



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO -
UNIRIO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - PPGBio
MESTRADO EM BIODIVERSIDADE NEOTROPICAL**

Patrícia Christina Genázio Pereira

**Efeitos ecotoxicológicos do fungicida imazalil e seus subprodutos de
fotocatálise em *Eisenia andrei***

Rio de Janeiro
2018

Patrícia Christina Genázio Pereira

Efeitos ecotoxicológicos do fungicida imazalil e seus subprodutos de fotocatalise em *Eisenia andrei*

Dissertação apresentada ao Programa de
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, da Universidade Federal do
Estado do Rio de Janeiro como requisito
para obtenção do grau de Mestre em
Biodiversidade Neotropical.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Veríssimo Correia
Co-orientador: Prof. Dr. Enrico Mendes Saggioro

Rio de Janeiro

2018

G436 Genázio Pereira, Patricia Christina
Efeitos ecotoxicológicos do fungicida imazalil e
seus subprodutos de fotocatálise em *Eisenia andrei*
/ Patricia Christina Genázio Pereira. -- Rio de
Janeiro, 2018.

86

Orientador: Fábio Veríssimo Correia.
Coorientador: Enrico Mendes Saggioro.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do
Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas, 2018.

1. Biomarcador. 2. *Eisenia andrei*. 3. Pesticida.
4. Processos Oxidativos Avançados. 5. Toxicidade. I.
Veríssimo Correia, Fábio, orient. II. Saggioro,
Enrico Mendes, coorient. III. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (UNIRIO)

Instituto de Biociências (IBIO)

Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (PPGBIO)



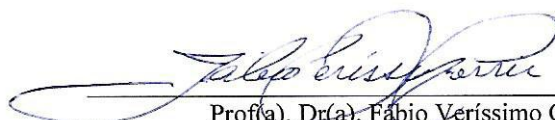
ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 68

Aos vinte e oito dias do mês de fevereiro de dois mil e dezoito, às 14 horas, realizou-se na sala 502 do Instituto de Biociências (Av. Pasteur 458), do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, a defesa da dissertação intitulada *Efeitos ecotoxicológicos do fungicida Imazalil e seus subprodutos de fotocatalise em Eisenia andrei* do(a) Mestrando(a) **Patrícia Christina Genázio Pereira** do Mestrado em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas (Biodiversidade Neotropical). A presente dissertação foi orientada pelo(a) Prof(a). Dr(a). Fábio Veríssimo Correia e coorientada pelo(a) Prof(a) Dr(a). Enrico Mendes Saggiaro. A Banca Examinadora foi constituída pelos professores, a saber: Prof(a). Dr(a). Cláudia Alessandra Fortes e Prof(a). Dr(a). Rachel Ann Hauser-Davis, com suplência do(a) Prof(a). Dr(a). Samira da Guia Mello Portugal. Após arguir o(a) mestrando(a) e considerar que o(a) mesmo(a) demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização dos dados, a Banca Examinadora houve por bem aprová-lo(a) com conceito A.

Rio de Janeiro, 28 de fevereiro de 2018.


Prof(a). Dr(a). Cláudia Alessandra Fortes (UNIRIO)


Prof(a). Dr(a). Rachel Ann Hauser-Davis (FIOCRUZ)


Prof(a). Dr(a). Fábio Veríssimo Correia (UNIRIO)
(Presidente da Banca)

Resumo

A biodiversidade é fundamental para o equilíbrio e a estabilidade dos ecossistemas. Mesmo assim vem sofrendo ameaças, dentre estas, destaca-se a contaminação por agrotóxicos. O imazalil (IMZ) é um fungicida que apresenta efeitos teratogênicos, danos genéticos e efeitos adversos nos sistemas reprodutivos e neurocomportamentais de organismos. Por ser comumente utilizado no tratamento de pós colheita de cítricos, foi detectado em águas residuais de indústrias alimentícias. Os processos oxidativos avançados (POA's) possuem capacidade de reagir com diversos compostos orgânicos e degradá-los. O presente estudo tem como objetivo analisar possíveis efeitos tóxicos do IMZ e a seus subprodutos de fotocatalise em anelídeos da espécie *Eisenia andrei*. Para isso foi realizada a degradação do IMZ utilizando a fotólise e fotocatalise para determinar a metodologia mais eficiente a ser utilizada nos ensaios ecotoxicológicos. Após a determinação, foram realizados ensaios ecotoxicológicos com diferentes concentrações de IMZ (0,01 a 10 mg.L⁻¹) e diferentes tempos de fotocatalise (FP-6, FP-18, FP-35 e FP-90 min). Os ensaios consistiram em testes de contato (24-72 h), fuga, agudo (15 dias), crônico (45 dias) e análise de biomarcadores celulares (densidade, viabilidade e tipagem) e de estresse oxidativo (GST e catalase). Durante os ensaios o IMZ provocou danos morfológicos, rompimento de membranas de células do sistema imunológico, diminuição da viabilidade celular, aumento na proporção de Eleócitos e aumento da atividade enzimática da GST. Tais resultados indicam que o IMZ provoca citotoxicidade em anelídeos. As alterações observadas na atividade da GST podem estar relacionadas com mudanças na síntese de lipídios. Nos ensaios com os fotoprodutos, houve uma diminuição na reprodução, diminuição da GST e catalase (CAT), indicando que os fotoprodutos oriundos da degradação ainda apresentam toxicidade para os anelídeos. Como a toxicidade foi mais evidente no FP-90, esta pode estar relacionada com compostos como hidroxibenzenos e imidazol, que geralmente são formados ao final da reação de fotocatalise. Além disso, os organismos expostos ao IMZ e aos fotoprodutos não apresentaram repulsão ao fungicida, o que pode indicar comprometimento na sobrevivência da população a longo prazo. Ao final dos ensaios os fotoprodutos apresentaram menor toxicidade em relação ao IMZ, contudo, ambos possuem potencial tóxico e podem comprometer a saúde dos organismos e do ambiente.

Palavras-chaves: Biomarcador; *Eisenia andrei*; pesticida; processos oxidativos avançados; toxicidade.

