



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Camila Campello

**EFEITO DE DOIS PESTICIDAS DE “NOVA
GERAÇÃO” EM DUAS ESPÉCIES DE
INVERTEBRADOS DO SOLO**

**Dissertação de Mestrado em Biologia, orientada pelo Professor Doutor
José Paulo Sousa e Doutora Sónia Chelinho, apresentada pelo
Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra.**

Agosto/2019



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

FACULDADE
DE CIÊNCIAS
E TECNOLOGIA

Efeito de dois pesticidas de “nova geração” em duas espécies de invertebrados do solo

Effects of two new generation pesticides on two soil invertebrate species

Camila Campello

Agosto/2019

Agradecimentos

Durante este trabalho tive a ajuda e incentivo de algumas pessoas as quais gostaria de agradecer:

Primeiramente aos meus orientadores, Professor Doutor José Paulo Sousa e a Doutora Sónia Chelinho. Ao professor pela oportunidade e confiança que me deu ao aceitar orientar-me e por todo seu conhecimento e ajuda com o meu projeto.

À Sónia por toda a ajuda e aprendizado durante esses meses tão corridos, obrigada pela paciência e por ter sido sempre tão solícita, me faltam palavras para agradecer.

Ao Doutor Tiago Natal-da-Luz por ter acompanhado todo o trabalho e por todo ensinamento.

À Daniela por cuidar da cultura dos *Oppias*, e ao Tiago, Antonieta, Filipa e Pedro pela coleta do Solo do Freixo, o qual usei neste trabalho.

Em geral, agradeço a todos do labSolos, alguns nomes já mencionados, mas que merecem a repetição: Sónia, Tiago, Daniela, Antonieta, Letícia, Patrícia, Fernanda, Eduardo, Filipa, Liliana, obrigada por toda a ajuda, aprendizado, apoio e alegria de todos os dias, me senti muito acolhida e isso fez toda a diferença, vocês não imaginam o quanto me ajudaram.

Por fim, meu agradecimento á minha mãe por toda a educação, oportunidade, incentivo e apoio, a minha irmã também por todo o apoio e por ter facilitado esse período longe do nosso país, e a todos os meus amigos de Portugal e do Brasil.

Resumo

Devido ao grande crescimento populacional, a procura de alimentos tem vindo a aumentar continuamente. As pragas e pestes são das maiores ameaças à produtividade agrícola pelo que a utilização de pesticidas para as combater tornou-se frequente e cada vez em maior escala.

De entre os pesticidas mais recentes no mercado encontra-se o Clorantraniliprol, o primeiro inseticida comercializado de uma nova classe química, as diamidas antranílicas, e o Espiroetramato, um inseticida foliar sistémico pertencente à família dos ácidos tetrónicos.

Tendo em conta a falta de dados na literatura sobre os efeitos adversos decorrentes da utilização destes inseticidas, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo principal de avaliar a toxicidade do Clorantraniliprol e do Espiroetramato na reprodução de três invertebrados do solo (*E. crypticus*, *H. aculeifer* e *O. nitens*). Mais especificamente, pretendeu-se: i) avaliar as possíveis diferenças ao nível da sensibilidade das três espécies-teste aos inseticidas testados; ii) contribuir para a otimização, ao nível das metodologias de cultura e de teste, de um novo ensaio ecotoxicológico com a espécie de ácaro *Oppia nittens*; iii) comparar a toxicidade dos dois inseticidas para a espécie de ácaro *Hypoaspis aculeifer*, em condições de exposição padrão (solo contaminado) e ecologicamente mais realistas (comida e solo contaminados).

Um solo natural, recolhido na Herdade Freixo do Meio (Alentejo, Sul de Portugal) foi utilizado em todos os ensaios (exceto num dos testes com *O. nitens* onde foi utilizado um solo Canadano), e para cada inseticida foi definida uma mesma gama de 5 concentrações crescentes: 4, 13, 45, 150 e 500 mg i.a/kg para as

espécies *O. nitens* e *E. crypticus*; e 13, 45, 150, 300 e 500 mg i.a/kg para os *H. aculeifer*.

Os ensaios foram realizados de acordo com normas ISO e OCDE ou baseadas em trabalhos anteriormente publicados.

No caso de um dos ensaios com *H. aculeifer*, foi realizada uma adaptação do teste-padrão, utilizando uma via de contaminação extra (além do solo), nomeadamente contaminação da comida fornecida durante o teste (ácaros da espécie *Tyrophagus putrescentiae*).

Os resultados demonstraram que nenhuma das espécies testadas foi negativamente afetada pela contaminação por Clorantroliprol. Quanto ao Espirotramato, este apresentou toxicidade apenas para o ácaro *H. aculeifer* mas em doses bastante altas quando comparadas as doses recomendadas. Foram calculados os seguintes parâmetros ecotoxicológicos: EC50 = 313 mg/kg, para o teste-padrão e EC50 = 280 mg/kg, para o ensaio com solo e comida contaminada.

Neste último teste, foi observada uma toxicidade ligeiramente maior que a do teste-padrão, sugerindo que a toxicidade pode ser sub-estimada quando se considera apenas a via de contaminação do solo. Os dados obtidos constituem uma contribuição para uma possível futura adaptação do protocolo em vigor, através da inclusão desta via de exposição mais realista (através da comida).

A espécie *O. nitens* apresentou baixa reprodução em todos os testes indicando uma possível necessidade de otimização quer da manutenção laboratorial da cultura quer dos próprios critérios de validade protocolo atual, que se encontra em fase de validação ("ring-test").

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que aparentemente não existem efeitos nefastos desses dois inseticidas para os organismos do solo. Contudo, outros estudos já demonstraram a sua alta toxicidade para organismos do ecossistema aquático. Assim, são necessários mais dados, com outros organismos e com outros solos para confirmar ou não a baixa toxicidade encontrada.

Palavras-chave: Inseticidas; Clorantniliprol; Espirotetramato; Testes Ecotoxicológicos; Invertebrados do Solo.

Abstract

Due to the great population growth the demand for food is continuously increasing. Plagues and pests are one of the biggest threats to agriculture productivity and, therefore, the use of pesticides to combat them has become frequent and continuously increasing.

Chlorantraniliprole and Spirotetramat are among the most recent pesticides on the market. Chlorantraniliprole is the first commercialized insecticide from a new chemical class, anthranilic diamides, and Spirotetramat is a systemic foliar insecticide belonging to the tetrone acid family.

Considering the scarcity of literature data on the potential environmental adverse effects associated with the agriculture applications of insecticides, this work had as major goal to evaluate the toxicity of Chlorantraniliprole and Spirotetramat in the reproduction of three soil invertebrate species (*E. crypticus*, *H. aculeifer* and *O. nitens*). More specifically, it was intended to: i) evaluate the possible differences in the sensitivity of the three test species to the insecticides tested; (ii) contribute to the optimization of both culture and methodologies of ecotoxicological testing of the mite species *Oppia nittens*; (iii) compare the toxicity of the two insecticides to the *Hypoaspis aculeifer* mite species under standard (contaminated soil) and more ecologically realistic (contaminated food and soil) exposure conditions.

A natural soil collected at Herdade Freixo do Meio (Alentejo, Southern Portugal) was used in all assays (except in one of the *O. nitens* assays where a Canadian

soil was used), and for each insecticide the same range of 5 increasing concentrations was defined: 4, 13, 45, 150 and 500 mg i.a. / kg for *O. nitens* and *E. crypticus* species; and 13, 45, 150, 300 and 500 mg i.a / kg for *H. aculeifer*.

The assays were conducted according to ISO and OECD standards or based on previous published works.

In one of the *H. aculeifer* assays, an adaptation was made from the standardized OECD guideline, using an extra contamination pathway (other than soil), namely the supply of contaminated food (*Tyrophagus putrescentiae* mites) during the assay .

The results showed that none of the tested species was negatively affected by Clorantirniliprole contamination. Regarding Spirotetramat, toxicity was only found for the *H. aculeifer* mite, although at very high doses when compared to recommended doses. The following ecotoxicological parameters were calculated: EC50 = 313 mg / kg for the standard assay and EC50 = 280 mg / kg for the adapted assay (soil+ contaminated food).

In the latter assay, a slightly higher toxicity was observed when compared to the standard assay, suggesting that toxicity could be underestimated when considering the soil contamination pathway only. The generated data can contribute for a future adaptation of the current guideline, through the inclusion of this more realistic exposure pathway (food contamination).

The *O. nitens* species presented a low reproduction pattern in all assays, indicating that the optimization of both laboratorial maintenance of the test-culture and also the current protocol validation criteria, (which is under validation phase; “ring-test”).

Apparently, the results obtained in the present study showed no negative effects of these two insecticides to soil organisms. However, previous studies have already shown their high toxicity for the aquatic environment. Therefore, more data, using other test species and soil types, is needed to confirm or not the low toxicity found.

Keywords: Insecticides; Chlorantraniliprole; Spirotetramat; Ecotoxicological Tests; Soil Invertebrates.

Índice

Capítulo I – Introdução Geral	3
I.1 Abordagem ao uso de pesticidas	3
I.2 Aumento da utilização de pesticidas na perspectiva do Brasil	4
I.3 Consequências ambientais da aplicação de pesticidas	6
I.4 A ecotoxicologia e a avaliação dos efeitos de pesticidas	7
I.4.1. Ensaio ecotoxicológicos com invertebrados do solo	8
I.4.2. Alguns desafios em ecotoxicologia de solos	11
I.5 Objetivos	12
I.6 Estrutura da tese	13
REFERÊNCIAS	14
Capítulo II – Efeito de dois pesticidas de “nova geração” em duas espécies de invertebrados do solo	19
II.1 Resumo / Abstract	20

II.2	Introdução	21
II.3	Materiais e Métodos	25
II.3.1.	Substância teste	25
II.3.2.	Solo teste	27
II.3.3.	Organismo teste	27
II.3.4.	Procedimento experimental	29
II.3.4.1.	Contaminação do solo	29
II.3.4.2.	Ensaio de Reprodução	29
II.3.5.	Análise de dados	32
II.4	Resultados	33
II.4.1.	Reprodução com <i>Enchytraeus crypticus</i>	33
II.4.2.	Reprodução com <i>Oppia nitens</i>	34
II.4.3.	Reprodução com <i>Hypoaspis aculeifer</i>	36
II.5	Discussão	38
II.5.1.	<i>Enchytraeus crypticus</i>	38
II.5.2.	<i>Hypoaspis aculeifer</i>	38
II.5.3.	<i>Oppia nitens</i>	41
II.6	Conclusão	43
	REFERÊNCIAS	43
Capítulo 3	Efeito dos inseticidas Clorantraniliprol e spirotetramato no ácaro predador <i>Hypoaspis aculeifer</i>, utilizando vias de exposição à contaminação mais realistas.	51
III.1	Resumo	52
III.2	Introdução	53
III.3	Materiais e Métodos	55

III.3.1. Organismos teste	55
III.3.2. Substância teste	56
III.3.3. Contaminação de levedura de cerveja	56
III.3.4. Contaminação do cheese mites (<i>Tyrophagus putrescentiae</i>)	57
III.3.5. Ensaio de reprodução	57
III.3.6. Análise de dados	58
III.4 Resultados	59
III.5 Discussão	61
III.6 Conclusão	63
REFERÊNCIAS	64

Capítulo I

Introdução Geral

I. Introdução geral

I.1. Abordagem ao uso de pesticidas

Devido ao grande crescimento populacional, a necessidade de alimentos tornou-se cada vez maior, sendo um desafio para a agricultura no que respeita à necessidade de aumentar a produção e aplicar tecnologias para diminuir as perdas de culturas devido às pragas agrícolas. Os pesticidas começaram a ser utilizados na década de 50 do século passado, com a chamada “revolução verde” que visava desenvolver técnicas mais avançadas para aumentar a produtividade agrícola (Spadotto et al., 2004, Pinotti, 2013).

Sendo as pragas uma das maiores ameaças à produtividade agrícola, a utilização dos pesticidas para as combater tornou-se frequente e cada vez em maior escala (Larson et al., 2012, Vanderlei, 2015).

No mercado existem vários tipos de pesticidas, direcionados para diferentes culturas e organismos-alvo, como por exemplo os Inseticidas, Herbicidas e Fungicidas. De entre os inseticidas, o seu uso teve início com os organoclorados, pesticidas com alta toxicidade e grande persistência no ambiente, classificados como pesticidas de primeira geração (Jurewicz et al,2013). Posteriormente, com o objetivo de diminuir os impactos negativos associados aos organoclorados surgiram os pesticidas da segunda geração, os organofosforados. Estes possuíam ingredientes ativos menos tóxicos, associados a uma menor persistência no ambiente (Alves, 2002). Já na década de 60, a evolução tecnológica permitiu o desenvolvimento de formulações, que além de menos nocivas para os humanos e para o meio ambiente, também eram mais eficientes,

resultando em menores doses de aplicação mas em grandes benefícios para agricultura (Palmquist et al, 2012).

No entanto, muitas pragas foram adquirindo resistência aos mesmos inseticidas, e por isso o desenvolvimento de novas substâncias com diferentes mecanismos de ação tornou-se cada vez mais premente (Gontijo et al., 2015), sendo muito frequente o lançamento de novos produtos no mercado.

I.2. Aumento da utilização de pesticidas na perspectiva do Brasil

Entre o ano 2000 a 2010 ocorreu um aumento significativo do uso dos pesticidas em todo o mundo, atingindo 100% em termos globais. Os locais mais atingidos por esse aumento foram os países em vias de desenvolvimento como por exemplo o Brasil, onde foi observado um aumento ainda superior, chegando a 200% nesse mesmo período, para além da Índia, China, Bangladesh e Guatemala (Mahmoud, 2017). Estes países em desenvolvimento sofrem diversas consequências decorrentes do uso de pesticidas, dada a precária ou ausente regulamentação e fiscalização. Em 25% deles não há qualquer regulamentação, e em 80% não existem recursos suficientes para a aplicação/fiscalização da legislação existente. Desta forma, normalmente os pesticidas altamente tóxicos, proibidos em outros países ou não regulamentados são sempre exportados para os referidos países em desenvolvimento (Ecobichon, 2001, Mahmoud, 2017).

Segundo Pelaez et al 2015, o Brasil é o consumidor de cerca de 20% dos pesticidas comercializados mundialmente. O principal destino destas substâncias é a cultura da soja, que foi responsável pelo consumo de 52% dos

pesticidas vendidos em 2015 no país segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal - SINDVEG (2018).



Figura. 1. Total de formulações de pesticidas registrados por ano no Brasil. (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2019).

Atualmente, 425 ingredientes ativos têm uso autorizado e 2.356 produtos estão autorizados para comercialização no Brasil. Nos dados apresentados na figura 1 observa-se um aumento mais intenso dos pesticidas registrados nos últimos três anos. Esse acréscimo continua em 2019, visto que apenas nos 7 primeiros meses do ano já foram autorizados mais 290 formulações para uso comercial, sendo a maioria à base de moléculas já antes aprovadas, mas entre estas existem duas novas, o sulfoxaflor e o florpirauxifen-benzil. Destes 290 produtos, 41% são classificados como altamente ou extremamente tóxicos e 32% são proibidos na União Europeia (MAPA, 2019, IBAMA, 2019).

