada variante entre 45 a 121 dias. É moderadamente tóxico para aves, peixes, crustáceos (*Daphnia*) e abelhas. No entanto, sob as condições de aplicação recomendadas, e devido à sua rápida biodegradação, ele é

considerado um risco agudo mínimo para plantas, mamíferos, aves, invertebrados e vida selvagem em geral. O recomendado é se evitar ao máximo a contaminação ambiental (CDPR-Cal/EPA, 2004).

Um estudo pioneiro, de Al-Rajab *et al.* (2016), procurou determinar resíduos dos inseticidas neonicotinóides imidacloprida e acetamiprida e inseticida carbamato metomil, mais utilizados na produção de folhas de khat (*Catha edulis*) – usadas em países do oriente como estimulante e na medicina tradicional, mas que tem seu consumo crescendo em países europeus e nos Estados Unidos. Os autores trataram dois grupos de plantas de khat – um, pulverizando só com água (controle) e outro, com as concentrações recomendadas nas embalagens dos três agrotóxicos – e acompanharam a concentração de cada um dos inseticidas nos extratos das folhas por 37 dias através de cromatografia líquida. A concentração inicial dos resíduos de imidacloprida foi de 6,2 mg kg<sup>-1</sup>; 37 dias após o tratamento, 10,65 % dos resíduos iniciais permaneceram nas folhas e a meia-vida foi relativamente longa, aproximadamente 12 dias. Já a concentração inicial de resíduos de acetamiprida foi de 3 mg kg<sup>-1</sup> e a meia-vida, também, de aproximadamente 12 dias, com concentração de 0,25 mg kg<sup>-1</sup> após 37 dias. E a concentração inicial do metomil foi de 12 mg kg<sup>-1</sup> e meia-vida de aproximadamente 5 dias; após 37 dias, foram encontrados 0,03 mg kg<sup>-1</sup>. Este estudo demonstrou que os inseticidas neonicotinóides imidacloprida e acetamiprida têm caminhos de dissipação semelhantes em folhas de khat e suas persistências foram significativamente maiores do que a do inseticida carbamato metomil.

Renaud *et al.* (2017) avaliaram o risco ambiental do acetamiprida e do tiacloprida para vários organismos, dentre eles, o *E. andrei*. Eles levaram em consideração a quantidade de inseticida numa pulverização máxima única indicada por dois fabricantes (100 g a.i. ha<sup>-1</sup>) e calcularam a concentração inicial no solo prevista para o pior caso (ou Concentração Prevista no Ambiente, PEC) e após 28 dias (PEC28), bem como suas respectivas concentrações com estimado risco para *E. andrei* (TER<sub>inicial</sub> e TER<sub>28</sub> = CE<sub>10</sub>/PEC). Também calcularam a concentração de segurança ou Concentração Prevista Sem Efeito no Ambiente (PNEC < CE<sub>10</sub>/100). Além de calcularem os quocientes de risco inicial e após 28 dias (HQ<sub>inicial</sub> e HQ<sub>28</sub> = PEC/PNEC), conforme mostrado na tabela (Tabela 3) a seguir:

**Tabela 3** – Concentrações de acetamiprida previstas no solo em condições de uso real. PEC: concentração inicial no solo prevista para o pior caso / PEC28: concentração após 28 dias no solo prevista para o pior caso / TERinicial: concentração inicial no solo com estimado risco para *E. andrei* / TER28: concentração após 28 dias no solo com estimado risco para *E. andrei* / PNEC: concentração de segurança / HQinicial: quociente de risco inicial / HQ28: quociente de risco após 28 dias. Fonte: adaptado a partir de Renaud *et al.* (2017).

ACETAMIPRIDA	PEC	PEC28	TERinicial	TER28	PNEC	HQinicial	HQ28
Concentrações (mg kg <sup>-1</sup> )	0,07	0,03	3,30	124,17	0,0015	166,67	17,72

### 3.5 Ecotoxicologia terrestre

Com a grande demanda do setor industrial e consequente geração de resíduos, órgão fiscalizadores, preocupados com o monitoramento ambiental, utilizam-se de testes que, aqui no Brasil, avaliam a contaminação química. Porém, apesar de não obrigatório aqui, os ensaios ecotoxicológicos em animais terrestres são ferramentas fundamentais no monitoramento biológico de um ambiente contaminado, apesar de ainda novos – existindo há menos de 20 anos. Visto que somente a análise química não fornece o comportamento ambiental de um composto como um todo (BIANCHI *et al.*, 2010). A ecotoxicologia avalia a contaminação ambiental por substâncias químicas (naturais ou sintéticas) decorrentes de atividades humanas e busca entender a ação e efeitos destas substâncias sobre a biosfera (RAMADE, 1977). Tal avaliação se dá através de ensaios ecotoxicológicos com espécies bioindicadoras de escolha, que podem ser organismos aquáticos e/ou terrestres. Andréa (2008) definiu bioindicadores como organismos com relação vital estreita com o ambiente onde vivem, os quais apresentam reações metabólicas e comportamentais quantificáveis que indicam alguma mudança nesse ambiente, quando essas perturbações não os levem à morte.

Os ensaios ecotoxicológicos podem ser feitos tanto em laboratório, com condições controladas como em campo (BIANCHI *et al.*, 2010). Nacionalmente, já existem algumas normas para a realização destes ensaios tanto em organismos aquáticos quanto em terrestres, como as padronizadas pela ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), INEA (Instituto Estadual do Ambiente - RJ), CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental - SP) e Manual de Testes para Avaliação da Ecotoxicidade de Agentes Químicos do IBAMA. Porém, testes com animais terrestres

não são bem padronizados para o Brasil e acaba-se por utilizar técnicas internacionais, como as descritas na ISO (International Organization for Standardization), OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) e EPA (Environmental Protection Agency - USA) (SISINNO *et al.*, 2004). Os ensaios ecotoxicológicos padronizados selecionam como espécies testes alguns organismos que representam ambientes terrestres, como colêmbolos, minhocas e enquitreídeos, além dos representantes de ambientes aquáticos, como algas, poliquetas, microcrustáceos e peixes (BIANCHI *et al.*, 2010). Um ponto chave é a escolha de determinada espécie, que deve ser representativa dentro do ambiente que ocupa, sensível a substâncias químicas, abundante e de fácil cultivo e manipulação laboratorial (CARVALHO *et al.*, 2009). Outro aspecto importante é a utilização de mais de uma espécie e que estas ocupem diferentes níveis tróficos, porque, dependendo da natureza química e da concentração da substância, pode ser tóxica para todas ou apenas algumas espécies (BEHRENS, 1995).

Os ensaios mais comuns para minhocas são os de fuga e os que medem a toxicidade aguda e crônica dos compostos químicos. No teste de fuga, é feita a exposição de minhocas (*Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*) ao solo contaminado e não contaminado (controle) ao mesmo tempo – num mesmo recipiente, separados por uma divisória. Então, retira-se esta divisória e coloca-se 10 minhocas entre as duas amostras de solo, observando-se, ao final de 48 horas, o número de organismos que migraram para cada amostra (ISO 17512-1, 2007 e BIANCHI *et al.*, 2010). Nos ensaios agudos, determina-se a concentração da substância química capaz de matar 50 % dos organismos testados (CL<sub>50</sub>) em até 96 horas de exposição através de cálculos feitos com os resultados de mortalidade, obtidos em várias diluições testadas para o composto (BIANCHI *et al.*, 2010). Nos ensaios crônicos, cujas diluições dos compostos são calculadas a partir dos resultados da CL<sub>50</sub> dos ensaios agudos, observa-se como que concentrações subletais – que permitem a sobrevivência dos organismos, porém com desenvolvimento de distúrbios de funções biológicas, como reprodução, crescimento e maturação (GOLDSTEIN, 1988) – podem causar efeitos crônicos, visto que as espécies estarão expostas a pequenas concentrações durante períodos de tempo maiores (SILVA, 2002).

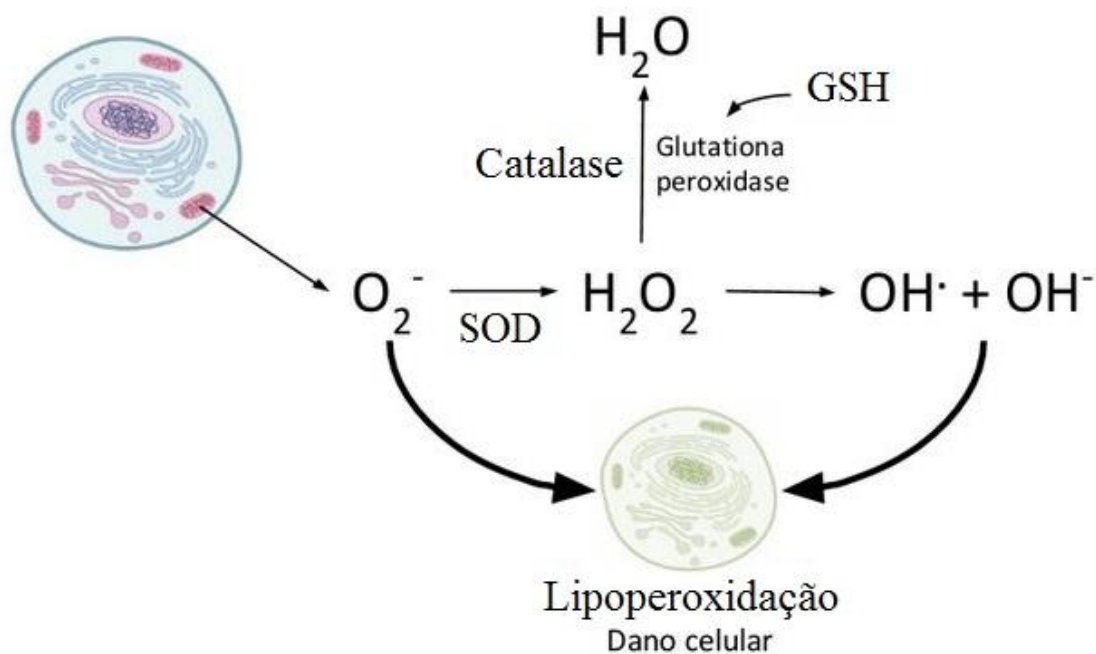
É importante o conhecimento sobre as características do solo ligadas ao ecossistema, bem como seu uso diverso na sociedade humana. Visto que o uso e manejo do solo, bem como a utilização de agrotóxicos e resíduos urbanos têm alterado suas

propriedades (ARAÚJO e MONTEIRO, 2007). Andréa (2008) observa que minhocas têm sido usadas como bioindicadores de contaminação do solo, devido seu papel fundamental na formação do mesmo, seja na decomposição de restos de plantas, formação de húmus, ciclagem da matéria orgânica, fertilidade ou drenagem, por exemplo. Com seus deslocamentos e ao ingerir solos contaminados, as minhocas entram em contato com diversos poluentes – entre eles, os agrotóxicos – os quais as intoxicam, as matam e as que sobrevivem, podem incorporar e bioacumular tais substâncias. Segundo a mesma autora, devido à sua posição trófica, minhocas servem como rota de transferência e biomagnificação de contaminantes ao longo de teias alimentares.

Tem-se, ainda, os ensaios que dosam enzimas de estresse oxidativo em minhocas (LIN *et al.*, 2012). Tal estresse – aqui, ocasionado pela exposição a agrotóxicos, por exemplo – ocorre devido ao desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante dos organismos, com geração de radicais livres e espécies não reativas – resultantes do metabolismo de oxigênio (BARBOSA *et al.*, 2010). O estresse oxidativo também afeta células do sistema imune de minhocas do gênero *Eisenia* (HOMA *et al.*, 2016), tais células, bem como estas enzimas e outras proteínas, podem servir como biomarcadores de efeito da exposição. Segundo Buonocore e Groenendaal (2007) e Halliwell e Gutteridge (2007), toxicantes produzem espécies reativas de oxigênio – as quais possuem um ou mais elétrons desemparelhados, com alto poder de reação, que sequestram elétrons de moléculas vizinhas para tornarem-se estáveis – que reagem com lipídios, proteínas ou ácidos nucleicos, resultando em prejuízos bioquímicos e genéticos.

Já existem vários ensaios padronizados para a quantificação de biomarcadores importantes de estresse oxidativo, como GSH, GST e catalase (CAT), por exemplo. A glutatona reduzida (GSH) pode atuar como antioxidante, ao manter o balanço redox da célula, protegendo-a contra agentes eletrofílicos, além de participar da biotransformação e eliminação de xenobióticos. Ou seja, é uma primeira linha de defesa contra a citotoxicidade (CANESI *et al.*, 1999; LEONARD *et al.*, 2004; REISCHL *et al.*, 2007; HUBER *et al.*, 2008; LUSHCHAK, 2012). A glutatona S-transferase (GST) também atua na biotransformação e detoxificação celular: ao ser estimulada, em conjunto com a GSH, ajuda na formação de conjugados hidrossolúveis de toxicidade reduzida, o que viabiliza a excreção de toxicantes (HABIG *et al.*, 1974; STOREY, 1996; ROVER JUNIOR *et al.*, 2001; VAN DER OOST *et al.*, 2003; MONTEIRO, 2006). Além disso,

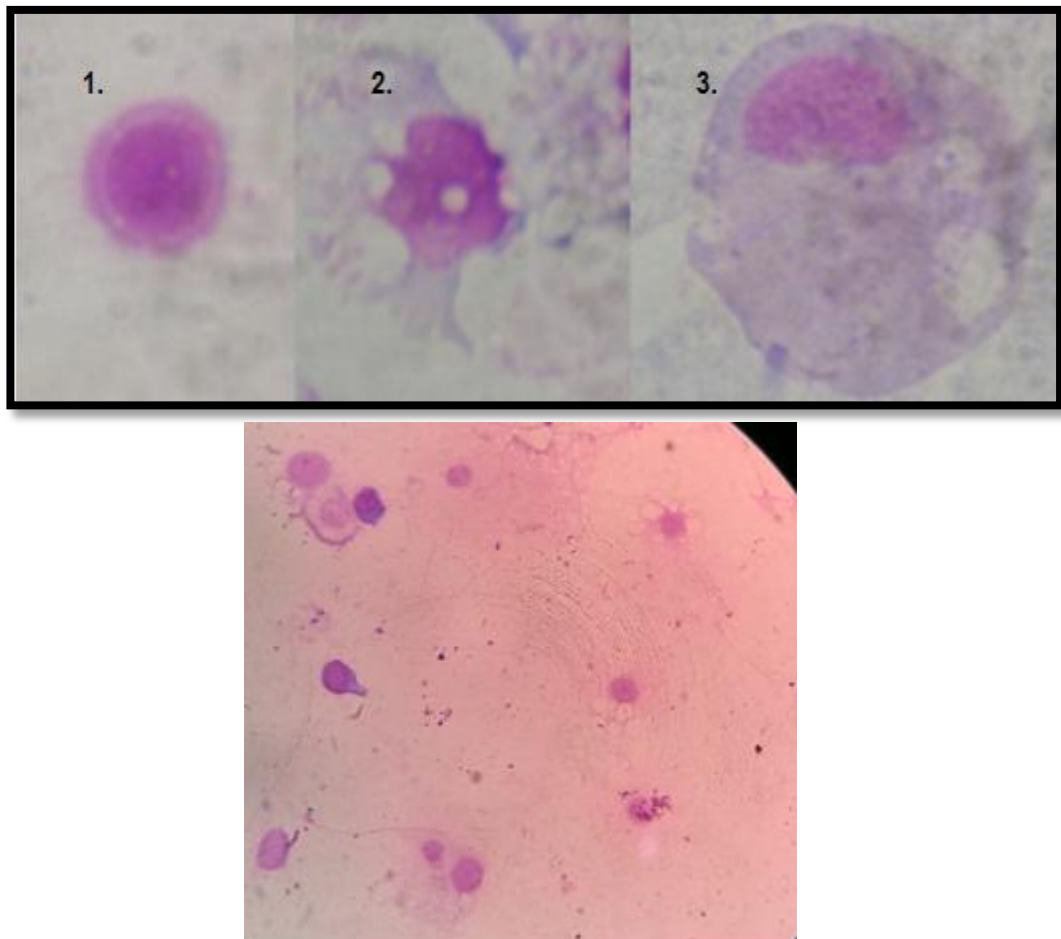
a catalase protege o organismo contra espécies reativas de oxigênio geradas, ao converter  $\text{H}_2\text{O}_2$  em água. Visto que,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , além de poder formar um radical livre, pode, em elevadas concentrações, reagir com superóxido ou ferro, produzindo radical hidroxila, que é altamente reativo (MICHIELS et al., 1994; SIMONIÉ et al., 2000).



**Figura 3** – Esquema do mecanismo antioxidante celular. Fonte: adaptado de Imunova Análises Biológicas (2018).

Ensaios ecotoxicológicos para avaliação de populações celulares em *E. andrei* são realizados a partir do fluido celômico (Figura 4) – o qual faz parte do sistema hidrostático esquelético, atuando como comunicador entre o interior e o meio externo, desempenha um papel importante na homeostase (COOPER, 1996). Nestes organismos, são conhecidos três tipos celulares, com morfologia e origens distintas: amebócitos (hialino e granular) e eleócitos (COOPER e STEIN, 1981). A composição destas células depende de fatores exógenos (ambientais) e endógenos (bióticos, ciclo de vida) (YADAV, 2016). Os amebócitos reconhecem e eliminam corpos estranhos por fagocitose e encapsulamento (COOPER, 1996; COSSARIZZA et al., 1996; LINTHICUM et al., 1977; STEIN et al., 1977), além de estarem envolvidos nos processos de coagulação, citotoxicidade, inflação e formação de granulômas, por exemplo (COOPER, 1996; COOPER e STEIN, 1981). Já os eleócitos, também chamados de cloragócitos, contêm numerosos grânulos esféricos e possuem a

capacidade de armazenar materiais endógenos, como glicogênio e lipídios, além de pigmentos. Participam do equilíbrio iônico e de pH, em alguns aspectos da nutrição e excreção, mas também estão associados à defesa imune, tendo a capacidade de encapsulamento. Suas secreções têm propriedades bacteriostáticas, além disso, eles participam da desintoxicação de tecidos da minhoca, como eliminação de metais (AFFAR et al., 1998; COOPER, 1996; COOPER e STEIN, 1981; LINTHICUM et al., 1977; STEIN et al., 1977).



**Figura 4** – Lâminas de microscopia contendo células de defesa do organismo *E. andrei*. 1. Eleócito / 2. Amebócito hialino / 3. Amebócito granular. Fonte: Correia, F. V. e Santo, D. G. E. (2017).

Ribera *et al.* (2001) estudaram as respostas bioquímicas da minhoca *Eisenia fetida* em solo artificial contaminado com o inseticida carbamato carbaril. O objetivo foi investigar os efeitos do composto em diferentes concentrações e tempos de exposição, para elucidar os mecanismos de ação da substância e utilizar as respostas bioquímicas como biomarcadores para monitoramento de contaminação do solo. As minhocas foram

expostas a concentrações crescentes de carbaril (12, 25 e 50 mg kg<sup>-1</sup>) por diferentes períodos de tempo (2, 7 e 14 dias). As enzimas catalase, acetilcolinesterase, glutathione redutase, glutathione-S-transferase, metoxiorresorufina-O-desmetilase, NADH, NADPH e citocromo P450 tiveram suas atividades reduzidas.

### 3.6 Processos Oxidativos Avançados

Existem formas de reduzir a toxicidade de agrotóxicos nos compartimentos ambientais, porém as técnicas tradicionais não são capazes de destruir completamente a molécula, sendo necessário um pós-tratamento custoso dos resíduos (PÉREZ *et al.* 2006). Na tentativa de tratar as águas residuais contaminadas por diversas substâncias persistentes, diversos Processos Oxidativos Avançados (POAs) têm se destacado pela sua elevada capacidade destrutiva de moléculas orgânicas (MBOULA, 2013). Estes se baseiam na formação de radicais hidroxilas altamente oxidantes, que possuem capacidade de reagir com os mais variados tipos de componentes orgânicos e inorgânicos, levando à formação de produtos intermediários de menor toxicidade ou a completa degradação, com formação de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e água (SAGGIORO *et al.* 2011).