Abstract

Biodiversity is essential to the balance and stability of ecosystems and yet, it is under threat. Among these is highlighted the contamination by pesticides. Imazalil (IMZ) is a fungicide that causes teratogenic effects, genetic damages and adverse effects on the reproductive and neurobehavioral systems of organisms. As IMZ is commonly used in citric post-harvest treatment, it has been detected in residual water from food industries. Advanced oxidative processes (AOPs) have the ability to react and degrade several organic compounds. This study aimed to analyze possible toxic effects of IMZ and its photocatalysis products on annelids of the species *Eisenia andrei*. For this purpose, IMZ degradation was performed using photolysis and photocatalysis to determine the most efficient methodology to be used in the ecotoxicological assays. When the best method was determined, ecotoxicological assays with different concentrations of IMZ (0.01 to 10 mg.L⁻¹) and different times of photocatalysis (FP-6, FP-18, FP-35 and FP-90 min) were performed. The assays consisted of contact tests (24-72 h), avoidance tests, acute (15 days) and chronic test (45 days) and cellular (density viability and cell typing) and oxidative stress biomarkers (GST and catalasys) analyses. During the assays the IMZ caused morphologic damages, membrane ruptures of immunologic system cells, decreasing the cellular viability and increasing the proportion of eleocytes and GST. These results indicate that IMZ causes cytotoxicity in annelids. The alterations observed of GST may be related with changes to lipid synthesis. In the photoproduct assays, there was a decrease in reproduction, decrease of GST and catalasys (CAT). This indicated that the photoproducts generated on IMZ degradation still cause toxicity to annelids. As the most evident toxicity was observed for FP-90, it can be related to compounds as hydroxybenzenes and imidazol. They are usually generated at the end of the photocatalysis reaction. Besides, organisms exposed to IMZ and its photoproducts were not repelled by the fungicide, which can indicate compromising effects on the survival of the population in long terms. At the end of the assays, photoproducts showed lower toxicity in comparison to IMZ. Both however have toxic potential and can compromise the health of organisms and the environment.

Key-words: Advanced oxidative processes; biomarkers; *Eisenia andrei*; pesticide; toxicity.

Lista de Ilustrações

Figura 1 - Ranking dos países com maior consumo total de agrotóxicos. Adaptado de FAO, 2017.	16
Figura 2 - Ranking dos países com maior consumo em Kg.ha ⁻¹ de agrotóxicos. Adaptado de FAO, 2017.	16
Figura 3 - Comparação entre a porcentagem da venda de agrotóxico e de área de plantio no Brasil durante o período de 2000-2014. Adaptado de IBAMA, 2016; IBGE, 2017	17
Figura 4 - Consumo, no Brasil, de agrotóxico por hectare ao longo dos anos (2000-2014). Adaptado de FAO, 2017.....	17
Figura 5 - Dinâmica dos agrotóxicos no meio ambiente. Adaptado de DORES & LAMONICA-FREIRE, 1999.	18
Figura 6: Representação esquemática das fases de biotransformação de xenobióticos. Adaptado de BASTOS, 2006.	26
Figura 7 - Sistema de defesa enzimático contra o estresse oxidativo. Adaptado de BARREIROS et al., 2006.....	27
Figura 8 - Estrutura química do IMZ.	28
Figura 9 – Esquema da oxidação e mineralização de contaminantes orgânicos através dos POA's.	31
Figura 10 – Diferentes metodologias de aplicação de Processos Oxidativos Avançados (POA's).....	31
Figura 11 - Esquema do ensaio de contato realizado com o IMZ e os diferentes tempos de fotocatalise.....	40
Figura 12 - Esquema do teste de fuga realizado com IMZ e os diferentes tempos de fotocatalise.....	41
Figura 13 - Esquema do ensaio agudo e crônico realizado com o IMZ e os diferentes tempos de fotocatalise	43
Figura 14 - Esquema do ensaio de reprodução realizado com o IMZ e seus diferentes tempos de fotocatalise	43
Figura 15 - Esquema da análise de fluido celômico de anelídeos expostos ao IMZ e seus diferentes tempos de fotocatalise.....	44
Figura 16 - Esquema da análise de enzimas de estresse oxidativos de anelídeos expostos ao IMZ e seus diferentes tempos de fotocatalise.....	46
Figura 17 - Gráfico comparativo das diferentes fotodegradações realizadas.....	48

Figura 18 – Gráfico da variação da biomassa de anelídeos expostos ao IMZ durante o ensaio de contato.....	49
Figura 19 - Alterações morfológicas observadas em anelídeos expostos ao IMZ durante o ensaio de contato.	50
Figura 20: Células do sistema imunológico de anelídeos da espécie <i>E. andrei</i>	50
Figura 21 – Gráfico da proporção de células encontradas no fluido celômico de anelídeos da espécie <i>E. andrei</i> expostos ao IMZ durante o ensaio de contato: (a) 24 h; (b) 48 h; (c) 72 h. * Difere estatisticamente do controle ($p < 0,05$)	51
Figura 22 – Gráfico da (a) densidade e (b) viabilidade celular dos organismos exposto ao IMZ durante o ensaio de contato. * Difere estatisticamente do controle ($p < 0,05$).....	52
Figura 23 – Gráfico da quantificação de (a) GST e (b) CAT em anelídeos expostos ao IMZ durante o ensaio de contato. * Difere estatisticamente do controle ($p < 0,05$).....	52
Figura 24 – Gráfico da variação da biomassa de anelídeos expostos aos diferentes tempos de fotocatalise durante o ensaio de contato. *FP-6. Fotoproducto de 6 min. FP18. Fotoproducto de 18 min. FP-35. Fotoproducto de 35 min. FP-90. Fotoproducto de 90 min.....	53
Figura 25 – Gráfico da proporção de células encontradas no fluido celômico de anelídeos expostos a diferentes tempos de fotocatalise do IMZ durante o ensaio de contato: (a) 24 h (b) 48 h (c) 72 h. * Difere estatisticamente do controle ($p < 0,05$). FP-6. Fotoproducto de 6 min. FP18. Fotoproducto de 18 min. FP-35. Fotoproducto de 35 min. FP-90. Fotoproducto de 90 min.	54
Figura 26 – Gráfico da (a) densidade e (b) viabilidade celular de organismos expostos aos diferentes tempos de fotocatalise do IMZ durante o ensaio de contato. * Difere estatisticamente do controle ($p < 0,05$). FP-6. Fotoproducto de 6 min. FP18. Fotoproducto de 18 min. FP-35. Fotoproducto de 35 min. FP-90. Fotoproducto de 90 min.	55
Figura 27 – Gráfico da atividade enzimática de (a) GST e (b) CAT em organismos expostos aos diferentes tempos de fotocatalise do IMZ durante o ensaio de contato. * Difere estatisticamente do controle ($p < 0,05$). FP-6. Fotoproducto de 6 min. FP18. Fotoproducto de 18 min. FP-35. Fotoproducto de 35 min. FP-90. Fotoproducto de 90 min.	56
Figura 28 – Gráfico com o percentual de fuga dos organismos expostos a diferentes concentrações (a) IMZ e (b) tempos de fotocatalise. FP-6. Fotoproducto de 6 min. FP18. Fotoproducto de 18 min. FP-35. Fotoproducto de 35 min. FP-90. Fotoproducto de 90 min.....	56
Figura 29 – Gráfico da variação da biomassa de anelídeos expostos ao IMZ durante o ensaio agudo e crônico. * Difere estatisticamente do tempo inicial ($p < 0,05$).....	57