De entre todos os pesticidas autorizados no Brasil, o Glifosato está no topo dos ingredientes ativos mais utilizados, como demonstrado na tabela 1.

Tabela. 1. Top 10 dos ingredientes ativos de pesticidas mais vendidos no Brasil. **Fonte:** IBAMA / Consolidação de dados fornecidos pelas empresas fabricantes de produtos técnicos, pesticidas e afins, conforme art. 41 do Decreto nº 4.074/2002 (Dados atualizados: 20/08/2018). HB- Herbicida; FG- Fungicida; AD- Adjuvante; IN- Inseticida.

Ingrediente Ativo (IA)	Vendas (toneladas)	Ranking
Glifosato e sais derivados (HB)	185 602,22	1º
2,4-D (HB)	53 374,41	2º
Mancozebe (FG)	33 232,94	3º
Atrazina (HB)	28 615,70	4º
Óleo mineral (AD)	27 801,09	5º
Acefato (IN)	24 858,68	6º
Óleo vegetal (AD)	17 259,26	7º
Dicloreto de paraquate (HB)	11 638,19	8º
Imidacloprido (IN)	9 165,97	9º
Clorpirifós (IN)	7 271,08	10º

I.3. Consequências ambientais da aplicação de pesticidas

Apesar de inovadoras e com benefícios evidentes na agricultura, o uso generalizado dessas substâncias tem provocado ao longo do tempo o surgimento de diversos problemas ambientais tais como a contaminação de solos, águas e efeitos adversos em organismos não-alvos. Além de tóxicas, estas substâncias tendem muitas vezes a serem persistentes e bioacumulativas (Fay & Silva, 2004, Nunes, 2010).

Segundo Bullard et al, (2017) o solo pode ser considerado como o ambiente diretamente mais afetado pelo uso de pesticidas. Sendo o solo um ecossistema fornecedor de diversos serviços, entre os quais a reciclagem de nutrientes e purificação e destino das águas, ele é também o principal suporte para a maioria das plantas e abriga cerca de um quarto de toda a biodiversidade existente no

planeta. Assim, muitos dos organismos que habitam e dependem do solo são fundamentais na decomposição da matéria orgânica e na reciclagem de nutrientes (Decaens et al., 2006, Pey et al., 2014), e, conseqüentemente, na fertilidade do solo e produtividade agrícola.

Desta forma, percebe-se que a preservação dos solos é uma forma de assegurar a sobrevivência de uma grande parte dos seres vivos e do próprio Homem. Por isso, a análise dos potenciais efeitos dos pesticidas nos organismos do solo é necessária e urgente, como forma de contribuir para a regulação da sua aplicação e para o desenvolvimento de medidas de mitigação de toxicidade.

I.4. A ecotoxicologia e a avaliação dos efeitos de pesticidas

A ecotoxicologia foi descrita pela primeira vez por René Truhaut, em 1969, que a definiu como uma ciência que estuda os efeitos de substâncias naturais ou sintéticas potencialmente poluentes em organismos vivos (animais ou vegetais), integrando duas disciplinas distintas, a Ecologia e a Toxicologia.

A avaliação dos riscos ecotoxicológicos de produtos químicos, entre os quais os pesticidas, utiliza várias ferramentas/metodologias. De uma forma geral, essas respostas são obtidas através de ensaios padronizados com organismos não-alvo, que são expostos a diferentes concentrações da substância em estudo, por um determinado período de tempo, ao fim do qual são avaliados vários parâmetros. Os mais frequentemente avaliados são a taxa de sobrevivência (letalidade), o comportamento, a reprodução, o crescimento e a biomassa (Van Gestel, 2012).

A maioria dos procedimentos segue protocolos padronizados pela Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Económico (OCDE) e pela Organização Internacional de Normalização (ISO). Os resultados obtidos disponibilizam informações quantitativas e / ou qualitativas acerca da toxicidade das substâncias testadas, podendo ser inclusivamente utilizados por diversas autoridades mundiais, com vista à regulamentação da sua venda e aplicação, como acontece com os pesticidas (EC, 2013).

O objetivo final é definir níveis seguros (dose máxima que não afeta significativamente os organismos-teste ou que afeta uma pequena parte da população) de utilização do produto e compará-los com os níveis de exposição previstos (ou medidos) da substância no meio ambiente, de forma a determinar o risco (Van Gestel, 2012). Quando as doses de exposição a um contaminante ultrapassam as doses estimadas como seguras para os organismos, poderá existir risco ambiental (Damalas & Eleftherohorinos, 2011). A suspeita de existência de risco implica muitas vezes análises mais aprofundadas desses efeitos, como por exemplo a recolha e integração de informação das linhas de evidência química, ecotoxicológica e ecológica, a fim de minimizar possíveis riscos para os ecossistemas e para a saúde dos seres humanos (Stützer, 2003).

I.4.1 Ensaios ecotoxicológicos com invertebrados do solo

Nos testes ecotoxicológicos laboratoriais, a utilização de invertebrados do solo como bioindicadores pode ser considerada um dos principais instrumentos de análise (Shugart, 2009, Cardoso, 2012). Os bioindicadores são organismos cuja presença, quantidade e/ou distribuição conseguem indicar a qualidade ambiental

de um determinado ecossistema (Doran & Zeiss, 2000), sendo por isso utilizados para analisar os possíveis efeitos da exposição de poluentes ao nível individual (organismo) e em categorias ecológicas superiores (populações, comunidades e ecossistemas). Além disso, para serem passíveis de utilização em testes ecotoxicológicos, os organismos devem possuir características que permitam o manuseamento e cultivo em laboratório. Assim, a sua biologia precisa de ser bem conhecida, de modo a que possam ser obtidos um grande número de indivíduos saudáveis e homogêneos (semelhante tamanho e biomassa). Por outro lado, é necessário que as espécies-teste tenham um ciclo de vida curto, para proceder à sua sincronização por idade (requisito da maioria dos ensaios padronizados) e à obtenção de resultados num espaço de tempo curto (Ronday & Houx, 1996, Fountain & Hopkin, 2005).

Com a existência de todos esses critérios, o número de espécies que cumprem esses requisitos é reduzida, sendo os principais invertebrados padrão utilizados em testes ecotoxicológicos, as minhocas (ex. *E. andrei* e *E. fetida*), colêmbolos (ex. *F. candida*), ácaros (ex. *H. aculeifer*) e enquitraídeos (*E. albidus*, *E. crypticus*; Van Gestel, 2012). Estes organismos abarcam diferentes vias de exposição a substâncias poluentes, devido às suas características morfológicas distintas (ex. estrutura da epiderme), fisiológicas (ex. diferentes vias de absorção de água e oxigénio) e hábitos alimentares e comportamentais (ex. hábito de escavação e movimentação no solo) (Peijnenburg et al, 2012).

As minhocas por exemplo absorvem a água principalmente através de sua pele, podendo assim, estar expostas a produtos químicos dissolvidos na fração líquida do solo. Por outro lado, visto que ingerem grande quantidade de solo enquanto

se alimentam, podem também estar expostas via ingestão (Peijnenburg et al, 2012).

Os enquitraídeos, apesar de morfologicamente parecidos com as minhocas, possuem uma menor capacidade de movimentos no solo, vivendo nas camadas mais superficiais (0-10cm), sendo sensíveis a substâncias potencialmente tóxicas abundantes em muitos solos onde as minhocas não estão presentes ou não estão bem representadas. As suas vias de exposição a contaminantes são principalmente pelas vias dérmicas, intestinais (pela alimentação) e respiratórias (Peijnenburg et al, 2012, Castro-Ferreira et al, 2012).

Os colêmbolos estão expostos aos contaminantes através da ingestão de água ou absorção de superfícies molhadas / húmidas, pelo consumo de alimentos e pela inalação de ar poroso do solo (Pankhurst et al, 1997, Peijnenburg et al, 2012).

Já a espécie de ácaro utilizada em ensaios ecotoxicológicos padronizados assume uma importância distinta dado que pertencem a um nível trófico diferente dos grupos anteriormente referidos, uma vez que são predadores, e estão por isso exposto aos contaminantes por diferentes vias, como por ingestão e contacto (Peijnenburg et al, 2012).

Normalmente os testes ecotoxicológicos são realizados apenas com uma espécie para que a interação entre elas não interfira nos resultados. No entanto, o uso de várias espécies, mesmo quando testadas separadamente, confere uma maior relevância ecológica aos resultados obtidos (Van Gestel, 2012).

I.4.2 Alguns desafios em ecotoxicologia de solos

Ensaio mais realistas

Um dos objetivos dos ensaios ecotoxicológicos é que os resultados obtidos possam ser comparados com situações reais de contaminação. Para isso, é necessário desenvolver novos ensaios ou incorporar nos ensaios-padrão diretrizes no sentido de os tornar ecologicamente mais relevantes (Van Gestel, 2012). Uma delas consiste na crescente utilização de solos naturais, dado que diferentes propriedades do solo podem alterar significativamente quer o comportamento do contaminante no ambiente, quer os seus efeitos (toxicidade) nos organismos não-alvo (Nunes & Espíndola, 2012).

Também é importante ter em conta as diferentes condições climáticas de cada região do globo e proceder à adaptação das metodologias-padrão, desenvolvidas originalmente para cenários Europeus e Norte Americanos. Algum trabalho foi já realizado nesse sentido, como por exemplo a criação de uma versão tropical do solo artificial da OCDE, e também a realização de testes com temperaturas mais altas, características de áreas tropicais húmidas e que podem, por exemplo, interferir na degradação, absorção e consequente toxicidade de certas substâncias (Niemeyer et al, 2017). Para além disto, um ponto muito importante para o aumento do realismo dos testes ecotoxicológicos é a escolha de espécies nativas como organismo-teste (Kuperman et al, 2009), sendo assim necessário que se conheça um amplo número de espécies, aumentando a possibilidade de encontrar organismos de diversas regiões, passíveis de serem utilizados em testes laboratoriais, percebendo-se assim, a importância de estudos que possibilitem a criação de protocolos para o uso de novas espécies em testes ecotoxicológicos.

Outra questão recentemente abordada é a avaliação de efeitos considerando vias de exposição mais relevantes, tendo em conta o comportamento e fisiologia da espécie-teste, como são exemplo os ensaios realizados com isópodes, onde são tidas em consideração duas vias de exposição (solo e alimento) (Van Gestel & Loureiro, 2018) e outro estudo recente (Natal-da-Luz et al, 2019). Neste último foram propostas melhorias do ensaio padronizado (OCDE-226, 2008) de reprodução com o ácaro predador *Hypoaspis aculeifer*, em que tanto o solo como também a comida oferecida são contaminados, por forma a cobrir diferentes vias de exposição à contaminação, tendo em conta a ecologia da própria espécie-teste.

I.5 Objetivos

O principal objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos de dois inseticidas de nova geração (Espirotetramato e Clorantraniliprole) na reprodução de três invertebrados de solo (*E. crypticus*, *H. aculeifer* e *O. nitens*).

Mais especificamente, pretendeu-se:

- i) Avaliar as possíveis diferenças ao nível da sensibilidade das três espécies-teste aos inseticidas testados;
- ii) Contribuir para a otimização, ao nível das metodologias de cultura e de teste, de um novo ensaio ecotoxicológico com a espécie de ácaro *Oppia nittens*;
- iii) Comparar a toxicidade dos dois inseticidas para a espécie de ácaro *Hypoaspis aculeifer*, em condições de exposição padrão (solo

contaminado) e ecologicamente mais realistas (comida e solo contaminados).

Este trabalho baseou-se na hipótese de que, para cada um dos inseticidas, concentrações crescentes provocarão uma diminuição na reprodução das três espécies testadas. No caso particular da espécie *Hypoaspis aculeifer*, e do ensaio adaptado com duas vias de exposição à contaminação (solo e alimento), a toxicidade observada será maior, comparativamente ao teste padrão, com uma via de contaminação (solo) apenas.

I.6 Estrutura da tese

Para atingir esses objetivos, o trabalho foi realizado em duas etapas principais:

1. Ensaio padronizados de reprodução com os inseticidas Espirotriamato e Clorantropilol, com três espécies de invertebrados do solo, duas delas padronizadas (o ácaro *Hypoaspis aculeifer* e o enquitraideo *Enchytraeus crypticus*) e uma terceira, o ácaro *Oppia nitens*, cujo protocolo se encontra em fase de otimização (“ring-test”). (capítulo 1)
2. Ensaio de exposição a comida contaminada, desenvolvidos recentemente no Laboratório de Ecologia e Ecotoxicologia de Solos, com a espécie *Hypoaspis aculeifer* e os pesticidas referidos acima, como forma de aumentar o realismo do ensaio de reprodução-padrão (norma 226; OCD, 2016) (capítulo 2).

REFERENCIAS:

Alves Filho, J. P. (2002). Uso de agrotóxicos no Brasil: controle social e interesses corporativos. Annablume.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA, (2016). Consulta Pública nº 198, de 07 de junho de 2016. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2822421/CONSULTA+P%C3%9ABLIC+A+N+198+GGTOX..pdf/55c18265-82a8-496d-bcd2-c69fa53a6b3e>> Acessado em 15 de julho.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989 [documento on-line]. Diário Oficial da União; 8 jan 2002. Disponível em URL: <http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=2848>.

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, (2019). Relatórios de comercialização de agrotóxicos. Brasília. Disponível em <http://www.ibama.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=594>. Acesso em 15 julho de 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, (2019). Esclarecimentos sobre Registros de Defensivos Agrícolas. Brasília. Disponível em <<http://www.agricultura.gov.br/noticias/esclarecimentos-sobre-registros-de-defensivos-agricolas>>. Acesso em 10 de agosto de 2019.

Cardoso EJB, Alves PRL, (2012). Soil ecotoxicology. In: Begum G, editor. Ecotoxicology. Rijeka: InTech – Open Access Publisher. pp. 27–50.

Castro-Ferreira MP, Roelofs D, Van Gestel CAM, Verweij RA, Soares AMVM, Amorim MJB, (2012). *Enchytraeus crypticus* as model species in soil ecotoxicology. Chemosphere. 87(11):1222–1227.

Cunha, J. P. A. R., Teixeira, M. M., Coury, J. R., & Ferreira, L. R. (2003). Avaliação de estratégias para redução da deriva de agrotóxicos em pulverizações hidráulicas. Planta Daninha, 21(2), 325-332.