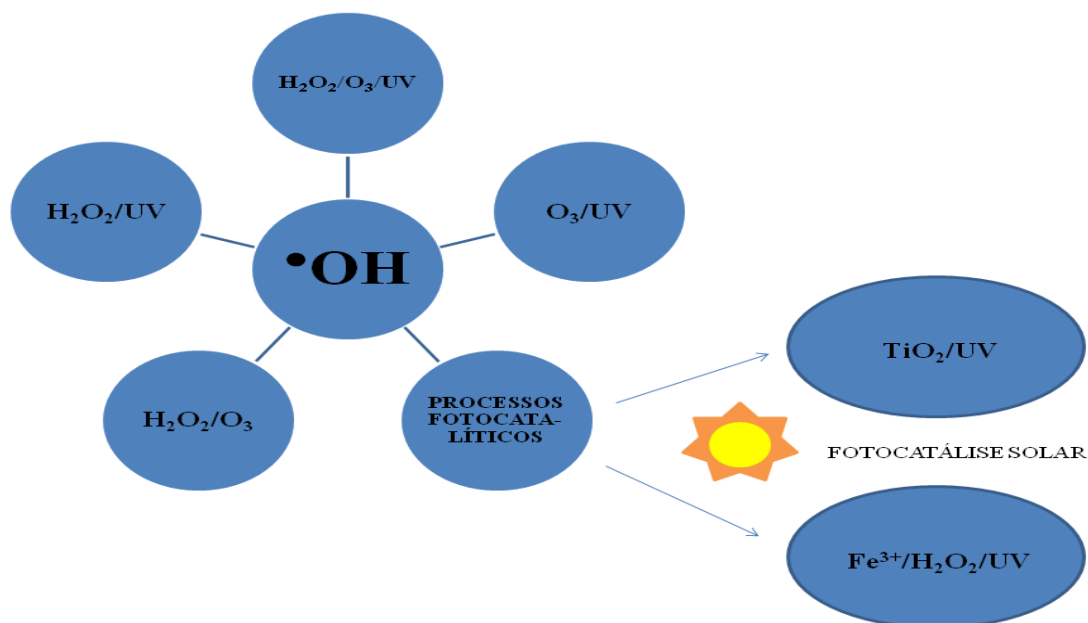
Os vários POAs se utilizam de sistemas de reações químicas diferentes, mas com uma característica em comum: a geração e uso de radicais hidroxila (<sup>•</sup>OH), os quais são oxidantes poderosos que tem capacidade de destruir moléculas orgânicas – como os agrotóxicos organoclorados, por exemplo – que não são destruídas por oxidantes comuns (METCALF e EDDY, 2003). A seguir, a Tabela 4 traz um comparativo entre o poder oxidante do radical hidroxila e de outros oxidantes:



**Tabela 4** – Comparação do potencial oxidante dos agentes oxidantes. Fonte: adaptado a partir de Teixeira e Jardim (2004).

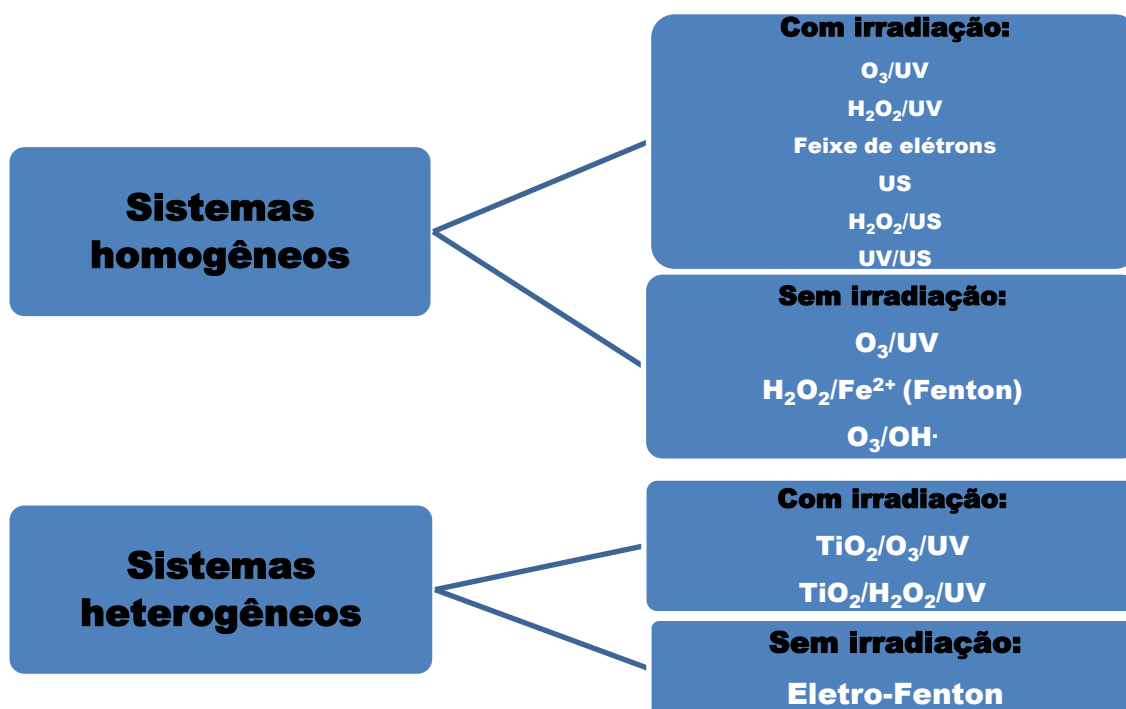
AGENTE OXIDANTE	POTENCIAL DE OXIDAÇÃO (VOLTS)
Flúor	3,06
Radical hidroxila	2,80
Oxigênio atômico	2,42
Ozônio	2,08
Peróxido de hidrogênio	1,78
Permanganato	1,68
Hipoclorito	1,49
Cloro	1,36
Oxigênio molecular	1,23

Observa-se que o radical hidroxila é mais forte, ficando atrás do flúor. Dando início a uma série de reações de oxidação, capaz de mineralizar completamente a substância tratada, bem como seus produtos de degradação. Ele interage com a substância de maneira pouco seletiva, o que é interessante quando usado para tratamento de remediação de ambientes contaminados (SAGGIORO *et al.*, 2011).



**Figura 5** – Esquema da formação do radical hidroxila, comum em todos os POAs e dos processos fotocatalíticos. Fonte: Saggiorno *et al.* (2011).

Os POAs são classificados de duas maneiras: sistemas heterogêneos ou homogêneos. O que quer dizer, respectivamente, que utilizam semicondutores como catalisadores na fase sólida – reação ocorre na interface entre as duas fases e a velocidade é proporcional à área de contato – e que o catalisador e o sistema formam apenas uma única fase (SILVA, 2007). A Figura 6 mostra os principais tipos de sistemas que podem ser empregados em descontaminações:



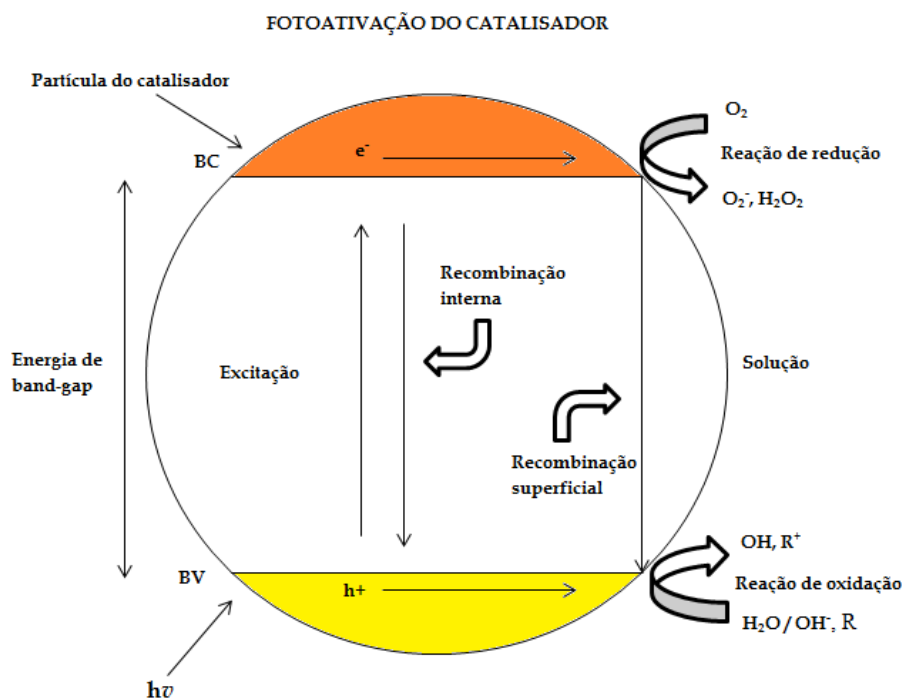
**Figura 6** - Tipos de sistemas de POAs que são utilizados em descontaminações. Adaptado a partir de Silva (2007).

Segundo Kammradt (2004), o tratamento com POAs é mais eficiente que os tratamentos convencionais por destruição completa dos contaminantes em vez de concentrá-los ou transformá-los de fase – o que elimina resíduos secundários, tornando-se dispensável o uso de métodos de deposição de produtos secundários.

### 3.6.1 TiO<sub>2</sub>/UV

O dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) é um semicondutor – seus níveis energéticos em estado normal não são contínuos, o que o impede de conduzir eletricidade. Mas quando este é irradiado com fótons energéticos iguais ou maiores à energia da “band-gap”,

acontece excitação elétrica e o elétron salta da banda de valência para a banda de condução, gerando um par elétron/lacuna. Tal par pode se recombinar externamente ou compor reações de oxi-redução, com absorção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$ ,  $\text{O}_2\cdot$  e compostos orgânicos (TEIXEIRA e JARDIM, 2004). O mecanismo de ativação do  $\text{TiO}_2$  pode ser visualizado na Figura 7:



**Figura 7** – Mecanismo de ativação do  $\text{TiO}_2$ . Fonte: adaptado de Teixeira e Jardim (2004).

As reações de oxidação podem acontecer entre a lacuna da banda de valência e a água ou com os íons hidroxila, produzindo radicais. Já nas reações de redução, podem acontecer entre o elétron da banda de condução e o oxigênio ( $\text{O}_2$ ), gerando o íon radical superóxido, que pode gerar  $\text{H}_2\text{O}_2$ , o qual gera radicais hidroxila (SURI *et al.*, 1993). O  $\text{TiO}_2$  tem uma banda de valência – na qual os elétrons não possuem livre movimentação – e uma banda de condução, onde os elétrons tem livre movimentação. No espaço compreendido entre estas duas bandas existe uma diferença energética, a “band-gap” (PARMON *et al.*, 2002). Além disso, o oxigênio desempenha um papel importante nas reações mediadas por semicondutores, visto que ele é capaz de aprisionar o elétron da banda de condução como íon radical superóxido, que impede a recombinação elétron-lacuna e também desencadeia várias reações, que formam e quebram o  $\text{H}_2\text{O}_2$  (OKAMOTO *et al.*, 1985).

Algumas pesquisas já foram realizadas para estudar a eficiência dos POAs na degradação do acetamiprida. Dentre elas, Khan *et al.* (2010) observaram que o  $\text{TiO}_2$  pode catalisar a fotodegradação do acetamiprida na presença de luz e oxigênio. Eles constataram também que a taxa de degradação aumenta com o aumento do pH e a maior eficiência foi observada a pH 8,7. E, como já se era esperado, com o aumento da concentração do catalisador, a taxa e a velocidade da degradação também aumentaram. Um aumento na taxa de degradação também pode ser observado com a adição e aumento das concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  – que foi o mais eficiente dentre os aceptores de elétrons testados.

Ainda segundo Khan *et al.* (2010), a solução contendo o composto e  $\text{TiO}_2$  foi degradada satisfatoriamente ao ser exposta à radiação solar, quando comparada à exposição a uma fonte de luz UV. A adsorção do acetamiprida na superfície do fotocatalisador, mantendo a solução no escuro por 24 horas, também foi investigada e não houve perda do composto. Eles constataram também a formação de vários produtos intermediários.

Outro estudo, de Guzsvany *et al.* (2009), observou a degradação de diferentes fragmentos da molécula do acetamiprida através da espectroscopia, monitorando a decomposição foto-oxidativa com  $\text{TiO}_2/\text{UV}$ . Com isso, eles observaram que a degradação foi moderadamente rápida, com redução substancial após 4 horas e meia e desaparecimento completo após 7 horas de irradiação – sendo o acetaldeído e os ácidos acético e fórmico os principais produtos de degradação. Foi constatado que a meia-vida para a degradação fotocatalítica da parte alicíclica foi de 76 minutos. A concentração de ácido fórmico atingiu seu máximo em torno de 4 horas e seu pico decaiu, o que pode ser explicado pela mineralização dos produtos de degradação.

Guzsvany *et al.* (2009) mencionaram também os radicais hidroxila como o principal oxidante a atacar o acetamiprida, produzindo hidroxilação dos produtos e estruturas quinonídicas e abertura do anel. Eles observaram também que os fótons emitidos pela fonte não foram eficientemente absorvidos pelo acetamiprida, levando-os à conclusão de que a principal causa da degradação do composto no período de irradiação foi a fotocatalise. Além disso, sugeriram que os centros mais suscetíveis ao ataque dos radicais hidroxila estão na parte alicíclica do composto, próxima da amina e da imina. E concluíram que a degradação oxidativa foto-assistida do acetamiprida na

presença de  $\text{TiO}_2$  é simples, rápida e envolve a formação de uma variedade de espécies intermediárias, porém provavelmente sem prejuízo significativo ao meio ambiente.

Fenoll *et al.* (2015) realizaram um estudo comparando a degradação de três neonicotinóides, dentre eles o acetamiprida. Os experimentos utilizaram o óxido de Zinco ( $\text{ZnO}$ ) e o  $\text{TiO}_2$  como catalisadores e o  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  como acceptor de elétrons. Foi observado que a degradação dos compostos aumentava quando se aumentavam as concentrações dos catalisadores, isso porque ocorria aumento do número de sítios ativos. Na presença de  $\text{ZnO}/\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$  e  $\text{TiO}_2/\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_8$ , o desaparecimento dos compostos foram obtidos após 10 e 30 minutos de irradiação, respectivamente. O  $\text{ZnO}$  pareceu ser mais eficaz na oxidação dos compostos do que o  $\text{TiO}_2$  sob diferentes tipos de irradiação (fonte de luz solar e artificial) – com maior taxa sob luz solar, provavelmente devido ao fato de que o  $\text{ZnO}$  absorver maior fração do espectro solar que o  $\text{TiO}_2$ . No entanto, apresenta a desvantagem de gerar resíduos de zinco na água.

Ainda segundo Fenoll *et al.* (2015), dentre os três neonicotinóides testados, o acetamiprida apresentou a maior estabilidade à fotólise e maior meia-vida. Tanto o  $\text{TiO}_2$  quanto o  $\text{ZnO}$  absorveram fótons em níveis semelhantes e ambos foram mais eficazes como catalisadores na remoção dos compostos sob luz solar do que sob luz artificial UV – a porcentagem de luz absorvida por eles foi de 41 % na irradiação solar contra apenas 17 % na irradiação artificial.

## **4. Metodologia**

### **4.1 Reagentes e compostos químicos**

Acetamiprida ( $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ClN}_4$ ): disponível em pó, mantido à temperatura ambiente, obtido da Sigma-Aldrich.

Acetonitrila ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ): disponível em líquido, mantido à temperatura ambiente, obtido da Tedia Company.

1 cloro 2,4 dinitrobenzeno ( $\text{C}_6\text{H}_3\text{ClN}_2\text{O}_4$  - CDNB): disponível em pó, mantido à temperatura ambiente, obtido de Acros Organics a 99 % de pureza.

Dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ): Degussa P25 com pureza de 99.5 % e aproximadamente 70 % de anatase e 30 % de rutilo. Com uma área superficial de cerca de  $50 \pm 15 \text{ m}^2/\text{g}$ , sem porosidade, possuindo partículas cúbicas de arestas arredondadas e um diâmetro médio de partícula de 21 nm, obtido da Evonik Industries.

Fosfato de potássio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ): disponível em pó, mantido à temperatura ambiente, obtido de VETEC Química Fina com 99 % de pureza.

Fosfato de potássio dibásico ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ): disponível em pó, mantido à temperatura ambiente, obtido de VETEC Química Fina com 98 % de pureza.

Glutathione redutase ( $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$  - GSH): disponível em pó (cristalizado), mantido sob refrigeração, obtido de Sigma-Aldrich com 99 % de pureza.

Peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ): disponível em líquido, mantido sob refrigeração, obtido de Merck KGaA com 30 % de pureza.

#### **4.2 Degradação do acetamiprida por fotocatalise heterogênea com $\text{TiO}_2/\text{UV}$**

O POA utilizado para degradar o pesticida acetamiprida foi a fotocatalise heterogênea com  $\text{TiO}_2$ . Durante o processo, foram retiradas alíquotas para proceder com os ensaios ecotoxicológicos, para verificação dos produtos da degradação – se estes foram ou não tóxicos para os organismos testados.

Foi preparada uma solução de 500 mL de acetamiprida a uma concentração de 5  $\text{mg L}^{-1}$  e adicionada uma quantidade equivalente a 200  $\text{mg L}^{-1}$  de dióxido de titânio. Antes do início do processo de irradiação, a suspensão formada pelo contaminante a ser degradado em adição ao  $\text{TiO}_2$  permaneceu em agitação e temperatura ambiente no escuro, para que ocorresse o equilíbrio de adsorção/dessorção. Após, as amostras foram levadas para serem irradiadas no reator com lâmpada de vapor de mercúrio de 125 W. O reator foi composto de uma tampa elíptica, onde se encontra o suporte para lâmpada de mercúrio HQL 125 W Osram, colocado a 25 cm da bancada de trabalho. Sob a bancada e por baixo do reator foi colocado um agitador magnético sobre o qual foram colocados os béqueres com as amostras que foram irradiadas, conforme ilustra a Figura 8.

O tempo total de irradiação foi de aproximadamente 180 min para cada amostra, tendo sido retiradas alíquotas para análise ao longo do tempo: 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 e 180 min. Após a retirada de cada alíquota, as amostras foram filtradas e, em seguida, analisadas em cromatografia líquida para verificar a degradação da molécula inicial.