Figura 30 – Gráfico com o total de juvenis encontrados em cada concentração após ensaio de reprodução com IMZ.	58
Figura 31 – Gráfico com proporção de células encontradas no fluido celômico de anelídeos expostos ao IMZ durante o ensaio agudo e crônico: (a) 15 dias (b) 30 dias (c) 45 dias. * Difere estatisticamente do controle ($p < 0,05$).	59
Figura 32 - Anomalias celulares observadas em coelomócitos de anelídeos expostos ao IMZ durante o ensaio agudo e crônico.	59
Figura 33 – Gráfico de (a) densidade e (b) viabilidade celular dos organismos expostos as diferentes concentrações de IMZ durante ensaio crônico. * Difere estatisticamente do controle ($p < 0,05$).	60
Figura 34 – Gráfico da atividade enzimática da (a) GST e (b) CAT de anelídeos expostos ao IMZ durante o ensaio agudo e crônico. * Difere estatisticamente do controle ($p < 0,05$).	61
Figura 35 – Gráfico da variação da biomassa de anelídeos expostos aos diferentes tempos de fotocatalise do IMZ durante o ensaio agudo e crônico. FP-6. Fotoproducto de 6 min. FP18. Fotoproducto de 18 min. FP-35. Fotoproducto de 35 min. FP-90. Fotoproducto de 90 min.	62
Figura 36 – Gráfico com o total de juvenis de anelídeos encontrados nos diferentes tempos de fotocatalise durante o ensaio de reprodução. * Difere estatisticamente do controle ($p < 0,05$). FP-6. Fotoproducto de 6 min. FP18. Fotoproducto de 18 min. FP-35. Fotoproducto de 35 min. FP-90. Fotoproducto de 90 min.	62
Figura 37 – Gráfico da proporção de células encontradas no fluido celômico de anelídeos expostos aos diferentes tempos de fotocatalise do IMZ durante o ensaio agudo e crônico: (a) 15 dias (b) 30 dias (c) 45 dias. FP-6. Fotoproducto de 6 min. FP18. Fotoproducto de 18 min. FP-35. Fotoproducto de 35 min. FP-90. Fotoproducto de 90 min.	63
Figura 38 – Gráfico da (a) densidade e (b) viabilidade celular de organismos expostos aos diferentes tempos de fotocatalise durante o ensaio agudo e crônico. * Difere estatisticamente do controle ($p < 0,05$). FP-6. Fotoproducto de 6 min. FP18. Fotoproducto de 18 min. FP-35. Fotoproducto de 35 min. FP-90. Fotoproducto de 90 min.	64
Figura 39 - Gráfico da atividade enzimática da (a) GST e (b) CAT de organismos expostos aos diferentes tempos de fotocatalise do IMZ durante o ensaio agudo e crônico. * Difere estatisticamente do controle ($p < 0,05$). FP-6. Fotoproducto de 6 min. FP18. Fotoproducto de 18 min. FP-35. Fotoproducto de 35 min. FP-90. Fotoproducto de 90 min.	64

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos. Adaptado de Lei Federal 7.802 (BRASIL, 1989).	14
Tabela 2 - Classificação ambiental dos agrotóxicos. Adaptado de IBAMA, portaria normativa nº 84 de 15 de Outubro de 1996.	15
Tabela 3 - Método cromatográfico utilizado na identificação e quantificação do IMZ.	36
Tabela 4 - Características do Latossolo Vermelho amarelo.	39

Lista de Siglas

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA – Análise de Variância
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAT – Catalase
CC – Capacidade de Campo
CDB – Convenção de Diversidade Biológica
CDNB – s-chloro-2,4-dinitrobenzene
CE₅₀ – Concentração Efetiva
CENO – Concentração de Efeito Não Observado
CEO – Concentração de Efeito Observado
CESTEH – Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana
CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo
CH₃O⁻ – Ânion metóxi
CH₃OH – Metanol
CL₅₀ – Concentração Letal necessária para matar 50% da população
CO₂ – Gás carbônico
CYP51 – esteroide 14 α -desmetilase
DDT – Diclorodifeniltricloroetano
DL₅₀ – Dose Letal necessária para matar 50% da população
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPA – Agência de Proteção Ambiental
ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio
ERO – Espécies Reativas de Oxigênio
FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
Fe – Ferro
FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz
FP-6 – Fotoprodutos de IMZ após 6 minutos de fotocatalise
FP-18 – Fotoprodutos de IMZ após 18 minutos de fotocatalise
FP-35 – Fotoprodutos de IMZ após 35 minutos de fotocatalise
FP-90 – Fotoprodutos de IMZ após 90 minutos de fotocatalise

GPx – Glutathione peroxidase
GR – Glutathione reduced
GSH – L-glutathione reduced
GST – Glutathione-S-transferase
H₂O – Água
H₂O₂ – Peroxide of hydrogen
HCB – Hexachlorobenzene
HNO₄ – Nitrous acid
HPLC-DAD – High Performance Liquid Chromatography with Diode Array detector
i.a – active ingredients
IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IMZ – Imazalil
ISO – International Organization for Standardization
K₂HPO₄ – Potassium dibasic phosphate
KCl – Potassium chloride
KH₂PO₄ – Potassium monobasic phosphate
K_{oc} – Coefficient of partition of organic carbon-water
K_{ow} – Coefficient of partition octanol-water
LBSS – Lumbricus Balanced Salt Solution
MgSO₄ – Magnesium sulfate
MMA – Ministry of the Environment
NaCl – Sodium chloride
Na₂HPO₄ – Potassium dibasic phosphate
NaHCO₃ – Sodium bicarbonate
NaOH – Sodium hydroxide
NO[•] – Nitric oxide
NO₂⁻ – Nitrites
NO₃⁻ – Nitrates
NBR – Brazilian Norm
O₂ – Oxygen
O₂^{•-} – Superoxide radical
•OH – Hydroxyl radical
OECD – Organization for Economic Cooperation and Development

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCBs – Bifenilas policloradas