- Damalas, C. A., & Eleftherohorinos, I. G. (2011). Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. *International journal of environmental research and public health*, 8(5), 1402-1419.
- Decaëns, T., Jiménez, J. J., Gioia, C., Measey, G. J., & Lavelle, P. (2006). The values of soil animals for conservation biology. *European Journal of Soil Biology*, 42, S23-S38.
- Doran, J. W., & Zeiss, M. R. (2000). Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied soil ecology*, 15(1), 3-11.
- EC. 284/2013 of 1 March 2013 Setting Out the Data Requirements for Plant Protection Products, in Accordance with Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council Concerning the Placing of Plant Protection Products on the Market. *J.O.L.* 2013;93:1–84.
- Ecobichon, D. J. (2001). Pesticide use in developing countries. *Toxicology*, 160(1-3), 27-33.
- Fay, E. F., & Silva, C. (2004). Comportamento e destino de agrotóxicos no ambiente solo-água. SILVA, CMS, FAY, EF, Agrotóxicos e ambiente. EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Meio Ambiente, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1ª ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 108-143.
- Fountain MT, Hopkin SP, (2005). *Folsomia candida* (Collembola): A “Standard” soil arthropod. *Annual Review of Entomology*.50:201–22.
- Gontijo, L. M., Celestino, D., Queiroz, O. S., Guedes, R. N. C., & Picanço, M. C. (2015). Impacts of azadirachtin and chlorantraniliprole on the developmental stages of pirate bug predators (Hemiptera: Anthocoridae) of the tomato pinworm *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Florida Entomologist*, 59-64.
- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, (2019). Relatórios de comercialização de agrotóxicos. Brasília, 2019. Disponível em <http://www.ibama.gov.br/index.php?option=com_content&view=article&id=594>. Acessado em: Junho de 2019.

- ISO (1998). Soil quality – effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). 2. Determination of Effects on Reproduction. International Organization for Standardization. No.11268-2
- Kuperman RK, Checkai RT, Garcia MV, Römbke J, Stephenson G, Sousa JP. (2009). Ecotoxicological assessment of contaminated land: The state-of-practice and the way forward. *Pesqui Agropecu Bras* 44:811–824.
- Larson, J. L., Redmond, C. T., & Potter, D. A. (2012). Comparative impact of an anthranilic diamide and other insecticidal chemistries on beneficial invertebrates and ecosystem services in turfgrass. *Pest management science*, 68(5), 740-748.
- Mahmood, I., Imadi, S. R., Shazadi, K., Gul, A., & Hakeem, K. R. (2016). Effects of pesticides on environment. In *Plant, soil and microbes* (pp. 253-269). Springer, Cham.
- Mahmoud B., (2017). The Catastrophic Impacts of Pesticides in Developing Countries. Food for thought. Disponível em <<https://www.agrilinks.org/blog/catastrophic-impacts-pesticides-developing-countries>>. Acessado em 19 de julho.
- Natal-da-Luz, T., Gevaert, T., Pereira, C., Alves, D., Arena, M., & Sousa, J. P. (2019). Should oral exposure in *Hypoaspis aculeifer* tests be considered in order to keep them in Tier I test battery for ecological risk assessment of PPPs?. *Environmental pollution*, 244, 871-876.
- Niemeyer, J. C., Chelinho, S., & Sousa, J. P. (2017). Soil ecotoxicology in Latin America: current research and perspectives. *Environmental toxicology and chemistry*, 36(7), 1795-1810.
- Nunes, M. E. T. (2010). 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 (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Nunes, M. E. T., & Espíndola, E. L. G. (2012). Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. *Ecotoxicology*, 21(4), 1063-1071.
- Pankhurst CE, Doube BM, Gupta VVSR, (1997). Biological indicators of soil health: Synthesis. In: Pankhurst CE, Doube BM, Gupta VVSR, editors. *Biological Indicators of Soil Health*. Wallingford: CAB International. pp. 265–296.

- Peijnenburg W, Capri E, Kula C, Liess M, Luttik R, Montforts M, Nienstedt K, Rombke J, Sousa JP, Jensen J, (2012). Evaluation of exposure metrics for effect assessment of soil invertebrates. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*.42:1862–1893.
- Pelaez, V. M., da Silva, L. R., Guimarães, T. A., Dal Ri, F., & Teodorovicz, T. (2015). A (des) coordenação de políticas para a indústria de agrotóxicos no Brasil. *Revista Brasileira de Inovação*, 14, 153-178.
- Pey, B., Nahmani, J., Auclerc, A., Capowiez, Y., Cluzeau, D., Cortet, J., & Briard, C. (2014). Current use of and future needs for soil invertebrate functional traits in community ecology. *Basic and Applied Ecology*, 15(3), 194-206.
- Pinotti, M. M. Z., & Santos, J. C. P. (2013). From the ancient times of the agriculture to the biological control in plants: a little of the history. *Ciência Rural*, 43(10), 1797-1803.
- Ribas, P. P., & Matsumura, A. T. S. (2009). A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. *Revista Liberato*, 10(14), 149-158.
- Ronday R, Houx NWH, (1996). Suitability of seven species of soil-inhabiting invertebrates for testing toxicity of pesticides in soil pore water. *Pedobiologia*. 40:106–112.
- Shugart LR, (2009). editor. *Emerging Topics in Ecotoxicology: Principles, Approaches and Perspectives*. Oak Ridge: Springer Science. 400p.
- SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA A DEFESA VEGETAL – SINDIVEG, (2018). O que você precisa saber sobre defensivos agrícolas. Disponível em:<<http://sindiveg.org.br/wpcontent/uploads/2018/08/oquevoceprecisasabersobredefensivosagricolas.pdf>>. Acessado em 25 de julho.
- Spadotto, C. A., Gomes, M. A. F., Luchini, L. C., & De Andréa, M. M. (2004). Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Embrapa Meio Ambiente. Documentos.
- Stützer, G., & Guimarães, G. (2003). Aspectos toxicológicos e ambientais relacionados com o uso de produtos fitossanitários. Zambolim L, Conceição MZ, Santiago T,

organizadores. O que os engenheiros agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários. Viçosa: UFV, 69-84.

Van Gestel, C. A. M. (2012). Soil ecotoxicology: state of the art and future directions. *Zookeys* 176: 275–296.

Van Gestel, C. A., & Loureiro, S. (2018). Terrestrial isopods as model organisms in soil ecotoxicology: a review. *ZooKeys*, (801), 127.

Vanderlei, M. R. (2015). Efeitos dos agrotóxicos Kraft® 36EC e Score® 250EC (e seus princípios ativos) em ecossistemas aquáticos: análises comparativas e ecossistêmicas (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo

Capítulo 2

Efeito dos inseticidas de “nova geração” Clorantraniliprol e Espirotetramato em três invertebrados do solo

II.1 Resumo

Para avaliar os efeitos adversos da utilização de pesticidas no ecossistema solo são frequentemente realizados testes ecotoxicológicos, sendo recomendada a sua realização com diferentes espécies, visto que os organismos possuem comportamentos, hábitos e vias de exposição à contaminação distintos e todos estes fatores influenciam a sua sensibilidade aos contaminantes.

Assim, este trabalho teve o objetivo principal de avaliar a toxicidade de dois novos inseticidas, o Clorantraniliprol e o Espirotetramato na reprodução de três invertebrados do solo: *E. crypticus*, *H. aculeifer* e *O. nitens* (espécie recentemente utilizada neste tipo de ensaios), utilizando um solo natural como substrato-teste.

Os resultados mostraram que não foi encontrada toxicidade do inseticida Clorantraniliprol para *H. aculeifer* e *E. crypticus* mesmo em concentrações elevadas (500 mg / kg). Relativamente ao Espirotetramato apresentou toxicidade apenas para *H. aculeifer*, mas em doses bastante altas quando comparada as doses reais recomendadas, com valor EC50 de 313 mg/kg.

A espécie *O. nitens* teve >80% de sobrevivência dos adultos no controlo, porém apresentou uma baixa reprodução, com média de apenas 4 indivíduos por réplica do controlo, não sendo possível determinar a toxicidade de nenhuma das duas substâncias testadas. A espécie apresentou uma baixa reprodução em todos os testes, podendo indicar uma possível necessidade de baixar o número mínimo

de juvenis do controlo, proposto pelo protocolo que se encontra em teste de validação.

Palavras-chave: Inseticida; Clorantriliprol; Espirotetramato; Ensaios Ecotoxicologicos; Invertebrados do solo.

II. 2 Introdução

Devido ao aumento generalizado da utilização de pesticidas e, conseqüentemente, da resistência das pragas-alvo, novas fórmulas químicas foram sendo lançadas no mercado (Gontijo et al., 2015).

A primeira geração de pesticidas tinha maioritariamente na sua constituição metais, como o cobre, o enxofre e o mercúrio, que, apesar da sua elevada eficácia, foram descontinuados devido à elevada toxicidade para humanos e à elevada persistência no ambiente, com efeitos nefastos para o ecossistema (Alves, 2002, Jurewicz et al,2013). A segunda geração surgiu na segunda revolução industrial, no final do século 19, com a utilização de novos compostos que geraram grande impacto positivo na agricultura e na saúde mundial (Alves, 2002).

Já na década de 60 surgiu a terceira geração de pesticidas, caracterizada por produtos com menores dosagens de aplicação e menor toxicidade para os seres humanos e o ambiente (Palmquist et al, 2012).

Posteriormente foram desenvolvidos com novas formas de atuação, por exemplo, no sistema endócrino dos insetos, interferindo no seu processo de crescimento. Esses produtos deram origem aos pesticidas da quarta geração, com atividade inseticida mais potente, mas com uma degradação ambiental mais

rápida e menor toxicidade associada, quer para os humanos quer para os ecossistemas (Alves, 2002, Schleier & Peterson, 2011).

De entre esses inseticidas de quarta geração encontram-se o Clorantraniliprol e o Espirotetramato.

O Clorantraniliprol é o primeiro inseticida comercializado de uma nova classe química, as diamidas antranílicas, e pertence à classe toxicológica III, onde são incluídos os produtos moderadamente tóxicos (ANVISA, 2015). O seu modo de ação consiste na ligação seletiva aos recetores de rianodina (RyR) nos músculos dos insetos, provocando um descontrolo na libertação de cálcio de reservas internas, no retículo sarcoplasmático (Cordova et al., 2006, Lavtizar et al., 2015). Esse descontrolo leva à paragem da alimentação, letargia, paralisia muscular e por fim à morte do organismo alvo (Sattelle et al., 2008; Lavtizar et al., 2015).

Devido ao seu novo e potente mecanismo de ação, esta molécula está sendo considerada uma promissora classe de inseticidas químicos (Rodrigues et al., 2015). Foi lançado comercialmente em 2007 (Fenoll et al., 2015) e neste mesmo ano foi comercializado no Brasil, já na União Europeia foi aprovado apenas em 2014 (Directiva 91/414/CEE do Conselho, 1991). O seu uso na agricultura tem vindo a mostrar-se extremamente significativo, substituindo de maneira eficaz os inseticidas neonicotinóides, piretróides, organofosforados e carbamatos, que possuem alta toxicidade para uma grande quantidade de organismos não-alvo e costumam ser muito ou moderadamente persistentes no ambiente (Morrissey et al., 2015, Grisolia, 2005, Viran et al., 2003).

Já o Espirotetramato é um inseticida foliar sistémico que pertence à família dos ácidos tetrónicos (Bretschneider et al., 2007), atuando de forma inovadora,

inibindo a biossíntese dos lipídios (Nauen et al., 2008). A modo de atuação é por contato e ingestão, acabando por causar a morte em estágios imaturos do inseto-alvo de 2 a 10 dias após a aplicação (Nauen et al. 2008).

Em 2011 esta substância foi autorizada em vários países europeus, sendo utilizado em diferentes culturas para o controle das pragas de sucção (Bayer Crop Science 2012).

Dado o uso contínuo desses novos pesticidas e os seus impactos ambientais ainda pouco analisadas, por exemplo, ao nível dos efeitos em organismos não-alvo, torna-se necessário desenvolver investigações focadas na avaliação dos riscos dessas substâncias nos vários compartimentos ambientais, como o solo.

Existem metodologias e ferramentas diversas para a avaliação dos riscos ambientais de pesticidas (Sánchez-Bayo & Tennekes, 2015), como por exemplo os ensaios ecotoxicológicos.

Estes são realizados expondo organismos-teste, padronizados e representativos do compartimento em estudo, num solo/meio aquoso contaminado com a substância-teste, avaliando assim o efeito dessa contaminação em diversos parâmetros biológicos como a sobrevivência, o crescimento e/ou a reprodução. Estes resultados podem ajudar a determinar quais as concentrações dos contaminantes que não são nocivas e quais são capazes de causar efeitos adversos nos organismos (Lima, 2009).

Em ecotoxicologia de solo, os ensaios são feitos seguindo protocolos definidos pela ISO (Organização Internacional para Normalização) e OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico), em diferentes níveis de complexidade: desde os ensaios mono-espécie executados em laboratório, os

mais comuns devido ao seu baixo custo e à menor complexidade e variabilidade dos resultados obtidos (Segat, 2016), aos ensaios de semi-campo (ex. microcosmos ou mesocosmos), mais realistas e ecologicamente relevantes mas com maiores custos e variabilidade associada (Chelinho et al., 2014).

Esses testes ecotoxicológicos padronizados utilizam diversas espécies de organismos, de grupos com representatividade no ambiente terrestre, tais como como os colêmbolos, minhocas, ácaros e enquitraídeos (Alves et al, 2018).

Além da escolha das espécies-teste também se deve ter em consideração o tipo de solo: existem solos artificiais padronizados como o solo da OCDE que é um substrato composto de uma mistura de 70% de areia industrial (com mais de 50% de partículas entre 0,05 e 0,2 mm), 20% de argila de caulino e 10% de turfa (moída e seca), e o solo artificial tropical (SAT), que consiste numa adaptação do solo artificial OCDE para ensaios em regiões tropicais, cuja composição difere apenas no tipo de matéria orgânica, uma vez que é utilizada fibra de coco moída, em substituição da turfa, sendo o primeiro solo o mais frequentemente testado. No entanto, a opção pela utilização de solos naturais é uma forma de incrementar o realismo da avaliação de efeitos tóxicos, uma vez que as propriedades do solo podem influenciar grandemente a toxicidade observada, ou podem, por si só, afetar negativamente a performance dos organismos (Nunes & Espíndola, 2012, Chelinho et al, 2011, Chelinho et al, 2014).

Este trabalho foi desenvolvido com o objetivo principal de avaliar a toxicidade dos inseticidas Clorantraniliprol e Espirotetramato na reprodução de três invertebrados do solo. Mais especificamente os objetivos foram (1) avaliar o grau de sensibilidade de três espécies-teste a estes dois inseticidas; (2) contribuir com

metodologias de cultivo e de ensaios com uma espécie recentemente utilizada em testes ecotoxicológicos.

Para atingir os objetivos foram realizados testes de reprodução com três invertebrados do solo: *Enchytraeus crypticus*, *Hypoaspis aculeifer* e *Oppia nitens*, utilizando duas formulações comerciais dos inseticidas descritos anteriormente, o MOVENTO O-TEQ e o CORAGEN em um solo natural.

Este trabalho baseou-se na hipótese de que concentrações crescentes de cada inseticida provocará uma diminuição na reprodução das espécies testadas.

II.3 Materiais e Métodos

II.3.1. Substâncias teste

Neste estudo foram utilizadas formulações comerciais de dois inseticidas diferentes, adquiridas na Cooperativa Agrícola de Coimbra (Coimbra, Portugal): o CORAGEN (Suspensão concentrada – SC, 200 g/L Clorantraniliprol) e o MOVENTO O-TEQ (Dispersão em óleo (OD) com 150 g/L de Espirotetramato).