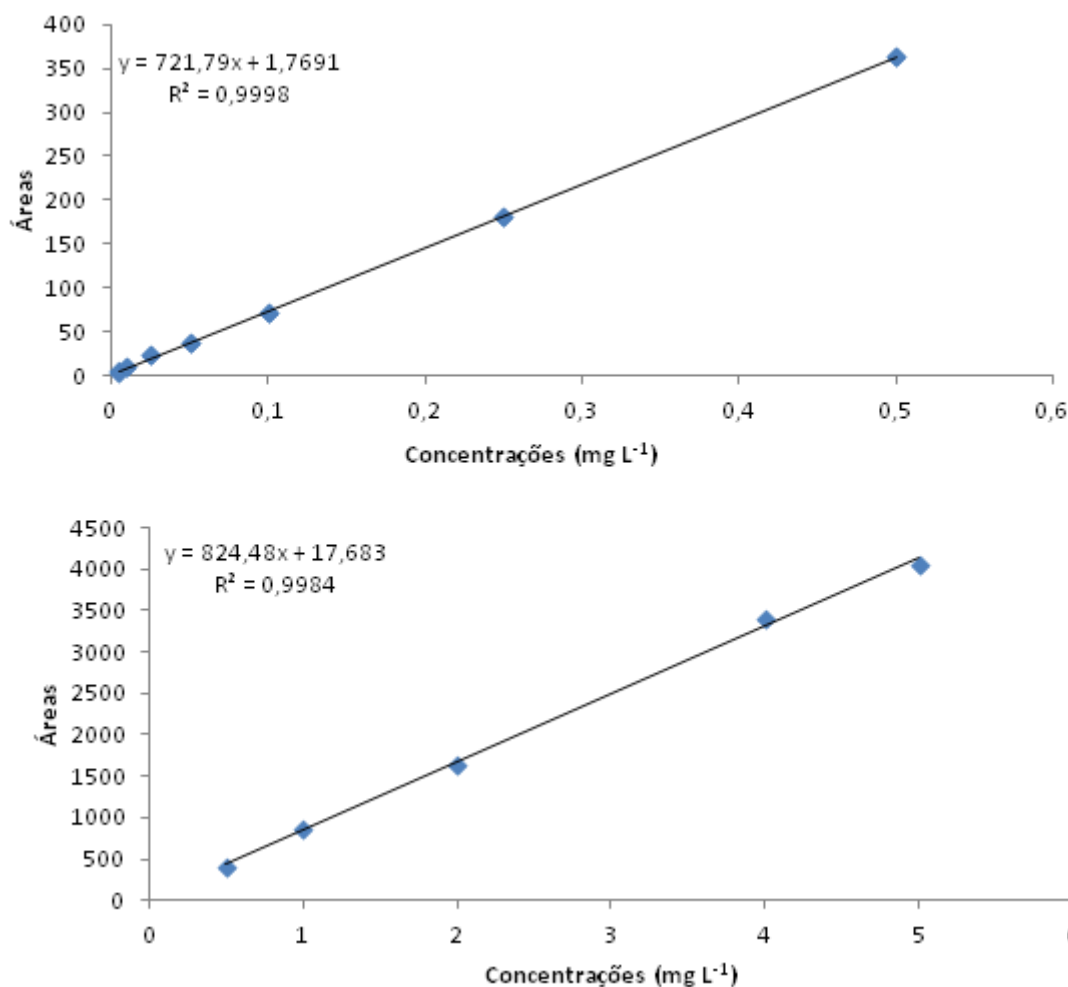
A radiação da lâmpada de mercúrio foi mensurada com auxílio de um radiômetro Cole Parmer (series 9811-50), e a temperatura do ambiente foi mantida em 22°C durante a irradiação.



**Figura 8** – Reator com lâmpada de vapor de mercúrio utilizada nos experimentos de fotodegradação do agrotóxico acetamiprida.

### **4.3 Análise cromatográfica**

O método cromatográfico para quantificação do acetamiprida foi realizada no HPLC-DAD Agilent 1200 Series (JIMENEZ *et al.* 2015). A fase móvel foi constituída de acetonitrila, água acidificada (30:70) com ácido fórmico 20 mol L<sup>-1</sup>, para a fase estacionária foi empregada uma coluna C18 Zorbax (250mm x 4,6mm x 5µm). Foi realizadas curvas analíticas para diferentes faixas de concentração do composto dissolvido em água, uma com concentrações mais baixas (0,005; 0,01; 0,025; 0,05; 0,1; 0,25 e 0,5 mg L<sup>-1</sup>) e outra com concentrações mais altas (0,5; 1; 2; 4 e 5 mg L<sup>-1</sup>) e volume de injeção foi de 20 µL. O tempo de retenção do composto ficou na faixa de 6 minutos e o comprimento de onda máximo utilizado, de acordo com varredura prévia, foi de 248 nm, resultando nos gráficos da Figura 9.



**Figura 9** – Gráfico da curva analítica de acetamiprida com algumas concentrações e suas respectivas áreas de pico no HPLC-DAD.

#### 4.4 Ensaios ecotoxicológicos com minhocas *Eisenia andrei*

Para o presente projeto, foi avaliada a toxicidade do agrotóxico acetamiprida, antes, durante e após o tratamento fotoquímico.

##### 4.4.1 Características do solo e cultivo das minhocas

O solo utilizado nos ensaios de fuga e crônico foi coletado no campo experimental da Embrapa Agrobiologia, no município de Seropédica (RJ) e analisado pelo laboratório da Embrapa Solos (RJ) para determinação das seguintes características: teor de areia (605,5 g.kg<sup>-1</sup>), silte (106,7 g.kg<sup>-1</sup>), argila (287,7 g.kg<sup>-1</sup>) e matéria orgânica (8,3 g.kg<sup>-1</sup>). De acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SANTOS,



2013), este foi categorizado como Argissolo Vermelho-amarelo e escolhido por ser considerado um dos mais representativos no território brasileiro. No laboratório de Toxicologia da Fundação Oswaldo Cruz foi determinada a capacidade de campo (CC) e o pH do solo em água (5,7). A umidade do solo foi corrigida e mantida em 60 % (USEPA, 1996; OEDC, 1984) e não houve necessidade de correção de acidez.

Os organismos utilizados nos ensaios foram adquiridos no minhocário Arborium (RJ), transportados e cultivados no laboratório de Toxicologia da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Como fonte de matéria orgânica para os organismos foi utilizado esterco bovino em temperatura de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  e com umidade controlada. Apenas minhocas adultas foram selecionadas nos ensaios, com aproximadamente 2 meses de idade, clitelo bem desenvolvido e peso individual entre 300 e 600 mg (ISO 11268-1, 2012). Previamente aos ensaios, os organismos foram aclimatados ( $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) por 24 horas, em seguida individualmente lavados com água ultra pura e pesados em balança analítica Sartorius MC1.

#### **4.4.2 Ensaio de contato em papel de filtro**

O ensaio envolveu a exposição dos anelídeos à substância teste e aos diferentes tempos de degradação por fotocatalise heterogênea com  $\text{TiO}_2$ , utilizando béquers (50 mL) forrados internamente com papéis de filtro (Whatman N<sup>o</sup>.2, 12 x 5 cm). Cada papel filtro foi umedecido com 1 mL de água ultra pura (controle) ou 1 mL das várias concentrações do composto. Após preparo do recipiente, foi adicionado um organismo por béquer, sendo empregadas 10 replicatas por grupo (Figura 10). Os organismos permaneceram expostos pelo período de 72 horas em temperatura controlada ( $25^{\circ}\text{C}$ ) e mantidos no escuro. Ao final de 24, 48 e 72 horas de ensaio, os organismos foram pesados e foi contabilizado o total de organismos vivos e mortos para determinar a  $\text{CL}_{50}$  (NBR 12713/2004). Neste ensaio, a concentração da substância foi expressa em  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  (OECD 207, 1984).

Foram realizados dois ensaios de contato utilizando o composto isolado – um preliminar, para avaliar a toxicidade do acetamiprida e sua  $\text{CL}_{50}$ , que será descrito a seguir e outro com menores concentrações, para determinação da atividade enzimática da GST e CAT e quantificação da GSH – marcadores de estresse oxidativo – e citotoxicidade do organismo *Eisenia andrei* frente à substância. Além de calcular a  $\text{CL}_{50}$ ,

o ensaio preliminar possibilitou a escolha da concentração de acetamiprida a ser utilizada nos ensaios de fotodegradação, uma vez que  $3 \text{ mg L}^{-1}$  representa, aproximadamente, o dobro da  $CL_{50}$  encontrada.

No primeiro ensaio, foram utilizados 50 organismos – 10 em contato com água para comporem os controles e dos outros 40, 10 para cada concentração da solução contendo o composto. As concentrações utilizadas foram de  $0,00016$ ;  $0,0016$ ;  $0,016$  e  $0,16 \text{ } \mu\text{g.cm}^{-2}$ . Já no segundo ensaio, foram utilizados 125 organismos, 25 por grupo – controle e concentrações de  $0,000016$ ,  $0,00016$ ,  $0,00083$  e  $0,0016 \text{ } \mu\text{g.cm}^{-2}$ .

No ensaio de fotodegradação,  $3 \text{ mg L}^{-1}$  de acetamiprida foi misturado a  $200 \text{ mg L}^{-1}$  de  $\text{TiO}_2$  e, desta reação, foram coletadas alíquotas em 4 momentos para posterior contaminação do papel de filtro: ao início da reação (Tempo 0 ou T0) e decorridos 15, 60 e 90 minutos, respectivamente T15, T60 e T90. Ao serem analisadas no HPLC, as alíquotas apresentaram as seguintes concentrações de acetamiprida, respectivamente: T0=  $2,48 \text{ mg L}^{-1}$ ; T15=  $1,75 \text{ mg L}^{-1}$ ; T60=  $0,64 \text{ mg L}^{-1}$  e T90=  $0,28 \text{ mg L}^{-1}$ . Que, no papel de filtro medindo  $60 \text{ cm}^2$ , tinham as concentrações  $0,0413$ ;  $0,0216$ ;  $0,0106$  e  $0,00467 \text{ } \mu\text{g.cm}^{-2}$ , respectivamente. Foram utilizados 125 organismos, que foram distribuídos 25 por grupo – controle e tempos 0, 15, 60 e 90.



**Figura 10** – Experimento ecotoxicológico de contato em papel de filtro com minhocas *Eisenia andrei*.

#### 4.4.3 Ensaio de Comportamento (Teste de Fuga)

O teste de fuga foi realizado de acordo com o a ISO 17512-1 (2011). Um recipiente foi dividido em duas seções e nele foram depositadas amostras de solo com 200 g cada. Uma das seções teve o solo umedecido apenas com água ultra pura (controle) e a outra umedecida com diferentes concentrações do composto. Após o preparo, a divisória foi retirada e 10 organismos foram depositados em cada recipiente (Figura 11). Os recipientes foram fechados com tecido microperfurado para favorecer a oxigenação e evitar fuga. Após 48 horas do início da exposição, os organismos presentes em cada seção foram pesados e quantificados. A resposta de fuga às diferentes concentrações foi obtida através da equação II (ISO, 2011), onde, uma resposta líquida (RL) positiva significa fuga enquanto que uma RL negativa significa "não resposta" ou "atração" pela substância química testada. Uma RL acima de 80 % pode significar possível perda de habitat.

$$\text{Equação II: } RL = \frac{C-T}{10} * 100\%$$

Onde: RL = Resposta Líquida; C = total de organismos no controle; T = total de organismos no solo tratado; e 10 = total de organismos por repetição.

Foram utilizadas 3 concentrações do composto diluídas em água e, posteriormente, misturadas em 200 g de solo (argissolo vermelho-amarelo). Foram utilizadas 120 minhocas *E. andrei*, que foram distribuídas 10 a cada 3 potes de controle-controle e controle-concentrações de acetamiprida (1 mg kg<sup>-1</sup>, 0,1 mg kg<sup>-1</sup> e 0,01 mg kg<sup>-1</sup>). Já no ensaio com o composto tratado com fotocatalise heterogênea por TiO<sub>2</sub>/UV, da solução de 3 mg L<sup>-1</sup> de acetamiprida em TiO<sub>2</sub> a 200 mg L<sup>-1</sup>, foram coletadas alíquotas em 5 momentos (tempos 0, 10, 30, 60 e 90 minutos). 150 minhocas foram distribuídas em grupos de 10 a cada 3 potes de tempos. Todos os organismos foram pesados ao início do ensaio e colocados entre amostras de controle e diferentes concentrações do composto. Ao serem analisadas no HPLC, as alíquotas apresentaram as seguintes concentrações de acetamiprida, respectivamente: T0= 2,17 mg L<sup>-1</sup>; T10= 1,62 mg L<sup>-1</sup>; T30= 0,69 mg L<sup>-1</sup>; T60= 0,02 mg L<sup>-1</sup> (0,43; 0,32; 0,14 e 0,004 mg kg<sup>-1</sup>, respectivamente, quando em 200 g de solo) e em T90 não teve área detectada pelo aparelho para cálculo da concentração.



**Figura 11** – Experimento ecotoxicológico de comportamento (teste de fuga) com minhocas *E. andrei*.

#### 4.4.4 Ensaio da toxicidade aguda e crônica em solo natural

O ensaio foi realizado segundo as normas ISO 11268-1 (ISO, 2012) com algumas adaptações. Os experimentos foram realizados sob temperatura, luminosidade e fotoperíodo controlados. Os organismos eram alimentados semanalmente com 10 g de esterco bovino e a umidade era corrigida duas vezes na semana, conforme perda de água constatada através da pesagem dos potes. Foram utilizados béqueres com 200 g de Argissolo Vermelho-amarelo cada, umedecidos com 35 mL de solução (apenas água ultra pura para o controle, várias concentrações do composto-alvo e vários tempos de fotodegradação). Após, foram adicionados dez organismos por béquer e cada grupo com cinco replicatas. Foram testadas diferentes concentrações de acetamiprida e diferentes tempos de degradação por fotocatalise heterogênea com  $\text{TiO}_2$ . Os béqueres foram cobertos com tecido microperfurado para permitir a oxigenação e evitar a saída dos organismos. Para o ensaio agudo, o ensaio teve duração de 14 dias, no qual foi observada a mortalidade e a variação de biomassa.

Para ensaio da toxicidade crônica foi feito o prolongando do tempo de contato dos organismos com as diferentes concentrações de acetamiprida ou de seus fotoprodutos, sob as mesmas condições, pelo período de 21, 28 e 43 dias. Neste ensaio foi possível verificar anomalias morfológicas, quantidade de ovos e contagem de indivíduos jovens. O ensaio foi realizado de acordo com a norma ISO 11268-2 (2012).

O ensaio somente com o acetamiprida foi realizado com 4 concentrações do composto diluídas em água e, posteriormente, contaminados em 200 g de solo (argissolo vermelho-amarelo). Foram utilizadas 300 minhocas *E. andrei*, que foram distribuídas 10 a cada 6 potes de controle e a cada 6 potes de cada uma das 4 concentrações (0,1 mg kg<sup>-1</sup>, 0,05 mg kg<sup>-1</sup>, 0,01 mg kg<sup>-1</sup> e 0,001 mg kg<sup>-1</sup>).

Já o ensaio com os produtos da oxidação, foi feita a degradação de 3 mg L<sup>-1</sup> de acetamiprida em TiO<sub>2</sub> a 200 mg L<sup>-1</sup> e, desta reação, foram coletadas alíquotas em 4 momentos (T0, T15, T60 e T90) para posterior contaminação do solo. As soluções resultantes dos 4 momentos da fotodegradação foram adicionadas em 200 g de solo. Foram utilizadas 300 minhocas *E. andrei*, que foram distribuídas 10 a cada 6 potes de controle e a cada 6 potes de cada um dos 4 tempos (T0, T15, T60 e T90). Ao serem analisadas no HPLC, as alíquotas apresentaram as seguintes concentrações de acetamiprida: T0 = 3,89 mg L<sup>-1</sup> e T15 = 0,82 mg L<sup>-1</sup> (0,78 e 0,16 mg kg<sup>-1</sup>), respectivamente, quando em 200 g de solo) e em T60 e T90 não teve pico detectável do composto para cálculo da concentração. Para ambos os ensaios, todos os organismos foram pesados ao início do ensaio e, a cada semana, pesados e contabilizados para avaliação da reprodução. Também semanalmente, os potes contendo o solo e as minhocas, eram acrescidos de 10 g de esterco e de água, conforme perda avaliada através do peso dos mesmos. A cada 15 dias até o final do ensaio, que durou 60 dias, 6 indivíduos de cada concentração eram coletados para a realização de ensaio que avaliaram a atividades enzimática e citotoxicidade – sendo três indivíduos para os ensaios celulares e os outros três para os ensaios enzimáticos.

#### **4.4.5 Alterações morfológicas**

Todos os ensaios executados neste trabalho foram acompanhados do registro fotográfico dos efeitos dos poluentes na morfologia da minhoca.

#### **4.4.6 Avaliação da atividade enzimática relacionada ao estresse oxidativo**

Os organismos serão triturados e homogeneizados individualmente a 10000 rpm com triturador Ultra Turrax IKA T18 Basic durante 60 seg em 2 mL de solução salina balanceada LBSS (NaCl – 4,18 g, KCl – 0,35 g, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O – 0,27 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,054 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> – 0,08 g e NaHCO<sub>3</sub> – 0,353 g). Os homogeneizados serão centrifugados a 3000 rpm durante 5 minutos em centrífuga CIENTEC CT 6000, e em seguida, os sobrenadantes foram separados e armazenados em banho de gelo para as análises posteriores. Para determinar a atividade da enzima catalase (CAT) foi utilizado o método reportado por Aebi (1984). Este método espectrofotométrico de cinética enzimática envolve o monitoramento do consumo de peróxido de hidrogênio, em um comprimento de onda de 240 nm, durante um período de 15 segundos, e os resultados são expressos em  $\mu\text{mol}$  por minuto, por miligrama de proteína. A atividade da enzima GST (Glutathione S-transferases) foi determinada segundo o método descrito por Habig *et al.* (1974). As enzimas GST catalisam a conjugação do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno com a glutathione, formando um tioéter, cuja formação pode ser medida por espectrometria (cinética enzimática), através do aumento da absorvância em um comprimento de onda de 340 nm, durante 1 minuto. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de produto formado por minuto, por miligrama de proteína. Para determinar a concentração de proteína total de cada amostra (organismo) foi utilizado o método de Bradford (1976) adaptado a leitor de microplacas.

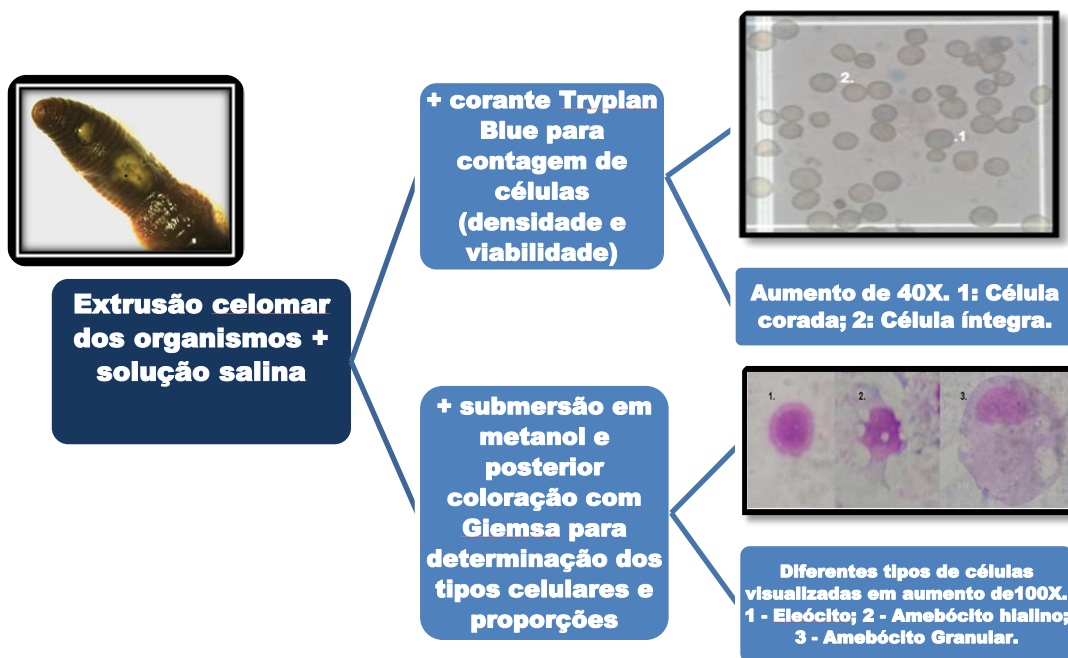
#### **4.4.7 Extração e quantificação de GSH**

A extração de GSH foi realizada seguindo o protocolo de Beutler (1975) com modificações por Wilhelm-Filho *et al.* (2005), no qual, aproximadamente, 50 mg de amostra de tecido foi homogeneizada em aproximados 500  $\mu\text{L}$  de solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0, contendo sacarose 0,25 mol L<sup>-1</sup>. Logo a seguir, as amostras foram centrifugadas a 11.000 x g, em centrífuga refrigerada modelo Eppendorf 5430 R por 30 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram, então, removidos e transferidos para microtubos estéreis, previamente nomeados e tratados com DTNB 0,1 mol L<sup>-1</sup> em solução tampão fosfato de sódio pH 8,0 a uma razão de 1:1. As amostras foram incubadas no escuro durante 15 min e suas absorvâncias foram lidas em cubetas de

quartzo, em um espectrofotômetro UV-VIS (Jasco V-530) a 412 nm. As concentrações de GSH foram estimadas usando uma curva analítica plotada com GSH como padrão externo (MONTEIRO, 2006).