PeCB – Pentaclorobenzeno

pKa – Constante de ionização

POA's – Processos Oxidativos Avançados

RL – Resposta Líquida

rpm – Rotação por minuto

S – Solubilidade em água

SOD – Superóxido desmutase

T_{1/2} – Meia vida

TiO₂ – Dióxido de titânio

USEPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

UV – Ultra-violeta

UVC – Ultra-violeta-C

UV-Vis – Ultra-violeta visível

VP – Pressão de vapor

Sumário

<u>1</u>	<u>INTRODUÇÃO.....</u>	<u>12</u>
1.1.	AGROTÓXICOS	13
1.2.	DINÂMICA DOS AGROTÓXICOS NO AMBIENTE	18
1.3.	CONTAMINAÇÃO DA BIOTA	20
1.4.	BIOINDICADORES	22
1.5.	BIOMARCADORES	24
1.6.	IMAZALIL.....	28
1.7.	PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS (POA'S)	30
<u>2</u>	<u>JUSTIFICATIVA</u>	<u>33</u>
<u>3</u>	<u>OBJETIVOS.....</u>	<u>35</u>
3.1.	OBJETIVO GERAL	35
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
3.3.	HIPÓTESES.....	35
<u>4</u>	<u>MATERIAL E MÉTODOS</u>	<u>36</u>
4.1.	FOTODEGRADAÇÃO DO IMAZALIL	36
4.1.1.	MÉTODO CROMATOGRÁFICO	36
4.1.2.	FOTODEGRADAÇÃO COM RADIAÇÃO UV-VIS	36
4.1.3.	FOTOCATÁLISE COM TiO ₂ – FOTOCATÁLISE I E II.....	37
4.1.4.	FOTOCATÁLISE COM TiO ₂ SUPORTADO – FOTOCATÁLISE III.....	37
4.1.5.	ANÁLISE DE DADOS	38
4.2.	ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS.....	39
4.2.1.	SOLO	39
4.2.2.	ORGANISMO TESTE	39
4.2.3.	ENSAIO DE CONTATO E CL ₅₀	40
4.2.4.	ENSAIO DE FUGA.....	41
4.2.5.	ENSAIO AGUDO E CRÔNICO EM SOLO.....	42
4.2.6.	ENSAIO DE REPRODUÇÃO	43

4.3.	DETERMINAÇÃO DOS BIOMARCADORES	43
4.3.1.	COLETA DO FLUIDO CELÔMICO	44
4.3.2.	ENZIMAS DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	45
4.4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5	<u>RESULTADOS</u>	<u>48</u>
5.1.	FOTODEGRADAÇÃO DO IMAZALIL	48
5.2.	ENSAIO DE CONTATO: IMAZALIL	49
5.2.1.	FLUIDO CELÔMICO	50
5.2.2.	ESTRESSE OXIDATIVO	52
5.3.	ENSAIO DE CONTATO: PRODUTOS DE FOTOCATÁLISE	53
5.3.1.	FLUIDO CELÔMICO	53
5.3.2.	ESTRESSE OXIDATIVO	55
5.4.	ENSAIO DE FUGA: IMAZALIL E SEUS PRODUTOS DE FOTOCATÁLISE	56
5.5.	ENSAIO AGUDO E CRÔNICO: IMAZALIL	57
5.5.1.	REPRODUÇÃO	57
5.5.2.	FLUIDO CELÔMICO	58
5.5.3.	ESTRESSE OXIDATIVO	60
5.6.	ENSAIO AGUDO E CRÔNICO: PRODUTOS DE FOTOCATÁLISE	61
5.6.1.	REPRODUÇÃO	62
5.6.2.	FLUIDO CELÔMICO	63
5.6.3.	ESTRESSE OXIDATIVO	64
6	<u>DISCUSSÃO.....</u>	<u>66</u>
7	<u>CONCLUSÃO</u>	<u>73</u>
	<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>74</u>

1 INTRODUÇÃO

A Convenção de Diversidade Biológica (CDB), de acordo com o Ministério do Meio Ambiente - MMA (2018), conceituou a biodiversidade ou diversidade biológica, em seu artigo 2º, como:

“ a variabilidade de organismos vivos de todas as origens, compreendendo, dentre outros, os ecossistemas terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos e os complexos ecológicos de que fazem parte, compreendendo ainda a diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas.”

Tendo em vista que, os distintos ecossistemas existentes no nosso planeta apresentam uma desigualdade na distribuição da biodiversidade, o Brasil assume então um papel de destaque, pois é o país com maior diversidade de espécies no mundo (MMA, 2017). Aproximadamente 103.870 espécies de animais e 43.020 espécies de vegetais estão presentes no país, abrigando assim, cerca de 20% do total de espécies já identificadas no mundo, sendo a maioria endêmica. Com o intuito de conservar e utilizar de maneira sustentável a diversidade que possui, o país passou a incorporar as recomendações da CDB, dentre elas, a elaboração de um relatório anual sobre a situação da diversidade no Brasil (MMA, 2017). No entanto, apesar dos esforços para conseguir alcançar as Metas de Biodiversidade Aichi, determinadas pela CDB, as iniciativas propostas não estão sendo suficientes para que as metas sejam cumpridas até 2020. De acordo com o Panorama da Diversidade Global 4 apresentado pelo Secretariado da Convenção de Diversidade Biológica (2014), as pressões que atuam sobre a biodiversidade têm aumentado cada vez mais, fazendo com que a diversidade biológica continue em declínio. Os esforços aplicados no Brasil não têm sido suficientes para superar os impactos ambientais, e a perda de biodiversidade vem aumentando consideravelmente ao longo dos anos.

Rountree (2015) discorre brevemente sobre algumas razões pelas quais vêm ocorrendo a perda de biodiversidade em nosso planeta. Entre suas justificativas o autor aponta a perda de habitat como sendo o principal processo de impacto, citando como um dos seus exemplos o desmatamento na floresta Amazônica brasileira para implantação do manejo da pecuária e/ou agricultura. Tem sido estimado que pelo menos 70% da perda da diversidade biológica terrestre ocorrerá devido a ação de setores relacionados à agricultura (SECRETARIADO DA CONVENÇÃO DE DIVERSIDADE BIOLÓGICA, 2014). A troca do ecossistema natural pelo agroecossistema para intensificação da

produção de alimentos intensifica este impacto. Principalmente com a expansão de monoculturas, quando a degradação do ambiente natural, promove a redução da biodiversidade local (ODUM, 1988). Essa redução pode ocorrer de diversas formas, dentre elas a perda de habitats de pastagens e florestas através do desmatamento para implantação da agricultura, assim como a drenagem de áreas úmidas. Estas alterações no ambiente podem favorecer o afugentamento ou até mesmo a extinção local de pássaros, primatas, insetos e plantas nativas (VIEIRA *et al.*, 2008). Além disso, há também a perda da diversidade genética pela substituição de linhagens selvagens por variedades de monocultura, que na maioria das vezes vêm acompanhadas do processo de fertilização (VIEIRA *et al.*, 2008; MILLER, 2013).

Nos sistemas agrícolas a biodiversidade desempenha diversos serviços ecossistêmicos, entre eles a ciclagem de nutrientes, controle do microclima local, regulação dos processos hidrológicos e a regulação da abundância de organismos indesejáveis (ALTIERE, 1999). No entanto, a simplificação biológica promovida pela monocultura favorece a perda das características de autorregulação dos ecossistemas afetados, levando assim à redução da atuação dos elementos de controle natural, além de alterações na dinâmica entre os seres vivos (ODUM, 1988). Originando então, um ecossistema artificial que requer intervenção humana a todo o momento (ALTIERE, 1999). Uma dessas intervenções ocorre através do aumento do uso de agrotóxicos.