No caso do CORAGEN, trata-se de um inseticida utilizado no controlo de diversas pragas, principalmente da ordem Lepidoptera (TROCZKA et al., 2015), De acordo com a ficha técnica disponibilizada pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) a sua substância ativa, o Clorantraniliprol, possui baixa solubilidade na água, com Koc (coeficiente de sorção) moderadamente móvel e é considerada muito persistente, com um DT50 (dias suficientes para degradar 50% do produto) de 270-1163 dias, em solo. Tem alta toxicidade em invertebrados aquáticos e moderada toxicidade em peixes,

plantas aquáticas, algas e abelhas. A sua dose recomendada é de 250 a 375 ml/ha de ingrediente ativo, e para este trabalho foi feita a conversão para mg/kg, chegando ao valor de 0,067 a 0,1 mg i.a/kg. A conversão para mg/kg feita para as doses recomendadas dos dois inseticidas testados foi feita considerando uma densidade média do solo de 1.5g /cm³ e uma profundidade de incorporação do pesticida no solo de 5cm.

Relativamente ao MOVENTO, os seus principais organismos alvo são as pragas de sucção, como os pulgões e as moscas brancas (Grafton-Cardwell et al. 2007, Grafton-Cardwell & Scott, 2008). De acordo com a ficha técnica disponibilizada pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) a sua substância ativa, o Espirotetramato, possui baixa solubilidade na água, com Koc (coeficiente de sorção) moderadamente móvel, sendo definido como não persistente, e possuindo um DT50 (dias suficientes para degradar 50% do produto) de 0,05-0,38 dias em solo. Possui toxicidade moderada para minhocas, algas, plantas aquáticas, peixes e invertebrados aquáticos. A dose recomendada é de 100 a 600 ml/ha de ingrediente ativo e, para este trabalho, que foi realizado na matriz solo, foi convertida para mg/kg, originando uma gama de valores de 0,02 a 0,12 i.a. /kg.

Por uma questão de simplificação, a partir daqui serão utilizadas ao longo do texto as designações das formulações comerciais (CORAGEN e MOVENTO).

II.3.2. Solo teste

Para todos os ensaios, foi utilizado um solo natural recolhido na Herdade do Freixo do Meio (38°41'44.9"N 8°18'33.7"W), localizada na fronteira entre o Alto Alentejo e o Ribatejo, no distrito de Évora. O solo foi crivado a 5mm e desfaunado através de dois ciclos de congelamento (-20° C) e descongelamento (20° C). A sua caracterização físico-química foi efetuada pela Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC, Brasil) e é a seguinte: capacidade de retenção máxima de água (66.9 ± 10.3 %), pH KCL (5.4 ± 0.2), matéria orgânica (4.0 ± 0.7 %), areia (68 ± 1 %), silte (24 ± 0.6 %) e argila (8 ± 1%).

II.3.3. Organismos teste

Para serem considerados como organismos-teste em ensaios ecotoxicológicos é recomendado o uso de espécies ecologicamente relevantes com um curto ciclo de vida, de ampla distribuição e facilmente amostradas e cultivadas em laboratório (Van Gestel et al. 1997). Para estes ensaios foram utilizadas as seguintes espécies: (1) *Hypoaspis aculeifer* (Acari : Laelapidae), um ácaro predador que se alimenta de outros ácaros, colêmbolos, fungos e pupas de insetos, sendo importante no ecossistema para o controlo biológico de pragas e outras espécies com populações abundantes (Lesna et al. 2000; Walter; Proctor & 2013); (2) *Oppia nitens* (Acari: Orbatidae), espécie de ácaro que contribui significativamente para o ciclo de nutrientes como por exemplo a mineralização e que possui limitada capacidade de dispersão, o que a torna vulnerável às perturbações do solo, e consequente válida como bioindicadora das mesmas (Singh et al, 1996, Johnston & Crossley, 2002, Coleman et al, 2004); (3)

Enchytraeus crypticus (Oligochaeta: Enchytraeidae), espécie que desempenha um importante papel na decomposição da matéria orgânica e na manutenção da estrutura do solo com a bioturbação, que se caracterizam pela formação de túneis promovidos pela sua movimentação. (Didden, 1993, Hassal, 1987).

Todos os organismos foram obtidos a partir de culturas mantidas no Laboratório de Ecologia e Ecotoxicologia de Solos, do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra, Portugal.

Ambas as espécies de ácaros foram mantidos em recipientes com meio composto por uma mistura de gesso e carvão ativado (na proporção de 11:1, p:p). No caso dos *H. aculeifer* estes foram alimentados três vezes por semana com "cheese mites" (*Tyrophagus putrescentiae*) cultivados simultaneamente em frascos de vidros e alimentados duas vezes por semana com levedura de cerveja (OCDE-226, 2008). No caso dos *O. nitens*, os organismos foram alimentados 3 vezes por semana com fermento granulado e seco. A humidade do substrato foi regularmente repostada com a adição de água destilada.

Já os enqittraídeos da espécie *E. crypticus* foram mantidos em placas de ágar e alimentados uma vez por semana com aveia em flocos autoclavada (ISO-16387, 2003). Todas as culturas foram mantidas em $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo 16: 8 (dia: noite).

II.3.4. Procedimento experimental

II.3.4.1 Contaminação do solo

Tendo em conta os resultados de ensaios preliminares, para cada inseticida foi definida uma gama 5 concentrações crescentes: 4, 13, 45, 150 e 500 mg i.a/kg para as espécies *O. nitens* e *E. crypticus*; e 13, 45, 150, 300 e 500 mg i.a/kg para os *H. aculeifer*.

Para cada inseticida, para obter as concentrações desejadas foi preparada uma solução “stock”, da qual foram retiradas quantidades específicas para cada concentração, as quais foram adicionadas a água destilada, de forma a obter o gradiente de contaminação desejado e manter uma humidade inicial do solo correspondente a 50% da sua capacidade de retenção máxima de água.

II.3.4.2. Ensaio de reprodução

Enquitrádeos (*Enchytraeus crypticus*)

O teste de reprodução de enquitrádeos foi realizado de acordo com a norma ISO-16387 (2003). Após a contaminação do solo, dez indivíduos adultos e com clitelo visível foram colocados em recipientes de vidro com 20g (peso seco) de solo e posteriormente alimentados com aveia em flocos autoclavada. Durante os 28 dias do ensaio, semanalmente, a humidade perdida foi repostada (através da pesagem dos frascos e adição de água destilada), assim como a comida (através da adição de flocos de aveia autoclavada). No final do ensaio foi adicionado etanol (a 80%) aos recipientes, em quantidade suficiente para cobrir o solo e de

forma a fixar os organismos, e de seguida, algumas gotas do corante Rosa de Bengala a 1% para corar os organismos. Posteriormente foram contados os adultos e juvenis de cada réplica, de acordo com Chelinho et al (2014).

Ácaros (*Hypoaspis aculeifer*)

O teste de reprodução com ácaros foi realizado de acordo com a norma 226 da OCDE (OCDE, 2008).

Para sincronização dos ácaros foram separadas 200 fêmeas e 25 machos para um novo meio de cultura, aguardando a postura de ovos durante 48h. Após esse período foram retirados todos os indivíduos, deixando apenas os ovos para eclodirem. Os animais nascidos foram usados 28-35 dias após o início do período de postura. Após a contaminação do solo, dez fêmeas sincronizadas foram selecionadas e colocadas em recipientes de vidro com 20g (peso seco) de solo e posteriormente alimentadas com “cheese mites” (*Tyrophagus putrescentiae*). Durante os 14 dias do ensaio, duas vezes por semana procedeu-se à correção da humidade (através da pesagem dos frascos e adição de água destilada), assim como à adição de comida (“cheese-mites”). No final do ensaio, os ácaros (adultos e juvenis) foram extraídos utilizando um extrator de Macfadyen por 3 dias, sendo 12 horas a 35 °C, 12 horas a 40 °C e 48 horas a 45°C.

Ácaros (*Oppia nitens*)

O teste de reprodução com os *O. nitens* foi baseado num trabalho inicialmente desenvolvido no Canada (Princz et al, 2010) e em trabalhos já realizados como “ring test” para esta espécie (Lavtizar, 2016). Nas culturas mantidas em laboratório, os organismos de cor âmbar foram previamente separados dos restantes, para recipientes com meio de cultura novo, e utilizados uma semana depois nos ensaios. Após a contaminação do solo (8 réplicas para o controlo - solo com adição de água destilada apenas e 5 réplicas para os tratamentos com os inseticidas), foram colocados 15 indivíduos em cada recipiente com 20g (peso seco) de solo e alimentados com fermento granulado e seco. Uma vez por semana, durante 4 semanas, procedeu-se à correção da humidade (através da pesagem dos frascos e adição de água destilada), assim como à adição de comida referida anteriormente. No final dos 28 dias de teste, os ácaros (adultos e juvenis) foram extraídos utilizando extrator de Macfadyen, durante 3 dias, a uma temperatura de 35º, sendo o solo humedecido uma vez por dia durante a extração.

Dada a baixa taxa de reprodução obtida no ensaio descrito acima (ver secção II.4.2 dos resultados) foi realizado um outro ensaio, com dois solos não contaminados (controlos), o solo natural utilizado nos restantes ensaios (recolhido no Freixo) e o solo artificial fornecido por colegas do Canadá, no âmbito do “ring-test” internacional que está a decorrer e no qual participa o Laboratório de Ecologia e Ecotoxicologia de Solos. Pretendeu-se avaliar se o solo utilizado era por si só impeditivo da reprodução dos organismos. Para cada um dos solos (natural e artificial) foram montadas 4 réplicas com 15g e outras 4 com 27g (peso húmido)

Todos os testes descritos anteriormente foram mantidos a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 16: 8 (dia: noite). Por tratamento foi ainda preparada uma réplica extra, para controlo da humidade e ph.

Para as três espécies testadas, a contagem de todos os indivíduos foi feita em placas de seis poços utilizando uma lupa binocular e a ampliação de 40 vezes.

II.3.5. Análise de dados

Para verificar a existência de outliers/valores extremos foi aplicado o critério de Chauvenet (1863) (média + 2x o desvio padrão e a média – 2x desvio padrão) para cada tratamento. Foram retirados os valores que não estavam dentro dessa margem de erro e/ou valores que tornavam esses resultados negativos (o que confirma a presença de valores extremos). A normalidade dos dados de reprodução foi verificada utilizando os testes de Kolmogorov e Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Sempre que estes pressupostos não foram cumpridos, foi aplicada uma transformação raiz ($x+1$) aos dados.

Para avaliar a existência de efeitos do tratamento com os inseticidas na reprodução de cada uma das espécies-teste, uma análise de variância unidirecional (ANOVA). Após a ANOVA foram também realizadas comparações post hoc (teste de Dunnett) para determinar para testar a existência de diferenças entre o controlo e cada uma das concentrações testadas, de forma a determinar o NOEC (“no observed effect concentration”; concentração sem efeitos observáveis) e o LOEC (“lowest observed effect concentration”: menor concentração com efeito observável).

Sempre que possível, as concentrações que causaram 50 % de redução na reprodução dos organismos (“Effect Concentration”; EC50), assim como os intervalos de confiança a 95% foram calculadas através de regressões não lineares (Environment Canada, 2007).

Todas as análises descritas anteriormente foram realizadas utilizando o programa Statistica 7.0. (Statsoft., 2004).

II.4 Resultados

II.4.1. Reprodução com *Enchytraeus crypticus*

Nos ensaios de reprodução efetuados com *E. crypticus* foram cumpridos os critérios de validade definidos pela ISO-16387 (2003). Nos controlos foram obtidos, em média, 8,6 adultos sobreviventes 780 juvenis, com um coeficiente de variação de 25,3%.

Os resultados estão representados na Figura 1.

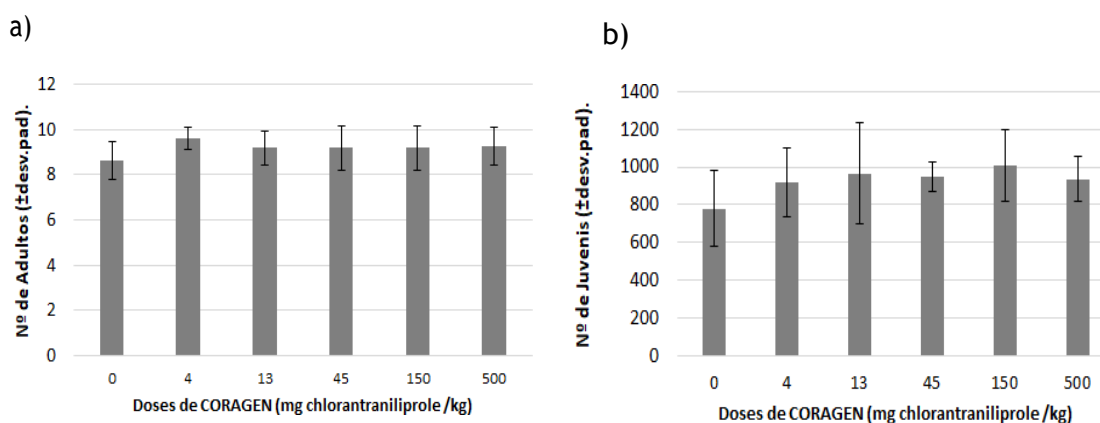


Figura 1. Efeitos do inseticida CORAGEN (i.a. Clorrantraniliprol) na sobrevivência (a) e reprodução do enquitraídeo *E. crypticus*, após 28 dias de exposição em solo natural do Freixo.

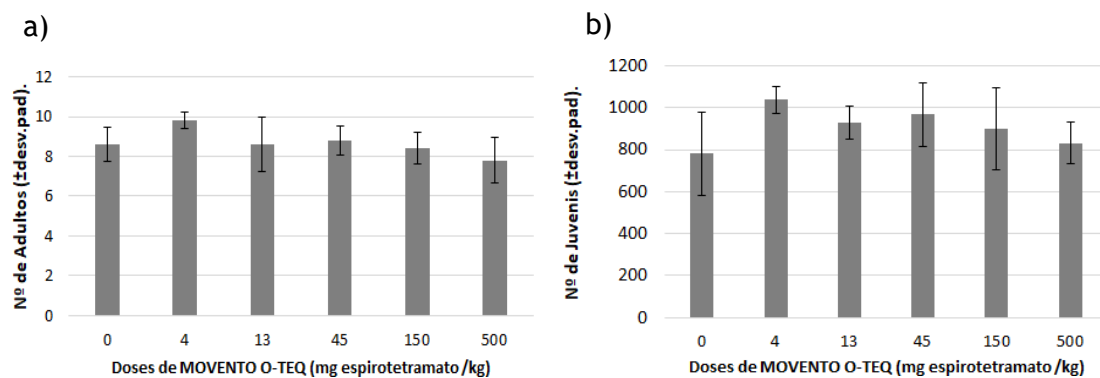


Figura 2. Efeitos do MOVENTO O-TEQ em solo natural do Freixo, sobre a) sobrevivência dos adultos e b) reprodução (número de juvenis) em *E. crypticus*, após 28 dias de exposição.