#### **4.4.8 Coleta do fluido celômico para análises de células**

A coleta de fluido celômico foi realizada de acordo com a metodologia de extrusão adaptada de Eyamber *et al.* (1991). Cada organismo foi transferido para um tubo de ensaio e a este pipetado 200 µL de solução de extrusão, ajustado a pH 7,3. Após 3 min, 800 µL de LBSS (*Lumbricus Balanced Salt Solution*: NaCl 71,5 mmol L<sup>-1</sup>, KCl 4,8 mmol L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 1,1 mmol L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,4 mmol L<sup>-1</sup>, NaHPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,3 mmol L<sup>-1</sup> e NaHCO<sub>3</sub> 4,2 mmol L<sup>-1</sup>) foram adicionados em cada tubo e o organismo retirado em seguida, conforme adaptação do método de Stein *et al.* (1982). A solução foi mantida refrigerada e, após repouso por 30 min, 700 µL do sobrenadante foi retirado e a amostra homogeneizada para execução de dois procedimentos posteriores. Para determinação da densidade e a viabilidade dos coelomócitos foram adicionados 30 µL da amostra com mais 30 µL de corante Tryplan Blue, e desta foram retirados 20 µL de alíquota para que fossem depositados em câmara de Neubauer espelhada. A câmara de Neubauer foi observada em microscópio com aumento de 10x, acoplado da câmera para registro fotográfico das células. Foram contabilizados números totais de células coradas e não coradas para determinar a densidade e a viabilidade celular dos organismos. Para determinar os tipos e a proporção das células presentes no sistema imunológico do organismo *E.andrei* foram pipetados 20 µL de amostra do fluido celômico, em lâmina microscópica para arraste da amostra. Após 24h de secagem em temperatura ambiente, as lâminas foram submersas em metanol por 10 min e lavadas com água ultra pura. Com a retirada do excesso de água, as lâminas foram submersas em um recipiente com corante Giemsa 5 % durante 10 min. As células coradas foram analisadas com auxílio do microscópio com aumento de 100x, e identificadas as proporções das células do sistema imunológico do organismo (Figura 12). Todos os procedimentos foram realizados em duplicata.



**Figura 12** – Esquema da coleta de fluido celômico de minhocas expostas ao acetamiprida para análises celulares.

#### 4.4.9 Análises estatísticas

Foram realizados diferentes testes estatísticos para os diversos experimentos. O teste de normalidade foi o Shapiro-Wilk. A estimativa de  $CL_{50}$  foi determinada à partir do teste de Spearman-Kärber com limite de confiança de 95 % (Hamilton *et al.*, 1977). Para o teste de fuga os resultados foram analisados pelo teste Exato de Fisher. A expressão dos resultados obtidos com o ensaio agudo e crônico com solo e os dados obtidos da análise do fluido celômico foram comparados com as amostras controle, através de ANOVA (Análise de Variância) com teste de Tukey ( $\alpha$  0,05) quando exibirem distribuição normal, e o teste de Kruskal-Wallis quando obtiverem distribuição não normal ( $\alpha$  0,05), utilizando o programa GraphPad Prism ® 5.00.



## 5. Resultados

### 5.1 Experimento de fotodegradação

A degradação do acetamiprida encontram-se ilustrada no gráfico a seguir (Figura 13). Na degradação do acetamiprida com  $\text{TiO}_2/\text{UV}$ , metade do composto já havia sido degradado em 30 minutos de irradiação e totalmente degradado na metade do tempo total do experimento (90 minutos). Em 120 minutos já não havia mais o composto. Tal fotocatalise ocorreu de maneira gradual, o que possibilitou a coleta de alíquotas.

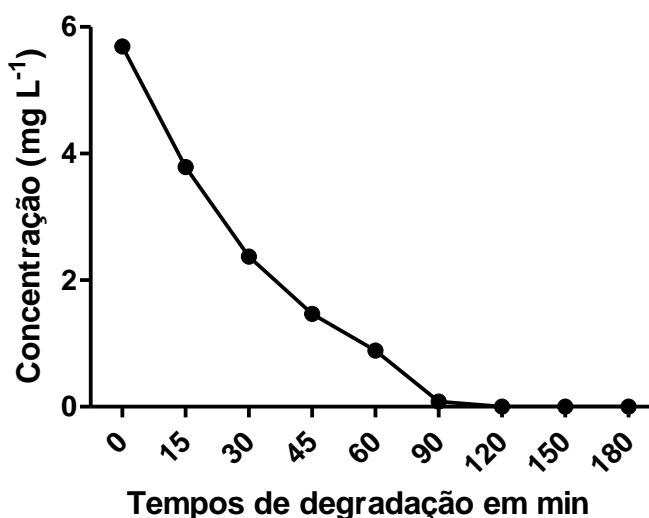


Figura 13 – Gráfico da fotodegradação de 5 mg L<sup>-1</sup> de acetamiprida com  $\text{TiO}_2/\text{UV}$ .

### 5.2 Ensaio ecotoxicológicos

Foram realizados três diferentes ensaios ecotoxicológicos com a minhoca *Eisenia andrei* para avaliar a toxicidade do composto para este organismo – tanto isoladamente, como com os produtos da fotodegradação com  $\text{TiO}_2/\text{UV}$  – sendo eles: ensaio de contato, teste de fuga e ensaio da toxicidade aguda e crônica.

#### 5.2.1 Ensaio de contato com papel de filtro com o acetamiprida

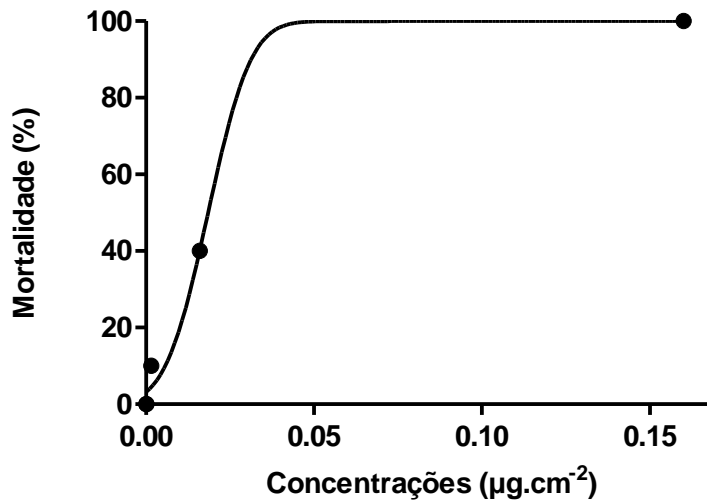
Após as primeiras 24 horas, a maior concentração (0,16  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) foi a mais tóxica para os organismos, com morte de 50 % e visível prejuízo para os que sobreviveram (Figura 14) – todos com baixo peso, inchaço, sensibilidade ao toque e

extrusão de líquido celomar. Na concentração de  $0,0016 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 20 % dos organismos estavam agitados e apresentando deformidade clitelar (estrangulamento) e na concentração de  $0,00016 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 10 % estavam agitados – estas concentrações não apresentaram mortes e a concentração de  $0,016 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  não apresentou mortes nem efeitos tóxicos observáveis. Passadas 48 horas, 100 % dos organismos da maior concentração ( $0,16 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) estavam mortos. Na concentração de  $0,0016 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 20 % estavam letárgicos e apresentando sensibilidade ao toque e deformidade clitelar. E na concentração de  $0,016 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , mais de 50 % apresentavam um ou mais efeitos tóxicos, como sensibilidade ao toque, inchaço, estrangulamento posterior, letargia ou agitação – estas concentrações não apresentaram mortes e a concentração de  $0,00016 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  não apresentou mortes nem efeitos tóxicos observáveis. E, finalmente, após 72 horas de ensaio, 40 % estavam mortos e ou 30 % apresentaram sensibilidade ao toque, inchaço e extrusão de líquido celomar na concentração de  $0,016 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , 10 % morreram na concentração de  $0,0016 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  e a concentração de  $0,00016 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  não apresentou mortes nem efeitos tóxicos observáveis.

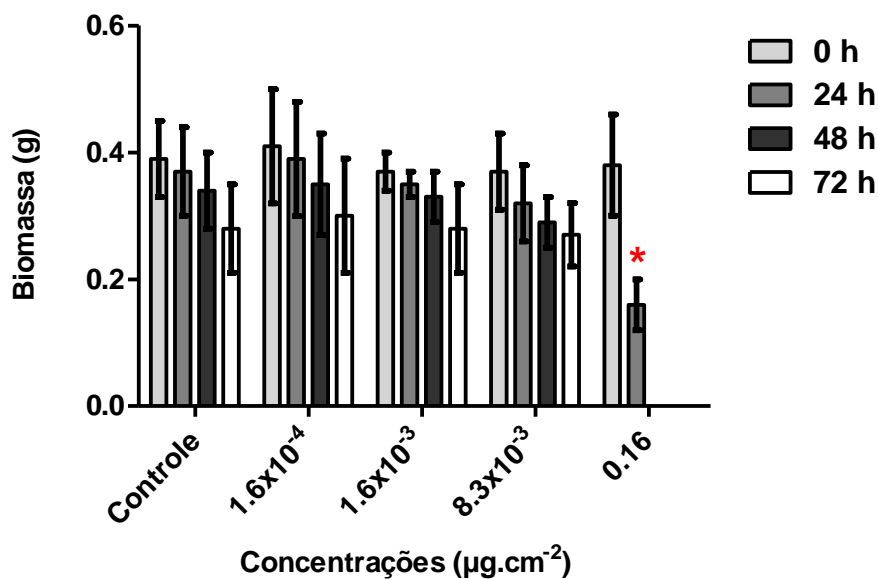


**Figura 14** – Alterações morfológicas (inchaço e nódulos) apresentadas por organismos *E. andrei* após 24 h na concentração de acetaminoprida de  $0,16 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  no ensaio de contato.

Com isso, foi possível determinar a  $CL_{50}$  após 72 horas ( $0,0186 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  ou  $1,12 \text{mg L}^{-1}$ , quando em solução). A Figura 15 mostra a curva dose-resposta feita com as concentrações nas soluções. Também foi possível comparar, entre cada concentração e o controle, a perda de biomassa. A mesma foi estatisticamente significativa para a concentração de  $0,16 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  (ou  $10 \text{mg L}^{-1}$ , quando em solução) após 24 horas em comparação com o controle (Figura 16).



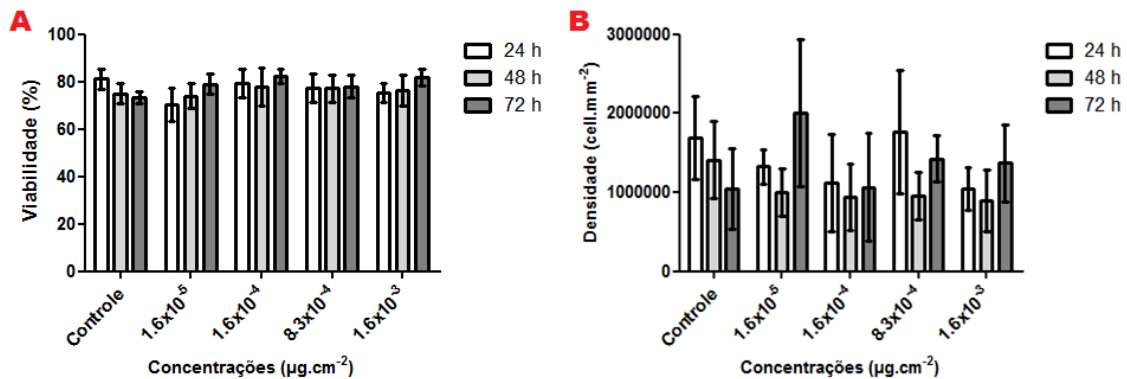
**Figura 15** – Gráfico com a curva de dose-resposta do acetamiprida para o organismo *E. andrei* no ensaio de contato com papel de filtro após 72 h de exposição.



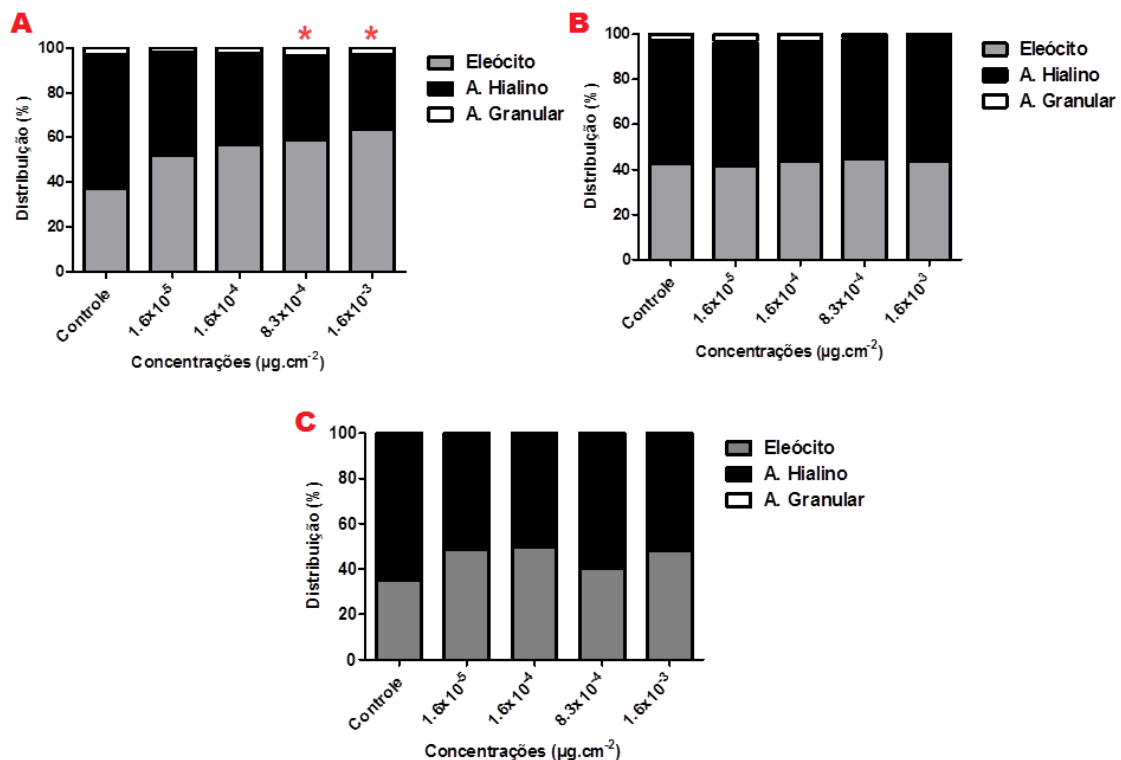
**Figura 16** – Gráfico comparativo de biomassa dos organismos *E. andrei* no ensaio de contato com papel de filtro. \* Diferente estatisticamente em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). \*\* Em 48 e 72 h, não teve n na concentração de 0,16 µg.cm<sup>-2</sup>.

No segundo ensaio, foram utilizados 125 organismos, que foram distribuídos 25 por grupo. Todos os organismos foram pesados e observados ao longo do início e em 24, 48 e 72 horas de ensaio. Não foram observadas alterações morfológicas neste experimento.

A viabilidade e a densidade das células do sistema imune, durante todo o ensaio, não apresentou diferenças estatisticamente significativas (Figura 17). Já em relação à contagem diferencial das células de defesa, as concentrações 0,00083 e 0,0016  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle após 24 horas para eleócitos e amebócitos hialinos (Figura 18).

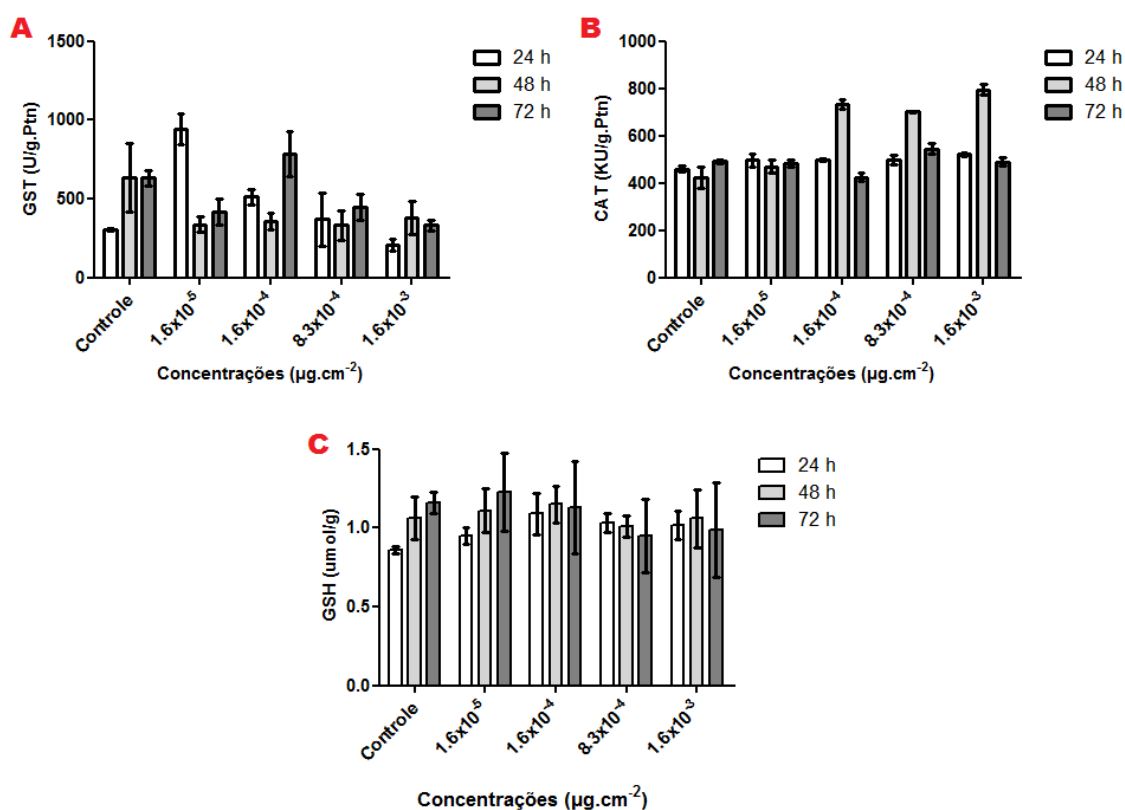


**Figura 17** – Médias da viabilidade (A) e densidade (B) das células imunes no ensaio de contato com o acetamiprida.



**Figura 18** – Distribuição da população das células imunes no ensaio de contato com o acetamiprida. A – 24 h; B – 48 h e C – 72 h. \* Eleócitos e amebócitos hialinos foram diferentes estatisticamente em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

Quanto à atividade enzimática, apesar de os ensaios de GST e CAT não apresentarem diferenças estatisticamente significativas, a CAT, em 48 horas, teve uma tendência de aumento de sua atividade conforme o aumento das concentrações. O quantitativo de GSH também não apresentou diferenças estatisticamente significativas (Figura 19).



**Figura 19** – Variação da atividade da GST (A) e CAT (B) e quantitativo de GSH (C) no ensaio de contato com o acetamiprida.