1.1. AGROTÓXICOS

Devido à necessidade de uma produção intensa de alimentos, o ecossistema natural começou a ser visto como um agroecossistema, e então a produtividade agrícola passou a ser caracterizada principalmente pela homogeneização da paisagem e pelo aumento do uso de agrotóxicos (JELIAZKOV, 2016).

De acordo com o artigo 2 da Lei Federal 7.802 (BRASIL, 1989), os agrotóxicos são definidos como:

“produtos e os componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento”.

Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com o ser vivo ao qual estão destinados a combater, então temos: inseticidas, larvicidas, herbicidas, fungicidas, acaricidas, carrapaticidas, formicidas, raticidas, entre outros. Além disso, também podem ser classificados de acordo com sua classe toxicológica (Tabela 1), determinada pela ANVISA, e ambiental (Tabela 2), determinada pelo IBAMA.

Para a ANVISA, portaria nº 0392 de Janeiro de 1992, o estudo de toxicidade de um agrotóxico é realizado através de ensaios com ratos para determinar a dose letal (DL) necessária para matar 50% dos organismos. A dose do ingrediente ativo do produto a ser analisado é ingerida pelo rato por via oral e o resultado é expresso em mg.Kg^{-1} de peso vivo. Outros ensaios para determinar a DL_{50} de um agrotóxico podem ser utilizados, como contato com a pele ou inalação, contudo, o mais utilizado é o ensaio por via oral.

Tabela 1 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos. Adaptado de Lei Federal 7.802 (BRASIL, 1989).

*DL: Dose letal.

Classe toxicológica	Toxicidade	DL* (mg.Kg^{-1})
I	Extremamente tóxico	≤ 5
II	Altamente tóxico	Entre 5 e 50
III	Medianamente tóxico	Entre 50 e 500
IV	Pouco tóxico	Entre 500 e 5000

De acordo com a portaria normativa nº 84 de 15 de Outubro de 1996, os ensaios realizados pelo IBAMA para determinação do nível de periculosidade ambientais de um agrotóxico pode ser determinado através de diversos parâmetros. Dentre estes, destacam-se os parâmetros de bioacumulação, persistência e transporte do agrotóxico no ambiente, além da toxicidade do mesmo em organismos. Os organismos utilizados para os ensaios de toxicidade do IBAMA podem incluir peixes, microcrustáceos, algas, minhocas, abelhas, microorganismos do solo, entre outros classificados como organismos não-alvos. Contudo, é válido destacar que os ensaios relacionados estes organismos podem ou não ser solicitado pelo IBAMA como requisito para obtenção da licença do agrotóxico. No Manual para requerimento de avaliação ambiental (IBAMA, 2009) é informado que na primeira fase para obtenção da licença são solicitados apenas os dados físicos e químicos do agrotóxico a ser avaliado. Caso o IBAMA julgue necessário, pode solicitar uma segunda fase. Nesta, é analisada a toxicidade oral,

inalatória, cutânea, além da mutagenicidade gênica e cromossômica do composto em animais superiores. Após estes ensaios, caso não haja equivalência nos dados, o IBAMA pode solicitar ensaios ecotoxicológicos. Na fase três os ensaios requeridos estão relacionados a análises aguda e crônica, além de avaliação de teratogenicidade, carcinogenicidade, neurotoxicidade e efeitos hormonais. Neste caso, a definição dos organismos utilizados nos ensaios irá depender do tipo de produto que está sendo analisado e também de seu organismo alvo (IBAMA, 2009).

Tabela 2 - Classificação ambiental dos agrotóxicos. Adaptado de IBAMA, portaria normativa nº 84 de 15 de Outubro de 1996.

Classificação ambiental	Periculosidade
I	Altamente perigoso
II	Muito perigoso
III	Perigoso
IV	Pouco perigoso

Até o ano de 2014 o consumo de agrotóxicos em todo o mundo foi de cerca de 2 milhões de toneladas por ano. Dentre os agrotóxicos mais consumidos, temos os herbicidas (47,5%), inseticidas (29,5%) e os fungicidas (17,5%). Os outros agrotóxicos como, acaricidas, formicidas e carrapaticidas, em conjunto, contemplam um total de 5,5% de pesticidas consumidos no mundo (DE *et al.*, 2014).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2017) até 2014 os países que mais consumiram agrotóxicos foram China, Brasil, França, Itália, Espanha, Índia, Colômbia, Inglaterra, Chile e Turquia (Figura 1). Porém é importante destacar que esses resultados estão relacionados ao consumo total, pois quando é realizada a divisão destes valores pelas áreas de cultivo, os resultados se alteram. Os maiores consumidores passam a ser as Ilhas Maldivas, Ilhas Maurícias, Trinidad e Tobago, Colômbia, Chile, China, Ilhas Maltesas, Japão, República da Coreia e Holanda (Figura 2).

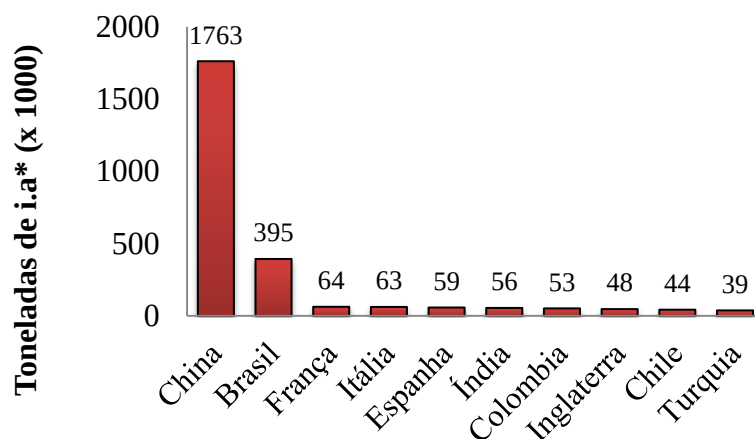


Figura 1 - Ranking dos países com maior consumo total de agrotóxicos. Adaptado de FAO, 2017.
*i.a: ingrediente ativo

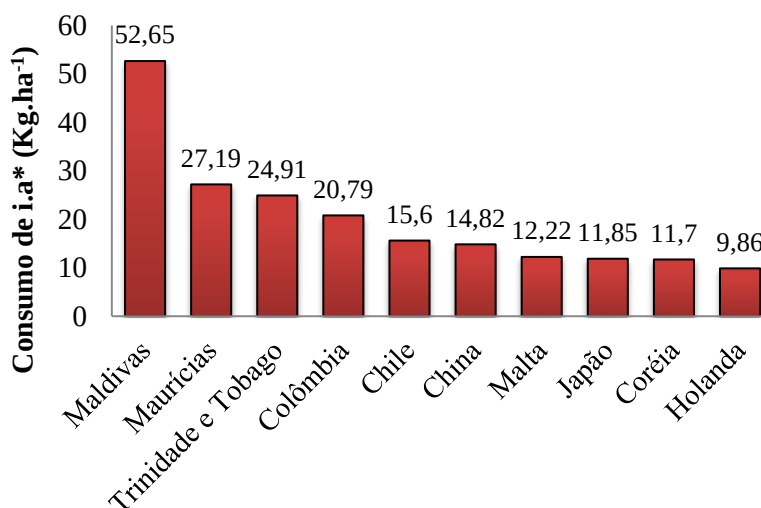


Figura 2 - Ranking dos países com maior consumo em Kg.ha⁻¹ de agrotóxicos. Adaptado de FAO, 2017.
*i.a: ingrediente ativo