Em ambos os ensaios, quer com MOVENTO quer com CORAGEN, a sobrevivência dos adultos e produção de juvenis manteve-se relativamente constante ao longo do gradiente de contaminação, não tendo sido encontradas diferenças entre o controlo e os tratamentos respetivos (ANOVA 1 via; $p > 0.05$).

II.4.2. Reprodução com *Oppia nitens*

Nos ensaios de reprodução efetuados com o ácaro *O.nitens* não foram cumpridos os critérios de validade definidos para o protocolo disponível (reprodução média de 60 juvenis no controlo e mortalidade dos adultos menor ou igual a 20%; ISO 23266, 2018). De facto, os indivíduos apresentaram uma baixa taxa de reprodução, apresentando uma média de apenas 4 juvenis por réplica do controlo, e ainda com elevada variabilidade associada dentro de cada tratamento. Já a sobrevivência dos adultos foi superior a 80% e não houve variação significativa entre o controlo e os tratamentos. Os resultados obtidos estão representados na figura 3.

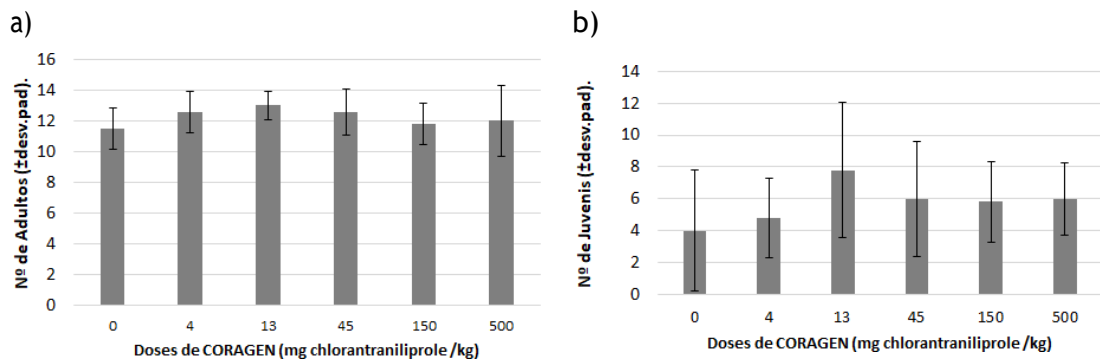


Figura 3. Efeitos do CORAGEN em solo natural do Freixo, sobre a) sobrevivência dos adultos e b) reprodução (número de juvenis) em *O. nitens*, após 28 dias de exposição.

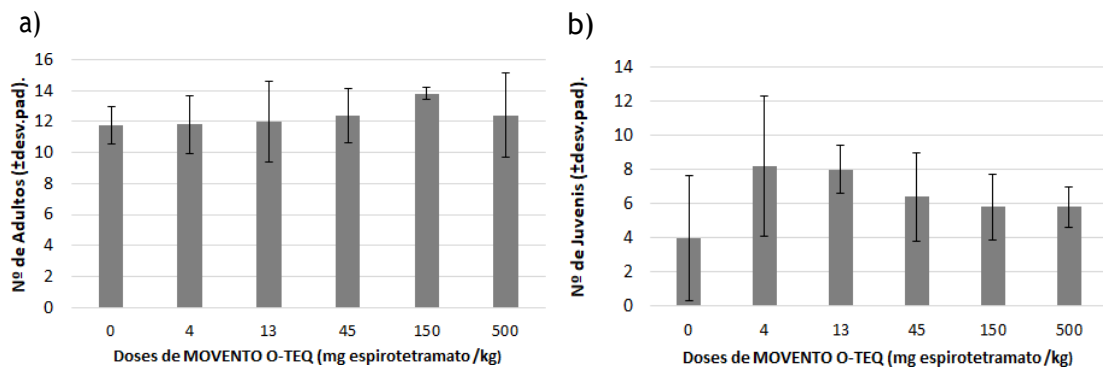


Figura 4. Efeitos do MOVENTO O-TEQ em solo natural do Freixo, sobre a) sobrevivência dos adultos e b) reprodução (número de juvenis) em *O. nitens*, após 28 dias de exposição.

Relativamente ao ensaio posterior apenas com solos não contaminados (solo do Freixo e solo Canadiano; ver secção II.3.4.2 dos Materiais e Métodos) para verificar se a baixa reprodução observada poderia ser decorrente do tipo e quantidade de solo, os resultados obtidos estão representados na Figura 5. Os mesmos mostraram uma reprodução muito baixa e altamente variável dos indivíduos de *O. nitens* (em concordância com o ensaio com os inseticidas; Figura 4), em ambos os solos e para as duas quantidades testadas (15 e 27g),

A sobrevivência dos adultos foi novamente alta e semelhante ao ensaio anterior (Figura 4).

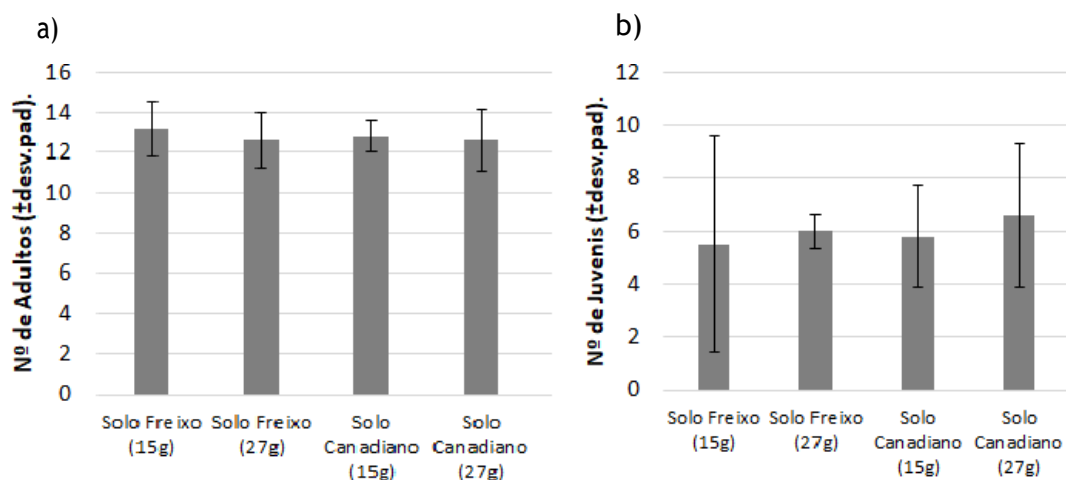


Figura 5. Testes controlo em solo natural do Freixo e solo Canadiao com 15 e 27g, para a avaliação da sobrevivência dos adultos (a) e reprodução (número de juvenis) (b) da espécie de ácaro *O. nitens*, durante 28 dias.

II.4.3. Reprodução com *Hypoaspis aculeifer*

Nos ensaios de reprodução efetuados com *H. aculeifer* foram cumpridos os critérios de validade definidos pela norma 226 da OCDE (OCDE, 2008). As médias observadas para o n.º de adultos sobreviventes e o n.º de juvenis no controlo foram, respetivamente, de 8 e 168, com coeficiente de variação da reprodução de 20,9%. Os resultados globais obtidos estão descritos na figura 6.

No teste com o inseticida CORAGEN, a sobrevivência dos adultos não foi negativamente afetada relativamente ao controlo, em nenhuma das concentrações (ANOVA 1 via: $p > 0.05$). O mesmo caso ocorreu com a taxa de reprodução, não foram encontradas diferenças no n.º de juvenis, para os vários tratamentos, não havendo assim efeito inibitório do CORAGEN na reprodução de *H. aculeifer* (ANOVA 1 via: $p > 0.05$).

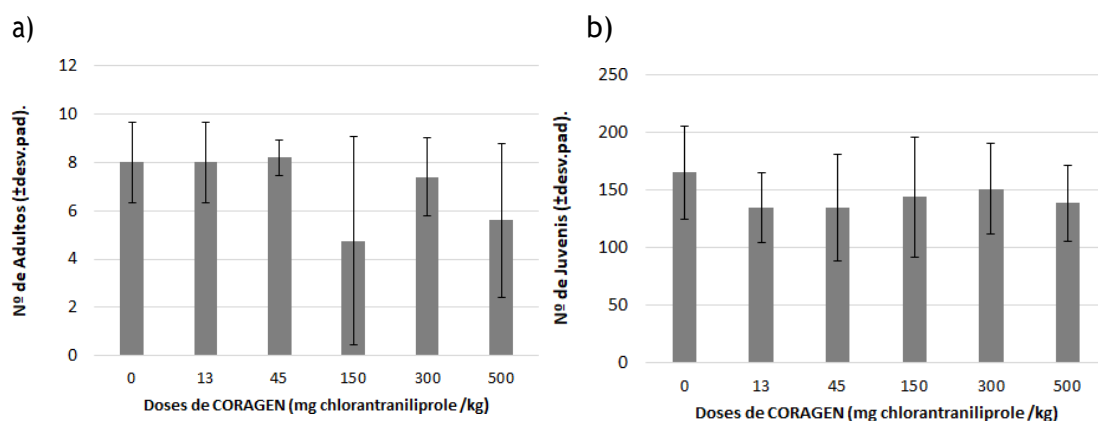


Figura 6. Efeitos do CORAGEN em solo natural do Freixo, sobre a) sobrevivência dos adultos e b) reprodução (número de juvenis) em *H. aculeifer*, após 14 dias de exposição.

Já no teste com o pesticida MOVENTO foi observado um cenário diferente, no que diz respeito aos efeitos na reprodução, com um padrão dose-resposta. Isto é, o número de juvenis diminuiu ao longo do gradiente de contaminação, sendo estatisticamente menor do que o controlo, a partir da concentração C3 (150mg/kg) (ANOVA 1 via, teste de Dunnet, $p < 0.05$), mostrando assim que há efeitos do tratamento na reprodução dos *H. aculeifer*. Desta forma foi possível calcular o NOEC (45 mg/kg), o LOEC (150 mg/kg) e o EC50 (313 mg/kg, com os intervalos de confiança entre 249 e 378 mg/kg).

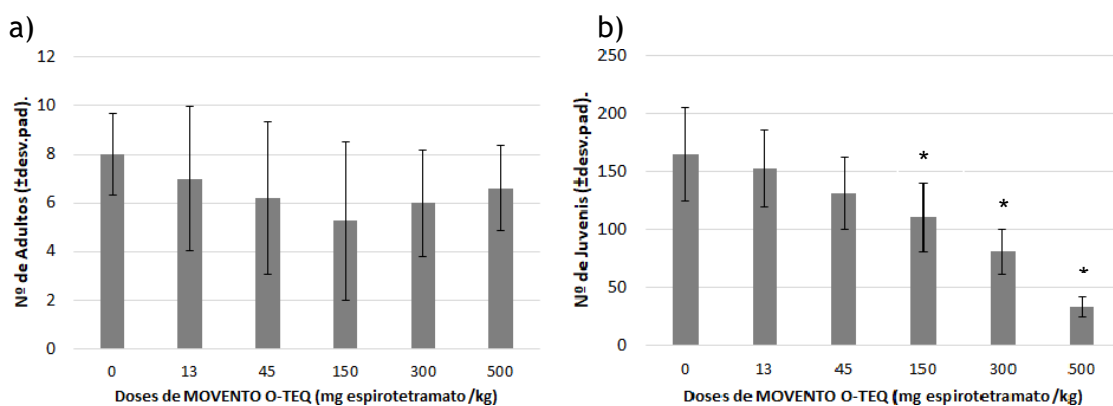


Figura 7. Efeitos do MOVENTO O-TEQ em solo natural do Freixo, sobre a) sobrevivência dos adultos e b) reprodução (número de juvenis) em *H. aculeifer*, após 14 dias de exposição. * indica média de juvenis estatisticamente menor que o controlo.

II.5 Discussão

II.5.1 *E. crypticus*

Nenhum dos dois inseticidas testados afetou a reprodução ou sobrevivência de *E. crypticus*. Quanto ao CORAGEN, Lavtizar et al (2015) também descreve testes de toxicidade com esta espécie em solo natural Lufa 2.2 (com baixo teor de matéria orgânica) em que foram obtidos resultados semelhantes aos deste trabalho, onde mesmo em concentrações não realistas (1000 mg / kg) esta espécie não apresentou decréscimo nem da sobrevivência nem da reprodução. Estes autores referem-se à probabilidade dos recetores de rianodina (canais que controlam a libertação de cálcio intracelular) desta espécie não sejam suscetíveis à ligação ao CORAGEN e por isto este produto não lhe cause efeitos adversos, visto que é por esse meio que este inseticida atinge os organismos-alvo: causando um descontrolo na libertação de cálcio ao ligar-se a rianodina. Além disso a baixa solubilidade em água descrita para o CORAGEN e o MOVENTO O-TEQ podem determinar uma baixa biodisponibilidade das substâncias no solo, podendo ser um dos motivos da baixa sensibilidade desta espécie aos contaminantes, visto que a sua principal via de exposição aos produtos químicos é através da absorção via solução do solo (Didden & Rombke, 2001).

II.5.2 *H. aculeifer*

Já para a espécie *H. aculeifer* o CORAGEN também não apresentou nenhum efeito negativo na reprodução, podendo essa espécie também não ser suscetível

a ligação do pesticida com sua rianodina, ou pode ter uma alta resistência a essa substância. Os ácaros possuem um exoesqueleto de quitina que tem como função a proteção contra atrito, patógenos, predadores e variações do meio ambiente, isto acaba por ser uma barreira para a absorção do pesticida por contato, diferente de outras espécies como os enquitraídeos que são expostos, também, pela absorção direta via derme (Ruppert & Barnes, 1996, Wolstenholme & Rogers, 2005). Na literatura diversos trabalhos demonstram a baixa sensibilidade de *H. aculeifer* a diversas substâncias tóxicas. Um levantamento de dados comparativo testando a sensibilidade de *Folsomia candida*, *H. aculeifer* e *Eisenia fetida* a 51 substâncias mostrou que *H. aculeifer* não foi a espécie-teste mais sensível para 48 delas (EFSA, 2017). Como exemplo temos os pesticidas deltametrina, clorpirifos, dimetoato, onde os *H. aculeifer* apresentaram menor sensibilidade quando comparada com *Folsomia candida* (EFSA, 2017, Owojori et al, 2014).

Quanto ao MOVENTO, houve efeito na reprodução dos *H. aculeifer*, no entanto em concentrações elevadas, que dificilmente serão encontradas em campo, excetuando talvez em cenários de derrames acidentais ou lavagem de tanques de aplicação. De facto, a dose recomendada para este inseticida é 0,02 a 0,12 i.a/kg, inferior em duas ordens de magnitude ao LOEC calculado (150 mg i.a /kg).

No entanto a substância ativa do MOVENTO, Espirotetramato, é descrita como moderadamente tóxica para peixes(*Cyprindon variegatus*) com LC50 1,96 mg/l e NOEC 0,534 mg/l, invertebrados aquáticos(*Daphnia magna*) com EC50 >42,7 mg/l e NOEC 2,0 mg/l e para as minhocas (*Eisenia fetida*), sendo estas afetadas para concentrações a partir de 100mg/kg (NOEC para a reprodução; IUPAC, 2019).