### 5.2.2 Ensaio de contato com papel de filtro com o acetamiprida tratado com $\text{TiO}_2$

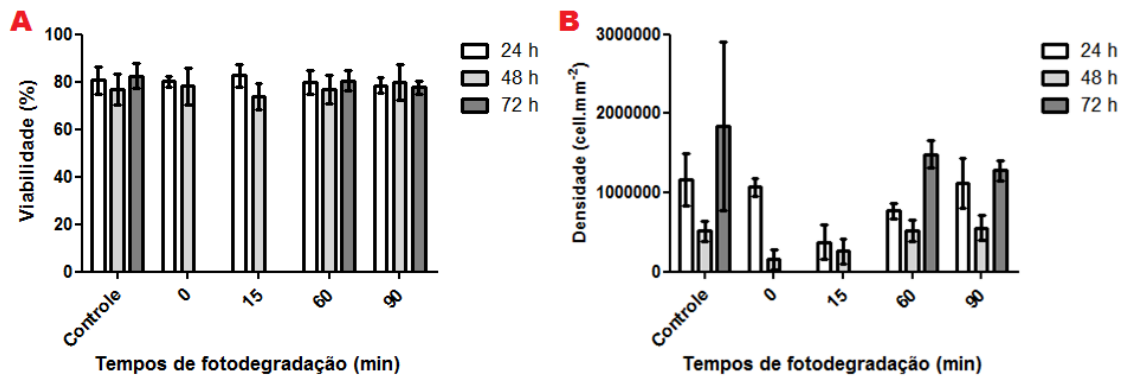
Ao serem analisadas no HPLC, as alíquotas apresentaram as seguintes concentrações de acetamiprida, respectivamente: T0= 2,48  $\text{mg L}^{-1}$ ; T15= 1,75  $\text{mg L}^{-1}$ ; T60= 0,64  $\text{mg L}^{-1}$  e T90= 0,28  $\text{mg L}^{-1}$ . Sendo assim, nas primeiras 24 horas, organismos do T0 e T15 apresentavam nódulos. O quantitativo de organismos com nódulos aumentou em 48 horas, incluindo também alguns do T60. Em 72 horas de ensaio, nenhum dos organismos dos tempos 0 e 15 sobreviveu para a realização dos ensaios de atividade celular e enzimática – aqui, a concentração foi próxima a  $\text{CL}_{50}$ , por

isso as mortes. Com o decorrer do tempo, a concentração do pesticida diminuiu, assim como a toxicidade. Alguns organismos do T60 apresentavam nodulações (Figura 20). No controle e no T90 não foram observadas alterações morfológicas.

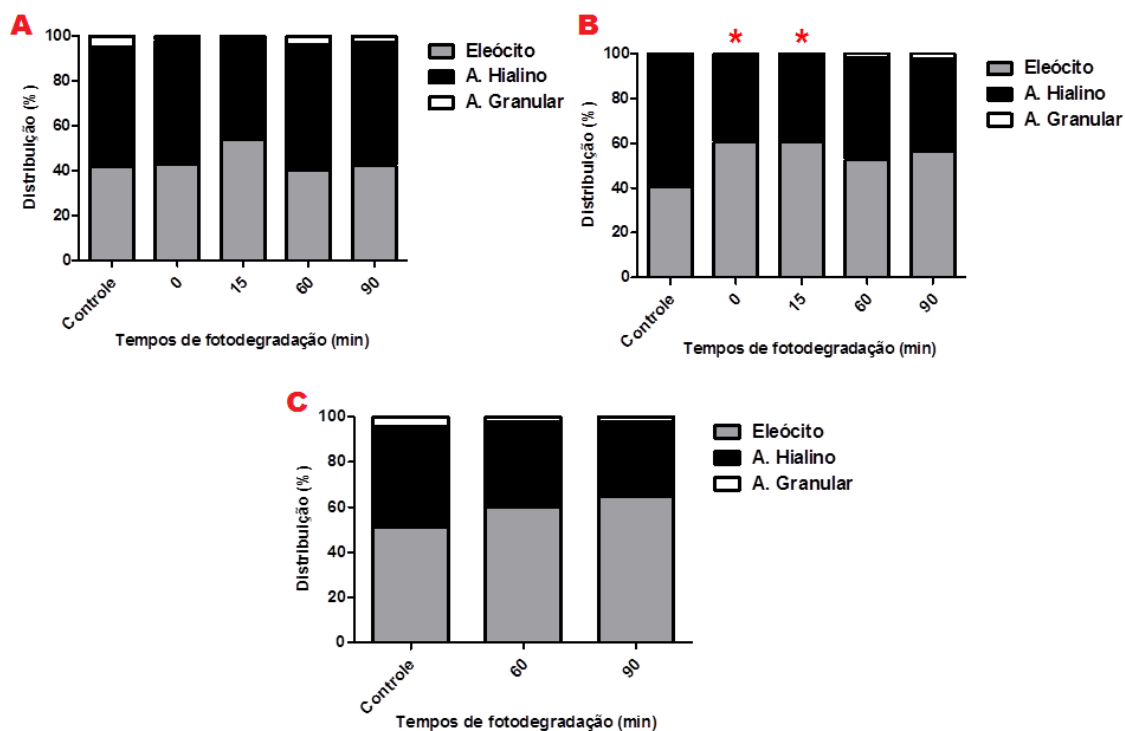


**Figura 20** – Alterações morfológicas (nódulos) observadas após 72h no T60, durante o ensaio de contato com o acetamiprida tratado com  $\text{TiO}_2$ .

A viabilidade e a densidade das células imunes não diferiram significativamente durante o ensaio em relação ao controle (Figura 21). Com relação à contagem diferencial das células imunes, os tempos 0 e 15 apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle após 48 horas para eleóцитos e amebócitos hialinos (Figura 22).

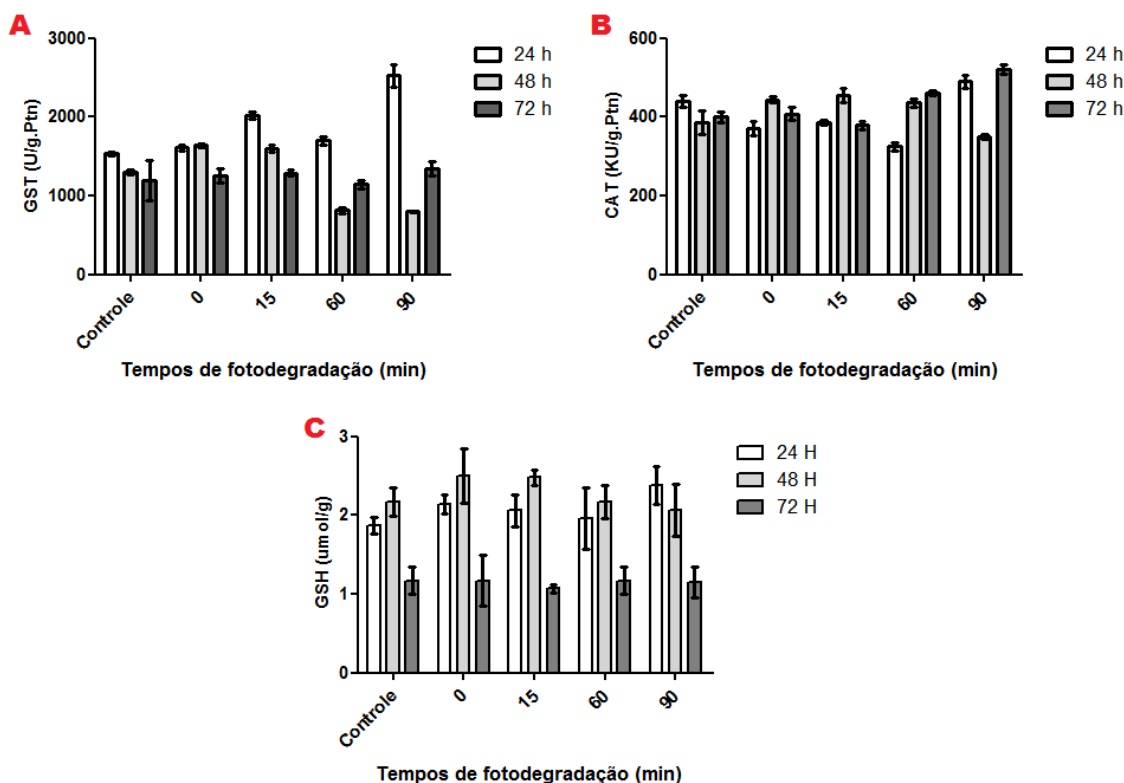


**Figura 21** – Médias da viabilidade (A) e densidade (B) das células imunes no ensaio de contato com o acetamiprida tratado com  $\text{TiO}_2$ . \* Não teve n nos tempos 0 e 15 em 72 h.



**Figura 22** – Distribuição da população das células imunes no ensaio de contato com o acetamiprida tratado com  $\text{TiO}_2$ . A – 24 h; B – 48 h e C – 72 h. \* Eleócitos e amebócitos hialinos foram diferentes estatisticamente em relação ao controle ( $p < 0,05$ ). \*\* Não teve n nos tempos 0 e 15 em 72 h.

Quanto à atividade enzimática, nos ensaios de GST e CAT, as diferenças não foram estatisticamente significativas, bem como o quantitativo de GSH (Figura 23).



**Figura 23** – Variação da atividade da GST (A) e CAT (B) e quantitativo de GSH (C) no ensaio de contato com o acetamiprida tratado com  $\text{TiO}_2$ .

### 5.2.3 Ensaio de comportamento (teste de fuga) com o acetamiprida

A concentração de  $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$  apresentou RL negativa e as concentrações de  $0,1$  e  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  apresentaram RL positiva. Sendo que, a concentração de  $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$  apresentou uma RL maior que 80 %, o que representar um possível risco perda de hábitat para o organismo *E. andrei* (Tabela 5). E, dentre os 30 organismos distribuídos nos 3 potes contendo uma parte do solo contaminada com  $1 \text{ mg kg}^{-1}$  de acetamiprida, apenas 6 foram encontrados no lado umedecido com o composto – os quais estavam visivelmente mais magros, apresentaram partição e nódulos e um estava morto (Figura 24). Já nos organismos encontrados nas concentrações  $0,1$  e  $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$  e nos controles não foram observados efeitos tóxicos.



**Tabela 5** – Valores das respostas líquidas obtidas no ensaio de comportamento utilizando três concentrações de acetamiprida.

	<b>1 mg kg<sup>-1</sup></b>	<b>0,1 mg kg<sup>-1</sup></b>	<b>0,01 mg kg<sup>-1</sup></b>
<b>RESPOSTAS LÍQUIDAS</b>	0,6	0,867	- 0,5



**Figura 24** – Alterações morfológicas (inchaço e nódulos) apresentadas pelos organismos *E. andrei* após 48 h de exposição na concentração de acetamiprida de 1 mg kg<sup>-1</sup> no teste de fuga.

#### **5.2.4 Ensaio de comportamento (teste de fuga) com o acetamiprida tratado com TiO<sub>2</sub>**

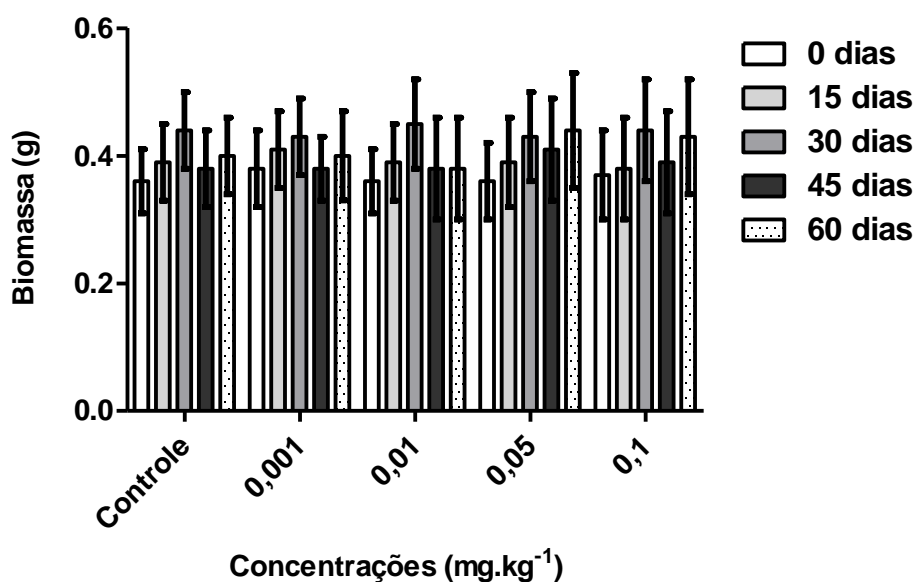
Ao serem analisadas no HPLC, as alíquotas apresentaram as seguintes concentrações de acetamiprida, respectivamente: T0= 2,17 mg L<sup>-1</sup>; T10= 1,62 mg L<sup>-1</sup>; T30= 0,69 mg L<sup>-1</sup>; T60= 0,02 mg L<sup>-1</sup> e T90 não apresentou pico detectável do composto para cálculo da concentração. Assim sendo, no T0, uma minhoca no controle e uma no lado contaminado estavam mortas por partição. Já no T10, duas estavam mortas nos controles, e, no lado contaminado, uma estava morta por partição e uma havia fugido. No T30, duas estavam mortas no controle, sendo uma por partição e uma havia fugido. No T60, duas estavam mortas no controle, ambas por partição. Por fim, no T90, três estavam mortas no lado contaminado, sendo uma por partição. Os tempos 0 e 60 apresentaram RL negativa, não houve diferença do tempo 90, onde a RL foi nula e os tempos 10 e 30 apresentaram RL positiva (Tabela 6).

**Tabela 6** – Valores das respostas líquidas obtidas no ensaio de comportamento utilizando 5 momentos da reação de degradação do acetamiprida por TiO<sub>2</sub>.

	TEMPO 0	TEMPO 10	TEMPO 30	TEMPO 60	TEMPO 90
RESPOSTAS LÍQUIDAS	-0,46	0,43	0,167	-0,46	0

### 5.2.5 Ensaio da toxicidade aguda e crônica em solo natural com o acetamiprida

No ensaio de toxicidade com o composto isolado, não foram observadas alterações morfológicas referentes à toxicidade. Ao final dos 60 dias, foi possível observar uma variação na biomassa das minhocas nas diferentes concentrações (Figura 25). Também foi possível verificar a reprodução das minhocas, com base no número encontrado de ovos (20) e filhotes (140), distribuídos nas várias concentrações, bem como a relação de ovos e filhotes (Tabela 7). Pode-se observar que houve uma redução no quantitativo de ovos e filhotes conforme se aumenta a concentração de acetamiprida.

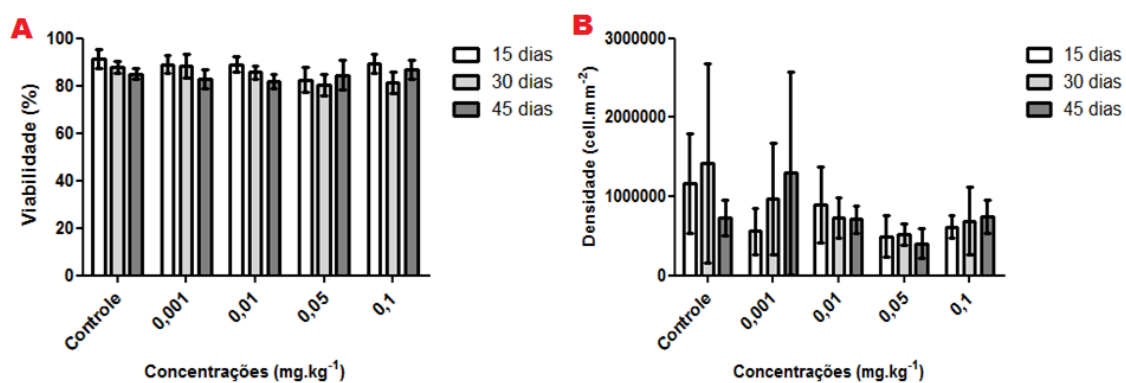


**Figura 25** – Variação da biomassa das minhocas *Eisenia andrei* no ensaio de toxicidade em solo com o acetamiprida.

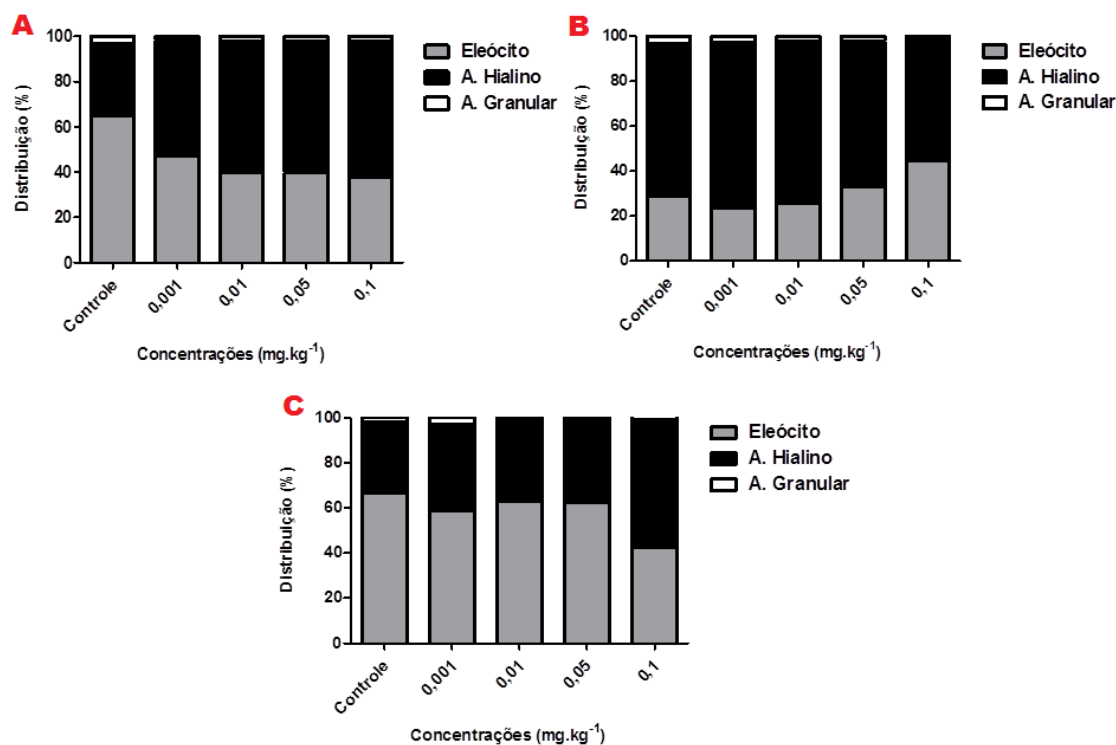
**Tabela 7** – Quantitativo de ovos e filhotes no ensaio de toxicidade em solo com o acetamiprida.

	OVOS	FILHOTES	FILHOTE/OVO
<b>CONTROLE</b>	3	46	15,3
<b>0,001 mg kg<sup>-1</sup></b>	11	47	4,27
<b>0,01 mg kg<sup>-1</sup></b>	4	20	5
<b>0,05 mg kg<sup>-1</sup></b>	0	4	—
<b>0,1 mg kg<sup>-1</sup></b>	2	23	11,5

Sobre a viabilidade e densidade das células do sistema imune, não houve diferenças estatisticamente significativas durante o ensaio em relação ao controle (Figura 26). Com relação à contagem diferencial das células imunes, nenhum dos tipos celulares apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle durante o ensaio (Figura 27).