No Brasil, o consumo de agrotóxicos ultrapassa 500 mil toneladas ao ano, isto representa um aumento de mais de 200% nos últimos 14 anos (IBAMA, 2016). Enquanto isso, a área de produção agrícola teve um aumento de apenas 47% (IBGE, 2017) neste mesmo período. Quando feita uma correlação entre esses dois dados (Figura 3) há um aumento considerável no uso de agrotóxicos por hectare FAO (2017). Estas porcentagens correspondem a um aumento no uso de agrotóxicos de 1,98 Kg.ha⁻¹ em 2000 para 4,36 Kg.ha⁻¹ em 2014 (Figura 4). Além disso, há diversos pesticidas que são utilizados no Brasil, mas são proibidos em outros países devido a seus efeitos ao meio ambiente e à saúde humana. Tais como: Abamectina, Acefato, Carbofurano, Fosmete, Lactofen, Paraquate, Parationa, Thiram, dentre outros (ANVISA, 2018).

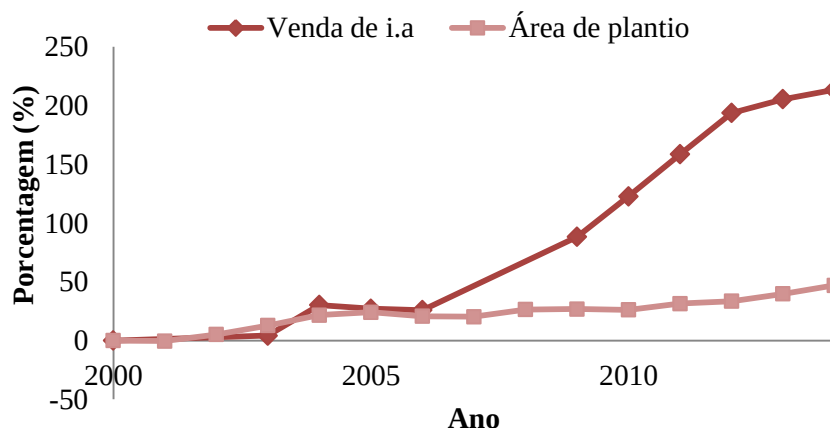


Figura 3 - Comparação entre a porcentagem da venda de agrotóxico e de área de plantio no Brasil durante o período de 2000-2014. Adaptado de IBAMA, 2016; IBGE, 2017

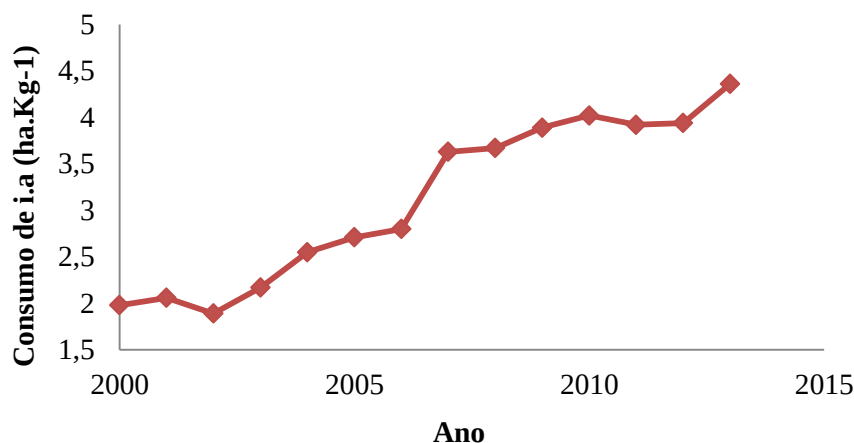


Figura 4 - Consumo, no Brasil, de agrotóxico por hectare ao longo dos anos (2000-2014). Adaptado de FAO, 2017.

Muitas são as justificativas para o uso de agrotóxico, contudo, há também grandes consequências advindas de seu uso, principalmente quando este uso é realizado de modo indiscriminado ou quando há falta de regulamentação das substâncias tidas como ingredientes ativos (i.a). Dentre as consequências podemos destacar a contaminação ambiental, podendo comprometer a saúde da biota e até mesmo da população humana (DORES & LAMONICA-FREIRE, 1999).

Para Beketova *et al.* (2013) o objetivo dos países de reduzir a perda de biodiversidade até 2020 pode estar comprometida, pois em seu estudo estes autores observaram declínios na biodiversidade em relação ao uso intensivo de agrotóxicos. Os autores destacam a perda de até 42% de espécies em rios contaminados da Europa e de 27% de famílias de invertebrados em rios contaminados da Austrália. Além disso, comentam

que mesmo rios contaminados por pesticidas em níveis aceitáveis pela regulamentação europeia, ainda assim apresentavam perda de biodiversidade.

Diversos outros estudos apontam para perda de biodiversidade devido ao uso intensivo de agrotóxicos e pelo fato de causarem danos em organismos não alvos. Geigera *et al.* (2010) identificaram que houve perda de biodiversidade de pássaros, besouros e plantas em fazendas que utilizavam pesticidas comparadas com áreas de plantio sem a utilização de agroquímicos. Dados semelhantes foram obtidos por Gibbs *et al.* (2009) onde observaram perda de espécies em áreas agrícolas, mas que a perda foi mais elevada nas áreas onde houve tratamento com pesticidas. Bonmatin *et al.* (2015) destacam que polinizadores, insetos herbívoros, organismos do edáficos e aquáticos, inevitavelmente, são os que mais sofrem com a exposição a pesticidas. Contudo, outros diversos organismos também sofrem diretamente com o uso intensivo de pesticidas, como, aves, que podem ser afetadas por inseticidas carbamatos ou organofosforados. Mas também há os efeitos indiretos, como por exemplo, a menor disponibilidade de alimento para animais insetívoros devido à utilização de inseticidas (ISENRING, 2010).

1.2. DINÂMICA DOS AGROTÓXICOS NO AMBIENTE

A contaminação ambiental por agrotóxicos ocorre por processos de transporte e transformação, governados por mecanismos físicos, químicos e biológicos que permitem a distribuição de pesticidas pelos ecossistemas aquático, terrestre e atmosférico. (Figura 5).