Apesar dos resultados obtidos para as espécies testadas no presente trabalho indicarem a não existência de ecotoxicidade e de risco para o compartimento solo, associado ao uso destes dois inseticidas, são necessários mais dados para confirmar que o seu uso agrícola é seguro. De facto, na literatura existem poucos trabalhos com esses produtos e sobre os seus impactos neste ecossistema. Para poder retirar conclusões mais consistentes é importante avaliar a influência de diferentes fatores como o tipo de solo e temperaturas, por exemplo, para estabelecer um limite ambientalmente seguro. O fator temperatura pode influenciar a toxicidade do Clorantniliprol, o que foi comprovado para a espécie *Eisenia fetida*, em ensaios com duas temperaturas (20°C e 25°C), em que os resultados mostraram que a atividade da enzima acetilcolinesterase foi maior a 25°C havendo uma indução da sua atividade, resultando em menor toxicidade, enquanto que no ensaio a 20° a enzima foi inibida, (Hackenberger, 2018). A inibição da acetilcolinesterase gera um excesso de acetilcolina, provocando paralisia dos músculos necessários à respiração, por exemplo (Savolainen, 2001; EFSA, 2005). Também a influência de 4 tipos de solo diferentes, contaminados com Clorantniliprol, na reprodução de *Folsomia candida* foi avaliada por Lavtizar et al. (2015) que encontrou maior toxicidade nos solos com menor teor de matéria orgânica. Os mesmos autores referiram a tendência desse inseticida a ligar-se fortemente à matéria orgânica (média KOC 329 L / kg; APVMA, 2008), e portanto um maior teor da mesma no solo reduziria a sua biodisponibilidade e, conseqüentemente diminuiria a sua toxicidade.

Além disso, o Clorantniliprol segundo as pesquisas de Lavtizar et al. (2015) demonstrou ser o mais tóxico dentro do seu próprio grupo, os inseticidas diamidas, sendo considerado muito tóxico para os invertebrados aquáticos e

organismos que vivem nos sedimentos, com EC50 (48h) de 9.4 µg/L para espécie de microcrustáceo *D. magna*. Outros trabalhos corroboram essa afirmação, com valores de EC50 (48h) de 11,6 µg/L para esta mesma espécie e 2,9 µg/L para outra espécie, *Ceriodaphnia dubia*), demonstrando assim uma alta sensibilidade ao Clorantniliprol (US.EPA, 2008, Nogueira, 2016). Por isso, apesar da baixa toxicidade para os invertebrados do solo, pode haver perigo indireto para os organismos aquáticos (que apresentam uma sensibilidade expressivamente maior) devido a lixiviação e/ou escorrência superficial deste inseticida.

II.5.3 *O. nitens*

Em relação aos testes com *O. nitens* não foi possível validar os testes devido à baixa reprodução dos indivíduos. Este mesmo padrão foi também observado nos testes subsequentes realizados com solo não contaminado (Freixo e Canadiano). Estes resultados sugerem que a baixa reprodução registrada poderá ser devida ao mau estado da própria cultura de laboratório, com condições sub-ótimas de reprodução, ou de algum erro de manuseamento durante a manutenção da cultura e/ou do próprio ensaio laboratorial. Durante a preparação destes ensaios, aquando da sincronização dos organismos, foi observado um baixo número de juvenis nas culturas, principalmente após a mudança de substrato.

Com um protocolo ainda por definir, devido à recente inclusão desta espécie em ensaios ecotoxicológicos, existem poucos laboratórios a utilizá-la e por isso há falta de dados comparáveis. Num dos trabalhos existentes, de Lavtizar et al

(2015), a espécie foi exposta ao Clorantniliprol e não demonstrou ser afetada pelo pesticida mesmo em altas concentrações (1000 mg/kg). Quanto aos controlos, apresentaram média de 80% de sobrevivência dos adultos e o número médio de 25 juvenis por réplica, número ainda abaixo da proposta de critério de validade do protocolo que está a ser otimizado (média de juvenis entre 50 a 60).

Já Princz (2010) investigou a variabilidade do teste na sobrevivência e reprodução desta espécie, que foi testada em 15 solos florestais. A sobrevivência dos adultos foi consistente entre os diferentes tipos de solo, com uma média de 86%. No entanto, a reprodução variou significativamente, com média entre 2,9 a 86,2. De todas as características do solo avaliadas (NH 3, NO 3, pH, P, OM, C:N, areia, silte, e argila), apenas o teor de OM (matéria orgânica) aparentou afetar a reprodução de *O. nitens*, isto é, a reprodução aumentou em solos com maiores teores de OM. Observou-se ainda que a reprodução foi ótima em solos com um teor de MO de 6 a 7%.

Em outro trabalho realizado por Princz (2018), foram feitos testes com *O. nitens* em dois tipos de solo, um franco-argiloso de textura grossa (VSL) e um franco argiloso de textura fina (NRS). A sobrevivência média dos adultos foi de 95 e 97% nos solos NRS e VSL, respetivamente, com taxas médias de reprodução de 152 e 190 juvenis por réplica.

De facto, tal como referido anteriormente, o ensaio de reprodução com esta espécie encontra-se em fase de padronização, pelo que é provável que a versão final do protocolo possa sofrer alterações, no sentido de fornecer indicações para ultrapassar estas e outras dificuldades.

II.6. Conclusão

Não foi encontrada toxicidade do inseticida Clorantraniliprol para o ácaro *H. aculeifer* e para o enquitraídeo *E. crypticus* mesmo em concentrações elevadas (500 mg / kg).

Para os testes com o inseticida Espirotetramato, a espécie *E. crypticus* também não foi sensível, mesmo na dose máxima testada (500 mg / kg). Contrariamente ao observado para o Clorantraniliprol, os ácaros *H. aculeifer* foram negativamente afetados por concentrações crescentes de Espirotetramato, tendo sido calculados valores de LOEC de 150 mg / kg, e EC50 para efeitos na reprodução de 313 mg / kg.

Quanto à espécie *Oppia nitens* não foi possível determinar a toxicidade de nenhuma das duas substâncias testadas, devido à baixa reprodução dos organismos nos controlos. Devido à dificuldade de atingir um grande número de juvenis nos controlos, como foi o caso do presente trabalho e de outros trabalhos citados, pode ser necessário rever em baixa o critério de validade relativo ao número mínimo de juvenis do controlo, proposto pelo protocolo que se encontra em validação.

REFERENCIAS:

Alves Filho, J. P. (2002). Uso de agrotóxicos no Brasil: controle social e interesses corporativos.

Annablume.

Alves, P. R. L. A., Cardoso, E. J. B. N., Niemeyer, J. C. (2018). Caracterização e criação dos organismos para os ensaios ecotoxicológicos. Em: Ecotoxicologia Terrestre: Métodos e Aplicações de Ensaio com Collembola e Isopoda, Publisher: UDESC, pp.111 – 131

- Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (APVMA). (2008). Public release summary on: Evaluation of the new active chlorantraniliprole in the products Dupont Coragen insecticide, Dupont Altacor insecticide, Dupont Acelepryn insecticide. Canberra, Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority, 75 pp.
http://archive.apvma.gov.au/registration/assessment/docs/prs_chlorantraniliprole.pdf.
Acessado em agosto de 2019.
- Bayer Crop Science (2012): Spirotetramat (Movento, Ultor, Tihan). Disponível em <http://www.bayercropscience.com/bcsweb/cropprotection.nsf/id/spirotetramat.htm>.
Acessado em julho de 2019.
- Bretschneider, T., Fischer, R., Nauen, R. (2007): Inhibitors of Lipid Synthesis (Acetyl-CoA-carboxylase Inhibitors) in: Modern Crop Protection Compounds, Volume 1, eds: Krämer, W., Schirmer, U., Wiley-VCH, Weinheim, Germany, Chapter 28, pp. 909-925
- Bullard, J. E., Ockelford, A., Strong, C. L., & Aubault, H. (2018). Impact of multi-day rainfall events on surface roughness and physical crusting of very fine soils. *Geoderma*, 313, 181-192.
- Chelinho, S., Domene, X., Andrés, P., Natal-da-Luz, T., Norte, C., Rufino, C., ... & Duarte, A. C. (2014). Soil microarthropod community testing: A new approach to increase the ecological relevance of effect data for pesticide risk assessment. *Applied soil ecology*, 83, 200-209.
- Chelinho, S., Domene, X., Campana, P., Andrés, P., Römbke, J., & Sousa, J. P. (2014). Toxicity of phenmedipham and carbendazim to *Enchytraeus crypticus* and *Eisenia andrei* (Oligochaeta) in Mediterranean soils. *Journal of soils and sediments*, 14(3), 584-599.
- Chelinho, S., Domene, X., Campana, P., Natal-da-Luz, T., Scheffczyk, A., Römbke, J., & Sousa, J. P. (2011). Improving ecological risk assessment in the Mediterranean area: selection of reference soils and evaluating the influence of soil properties on avoidance and reproduction of two oligochaete species. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(5), 1050-1058.
- Coleman DC, Crossley DA Jr, Hendrix PF. (2004). *Fundamentals of Soil Ecology*. Academic, London, UK.

- Cordova D, Benner EA, Sacher MD, Rauh JJ, Sopa JS, Lahm GP, Selby TP, (2006). Anthranilic diamides: a new class of insecticides with a novel mode of action, ryanodine receptor activation. *Pesticide Biochemistry Physiology*, Maryland Heights, v. 84, n.1, p.196-214.
- Didden, W.A.M, (1993). Didden Ecology of terrestrial Enchytraeidae. *Pedobiologia*, 37 (1993), pp. 2-29
- Didden, W., & Römbke, J. (2001). Enchytraeids as indicator organisms for chemical stress in terrestrial ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 50(1), 25-43.
- EFSA (European Food Safety Authority), (2017). Panel on Plant Protection Products and their Residues, 2017. Scientific Opinion addressing the state of the science on risk assessment of plant protection products for in-soil organisms. *EFSA J.* 15 (2), 4690. In: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4690>, 225 pp.
- Environment Canada. (2007). Guidance document on statistical methods for environmental toxicity tests. Report EPS 1/RM/46, March 2005 (with June 2007 amendments). Ottawa, Ontario, Canada.
- EPA, U. (2008). Environmental Protection Agency (2002). Mercury Human Exposure: <http://www.epa.gov/hg/exposure.htm>.
- EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL, (2005). Directorate D - Food Safety: Production and distribution chain Unit D.3 - Chemicals, contaminants and pesticides: Chlorpyrifos. SANCO/3059/99 - rev. 1.5.
- Fenoll, J., Garrido, I., Cava, J., Hellin, P., Flores, P., & Navarro, S. (2015). Photometabolic pathways of chlorantraniliprole in aqueous slurries containing binary and ternary oxides of Zn and Ti. *Chemical Engineering Journal*, 264, 720-727.
- Gontijo LM, Celestino D, Queiroz OS, Guedes RNC, Picanco, MC, (2015). Impacts of azadirachtin and chlorantraniliprole on the developmental stages of pirate bug predators (Hemiptera: Anthocoridae) of the tomato pinworm *Tuta absoluta* (Lepidoptera: Gelechiidae). *FLORIDA ENTOMOLOGIST*. Volume: 98. Edição: 1. Páginas: 59-64.

- Grafton-Cardwell EE, Reagan CA, Haviland DR (2007): Eficácia do Movento para controlar a escala vermelha da Califórnia, 2006. Artrópodes Gerir Testes, volume 32 (D6). Sociedade Entomológica da América, Lanham.
- Grafton-Cardwell EE, Scott SJ, (2008): Eficácia dos acaricidas no controle do ácaro-vermelho-cítrico. Artrópodes Gerenciar Testes, vol 33, (D5). Sociedade Entomológica da América, Lanham
- Grisolia, C. K. (2005). Agrotóxicos: mutações, reprodução & câncer; riscos ao homem e ao meio ambiente, pela avaliação de genotoxicidade, carcinogenicidade e efeitos sobre a reprodução. Ed. UnB.
- Hassall, M., Turner, J. G., & Rands, M. R. W. (1987). Effects of terrestrial isopods on the decomposition of woodland leaf litter. *Oecologia*, 72(4), 597-604.
- ISO (2003). Soil Quality — Effects of Pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.). Determination of effects on reproduction. International Organisation for Standardisation. No. 16387
- ISO (1998). Soil quality – effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). 2. Determination of Effects on Reproduction. International Organization for Standardization. No. 11268-2.
- ISO (2016). Soil quality—method for testing effects of soil contaminants on the feeding activity of soil dwelling organisms—Bait-lamina test. Geneva. International Organization for Standardization. No. 18311.
- ISO (2014). Soil Quality – Inhibition of Reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by Soil Pollutants ISO, Geneva, Switzerland. International Organization for Standardization. No. 11267.
- IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry (2019). Disponível em: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/1138.htm>. Acessado em agosto, 2019.
- Jänsch, S., Amorim, M. J., & Römbke, J. (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. *Environmental Reviews*, 13(2), 51-83.

- Johnston JM, Crossley DA Jr. (2002). Forest ecosystem recovery in the southeast US: Soil ecology as an essential component of ecosystem management. *Forest Ecol Manage* 155: 187–203.
- Jurewicz, J., Polanska, K., & Hanke, W. (2013). Chemical exposure early in life and the neurodevelopment of children—an overview of current epidemiological evidence. *Annals of agricultural and environmental medicine*, 20(3).
- Lavtižar, V., Helmus, R., Kools, S. A., Dolenc, D., van Gestel, C. A., Trebše, P., ... & Kraak, M. H. (2015). Daphnid life cycle responses to the insecticide chlorantraniliprole and its transformation products. *Environmental science & technology*, 49(6), 3922-3929.
- Lavtižar, V., Berggren, K., Trebste, P., Kraak, MH, Verweij, RA, e van Gestel, CA. (2016). Ecotoxicidade comparativa do clorantraniliprol a invertebrados do solo não-alvo. *Chemosphere* , 159 , 473-479.
- Lesna, I., Conijn, C.G.M., Sabelis, M.W. & van Straalen, N.M. (2000) Biological control of the bulb mite, *Rhizoglyphus robini*, by the predatory mite, *Hypoaspis aculeifer*, on lilies: Predator-prey dynamics in the soil, under greenhouse and field conditions. *Biocontrol Science and Technology*, 10, 179–193.
- Lima, CA. (2009). Avaliação de risco ambiental como ferramenta para o descomissionamento de uma indústria de metalurgia de zinco. 238 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro (RJ).
- Magalhães, DP; Ferrão Filho, AS. (2008). A Ecotoxicologia como ferramenta para o biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia Brasiliensis*, Rio de Janeiro, v. 12, p. 355-381.
- Melchior, P. (1960). Chauvenet, W.-A Manual of Spherical and Practical Astronomy. *Ciel et Terre*, 76, 427.
- Morrissey, C. A., Mineau, P., Devries, J. H., Sanchez-Bayo, F., Liess, M., Cavallaro, M. C., & Liber, K. (2015). Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: a review. *Environment international*, 74, 291-303.