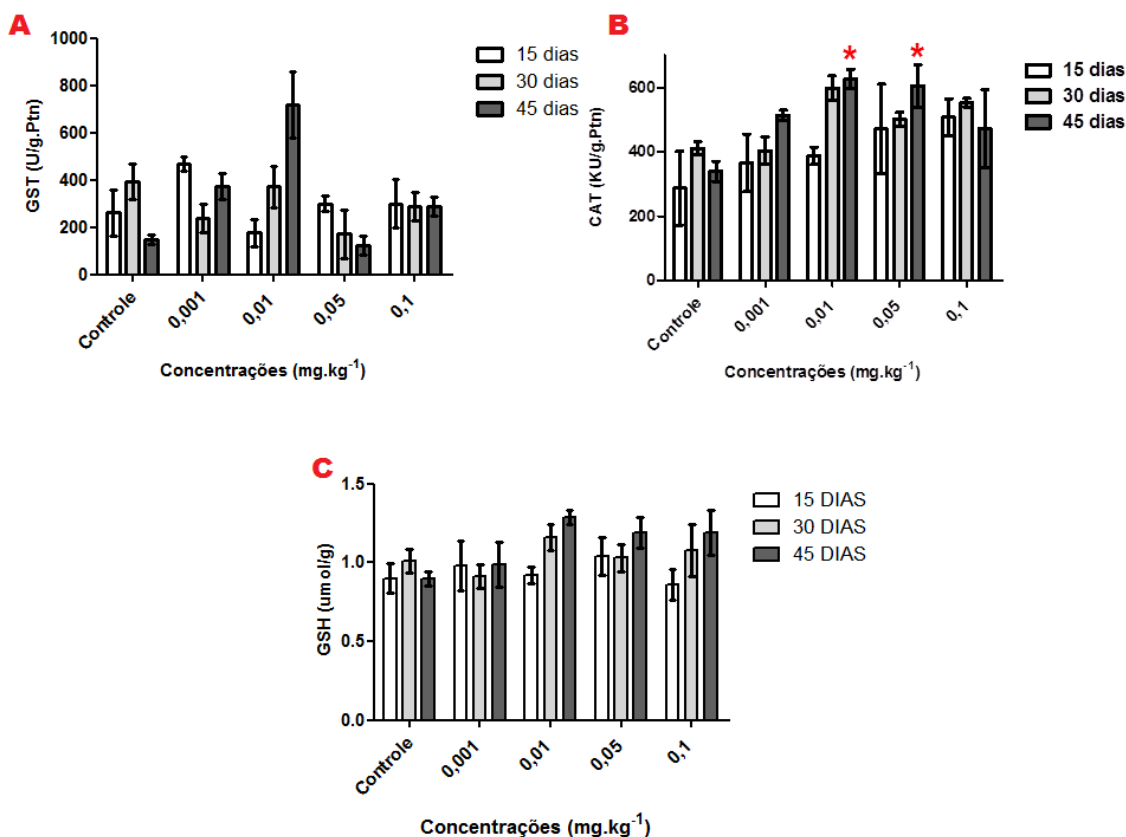


**Figura 26** – Médias da viabilidade (A) e densidade (B) das células imunes no ensaio de toxicidade em solo com o acetamiprida.



**Figura 27** - Distribuição da população das células imunes no ensaio de toxicidade em solo com o acetaminiprida. A – 15 dias; B – 30 dias e C – 45 dias.

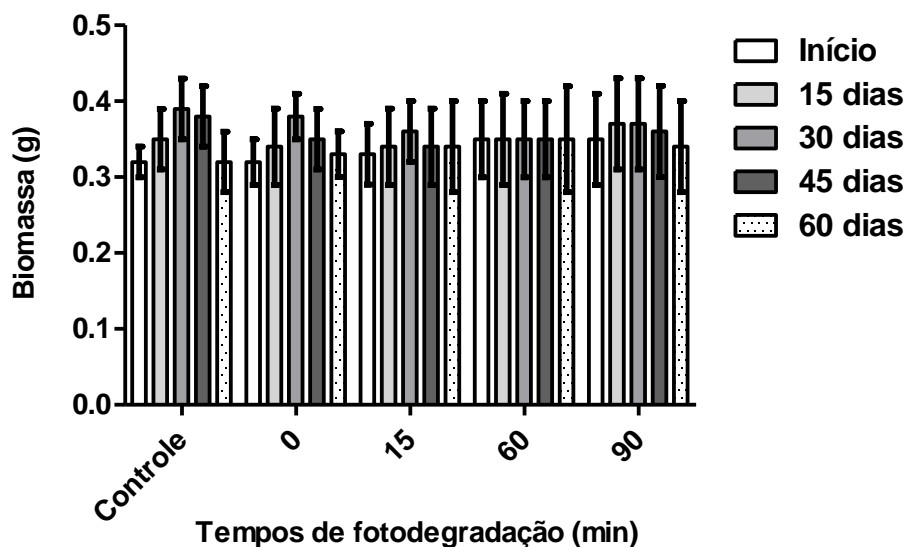
A atividade enzimática da GST e o quantitativo da GSH não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, porém o quantitativo de GSH apresentou uma tendência de aumento, em 45 dias, relacionada às concentrações. Já o ensaio de CAT apresentou diferença estatisticamente significativa nas concentrações 0,01 e 0,05 mg kg<sup>-1</sup> em relação ao controle em 45 dias de ensaio, a referida enzima teve sua atividade aumentada (Figura 28).



**Figura 28** – Variação da atividade da GST (A) e CAT (B) e quantitativo de GSH (C) no ensaio de toxicidade em solo com o acetaminofrida. \*Diferentes estatisticamente em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

### 5.2.6 Ensaio da toxicidade aguda e crônica em solo natural com o acetaminofrida tratado com TiO<sub>2</sub>

Ao serem analisadas no HPLC, as alíquotas apresentaram as seguintes concentrações de acetaminofrida: T0 = 3,89 mg L<sup>-1</sup>, T15 = 0,82 mg L<sup>-1</sup> e em T60 e T90 não teve pico detectável do composto para cálculo da concentração. Ao final dos 60 dias, foi possível observar uma variação na biomassa das minhocas nas diferentes concentrações, tal como está representado no gráfico (Figura 29) abaixo. Também foi possível verificar a reprodução das minhocas, com base no número encontrado de ovos (19) e filhotes (26), distribuídos nos vários tempos, conforme mostra a tabela (Tabela 8) que se segue.

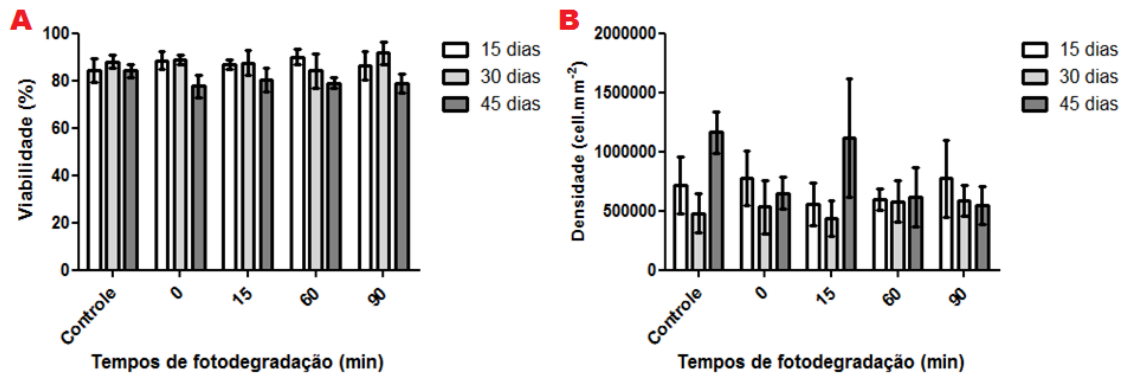


**Figura 29** – Variação da biomassa no ensaio de toxicidade em solo com diferentes tempos de fotodegradação com  $\text{TiO}_2$ .

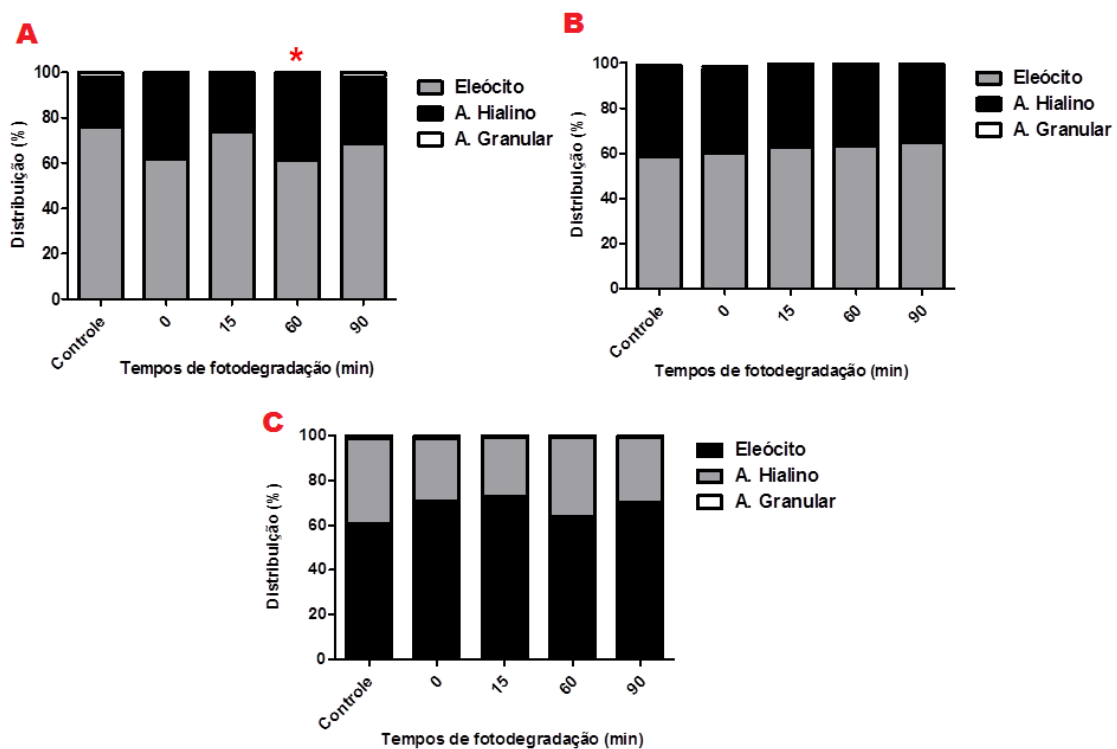
**Tabela 8** – Quantitativo de ovos e filhotes no ensaio de toxicidade em solo com o composto tratado com  $\text{TiO}_2$ .

	OVOS	FILHOTES	FILHOTE/OVO
<b>CONTROLE</b>	5	3	0,6
<b>TEMPO 0</b>	0	0	—
<b>TEMPO 15</b>	0	4	—
<b>TEMPO 60</b>	8	7	0,87
<b>TEMPO 90</b>	6	12	2

Quanto à viabilidade e densidade das células imunes, não houve diferenças estatisticamente significativas durante o ensaio em relação ao controle (Figura 30). Com relação à contagem diferencial das células imunes, o tempo 60 foi estatisticamente diferente em relação ao controle após 15 dias para eleóцитos e amebócitos hialinos (Figura 31).

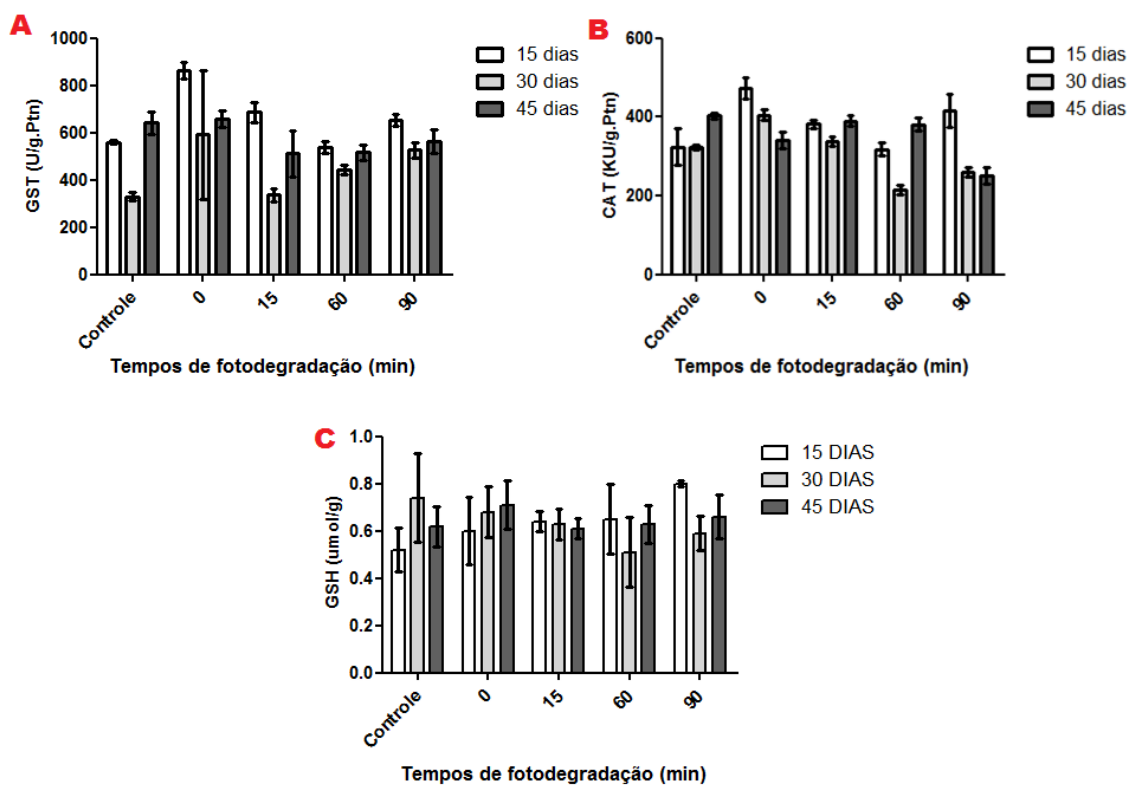


**Figura 30** – Médias da viabilidade (A) e densidade (B) das células imunes no ensaio de toxicidade em solo com o acetamiprida tratado com TiO<sub>2</sub>.



**Figura 31** – Distribuição da população das células imunes no ensaio de toxicidade em solo com o acetamiprida tratado com TiO<sub>2</sub>. A – 15 dias; B – 30 dias e C – 45 dias. \* Diferente estatisticamente em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

Quanto à atividade enzimática, apesar de os ensaios de GST e CAT não apresentarem diferenças estatisticamente significativas, houve uma tendência de aumento das atividades dos tempos 0 e 15 (tempos em que o composto ainda estava presente) em 15 e 30 dias. O quantitativo de GSH também não apresentou diferenças com significância estatística (Figura 32).



**Figura 32** – Variação da atividade da GST (A) e CAT (B) e quantitativo de GSH (C) no ensaio de toxicidade em solo com o acetamiprida tratado com TiO<sub>2</sub>.

## 6. Discussão

Neste trabalho, foi possível verificar a suscetibilidade do organismo *E. andrei* em relação ao inseticida acetamiprida. Fato que pode acarretar, inclusive, em um possível risco de perda de hábitat para tal organismo terrestre, segundo resultados obtidos nos testes de fuga, que apresentou RL acima de 80 % nas maiores concentrações e nos tempos em que ainda continham concentrações elevadas do composto. Os organismos encontrados no lado contaminado apresentaram alterações morfológicas, o que reforça o caráter tóxico do composto. Renaud *et al.* (2017) conseguiram estimar a concentração de acetamiprida com maior risco ambiental para o organismo *E. andrei*, que foi de 3,30 mg kg<sup>-1</sup> em solo inicialmente contaminado – concentração bem próxima à maior testada neste estudo.

Wang *et al.* (2012) compararam a toxicidade aguda de vinte e quatro agrotóxicos pertencentes à seis diferentes classes químicas para a minhoca *Eisenia fetida*, utilizando dois bioensaios: ensaio de contato em papel de filtro e ensaio em solo. No ensaio de contato, os neonicotinóides demonstraram ser extremamente tóxicos (valor da CL<sub>50</sub>



variou de 0,0088 a 0,45  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  em 48 horas); os piretróides, muito tóxicos (valor da  $\text{CL}_{50}$  variou de 10,55 a 25,7  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  em 48 horas) e os reguladores de crescimento de insetos, moderadamente tóxicos (valor da  $\text{CL}_{50}$  variou de 117,6 a 564,6  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  em 48 horas). Antibióticos, carbamatos e organofosforados induziram respostas de toxicidade variável, indo de muito a extremamente tóxicos (valor da  $\text{CL}_{50}$  variou de 3,64 a 75,75  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  em 48 horas). Já no ensaio em solo, os resultados mostraram um padrão diferente de toxicidade, exceto para os neonicotinóides – que se mantiveram como os mais tóxicos entre todos. Sendo assim, as minhocas foram mais sensíveis aos neonicotinóides, cuja toxicidade aguda foi superior a dos antibióticos, carbamatos, reguladores de crescimento de insetos e organofosfatos. Em contraste, os piretróides foram os menos tóxicos.

O que chamou a atenção neste estudo de Wang *et al.* (2012) foi a alta toxicidade do acetamiprida, que foi 64.159 vezes mais tóxico que o inseticida tiadiazinona buprofezina em 48 horas de exposição – considerando a ordem de toxicidade dos vinte e quatro agrotóxicos testados, o acetamiprida foi o mais tóxico e a buprofezina, a menos tóxica. Entre os cinco neonicotinóides testados, o acetamiprida apresentou a maior toxicidade, enquanto que o tiaclopride foi o menos tóxico para *E. fetida*. Em relação aos valores da  $\text{CL}_{50}$ , o acetamiprida foi 51,1 e 31,8 vezes mais tóxico do que os neonicotinóides tiaclopride e clothianidina, respectivamente. A toxicidade do acetamiprida foi de 901 vezes maior que o piretróide “lambda-cyhaltrin” em 14 dias de exposição em solo, considerando os cinco neonicotinóides testados. Os autores observaram que os dados exibiram relação de dependência com a concentração e a mortalidade aumentou quando o período de exposição aumentou para todos os agrotóxicos no ensaio em solo. No presente trabalho, a  $\text{CL}_{50}$  de acetamiprida após 72 horas no ensaio de contato foi de 0,0186  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ , com alterações morfológicas e morte de todos os organismos na maior concentração (0,16  $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ), o que reafirma o potencial tóxico do composto para minhocas, o que foi condizente com os achados de Wang *et al.* (2012).

Observou-se inibição no quantitativo de ovos e filhotes, nos ensaios de toxicidade crônica, nas maiores concentrações e nos tempos em que ainda continham concentrações elevadas do composto – o que corrobora com achados de outros autores. Gu *et al.* (2013) testaram os efeitos do acetamiprida e do imidacloprida na reprodução e no início do desenvolvimento embrionário de ratos *in vitro*. A exposição direta pelo

período de 30 minutos não afetou significativamente a motilidade e a integridade do DNA espermático, mas afetou a capacidade de fertilização *in vitro*. O que poderia indicar possíveis efeitos da exposição a neonicotinóides na capacidade de fertilização de espermatozoides de mamíferos. Wang *et al.* (2015) avaliaram a toxicidade de cinco neonicotinóides, entre eles o acetamiprida, e observaram que ele reduziu em 40 % a fertilidade em *E. fetida* em concentrações subletais ( $1,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ) – com a produção e eclosão de ovos inibida numa relação concentração dependente. Observaram também significativa ruptura de epiderme e do intestino médio após 14 dias de exposição, indicando uma alta toxicidade aguda. O acetamiprida exibiu efeito tóxico todos os parâmetros na concentração absoluta de  $0,75 \text{ mg kg}^{-1}$ . A minhoca é a maior biomassa em terra, sendo muito importante para o solo, é a base da cadeia alimentar terrestre, logo, quando a população de minhoca é afetada por pesticidas, toda a cadeia alimentar é afetada (BARTLETT *et al.*, 2010).

Zhang *et al* (2011) analisaram o efeito do acetamiprida sobre a função reprodutiva de camundongos machos. Os resultados indicaram que o acetamiprida diminuiu significativamente o peso corporal e o peso dos testículos, epidídimo, vesícula seminal e próstata. Além de ter reduzido a concentração de testosterona e a contagem, viabilidade e motilidade dos espermatozoides. O acetamiprida danificou os túbulos seminíferos, afetando a espermatogênese. Os autores relacionaram estes efeitos tóxicos ao estresse oxidativo causado pelo acetamiprida, que pode afetar a função reprodutiva masculina através da ação de seus metabólitos nos testículos.