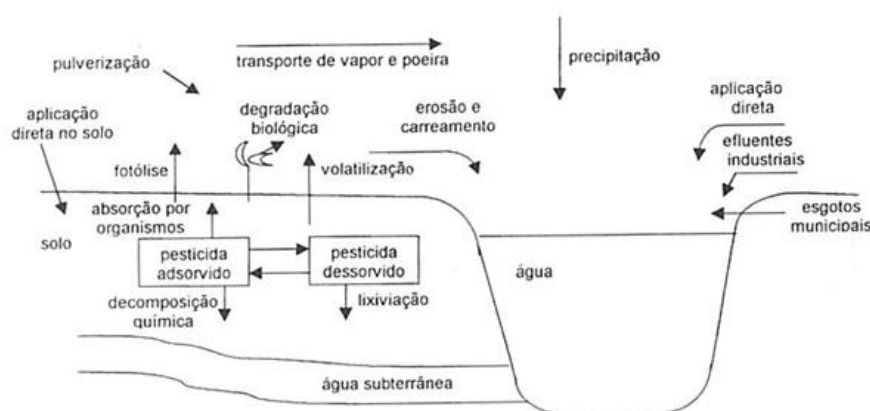


Figura 5 - Dinâmica dos agrotóxicos no meio ambiente. Adaptado de DORES & LAMONICA-FREIRE, 1999.

Dependendo da maneira que o pesticida é aplicado, o mesmo terá diferentes destinos; desde permanecer adsorvido no solo até ser transportado para locais distantes, como um município vizinho ou mesmo outro continente (DORES & LAMONICA-FREIRE, 1999). Diversos exemplos de ambientes distantes de campos de agricultura ou fazendas pecuaristas onde foram encontradas amostras de pesticidas são relatados em estudos. Kang *et al.* (2012) encontraram resíduos de pesticidas organoclorados na neve superficial do continente Antártico. Outro exemplo foi a pesquisa realizada por Meire *et al.* (2016) que detectaram Hexaclorobenzeno e Endosulfan em rios do Parque Nacional de São Joaquim – SC e do Parque Nacional do Itatiaia – RJ. Em ambos trabalhos os autores apontam que o transporte destes resíduos ocorreu através de massas de ar devido à volatilização dos compostos, sendo depois depositados pela precipitação. No entanto, esta não é a única forma de transporte dos pesticidas por via aérea, havendo também a deriva. Esta ocorre quando gotas emitidas pelo pulverizador, seja este terrestre ou aéreo, são carregadas pelo vento para outras áreas. Geralmente essas gotas são depositadas em locais distantes do ponto de emissão. A distância de transporte será inversamente proporcional ao tamanho da gota, ou seja, quanto menor gota maior será a distância de deriva (DORES & LAMONICA-FREIRE, 1999; CHAIM, 2004).

Quando ocorre a aplicação de agrotóxicos, além do transporte aéreo temos também a degradação, retenção ou transporte do composto no solo. Cada processo vai depender das características físicas e químicas de cada composto. Dentre essas características podemos destacar o grau de ionização (pK_a), solubilidade em água (S), pressão de vapor (VP), retenção pelo solo (coeficiente de partição carbono orgânico-água - K_{oc}) e tempo de meia vida ($T_{1/2}$) (FAY & SILVA, 2004).

A degradação dos pesticidas no solo pode ocorrer através da fotólise, ou seja, o composto é degradado a partir da irradiação solar. Também pode ocorrer por meio da interação com substâncias químicas presentes no solo ou mediante a ingestão e metabolização do composto por organismos edáficos (DORES & LAMONICA-FREIRE, 1999). Tanto as partículas degradadas quanto o composto não degradado, podem ser retidos no solo através da adsorção, isto é, uma interação entre os íons do pesticida com a superfície das partículas do solo. Esta interação pode se estabelecer por uma ligação forte ou fraca, dependendo das características do composto e do solo. Este processo tende a diminuir a mobilidade das moléculas orgânicas no solo. No entanto, com o passar tempo e dependendo da força dessa ligação, também pode ocorrer a

dessorção, processo inverso da adsorção (DORES & LAMONICA-FREIRE, 1999; FAY & SILVA, 2004).

As moléculas de pesticidas não adsorvidas pelo solo possuem uma tendência de se movimentar junto com a água, podendo ocorrer o transporte das mesmas para lençóis freáticos e outros corpos d'água, através da lixiviação. No entanto, mesmo quando adsorvidas no solo, estas podem ser transportadas através do escoamento superficial. Isto ocorre quando o volume de entrada de água excede o volume infiltrado no solo. Além das partículas adsorvidas, o escoamento também pode transportar compostos suspensos em material particulado, além de promover a diluição dos mesmos. No escoamento os fatores que mais influenciam no transporte são o volume de água e a inclinação do terreno (FAY & SILVA, 2004). Um exemplo disto foi o estudo realizado por Rabiet *et al.* (2010), neste os autores comentam que o aumento de chuvas e as épocas de cheias nos rios podem estar associadas ao aumento na concentração de agrotóxicos presentes em rios e lagos. Tais eventos ocorrem principalmente quando estes corpos d'água estão próximos de um campo de plantação que utiliza pesticidas.

Além do escoamento e da lixiviação, outro ponto de entrada dos pesticidas no ambiente aquático é através do despejo de águas residuais de indústrias, esgoto doméstico e devido ao controle de ervas e insetos aquáticos. Ao entrar no ambiente aquático o pesticida pode interagir com o sedimento ou com a matéria em suspensão, dependendo da solubilidade do composto e das características do sedimento. Assim como no solo, o pesticida em contato com o sedimento pode sofrer sorção, ou seja, adsorção e dessorção. E quando diluído em água ou mesmo associado a materiais particulados, pode ser degradado por meio da fotólise. Também pode acontecer de ser absorvido por organismos ou degradado por microrganismos (DORES & LAMONICA-FREIRE, 1999).

1.3. CONTAMINAÇÃO DA BIOTA

A contaminação do solo, das águas e do ar, tem um ponto em comum, todos eles possuem um ponto em comum que é a contaminação de organismos, sejam aqueles que vivem próximo ao local de aplicação ou a quilômetros de distância. Wang *et al.* (2015) comenta sobre a bioacumulação de pesticidas em peixes presentes no reservatório Três Gargantas, na China, localizado próximo a campos de plantação de arroz e laranja.

Dentre os pesticidas analisados, o DDT e seus derivados foram os contaminantes com presença predominante no organismo de todas as cinco espécies de peixes avaliadas. Outro exemplo da contaminação da biota por pesticida foi um estudo realizado por Colabuono *et al.* (2016). Neste, os autores identificaram colônias de Petreus da Antártica contaminados por compostos presentes na composição de pesticidas como, Hexaclorobenzeno (HCB) Bifenilas policloradas (PCBs) e Pentaclorobenzeno (PeCB). Além desses, também foi encontrado diclorodifeniltricloroetano (DDT) e alguns de seus derivados. As concentrações determinadas por ambos estudos indicaram altos níveis de contaminantes (Σ DDT's variando de 2,16 a 34,5 ng.g⁻¹ no sangue de indivíduos adultos), pois os organismos estudados são definidos como organismos de topo de cadeia e por isso sofrem mais com a bioacumulação.