- Nauen R., Reckmann, U., Thomzik J., Thielert W. (2008): Perfil biológico de spirotetramat (Movento®) um novo inseticida sistêmica de duas vias (ambimobile) contra espécies de pragas de sucção. *Bayer CropScience Journal* 61: 245–278
- Nogueira, L. R. (2016). Toxicidade aguda e crônica do pesticida chlorantraniliprole sobre o organismo-teste *Ceriodaphnia dubia*.
- Nunes, M. E. T., & Espíndola, E. L. G. (2012). Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. *Ecotoxicology*, 21(4), 1063-1071.
- OECD (2008). Guidelines for the Testing of Chemicals - Predatory Mite (*Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer*) Reproduction Test in Soil. Organisation for Economic Co-operation and Development. No. 226.
- OECD (2010). Guidelines for the Testing of Chemicals e Biopaccumulation in Terrestrial Oligochaetes. Organisation for Economic Co-operation and Development. No. 317.
- Oliveira, V., Oliveira, R., Amorim, M., Domingues, I., & Soares, A. (2009). Os medicamentos veterinários no meio ambiente: aplicações e implicações. *Revista Captar: Ciência e Ambiente Para Todos*, 1(2).
- Owojori, O. J., Waszak, K., & Roembke, J. (2014). Avoidance and reproduction tests with the predatory mite *Hypoaspis aculeifer*: effects of different chemical substances. *Environmental toxicology and chemistry*, 33(1), 230-237.
- Palmquist, K., Salatas, J., & Fairbrother, A. (2012). Pyrethroid insecticides: use, environmental fate, and ecotoxicology. In *Insecticides-advances in integrated pest management*. IntechOpen.
- Princz, J. I., Behan-Pelletier, V. M., Scroggins, R. P., & Siciliano, S. D. (2010). Oribatid mites in soil toxicity testing—the use of *Oppia nitens* (CL Koch) as a new test species. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 29(4), 971-979.

- Rodrigues, A. C., Gravato, C., Quintaneiro, C., Golovko, O., Žlábek, V., Barata, C., ... & Pestana, J. L. (2015). Life history and biochemical effects of chlorantraniliprole on *Chironomus riparius*. *Science of the Total Environment*, 508, 506-513.
- Ruppert E, Barnes RD. (1996). *Zoologia dos Invertebrados*. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Rocca Ltda.
- Sánchez-Bayo, F., & Tennekes, H. A. (2015). Environmental risk assessment of agrochemicals- A critical appraisal of current approaches. *Toxicity and Hazard of Agrochemicals*, 1.
- Sattelle, D. B., Cordova, D., & Cheek, T. R. (2008). Insect ryanodine receptors: molecular targets for novel pest control chemicals. *Invertebrate Neuroscience*, 8(3), 107.
- Savolainen, K. (2001). Understanding the toxic actions of organophosphates. *Handbook of Pesticide Toxicology vol. 2*, 1013-1041.
- Schleier III, J. J., & Peterson, R. K. (2011). Pyrethrins and pyrethroid insecticides. *Green trends in insect control*, 94, 131.
- Segat, JC. (2016). Avaliação ecotoxicológica da aplicação de dejetos líquidos de suíno em solos subtropicais. 312 f. Tese (Doutorado em Ciências do Solo) – Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages (SC).
- Singh M, Jain KL, Mathur RB, Dogra D., (1996). Laboratory study of food preferences of some cryptostigmatic mites and their contribution in litter degradation and mineralization in soils. *Ann Biol* 12: 335–343.
- Trocza, B. J., Williams, A. J., Williamson, M. S., Field, L. M., Lüemmen, P., & Davies, T. E. (2015). Stable expression and functional characterisation of the diamondback moth ryanodine receptor G4946E variant conferring resistance to diamide insecticides. *Scientific reports*, 5, 14680.
- Van Gestel, C. A. (1997). Scientific basis for extrapolating results from soil ecotoxicity tests to field conditions and the use of bioassays. In *Ecological risk assessment of contaminants in soil*(pp. 25-50). Springer, Boston, MA.
- Vänninen, I. & Koskula, H. (2004) Biocontrol of the shore fly *Scatella tenuicosta* with *Hypoaspis miles* and *H. aculeifer* in peat pots. *BioControl*, 49, 137–152.

- Viran, R., Erkoç, F. Ü., Polat, H., & Koçak, O. (2003). Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and environmental safety*, 55(1), 82-85.
- Walter, D.E., Proctor, H.C., (2013). Mites: ecology, evolution & behaviour. In: *Mites: Ecology, Evolution & Behaviour: Life at a Microscale*, second ed. pp. 1–494. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-7164-2>.
- Wolstenholme, A. J., & Rogers, A. T. (2005). Glutamate-gated chloride channels and the mode of action of the avermectin/milbemycin anthelmintics. *Parasitology*, 131(S1), S85-S95.

Capítulo 3

**Efeito dos inseticidas Clorantraniliprol e
Espirotetramato no ácaro predador *Hypoaspis
aculeifer*, utilizando vias de exposição à contaminação
mais realistas.**

III.1 Resumo

De entre todas as espécies de invertebrados de solo utilizados em ensaios ecotoxicológicos padronizados, o ácaro *Hypoaspis aculeifer* é a única espécie predadora (OCDE, 2008). Contudo, vários estudos têm demonstrado a sua baixa sensibilidade a diversas substâncias, podendo a mesma estar relacionada com o modo de exposição à substância-teste, uma vez que o protocolo em vigor para esta espécie (norma 226 da OCDE), não considera a exposição via oral mas apenas a exposição via solo contaminado, não tendo em conta o seu hábito predador.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de dois novos inseticidas, o Espirotetramato e o Clorantraniliprol, na mortalidade e reprodução do ácaro *Hypoaspis aculeifer* num solo natural do freixo, através da adaptação do protocolo existente, considerando a via de exposição oral ao contaminante, além da via tradicional (através da contaminação do solo). As presas (*Tyrophagus putrescentiae*) oferecidas nos ensaios foram previamente expostas ao contaminante a partir da levedura de cerveja, utilizada para alimentá-las. Os resultados desse ensaio foram comparados com os obtidos no ensaio-padrão realizado anteriormente (capítulo 2).

Os resultados demonstraram que o inseticida Clorantraniliprol não afetou nem a sobrevivência nem a reprodução dos *Hypoaspis aculeifer*. Quanto ao Espirotetramato, afetou negativamente a sobrevivência dos adultos nas duas doses mais altas (300 e 500 mg / kg), o que não ocorreu no teste-padrão. Quanto a taxa de reprodução, foi encontrado EC50 de 280 mg/kg, valor menor que o apresentado pelo teste-padrão: 313 mg/kg, sugerindo uma tendência de maior toxicidade observada na exposição por via oral. No entanto, são necessários

mais ensaios, com outros contaminantes e com outros solos, quer para confirmar esta tendência, quer para propor alterações ao protocolo vigente, no sentido de ter em conta os hábitos alimentares desta espécie.

Palavras-chave: Ensaios Ecotoxicológicos; vias de exposição a contaminantes; Comida Contaminada; inseticidas; Ácaro Predador.

III.2 Introdução

Os ensaios ecotoxicológicos existentes para avaliar os efeitos de substâncias químicas nos organismos não-alvo, normalmente são realizados seguindo protocolos padronizados pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE) e/ou Organização Internacional de Normalização (ISO) e consistem em expor espécies padrão a amostras de solo contaminado.

A utilização de invertebrados do solo como organismo-teste neste tipo de ensaios pode ser considerada um dos principais instrumentos de análise, pois normalmente são suficientes para determinar o risco ecológicos dessas substâncias e o nível de exposição segura para a saúde humana. (Shugart, 2009, Cardoso, 2012).

De entre todas as espécies de invertebrados de solo que podem ser utilizados nestes ensaios padronizados (OCDE, 2008), o ácaro *Hypoaspis aculeifer* é a única espécie predadora, alimentando-se normalmente de outros ácaros, colêmbolos, fungos e pupas de insetos e por isto é uma espécie importante no controlo biológico de pragas e outras espécies com populações abundantes (Lesna et al. 2000; Walter & Proctor, 2013). Contudo, vários estudos têm demonstrado a sua baixa sensibilidade a diversas substâncias, como os

pesticidas deltametrina, clorpirifos, dimetoato, quando comparada com outros invertebrados do solo, como por exemplo a *Folsomia candida* (EFSA, 2017; Owojori et al, 2014; Huguiet et al, 2015; Jegede et al., 2017). Esta baixa sensibilidade poderá estar relacionada com o modo de exposição à substância-teste, preconizado pelo protocolo em vigor para esta espécie (norma 226 da OCDE, OCDE 2008), uma vez que considera apenas a exposição via solo contaminado, não considerando seu hábito predador, e oferecendo alimento (“presas”) não contaminado durando o ensaio.

Se levarmos em conta um cenário real de contaminação, as espécies que servem de alimento para o *H. aculeifer* também estariam previamente expostas ao contaminante, podendo o protocolo atual estar a subestimar a toxicidade dos contaminantes para esta espécie, como já foi previamente discutido num estudo anterior (Natal-da-Luz, 2019). No trabalho referido, o protocolo padronizado foi adaptado no sentido de expor os organismos a um Solo artificial padrão (OCDE; 5% de turfa, 20% de caulim e 75% de areia, com o pH ajustado para 6) contaminado, e alimentar o ensaio com presas (*Tyrophagus putrescentiae*) previamente expostas ao Cobre (Cu). Os resultados mostraram que os ácaros alimentados com presas pré-expostas foram afetados pelo Cu em concentrações menores quando comparados ao teste padrão alimentado com presas “limpas”.

Após o trabalho de Natal-da-Luz et al. (2019) ficou evidente a necessidade de prosseguir com esta avaliação com outros grupos de contaminantes (ex. pesticidas) e outros tipos de solo, de forma a obter uma base de dados maior e mais sólida, com vista a uma possível futura adaptação do protocolo em vigor.

Assim o presente trabalho teve como objetivo principal a avaliação dos efeitos de dois inseticidas, o Espirotriamato e o Clorantraniliprol, na mortalidade e

reprodução do ácaro *Hypoaspis aculeifer*, através da adaptação do protocolo existente, considerando vias de exposição ao contaminante mais realistas, nomeadamente a exposição à comida contaminada. Mais especificamente, pretende-se comparar a toxicidade obtida no presente estudo com a observada nos ensaios padrão, realizados com a mesma espécie e contaminantes, descritos no capítulo 2.

Este trabalho baseou-se na hipótese que a toxicidade observada nos ensaios adaptados, com duas vias de exposição à contaminação (solo e alimento), será maior, comparativamente ao teste padrão, com só uma via de contaminação (solo).

III.3 Materiais e Métodos

III.3.1. Organismos teste

Os organismos foram obtidos de culturas mantidas no Laboratório de Ecotoxicologia do Departamento de Ciências da Vida da Universidade de Coimbra, Portugal. Para o teste de reprodução foi utilizada a espécie *Hypoaspis aculeifer*, cultivada em meios produzidos com uma mistura de gesso e carvão ativado (11: 1) e alimentados duas vezes por semana com cheese mites (*Tyrophagus putrescentiae*), que foram cultivados simultaneamente em frascos de vidros e alimentados duas vezes por semana com levedura de cerveja.

III.3.2. Substância teste

Foram utilizadas formulações comerciais de dois inseticidas diferentes, adquiridas na Cooperativa Agrícola de Coimbra (Coimbra, Portugal): o CORAGEN (Suspensão concentrada – SC, 200 g/L Clorraniliprol) e o MOVENTO O-TEQ (Dispersão em óleo (OD) com 150 g/L de Espirotetramato), tal como descrito na secção II.3.1 (capítulo 2).

As doses utilizadas tanto para o solo quanto para levedura foram 5 concentrações crescentes: 13, 45, 150, 300, 500 mg i.a/kg para os dois inseticidas.

III.3.3. Contaminação da levedura de cerveja

Todos os procedimentos descritos relativos à adaptação do protocolo de reprodução existente (norma 226 da OCDE, OCDE 2018) basearam-se nos trabalhos de Natal-da-Luz et al. (2019) e de Letícia Carniel (comunicação pessoal, 2019).

A levedura de cerveja foi separada em caixas de petri de vidro, sendo 20g para o controlo e 15g para cada tratamento, contaminada uniformemente (verificando se pelo menos 80% da levedura se apresentava húmida) e congeladas até serem levadas para secar (liofilizador a frio por cerca de 48h). Após esse procedimento a levedura foi macerada com a ajuda de uma colher e dividida em microtubos com cerca de 5g cada (quantidade suficiente para alimentar os cheese mites), que foram congelados a -20C até serem posteriormente utilizados, de forma a evitar a degradação dos contaminantes.

III.3.4. Contaminação do cheese mites (*Tyrophagus putrescentiae*)

Os cheese mites foram extraídos da sua cultura original com a ajuda de uma lâmpada de 60W (para induzir, pela ação do calor, a fuga dos organismos para baixo) direcionada para um funil, na qual foi colocada uma rede (1 mm de malha), e onde foram previamente colocados os cheese mites. A referida rede foi utilizada para evitar a passagem de possíveis resíduos de levedura de cerveja não contaminada presente na cultura original. Neste sentido, para evitar ao máximo a existência desses mesmos resíduos, os cheese mites não foram alimentados durante pelo menos uma semana, antes de sofrerem este procedimento de extração.

Por baixo do funil foi colocado um recipiente com a levedura contaminada (e previamente descongelada), destino final dos cheese mites extraídos. A exposição à levedura contaminada foi realizada durante os 4 dias anteriores à data de serem utilizados para alimentar os ensaios (ver secção seguinte). Este procedimento foi realizado separadamente para cada uma das concentrações testadas dos dois inseticidas. No caso do tratamento controlo, foi utilizado o mesmo procedimento dos tratamentos contaminados, mas utilizando levedura humedecida com água destilada apenas.

III.3.5. Ensaio de reprodução

Os ensaios foram realizados de acordo com os procedimentos descritos no protocolo da OCDE nº 226 (OCDE, 2008), com as adaptações referidas na secção anterior.

Assim, 10 fêmeas com idade entre 28-35 dias foram colocadas em frascos de vidro contendo 20g (peso seco) de solo contaminado e alimentadas a cada dois dias (dias 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12) com a levedura contaminada durante as duas semanas do ensaio. No caso do tratamento controle foi utilizado o mesmo solo, sem contaminação, e foram alimentados com a levedura não contaminada, durante os mesmos dias dos outros tratamentos.

Uma vez por semana foi também realizada a correção da humidade (através da pesagem dos frascos e adição de água destilada correspondente à perda por evaporação).

Os ensaios foram mantidos a $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 16: 8 (claro: escuro). Foram utilizadas 8 réplicas para o controle (apenas adição de água ao solo) e 5 réplicas para os tratamentos com inseticida. Foi também preparada uma réplica extra para cada tratamento, para controle da humidade e ph.

No final do ensaio, os indivíduos foram extraídos utilizando um extrator de Macfadyen durante 3 dias (12 horas a 35° , 12 horas a 40° e 48 horas a 45°) e preservados em álcool. A contagem do número de adultos e juvenis foi realizada com recurso a uma lupa binocular.