Brunet *et al.* 2005 estudaram o metabolismo do acetamiprida em abelhas *Apis mellifera* através da cromatografia em camada delgada (TLC), que utilizou fósforo para detecção radioativa sob luz UV a 254 nm. Eles analisaram, por 72 horas, seis compartimentos deste organismo: cabeça, tórax, abdome, hemolinfa, intestino médio e reto. As abelhas foram tratadas por via oral com  $100 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ , dose cerca de 1500 vezes inferior à dose letal. Após 72 horas, apenas 40 % da radioatividade total foi eliminada, sugerindo que o acetamiprida e seus metabólitos tendem a persistir no organismo das abelhas. Os autores sugeriram que a clivagem do acetamiprida nas abelhas é seguida por oxidação, que resulta no aparecimento do 6-ácido cloronicotínico (IC 0), que pode, então, ser convertido no metabólito U1 (metabólito distinto, mas não identificado na TLC), o qual apresenta uma maior polaridade. Os autores perceberam que IC 0 não era tóxico quando aplicado topicamente (sem mortalidade com dose de  $50 \text{ } \mu\text{g/abelha}$ ), no

entanto, é muito mais tóxico durante a exposição crônica oral do que na exposição aguda (mais de 100.000 vezes). Provavelmente pelo aumento gradual e cumulativo, conforme já tem sido descrito com inseticidas organofosforados e piretróides. Segundo Brunet *et al.* 2005, esta diferença de toxicidade pode ser explicada por uma incapacidade de doses baixas induzirem sistemas detoxificantes ou pela existência de locais de ligação de alta e baixa afinidade para o composto tóxico. No caso dos neonicotinóides, a hipótese é que eles poderiam ativar os receptores nicotínicos da acetilcolina através dos dois sítios de ligação.

Cruz-Alcalde *et al.* (2017) estudaram a degradação do acetamiprida por ozônio, demonstrando que a fração de acetamiprida N-desmetil, o ácido 6-cloronicotínico, o N-ciano-N-metilacetamida e o N-ciano acetamida são os principais produtos de transformação, todos formados através da oxidação de carbono amina  $\alpha$  em combinação com hidrólise. No ensaio de toxicidade para verificação da  $EC_{50}$ , eles utilizaram uma espécie não-alvo, a bactéria *Vibrio fischeri*, e observaram que o tratamento foi mais tóxico que o composto em si, aumentando em 51,6 % a  $EC_{50}$ . O aumento da toxicidade foi atribuída ao ácido 6-cloronicotínico. Por outro lado, no presente trabalho, a degradação do acetamiprida por  $TiO_2$ , por sua vez, mostrou-se eficaz na redução de toxicidade, uma vez que, após a primeira hora de degradação, não houve alterações morfológicas nem mortes nos ensaios ecotoxicológicos. Li *et al.* (2015) estudaram a degradação eletrocatalítica do acetamiprida com dióxidos de titânio e de estanho e concluíram que 6-CNA (*6-chloronicotinic acid*) é o principal produto intermediário antes da clivagem do anel de piridina e que o mecanismo de degradação envolveu o ataque de  $\bullet OH$  e  $H_2O_2$ .

Pôde-se constatar perturbações na atividade enzimática no ensaio de contato e no ensaio crônico com o composto isolado, nos quais houve tendência de aumento das atividades da GST e catalase – a primeira atua na biotransformação e a segunda, protege a célula ao converter  $H_2O_2$  em água – e do quantitativo de GSH – linha de defesa primária, mantém o balanço redox da célula – conforme a concentração de acetamiprida e tempo de exposição. No ensaio crônico com o acetamiprida, por exemplo, houve um aumento estatisticamente significativo da atividade da catalase nas maiores concentrações após 45 dias. Fato que indica que o composto causou estresse oxidativo no organismo *E. andrei*, ou seja, um desequilíbrio entre a quantidade de espécies reativas de oxigênio geradas pelo composto com os mecanismos de defesa antioxidante

da célula. Sendo assim, o monitoramento da atividade da GST e da catalase, bem como a quantificação da GSH, mostraram-se eficientes como marcadores de estresse oxidativo no organismo terrestre *E. andrei*. Zhang *et al.* (2014) também observaram perturbações no balanço redox celular ao estudaram alterações bioquímicas causadas na minhoca *E. fetida* pelo agrotóxico neonicotinóide imidacloprida. Eles monitoraram as atividades do superóxido dismutase, da catalase, da peroxidase, da celulase, de espécies reativas de oxigênio e do malondialdeído. Os resultados indicaram que a atividade destes biomarcadores foi estreitamente relacionada com a dose e duração da exposição. A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi significativamente estimulada com exposição a doses entre 0,66 e 2 mg kg<sup>-1</sup> e inibida a dose de 4 mg kg<sup>-1</sup>. Este fenômeno indica que o imidacloprida poderia induzir a formação de O<sub>2</sub><sup>-</sup> e depois estimular a biossíntese da SOD para proteger as células. Já as atividades da catalase e da peroxidase aumentaram irregularmente em doses entre 0,2 e 4 mg kg<sup>-1</sup>. O nível de espécies reativas de oxigênio em doses de 2 ou 4 mg kg<sup>-1</sup> foi significativamente aumentado ao longo de todo o período de exposição. Quando a concentração de imidacloprida foi maior que 0,66 mg kg<sup>-1</sup>, o equilíbrio da atividade das enzimas antioxidantes e o nível de espécies reativas de oxigênio foram interrompidos. A atividade da celulase diminuiu significativamente com a exposição prolongada, o que pode causar prejuízos ao metabolismo bioquímico da *E. fetida*, uma vez que a celulase é um enzima digestiva. Por sua vez, o nível de malondialdeído aumentou com o aumento do tempo de exposição, o que significa que a peroxidação lipídica foi aumentada, contribuindo para o dano celular.

Sendo assim, Zhang *et al.* (2014) concluíram que o imidacloprida é potencialmente tóxico para *E. fetida*, visto que o neonicotinóide causou alterações a nível bioquímico no organismo estudado, com evidente estresse oxidativo. Os dados indicam que a sensibilidade da *E. fetida* ao imidacloprida foi aumentada com o aumento do tempo de exposição. Estes resultados podem ser úteis para avaliar o risco deste inseticida em ecossistemas de solo de acordo com os autores.

Foi possível observar diferenças estatisticamente significativas nas populações das células imunes do organismo *E. andrei* em comparação com os controles, nos ensaios de contato e de toxicidade crônica, o que indica que tais células tentaram neutralizar o composto. Uma vez que o número de eleócitos aumentou e suas secreções participam da desintoxicação de tecidos da minhoca, como eliminação de metais

(COOPER, 1996). Devan *et al.* (2014) avaliaram o potencial imunotóxico do acetamiprida em ratos, testando alterações hemato-bioquímicas, resposta dos linfócitos T e B, função macrófaga, histopatologia dos órgãos linfoides e respostas humorais. Os resultados indicaram que o acetamiprida pode diminuir a resposta do sistema imunológico e, assim, tornar o indivíduo suscetível a uma variedade de doenças. Os autores concluíram que a administração subcrônica de acetamiprida causa diminuições significativas na proliferação de linfócitos, bem como causa alterações na função dos macrófagos.

## 7. Conclusões

O ensaio de contato com o acetamiprida revelou que o composto foi tóxico para o organismo *E. andrei*, que apresentou alterações morfológicas, como inchaço, partição, nodulações e morte, bem como perda de biomassa – podendo-se determinar a CL50 após 72 horas de exposição ( $0,0186 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ ). Já no teste de fuga, as respostas líquidas foram positivas nas maiores concentrações (1 e  $0,1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e nos menores tempos de degradação, indicando risco de perda de hábitat, se este cenário fosse em condições reais de contaminação. Já no ensaio crônico, houve inibição no quantitativo de ovos e filhotes nas maiores concentrações e menores tempos de degradação.

Os marcadores de estresse oxidativo GST e CAT apresentaram tendência de aumento em suas atividades e GSH, em seu quantitativo, relacionada à concentração do acetamiprida ao longo do tempo de exposição nos ensaios de contato e crônico. O que significa um maior esforço do organismo *E. andrei* em metabolizar o xenobiótico, indicando que a substância foi capaz de causar estresse oxidativo nas minhocas. Por outro lado, a contagem diferencial das células imunes apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle, relacionadas à concentração do composto e tempo de exposição, indicando um possível efeito imunotóxico para *E. andrei*.

A degradação do acetamiprida por fotocatalise heterogênea com  $\text{TiO}_2/\text{UV}$  promoveu a completa mineralização em 90 minutos no experimento de degradação. E, nos ensaios ecotoxicológicos, a degradação se mostrou eficiente na redução de toxicidade do composto, uma vez que, tempos iguais ou superiores a 60 minutos, não apresentaram perturbações morfológicas, nem enzimáticas ou celulares significativas.

Também não foi observada inibição no quantitativo de ovos e filhotes, nem resposta líquida positiva. Logo, o tratamento se mostrou uma eficaz alternativa para remediação de ambientes contaminados com acetamiprida.

## **8. Recomendações futuras**

É de extrema relevância a elucidação do mecanismo de interação biológica dos principais metabólitos do acetamiprida em diferentes bioindicadores. Efeitos sinérgicos com outros agrotóxicos e processo de degradação natural também seriam interessante, visto que ajudaria na escolha ou elaboração de um método de remediação eficaz e específico para diversos cenários de contaminação ambiental.

Sendo assim, sugere-se a realização de estudos adicionais para compreender melhor a forma com que os organismos *E. andrei* interagem com os fotoprodutos, bem como identificá-los. Além de realizar ensaios ecotoxicológicos do acetamiprida tratado com outros processos oxidativos avançados, para comparação da eficiência com o  $\text{TiO}_2/\text{UV}$  realizado neste estudo.

Estudos sobre o efeito do acetamiprida no organismo *Eisenia andrei* ainda são incipientes, o que sugere cautela no uso deste composto, fazendo-se necessários mais estudos sobre a avaliação ecotoxicológica do acetamiprida para estimar possível redução, ou não, da toxicidade do composto durante e após o tratamento com outros POAs. A avaliação ecotoxicológica em diferentes níveis tróficos é importante para avaliar possíveis riscos às espécies testadas e ao ambiente onde vivem, além de nortear futuras tomadas de decisões frente aos possíveis danos do composto-alvo ao ecossistema onde seu uso estiver em pauta.



**Figura 33** – Recomendações para estudos futuros com o acetamiprida. Fonte: Santo, D. G. E. (2017).

## Referências

AEBI, H. [13] Catalase in vitro. In: **Methods in Enzymology**. Elsevier, 1984. v. 105p. 121–126.

AFFAR, E. B. et al. Isolation, purification and partial characterization of chloragocytes from the earthworm species *Lumbricus terrestris*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 185, n. 1–2, p. 123–133. 1998.

AL-RAJAB, A. J.; ALHABABY, A. M.; ALFAIFI, T. Persistence of imidacloprid, acetamiprid and methomyl in qat leaves. **Hellenic Plant Protection Journal**, v. 9, n. 2. 2016.

ALVES, J.E. **Toxicidade do nim (*Azadirachta indica* A. Juss.: Meliaceae) para *Apis mellifera* e sua importância apícola na caatinga e mata litorânea cearense**. Tese de Doutorado. Fortaleza, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Doutorado Integrado UFC-UFPB-UFRPE. Universidade Federal do Ceará. 129 p. 2010.

ALVES FILHO, J. P. **Uso de agrotóxicos no Brasil: controle social e interesses corporativos**. São Paulo: Annablume, 2002.

AMARANENI, S. R.; PILLALA, R. R. Concentrations of pesticide residues in tissues of fish from Kolleru Lake in India. **Environmental Toxicology**, v. 16, n. 6, p. 550–556, 2001

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resoluções **RE nº 144 de 18/01/10 (DOU de 19/01/10) e RE nº 2.140 de 13/05/10 (DOU de 17/05/10)**. Disponíveis em: <<http://portal.anvisa.gov.br>> Acessado em: 14 out. 2016.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629–643. 2010.

BARTLETT, M. D. et al. A critical review of current methods in earthworm ecology: From individuals to populations. **European Journal of Soil Biology**, v. 46, n. 2, p. 67–73. 2010.

BATISTELLA, M.; VALLADARES, G. S. Farming expansion and land degradation in Western Bahia, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 9, n. 3, p. 61–76. 2009.

BEHRENS, A. **Avaliação da toxicidade aguda (FD) em efluentes industriais – galvanoplastia**. 37 f. Monografia (Bacharelado em Biologia) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba. 1995.

BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 3. ed. Ceres, 1995.

BERGER, S.; ERNST, E. C.; BARZA, M. Comparative incidence of phlebitis due to buffered cephalothin, cephalpirin, and cefamandole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 9, n. 4, p. 575–579. 1976.

BIANCHI, M. O.; CORREIA, M. E. F.; RESENDE, A. S. de; CAMPELLO, E. F. C. **Importância de estudos ecotoxicológicos com invertebrados do solo**. Seropédica - RJ: Embrapa Agrobiologia, 2010. (Embrapa Agrobiologia. Série Documentos, 266). ISSN: 1517-8498. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/50057/1/DOC266-10.pdf>> Acessado em: 28 nov. 2016.

BLACQUIÈRE, T. et al. Neonicotinoids in bees: a review on concentrations, side-effects and risk assessment. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 4, p. 973–992. 2012.

BONMATIN, J. M. et al. A LC/APCI-MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants, and in pollens. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 9, p. 2027–2033. 2003.



BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254. 1976.

BRASIL. **Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002**. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/2002/d4074.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm)> Acessado em: 23 out. 2016.

BRASIL. **Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989**. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/L7802.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L7802.htm)> Acessado em: 23 out. 2016.

BRUNET, J.-L.; BADIOU, A.; BELZUNCES, L. P. *In vivo* metabolic fate of [14C]-acetamiprid in six biological compartments of the honeybee, *Apis mellifera* L. **Pest Management Science**, v. 61, n. 8, p. 742–748. 2005.

BRUNET, J.-L. et al. Intestinal absorption of the acetamiprid neonicotinoid by Caco-2 cells: Transepithelial transport, cellular uptake and efflux. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 43, n. 3, p. 261–270. 2008.

BUONOCORE, G.; GROENENDAAL, F. Anti-oxidant strategies. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v. 12, n. 4, p. 287–295. 2007.

CANESI, L. et al. Heavy metals and glutathione metabolism in mussel tissues. **Aquatic Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 67–76. 1999.

CAPORAL, F. R. **Em defesa de um Plano Nacional de Transição Agroecológica: compromisso com as atuais e nosso legado para as futuras gerações**. BRASÍLIA: EMBRAPA, 2008.

CARVALHO, A. E. F.; LEONEL, L. F.; MATSUBARA, K. G.; SILVA, E. M. F.; SASAKI, T. H.; MONZANE, P. V. G. **Avaliação ecotoxicológica de ecossistemas aquáticos da bacia hidrográfica do rio Itaqueri (Itirapina/Brotas, SP): uma análise espacial**. In: JORNADA CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UFSCAR. São Carlos: UFSCar, 2009. Disponível: <<http://www.ambiente-augm.ufscar.br/uploads/A2-158.pdf>>. Acessado: 15 fev. 2016.

ÇAVALAS, T. et al. In vitro genotoxicity evaluation of acetamiprid in CaCo-2 cells using the micronucleus, comet and  $\gamma$ H2AX foci assays. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 104, n. 3, p. 212–217. 2012.

CDPR-Cal/EPA - California Department of Pesticide Regulation of the California Environmental Protection Agency in <http://www.cdpr.ca.gov/docs/toxsums/toxsumlist.htm> on Acetimidrid (135410-20-7) as of September 30, 2004].

CHARVET, R. et al. Systemic insecticides: new risk for pollinator insects. **Annales Pharmaceutiques Francaises**, v. 62, n. 1, p. 29–35. 2004.

CHRISTEN, V.; MITTNER, F.; FENT, K. Molecular effects of neonicotinoids in honey bees (*Apis mellifera*). **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 7, p. 4071–4081. 2016.

COSSARIZZA, A. et al. Earthworm leukocytes that are not phagocytic and cross-react with several human epitopes can kill human tumor cell lines. **Experimental Cell Research**, v. 224, n. 1, p. 174–182. 1996.

COSTA, E. C.; OLIVEIRA, R. S. DE. **Meio ambiente e a agricultura no século XXI**. Curitiba (Brasil): Editora Íthala, 2013.

COSTA, Geovana Specht Vital da. **Da regulamentação dos agrotóxicos**. In: *Âmbito Jurídico*, Rio Grande, XV, n. 103, ago 2012. Disponível em: <[http://www.ambito-juridico.com.br/site/?n\\_link=revista\\_artigos\\_leitura&artigo\\_id=11864](http://www.ambito-juridico.com.br/site/?n_link=revista_artigos_leitura&artigo_id=11864)>. Acessado em: 14 nov. 2016.

CREMONESE, C. **Exposição a agrotóxicos e distúrbios reprodutivos: estudo em trabalhadores rurais, seus familiares e jovens do município de Farroupilha-RS**. PhD Thesis—[s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/13159/1/193.pdf>>. Acessado em: 20 jan. 2016.

CREMONESE, C. et al. Exposição a agrotóxicos e eventos adversos na gravidez no Sul do Brasil, 1996-2000. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 28, n. 7, p. 1263–1272. 2012.

CRUZ-ALCALDE, A.; SANS, C.; ESPLUGAS, S. Priority pesticides abatement by advanced water technologies: The case of acetamidrid removal by ozonation. **Science of the Total Environment**, v. 599–600, p. 1454–1461. 2017.

DA SILVA MANSANO, A.; APARECIDA MOREIRA, R.; ROCHA, O. Toxicidade aguda do agrotóxico carbofurano ao cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii daday*, 1902. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 8, n. 12. 2012.

DE ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. **Bioscience Journal**, v. 23, n. 3, 2007.

DORES, E. F. G. DE C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso - análise preliminar. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 27–36. 2001.

EDWIN L. COOPER; E.A. STEIN. **Oligochaetes, in invertebrate blood cells, Vol. 1. Ratcliffe**. San Francisco: A.F. Rowley, 1981. v. Academic Press.

EL HASSANI, A. K. et al. Effects of sublethal doses of acetamiprid and thiamethoxam on the behavior of the honeybee (*Apis mellifera*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 54, n. 4, p. 653–661. 2008.

EPA, *Environmental Protection Agency*. **Prevention, Pesticides And Toxic Substances**, United States, 2005. Disponível em: <<http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/factsheets/2325fact.pdf>>. Acessado em: 14 out. 2016.

ERAKOVIĆ, V. et al. Lithium plus pilocarpine induced status epilepticus — biochemical changes. **Neuroscience Research**, v. 36, n. 2, p. 157–166. 2000.

ERNEST BEUTLER. **Red Cell Metabolism: a Manual of Biochemical Methods**. 2. ed. Nova Iorque: Grune and Stratton, 1975.

EYAMBE, G. S. et al. A non-invasive technique for sequential collection of earthworm *Lumbricus terrestris* leukocytes during subchronic immunotoxicity studies. **Laboratory Animals**, v. 25, n. 1, p. 61–67. 1991.

FENOLL, J. et al. Photodegradation of neonicotinoid insecticides in water by semiconductor oxides. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 22, n. 19, p. 15055–15066. 2015.

FILHO, R. W. R.; LUVIZOTTO-SANTOS, R.; VIEIRA, E. M. Poluentes Emergentes como Desreguladores Endócrinos. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 2, n. 3, p. 283–288, 2007.

GOLDSTEIN, E. G. Ambiente. **Testes de toxicidade de efluentes industriais**, v. 2, n. 2, p. 33 a 38, 1988.

GROS, M.; PETROVIC, M.; BARCELÓ, D. Analysis of Emerging Contaminants of Municipal and Industrial Origin. In: BARCELÓ, D.; PETROVIC, M. (Eds.). **Emerging Contaminants from Industrial and Municipal Waste**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. v. 5S/1p. 37–104.

GU, Y.-H. et al. Reproductive effects of two neonicotinoid insecticides on mouse sperm function and early embryonic development in vitro. **PloS One**, v. 8, n. 7, p. e70112, 2013.

GUZSVÁNY, V. J. et al. Photocatalytic degradation of the insecticide acetamiprid on TiO<sub>2</sub> catalyst. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2009.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130–7139, 25. 1974.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Fifth edition ed. Oxford, Reino Unido. Oxford University Press, 2015.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science & Technology**, v. 11, n. 7, p. 714–719. 1977.