III.3.6. Análise de Dados

Para verificar a existência de outliers/valores extremos foi aplicado o critério de Chauvenet (1863) (média + 2x o desvio padrão e a média – 2x desvio padrão) para cada tratamento. Foram retirados os valores que não estavam dentro dessa margem de erro e/ou valores que tornavam esses resultados negativos (o que confirma a presença de valores extremos). A normalidade dos dados de

reprodução foi verificada utilizando os testes de Kolmogorov e Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Sempre que estes pressupostos não foram cumpridos, foi aplicada uma transformação raiz ($x+1$) aos dados.

Para avaliar a existência de efeitos do tratamento com os inseticidas na reprodução da espécie-teste, foi feita uma análise de variância unidirecional (ANOVA). Após a ANOVA foram também realizadas comparações post hoc (teste de Dunnett) para determinar a existência de diferenças entre o controle e cada uma das concentrações testadas, de forma a determinar o NOEC (“no observed effect concentration”; concentração sem efeitos observáveis) e o LOEC (“lowest observed effect concentration”: menor concentração com efeito observável).

Sempre que possível, as concentrações que causaram 50 % de redução na reprodução dos organismos (“Effect Concentration”; EC50), assim como os intervalos de confiança a 95% foram calculadas através de regressões não lineares (Environment Canada, 2007). Todas as análises descritas anteriormente foram realizadas utilizando o programa Statistica 7.0. (Statsoft., 2004)

III.4 Resultados

Nos ensaios de reprodução efetuados para *H. aculeifer* foram cumpridos os critérios de validade definidos pela norma 226 da OCDE (OCDE, 2008). As médias observadas para o n.º de adultos sobreviventes e o n.º de juvenis no controle foram, respetivamente, de 8 e 79, com coeficiente de variação da reprodução de 20,7%. Os resultados estão descritos nas figuras 1 e 2.

O teste com o pesticida CORAGEN não apresentou diferenças entre os tratamentos e o controle na sobrevivência dos adultos (ANOVA 1 via: $p > 0.05$). O mesmo ocorreu com a taxa de reprodução, uma vez que não foram encontradas diferenças no n.º de juvenis, para os vários tratamentos, não havendo assim efeito inibitório do CORAGEN na reprodução de *H. aculeifer* (ANOVA 1 via: $p > 0.05$).

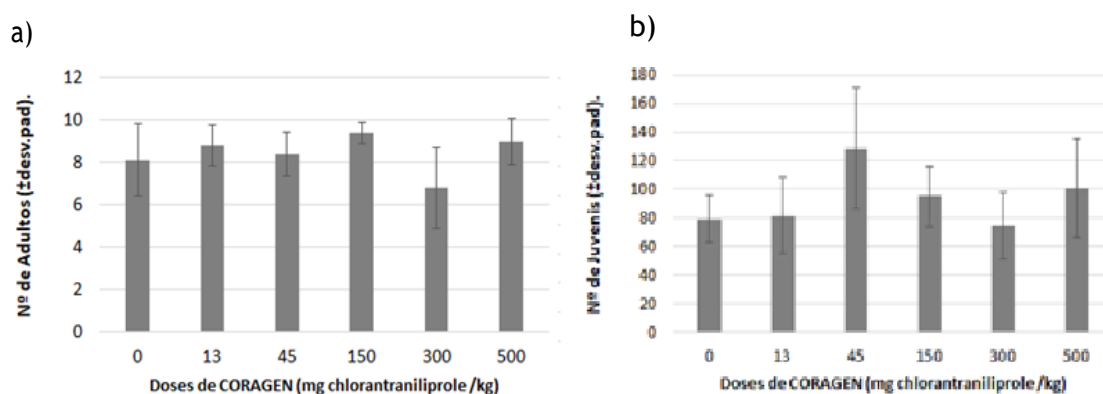


Figura 1. Efeitos do inseticida CORAGEN (i.a. Clorantraniliprol) na sobrevivência (a) e reprodução (b) do ácaro *H. aculeifer*, após 14 dias de exposição em solo natural do Freixo.

Já o teste com o pesticida MOVENTO O-TEQ apresentou um padrão dose-resposta, com diferenças na sobrevivência dos adultos entre os tratamentos, sendo os dois últimos (300, 500 mg i.a/kg) significativamente menores que o controle (ANOVA 1 via, teste de Dunnet, $p < 0.05$). Também na taxa de reprodução foram observados efeitos inibitórios, nomeadamente uma diminuição no número de juvenis ao longo do gradiente de contaminação (ANOVA 1 via, teste de Dunnet, $p < 0.05$), mostrando assim que há efeitos do inseticida tanto na taxa de mortalidade dos adultos como na taxa de reprodução. Desta forma foi possível calcular

um valor de EC50 de 280 mg/kg (com os intervalos de confiança entre 238 e 323 mg/kg), e valores de NOEC (150 mg/kg), e LOEC (300 mg/kg).

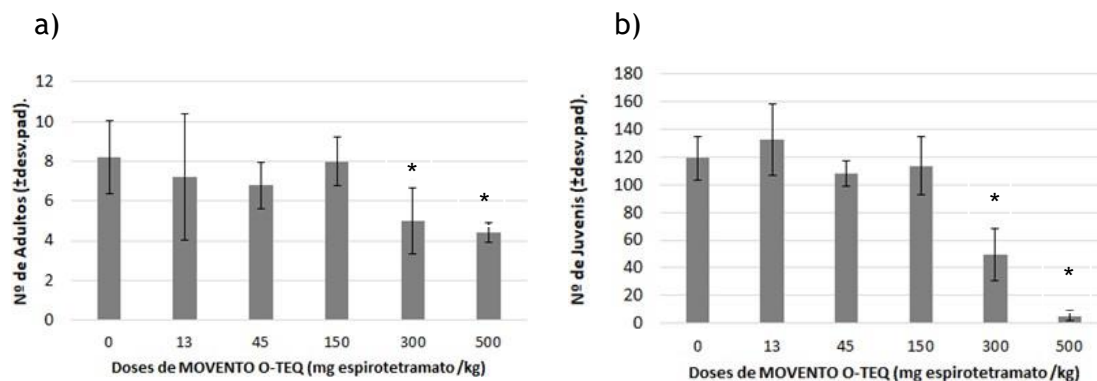


Figura 2. Efeitos do inseticida MOVENTO O-TEQ (i.a. Espirotertramato) na sobrevivência (a) e reprodução (b) do ácaro *H. aculeifer*, após 14 dias de exposição em solo natural do Freixo. * indica média de juvenis estatisticamente menor que o controle.

III.5 Discussão

Os resultados desse trabalho foram comparados com os resultados do teste padrão de reprodução com *H. aculeifer* (secção II.4.3).

O Clorantniliprol não afetou os organismos, mesmo quando a exposição foi feita via solo e comida (presas: *Tyrophagus putrescentiae*) contaminados, em concordância com os resultados do teste padrão anteriormente realizado (secção II.4.3), onde não foi encontrada toxicidade para esta espécie. Ou seja, a via de exposição mais realista ao contaminante não se traduziu numa maior toxicidade. Em contraste o Espirotertramato demonstrou afetar negativamente quer a sobrevivência quer a reprodução dos ácaros, sendo assim possível comparar a toxicidade deste ensaio e do teste padrão. Contrariamente ao teste padrão, o ensaio com comida contaminada afetou a sobrevivência dos adultos

nas duas últimas concentrações (300, 500 mg i.a/kg), indicando uma maior toxicidade.

Quanto à taxa de reprodução, os ácaros alimentados com presas pré-expostas apresentaram um valor de EC50 de 280 mg/kg, valor um pouco mais baixo em comparação com o EC50 de 313 mg/kg, calculado para o teste-padrão (com ácaros alimentados com presas não contaminadas), o que sugere uma maior toxicidade aquando da exposição a comida e solos contaminados. No entanto, os intervalos de confiança sobrepõem-se (entre 238 e 323 mg/kg para o teste com comida contaminada e 249 e 378 mg/kg para o teste padrão), o que poderá indicar uma diferença não significativa.

Relativamente à mortalidade dos adultos podemos afirmar que há uma tendência para um aumento geral da toxicidade do Espirotramato para os ácaros predadores (*H. aculeifer*) devido à alimentação com presas contaminadas. De facto, no teste-padrão não se observaram diferenças na sobrevivência ao longo do gradiente de contaminação, enquanto no caso do ensaio com comida contaminada, nas duas últimas doses (300 e 500 mg/kg) o número de adultos sobreviventes foi reduzido comparativamente ao controlo.

No entanto, os resultados obtidos estão de acordo com os de Natal-da-Luz (2019), que observou diferenças de toxicidade do cobre, tendo o ensaio com comida contaminada causado maior toxicidade quando comparado ao teste padrão sendo apresentado EC10 de 1204mg/kg (comida contaminada) e EC10 de 1903 mg/kg (teste-padrão). Posteriormente, este ensaio adaptado foi também realizado com os pesticidas Clorotalonil e Clorpirifós, sendo que o primeiro não apresentou nenhuma toxicidade para a espécie em nenhum dos dois ensaios. No caso do segundo inseticida (clorpirifós) houve maior toxicidade maior

toxicidade no teste com comida contaminada quando comparado ao teste padrão (Scopel, comunicação pessoal).

A tendência observada corrobora a necessidade de prosseguir com mais testes com comida contaminada, no sentido de obter mais dados relativos à toxicidade de outros contaminantes para *H. aculeifer*, visto que a relevância da exposição oral à toxicidade de uma substância pode ser dependente das suas propriedades químicas (persistência) e cinética, tanto no solo como na presa. Isto é, provavelmente quanto mais persistente e bioacumulativa seja uma substância maiores serão os efeitos da exposição oral (Natal-da-Luz, 2019).

Quanto aos ensaios, estes devem ser adaptados ao contaminante testado. Um dos desafios deste ensaio, como refere Natal-da-Luz (2019), é a adaptação às propriedades do contaminante, uma vez que deve levar-se em conta, principalmente, o tempo de degradação da substância-teste, pelo que o período de pré-exposição das presas deve ser suficiente para as contaminar, mas não pode ser demasiado longo para não “perder” a substância através da degradação.

III.6. Conclusão

O inseticida Clorantriliprol não afetou nem a sobrevivência nem a reprodução dos *Hypoaspis aculeifer* expostos ao solo contaminado e a presas pré-expostas ao contaminante.

Quanto ao Espirotetramato, afetou negativamente a sobrevivência dos adultos nas duas doses mais altas (300 e 500 mg / kg) e a taxa de reprodução, apresentando um EC50 de 280 mg / kg. Esses resultados apresentaram uma

tendência de maior toxicidade do Espirotetramato para a espécie *H. aculeifer* quando, além da contaminação do solo, os organismos foram alimentadas com presas pré-expostas ao contaminante, se comparada com o teste padrão realizado apenas com solo contaminado. No entanto, são necessários mais ensaios tanto para confirmar esta tendência de maior toxicidade observada na exposição ao solo e comida contaminados, como para melhorar a técnica do ensaio e, possivelmente, propor alterações ao protocolo vigente.

REFERENCIAS:

- Cardoso, E. J. B. N., & Alves, P. R. L. (2012). Soil ecotoxicology. In *Ecotoxicology*. IntechOpen.
- EFSA (European Food Safety Authority), (2017). Panel on Plant Protection Products and their Residues, 2017. Scientific Opinion addressing the state of the science on risk assessment of plant protection products for in-soil organisms. *EFSA J.* 15 (2), 4690. In: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4690>, 225 pp.
- Fay, E. F., & Silva, C. (2004). Comportamento e destino de agrotóxicos no ambiente solo-água. SILVA, CMS, FAY, EF, *Agrotóxicos e ambiente*. EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Meio Ambiente, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 1ª ed. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 108-143.
- Huguiet, P., Manier, N., Owojori, O.J., Bauda, P., Pandard, P., Rombke, J., (2015). The use of soil mites in ecotoxicology: a review. *Ecotoxicology* 24, 1e18.
- ISO (2017). Soil Qualityd Inhibition of Reproduction of Soil Mite (*Hypoaspis aculeifer*) by Soil Contaminants. ISO/DIS 21285. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

- Jänsch, S., Amorim, M. J., & Römbke, J. (2005). Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. *Environmental Reviews*, 13(2), 51-83.
- Jegade, O. O., Owojori, O. J., & Römbke, J. (2017). Temperature influences the toxicity of deltamethrin, chlorpyrifos and dimethoate to the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Acari) and the springtail *Folsomia candida* (Collembola). *Ecotoxicology and environmental safety*, 140, 214-221.
- Lesna, I., Conijn, C. G. M., Sabelis, M. W., & Van Straalen, N. M. (2000). Biological control of the bulb mite, *Rhizoglyphus robini*, by the predatory mite, *Hypoaspis aculeifer*, on lilies: predator-prey dynamics in the soil, under greenhouse and field conditions. *Biocontrol Science and Technology*, 10(2), 179-193.
- Natal-da-Luz, T., Gevaert, T., Pereira, C., Alves, D., Arena, M., & Sousa, J. P. (2019). Should oral exposure in *Hypoaspis aculeifer* tests be considered in order to keep them in Tier I test battery for ecological risk assessment of PPPs?. *Environmental pollution*, 244, 871-876.
- Nunes, M. E. T. (2010). 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 (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- OECD (2008). Guidelines for the Testing of Chemicals - Predatory Mite (*Hypoaspis* (*Geolaelaps*) *aculeifer*) Reproduction Test in Soil. Organisation for Economic Co-operation and Development. No. 226.
- OECD (2010). Guidelines for the Testing of Chemicals e Biopaccumulation in Terrestrial Oligochaetes. Organisation for Economic Co-operation and Development. No. 317
- Owojori, O.J., Waszak, K., Rombke, J., (2014). Avoidance and reproduction tests with the predatory mite *Hypoaspis aculeifer*: effects of different chemical substances. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 230e237

- Princz, J., Jatar, M., Lemieux, H., & Scroggins, R. (2018). Perfluorooctane sulfonate in surface soils: Effects on reproduction in the collembolan, *Folsomia candida*, and the oribatid mite, *Oppia nitens*. *Chemosphere*, 208, 757-763.
- Shugart LR, (2009). editor. *Emerging Topics in Ecotoxicology: Principles, Approaches and Perspectives*. Oak Ridge: Springer Science. 400p.
- STATSOFT, Inc. (2004). STATISTICA (data analysis software system), version 7. www.statsoft.com.
- Vänninen, I., & Koskula, H. (2004). Biocontrol of the shore fly *Scatella tenuicosta* with *Hypoaspis miles* and *H. aculeifer* in peat pots. *BioControl*, 49(2), 137-152.
- Van Gestel, C. A. (2012). Soil ecotoxicology: state of the art and future directions. *ZooKeys*, (176), 275.
- Walter, D.E., Proctor, H.C., (2013). Mites: ecology, evolution & behaviour. In: *Mites: Ecology, Evolution & Behaviour: Life at a Microscale*, second ed. pp. 1–494. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-7164-2>