HUBER, P. C.; ALMEIDA, W. P.; FÁTIMA, Â. DE. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170–1179, 2008.

HAYNES, K. F. Sublethal effects of neurotoxic insecticides on insect behavior. **Annual Review of Entomology**, v. 33, n. 1, p. 149–168. 1988.

HOMA, J. et al. Effective activation of antioxidant system by immune-relevant factors reversely correlates with apoptosis of *Eisenia andrei* coelomocytes. **Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 186, n. 4, p. 417–430. 2016.

HUANG, C. P.; DONG, C.; TANG, Z. Advanced chemical oxidation: Its present role and potential future in hazardous waste treatment. **Waste Management**, v. 13, n. 5–7, p. 361–377. 1993.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Manual para Requerimento de Avaliação Ambiental: agrotóxico e afins**. Disponível em: <[http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade\\_Ambiental/manual\\_de\\_procedimento\\_agrototoxicos\\_ibama\\_2009-11.pdf](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/manual_de_procedimento_agrototoxicos_ibama_2009-11.pdf)> Acessado em: 23 out. 2016.

IMUNOVA ANÁLISES BIOLÓGICAS. Centro Politécnico UFPR (Universidade Federal do Paraná), Setor de Ciências Biológicas, Dep. de Patologia Básica. Equipe: Beirão, B. C. C.; Júnior, C. F; Ingberman, M. Disponível em: <<https://imunova.com.br/avaliacao-do-sistema-redox/>>. Acessado em: 24 jul. 2018.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 17512-1: soil quality: avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemical on behavior. Part 1: test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*)**. Geneva, Suíça, 2007.

ISO 11268-1, **Soil quality - Effects of Pollutants on Earthworms - Part 1: Determination of Acute Toxicity to *Eisenia fetida*/ *Eisenia andrei***, 2012.

ISO 11268-2 **Soil Quality – Effects of Pollutants on Earthworms. Part 2: Determination of Effects on Reproduction of *Eisenia fetida*/ *Eisenia andrei***, 2012.

JIMÉNEZ, M. et al. Supported TiO<sub>2</sub> solar photocatalysis at semi-pilot scale: degradation of pesticides found in citrus processing industry wastewater, reactivity and influence of photogenerated species. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 90, n. 1, p. 149–157. 2015.

JIMÉNEZ-TOTOTZINTLE, M. et al. Remediation of agro-food industry effluents by biotreatment combined with supported TiO<sub>2</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solar photocatalysis. **Chemical Engineering Journal**, v. 273, p. 205–213. 2015.

KAMMRADT, P. B. Remoção de cor de efluentes de tinturarias industriais através de processos de oxidação avançada. Disponível em: <[https://docs.ufpr.br/~bleninger/dissertacoes/086-Patricia\\_Bastos\\_Kammradt.pdf](https://docs.ufpr.br/~bleninger/dissertacoes/086-Patricia_Bastos_Kammradt.pdf)>. Acessado em: 25 jan. 2016. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos e Ambientais, p. 107, 2004.

KHAN, A. et al. Heterogeneous photocatalysed degradation of an insecticide derivative acetamiprid in aqueous suspensions of semiconductor. **Desalination**, v. 261, n. 1–2, p. 169–174. 2010.

KIMURA-KURODA, J. et al. Neonicotinoid insecticides alter the gene expression profile of neuron-enriched cultures from neonatal rat cerebellum. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 10, p. 987. 2016.

KOIFMAN, S.; KOIFMAN, R. J.; MEYER, A. Human reproductive system disturbances and pesticide exposure in Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 2, p. 435–445. 2002.

KÓS, M. I. et al. Efeitos da exposição a agrotóxicos sobre o sistema auditivo periférico e central: uma revisão sistemática. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 29, n. 8, p. 1491–1506. 2013.

LAABS, V. et al. Pesticides in surface water, sediment, and rainfall of the northeastern Pantanal basin, Brazil. **Journal of Environmental Quality**, v. 31, n. 5, p. 1636–1648. 2002.

LEGRINI, O.; OLIVEROS, E.; BRAUN, A. M. Photochemical processes for water treatment. **Chemical Reviews**, v. 93, n. 2, p. 671–698. 1993.

LEONARD, S. S.; HARRIS, G. K.; SHI, X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 37, n. 12, p. 1921–1942. 2004.

LI, S. et al. Electro-catalytic degradation pathway and mechanism of acetamiprid using an Er doped Ti/SnO<sub>2</sub>-Sb electrode. **RSC Advances**, v. 5, n. 84, p. 68700–68713, 2015.

LIN, D. et al. Biochemical and genotoxic effect of triclosan on earthworms (*Eisenia fetida*) using contact and soil tests. **Environmental Toxicology**, v. 27, n. 7, p. 385–392. 2012.

LINTHICUM, D. S. et al. Electron-microscopic observations of normal coelomocytes from the earthworm, *Lumbricus terrestris*. **Cell and Tissue Research**, v. 185, n. 3, p. 315–330. 1977.

LUCCHESI, Geraldo. **Agrotóxicos – construção da legislação**. Brasília, DF: Consultoria Legislativa, 2005. Disponível em: <[http://www2.camara.leg.br/a-camara/documentos-e-pesquisa/estudos-e-notas-tecnicas/areas-da-conle/tema19/2005\\_13187.pdf](http://www2.camara.leg.br/a-camara/documentos-e-pesquisa/estudos-e-notas-tecnicas/areas-da-conle/tema19/2005_13187.pdf)>. Acessado em: 22 fev. 2016.

LUSHCHAK, V. I. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. **Journal of Amino Acids**, v. 2012, p. 1–26, 2012.

MARA M. DE ANDRÉA. **Bioindicadores ecotoxicológicos de agrotóxicos**. Governamental. Disponível em: <<http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/publicacoes/comunicados-documentos-tecnicos/comunicados-tecnicos/bioindicadores-ecotoxicologicos-de-agrotoxicos>>. Acessado em: 30 abr. 2018.

MARICONI, F. A. M. **Inseticidas e seu emprego no combate às pragas**. 5. ed. São Paulo: Ed. Agron. Ceres, 1980.

MATOS, P. F.; PESSOA, V. L. S. A modernização da agricultura no Brasil e os novos usos do território. **Geo UERJ**, v. 2, n. 22. 2011.

MBOULA, V. M. et al. Photocatalytic degradation of endocrine disruptor compounds under simulated solar light. **Water Research**, v. 47, n. 12, p. 3997–4005. 2013.

MEYER, A. et al. Cancer mortality among agricultural workers from Serrana Region, state of Rio de Janeiro, Brazil. **Environmental Research**, v. 93, n. 3, p. 264–271. 2003.

MICHIELS, C. et al. Importance of SE-glutathione peroxidase, catalase, and CU/ZN-SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 17, n. 3, p. 235–248. 1994.

MONTEIRO, D. A. **Efeitos do inseticida organofosforado Metil Paration (Folisuper 600 BR®) sobre biomarcadores do estresse oxidante no teleósteo de água doce matrinxã *Brychon cephalus* (GÜNTHER, 1869) e o papel da suplementação de selênio na dieta**. (MSc). Dissertação de mestrado em Fisiologia do programa de Ciências Fisiológicas, p. 183, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2006.

MONTENEGRO GÓMEZ, J. R. **Desenvolvimento em (des) construção: narrativas escalares sobre desenvolvimento territorial rural**. 2006. Disponível em: <[http://200.145.6.238/bitstream/handle/11449/105042/montenegrogomez\\_jr\\_dr\\_prud.pdf?sequence=1&isAllowed=y](http://200.145.6.238/bitstream/handle/11449/105042/montenegrogomez_jr_dr_prud.pdf?sequence=1&isAllowed=y)>. Acessado em: 27 jan. 2016.

NAKAGOME, F. K.; NOLDIN, J. A.; RESGALLA JR., C. Toxicidade aguda de alguns herbicidas e inseticidas utilizados em lavouras de arroz irrigado sobre o peixe *Danio rerio*. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 17, 31. 2007.

NBR 12.713. Aquatic Ecotoxicology. Acute toxicity. **Test method with *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea)**. Rio de Janeiro, 2004.

NEVES, P. D. M.; BELLINI, M. Intoxicações por agrotóxicos na mesorregião norte central paranaense, Brasil - 2002 a 2011. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 18, n. 11, p. 3147–3156. 2013.

NGUYEN, B. K. et al. Does imidacloprid seed-treated maize have an impact on honey bee mortality? **Journal of Economic Entomology**, v. 102, n. 2, p. 616–623. 2009.

NUNES, M. E. T. **Avaliação dos efeitos de agrotóxicos sobre a fauna edáfica por meio de ensaios ecotoxicológicos com *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) e com comunidade natural de solo**. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, p. 175, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

OECD – Organization for Economic Cooperation and Development. **Guideline for testing of chemicals n° 207**, Earthworm acute toxicity tests, 1984.

OKAMOTO, K. et al. Heterogeneous Photocatalytic Decomposition of Phenol over TiO<sub>2</sub> Powder. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 58, n. 7, p. 2015–2022. 1985.

PARMON, V.; EMELINE, A. V.; SERPONE, N. Glossary of terms in photocatalysis and radiocatalysis. **International Journal of Photoenergy**, v. 4, p. 91–131, 2002.

PEDROSO, R. C. R. et al. Desenvolvimento de métodos de análise por CLAE-UV para os antimicrobianos tetraciclina, sulfametoxazol e trimetoprima utilizando materiais à base de sílica como sistemas de pré-concentração. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 206–212, 2011.



PERES, F. et al. Desafios ao estudo da contaminação humana e ambiental por agrotóxicos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10, n. suppl, p. 27–37. 2005.

PÉREZ, M. H. et al. Degradation of pesticides in water using solar advanced oxidation processes. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 64, n. 3–4, p. 272–281. 2006.

PHAM-DELÈGUE, M.; DECOURTYE, A. The proboscis extension response: Assessing the sublethal effects of pesticides on the honey bee. In: DEVILLERS, J.; PHAM-DELÈGUE, M.-H. (Eds.). **Honey Bees**. [s.l.] CRC Press, 2002. p. 67–84.

PIGNATI, W.; OLIVEIRA, N. P.; SILVA, A. M. C. DA. Vigilância aos agrotóxicos: quantificação do uso e previsão de impactos na saúde-trabalho-ambiente para os municípios brasileiros. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, n. 12, p. 4669–4678. 2014.

PINGALI, P. L.; MARQUEZ, C. B.; PALIS, F. G. Pesticides and Philippine rice farmer health: a medical and economic analysis. **American Journal of Agricultural Economics**, v. 76, n. 3, p. 587–592, 1994.

PREFEITURA DE JUNDIAÍ – SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO. **História da Agricultura**. São Paulo; 2016. Disponível em: <<https://www.jundiai.sp.gov.br/agricultura-e-abastecimento/historia-da-agricultura/>> Acessado em: 14 out. 2016.

PROSSER, R. S. et al. Sensitivity of the early-life stages of freshwater mollusks to neonicotinoid and butenolide insecticides. **Environmental Pollution**, v. 218, p. 428–435. 2016.

PUBCHEM – National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; **CID=213021 (ACETAMIPRID)**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/213021>> Acessado em: 27 nov. 2016.

RAMADE, F. **Écotoxicologie**. Paris ; New York: Masson, 1977.

REISCHL, E. et al. Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. **Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & pharmacology: CBP**, v. 146, n. 1–2, p. 22–53. 2007.

RENAUD, M. et al. Effects of the neonicotinoids acetamiprid and thiacloprid in their commercial formulations on soil fauna. **Chemosphere**, v. 194, p. 85–93. 2018.

RIBERA, D. et al. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil, effects of carbaryl. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, n. 7–8, p. 1123–1130. 2001.

RINKEVICH, B.; MÜLLER, W. E. G. (EDS.). **Invertebrate Immunology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1996. v. 15

ROCHA, A. G. da; ESPINDOLA, E. L. G. **Agrotóxicos: uma análise comparativa da legislação entre Brasil, União Européia e Estados Unidos da América**. Trabalho de Graduação apresentado à Escola de Engenharia de São Carlos (EESC) da Universidade de São Paulo (USP) como parte dos requisitos para obtenção do título de Graduação em Engenharia Ambiental. São Carlos – SP, 31 de outubro de 2014. Disponível em: <<http://www.tcc.sc.usp.br/tce/disponiveis/18/180300/tce-02032015-155351/?&lang=br>> Acessado em: 25 nov. 2016.

ROVER JÚNIOR, L. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1. 2001.

RÚBIA YURI TOMITA; ZULEIKA BEYRUTH. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biológico, São Paulo**, v. 64, n. 2, p. 135–142, 2002.

SAGGIORO, E.M., *et al.* **Efeito dos Processos Oxidativos Avançados na decomposição fotocatalítica do corante Índigo carmin**. Projeto parcial apresentado com vistas ao exame de qualificação para obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Saúde Pública e Meio Ambiente junto à Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, p. 64. 2011.

SAGGIORO, E. M. et al. Use of titanium dioxide photocatalysis on the remediation of model textile wastewaters containing azo dyes. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 10370–10386. 2011.

SAGGIORO, E. M. et al. Solar CPC pilot plant photocatalytic degradation of bisphenol A in waters and wastewaters using suspended and supported-TiO<sub>2</sub>. Influence of photogenerated species. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 21, p. 12112–12121. 2014.

SANO, K. et al. In utero and Lactational Exposure to Acetamiprid Induces Abnormalities in Socio-Sexual and Anxiety-Related Behaviors of Male Mice. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, p. 228, 2016.

SANTANA, F., MUELLE, H., MATEUS, E. & SEPÚLVEDA (2002). Avaliação de impactos da aplicação no solo de compostos disruptores endócrinos. p. 15-26 In: DUARTE, A., SANTOS, T.R., PANTELEITCHOUK, A. e PREGO, R. Ecotoxicologia e Remoção de Poluentes: Estudos na Península Ibérica. Coleção Estudos e Documentos. Instituto Piaget: Lisboa, p. 252.

SANTOS, H. G. DOS. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 3a edição revista e ampliada ed. Brasília, DF: Embrapa, 2013.

SCHMOLDT, A.; BENTHE, H. F.; HABERLAND, G. Digitoxin metabolism by rat liver microsomes. **Biochemical Pharmacology**, v. 24, n. 17, p. 1639–1641. 1975.

SCHMUTTERER, H. Properties and Potential of Natural Pesticides from the Neem Tree, *Azadirachta Indica*. **Annual Review of Entomology**, v. 35, n. 1, p. 271–297. 1990.

SHAKTHI DEVAN, R. K.; PRABU, P. C.; PANCHAPAKESAN, S. Immunotoxicity assessment of sub-chronic oral administration of acetamiprid in Wistar rats. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 38, n. 3, p. 328–336. 2015.

SILVA, A. C. **Tratamento do percolado de aterro sanitário e avaliação da toxicidade do efluente bruto e tratado**. 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, p. 126. Disponível em: <[http://www.snatural.com.br/PDF\\_arquivos/Efluente-Tratamento-Chorume.pdf](http://www.snatural.com.br/PDF_arquivos/Efluente-Tratamento-Chorume.pdf)>. Acessado em: 10 fev. 2016.

SILVA, C. G. A. DA; COLLINS, C. H. Aplicações de cromatografia líquida de alta eficiência para o estudo de poluentes orgânicos emergentes. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665–676, 2011.

SILVA, T.C.F. **Processos oxidativos avançados para tratamento de efluentes de indústria de celulose kraft branqueada**. 2007. 104f. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007. Disponível em: <<http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/2139/texto%20completo.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acessado em: 16 fev. 2016.

SIMON-DELISO, N. et al. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 5–34. 2015.

SISINNO, C. L. S.; BULUS, M. R. M.; RIZZO, A. C.; SÁFADI, R.; FONTES, A.; MOREIRA, J. C. Ensaios ecotoxicológicos como um instrumento de complementação da avaliação de áreas contaminadas: resultados preliminares em áreas contaminadas por hidrocarbonetos. Pp. 150-154. In: **seminário nacional de saúde e ambiente**, 3., 2004, Rio de Janeiro. Anais... Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2004, p. 164.

SOARES, W. L.; PORTO, M. F. Atividade agrícola e externalidade ambiental: uma análise a partir do uso de agrotóxicos no cerrado brasileiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 131–143. 2007.

STEIN, E.; AVTALION, R. R.; COOPER, E. L. The coelomocytes of the earthworm *Lumbricus terrestris*: morphology and phagocytic properties. **Journal of Morphology**, v. 153, n. 3, p. 467–477. 1977.

STOREY, K. B. Oxidative stress: animal adaptations in nature. **Revista Brasileira de Pesquisas Medicas e Biologicas**, v. 29, n. 12, p. 1715–1733. 1996.

SURI, R. P. S. et al. Heterogeneous photocatalytic oxidation of hazardous organic contaminants in water. **Water Environment Research**, v. 65, n. 5, p. 665–673. 1993.

SUZUKI, Y. [Inborn error of glycolipid metabolism]. **Hormon to Rinsho. Clinical Endocrinology**, v. 23, n. 9, p. 885–891. 1975.

TCHOBANOGLIOUS, G. et al. (EDS.). **Wastewater engineering: treatment and reuse**. 4th ed. Boston: McGraw-Hill, 2003.

TERRA, Fábio Henrique Bittes; PELAEZ, Victor. **A história da indústria de agrotóxicos no Brasil: das primeiras fábricas na década de 1940 aos anos 2000**. In: Simpósio de Pós-Graduação em História Econômica/IV Congresso de Pós-Graduação em História Econômica/IV Encontro de Pós-Graduação em História Econômica/II Conferência Internacional de História Econômica. 2008.

TEIXEIRA, C.P.; JARDIM, W.F. **Processos Oxidativos Avançados – Conceitos teóricos**. Caderno Temático, Campinas, v. 3, ago. 2004. Disponível em: <<http://lqa.iqm.unicamp.br/cadernos/caderno3.pdf>>. Acessado: 10 fev. 2016.

USEPA 712-C-96-167 (OPPTS 850.4200). Seed Germination / Root Elongation Toxicity Test. **Ecological effects test guidelines**. Washington DC. 1996.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57–149. 2003.

VEHOVSZKY, Á. et al. Neonicotinoid insecticides inhibit cholinergic neurotransmission in a molluscan (*Lymnaea stagnalis*) nervous system. **Aquatic Toxicology**, v. 167, p. 172–179. 2015.

VEIGA, M. M. et al. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 11, p. 2391–2399. 2006.

VIEIRA, M.F.L. **Aplicação de fenton seguida de biodegradação no tratamento de efluente contendo corante têxtil**. 2008. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Faculdade de Engenharia, Universidade Tiradentes, Aracaju, p. 118. 2008.

WANG, K. et al. Biological response of earthworm, *Eisenia fetida*, to five neonicotinoid insecticides. **Chemosphere**, v. 132, p. 120–126. 2015.

WANG, Y. et al. Comparative acute toxicity of twenty-four insecticides to earthworm, *Eisenia fetida*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 79, p. 122–128. 2012.

WILHELM FILHO, D. et al. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). **Aquaculture**, v. 244, n. 1–4, p. 349–357. 2005.

WU, J.; WANG, K.; ZHANG, H. Dissipation and residue of acetamiprid in watermelon and soil in the open field. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 89, n. 3, p. 644–648. 2012.

YADAV, S. Screening of Immunocompetent Coelomic Cells in Earthworms. **International Journal of Sciences**, v. 2, n. 4, p. 43–51, 2016.

YAMAMOTO, A. et al. Evaluation of river pollution of neonicotinoids in Osaka City (Japan) by LC/MS with dopant-assisted photoionisation. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 14, n. 8, p. 2189–2194. 2012.

ZHANG, J. et al. Oxidative Stress: Role in Acetamiprid-induced impairment of the male mice reproductive system. **Agricultural Sciences in China**, v. 10, n. 5, p. 786–796. 2011.

ZHANG, Q.; ZHANG, B.; WANG, C. Ecotoxicological effects on the earthworm *Eisenia fetida* following exposure to soil contaminated with imidacloprid. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 21, p. 12345–12353. 2014.