A bioacumulação é definida pela EPA (2000) como sendo a acumulação de contaminantes no tecido de organismos através de diversas rotas de exposição, dentre elas, a via respiratória, a ingestão e o contato direto com o contaminante, seja pela água, solo, sedimento ou outros meios. Um fator determinante na bioacumulação é a lipossolubilidade do pesticida ou Kow (coeficiente de partição octanol-água), essa característica indicará o quanto do mesmo pode ser absorvido e incorporado aos organismos. Compostos lipossolúveis são mais difíceis de serem excretados pelos organismos do que compostos hidrossolúveis. Isso ocorre porque aqueles que apresentam hidrossolubilidade podem ser eliminados pela urina, suor e outras vias, enquanto que os que possuem lipossolubilidade ficam retidos nos tecidos dos organismos por tempo indeterminado. (DORES & LAMONICA-FREIRE, 1999).

Lizotte *et al.* (2010) destaca a bioacumulação de pesticidas em uma população de amphipoda (*Hyalella azteca*) presente no Lago Beasley, no Delta do Mississippi durante os anos de 2004 e 2008. Neste estudo os autores observaram que houve uma diminuição na bioacumulação de pesticidas nos organismos entre os anos analisados. Tal efeito estaria relacionado as mudanças nas práticas de manejo agrícola e do controle de pragas. Katagi & Ose (2015) observaram e compararam a bioacumulação de diversos pesticidas (DDT, DDE, Endosulfan, Carbofuran, Malation, Atrazina, Cipermetrina, entre outros) em diferentes espécies de anelídeos, dentre elas, *Eisenia andrei*, *Eisenia fétida* e *Lumbricus terrestris*. Neste estudo, os autores comentam a importância da análise de bioacumulação de contaminantes em organismos, principalmente em organismos terrestres.

Além da bioacumulação, temos também efeitos como a mortalidade devido a exposição aguda, no entanto, esta geralmente associadas a aplicação direta do pesticida ou algum acidente. Os efeitos mais comuns de serem observados estão relacionados com efeitos sub-letais, tais como alterações comportamentais e alimentares, efeitos na reprodução, alterações morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. Esses efeitos são mais comuns em exposição crônica, ou seja, quando os organismos ficam expostos à baixas concentrações do contaminante por longos períodos de tempo, mas também podem comprometer a sobrevivência dos organismos. Denoel *et al.* (2013) em um experimento realizado com girinos observaram alterações comportamentais em relação a natação, daqueles expostos a Endosulfan. A resposta a exposição variou de acordo com a concentração do composto, em concentrações mais baixas foram observadas poucas anomalias comportamentais enquanto que em concentrações mais altas afetou a sobrevivência dos organismos. Willians *et al.* (2015) observaram alterações morfológica do ovário, assim como alterações fisiológicas (quantidade e qualidade de espermatozoides) de abelhas expostas a pesticidas neonicotinoides. Esses estudos demonstram como pesticidas podem afetar não só populações de organismos isoladas, como também a biodiversidade e os serviços ecossistêmicos.

Logo, para conseguir determinar como e em que intensidade a biota é afetada pelos pesticidas e outros compostos, assim como regulamentar seu uso, são realizados ensaios ecotoxicológicos com organismos bioindicadores.

1.4. BIOINDICADORES

Bioindicadores são organismos, ou mesmo comunidades de organismos, que reagem a um agente estressor ou mesmo alterações físicas /químicas no ambiente, com modificações em suas funções vitais e /ou em sua composição química, permitindo assim conclusões a respeito da saúde ambiental, indicando grau de perigo e determinando os possíveis riscos ecológicos. Estes, portanto, são úteis para o monitoramento e avaliações de impactos ambientais, pois mesmo mudanças pequenas na qualidade do ambiente podem alterar suas características físicas, químicas e estruturais (KLUMPP *et al.*, 2001; ARIAS *et al.*, 2007; ANDREA, 2010).

Os bioindicadores podem determinar o índice de poluição atmosférica, aquática ou ambiental; sendo assim, são necessários diferentes organismos para indicar efeitos em diferentes ambientes. Os mais utilizados são os que conseguem diferenciar fenômenos

naturais de eventos de caráter antrópico. Porém, estes organismos também devem apresentar uma facilidade de amostragem, assim como é preciso que o mesmo tenha uma resposta conhecida e explícita à alteração ambiental (KLUMPP *et al.*, 2001; DALE & BEYELER, 2001).

Dentre os organismos bioindicadores de contaminação atmosférica, temos principalmente os líquens, musgos e plantas. Estes apresentam como vantagens uma ampla distribuição global, além disso, alguns apresentam características como resistência a poluição, acumulam compostos em seus tecidos e tendem a crescer o ano todo (ADAMO *et al.*, 2003; GARTY *et al.*, 2003). Bosh-Roig *et al.* (2013) descreveram em seu artigo o uso do líquen como bioindicador de poluição atmosférica, e também comentam sobre como esses organismos podem ser utilizados como bioacumuladores, tanto de metais pesados como de elementos traços.

Em ambientes aquáticos, destaca-se o uso de macroinvertebrados bentônicos e peixes. O uso de macroinvertebrados bentônicos tem como vantagem o fato de que, em sua maioria, são organismos sésseis e com isso permanecem no ambiente (GOULART & CALLISTO, 2003). Arias *et al.* (2007) utilizaram uma comunidade de macroinvertebrados aquáticos para avaliar como a transformação da paisagem pelo desmatamento e a aplicação intensiva de agrotóxicos pode afetar esses organismos de maneira sinérgica. Em um segundo momento, os autores utilizaram tilápias e acarás para determinar o grau de impacto que agrotóxicos podem causar a um ecossistema. Com isso, os autores demonstram que o uso de bioindicadores pode ser aplicado tanto a nível de comunidade como a nível individual, como foi o caso das tilápias e acarás.

No solo, tanto a fauna da serapilheira quanto a presente no perfil do solo, podem ser excelentes bioindicadores, pois apresentam alta diversidade, alta taxa de reprodução e suas funções ou propriedades auxiliam a determinar a qualidade do solo (KNOEP *et al.*, 2000). Dentre os organismos mais utilizados como bioindicadores da qualidade do solo temos os artrópodes (formigas, mosquitos, besouros e collembolas) e anelídeos (minhocas) (WINK *et al.*, 2005; ANDREA *et al.*, 2010). Chang *et al.* (2017) em estudo com plantações florestais conseguiram, usando comunidades de collembolas como bioindicadores, determinar o nível de recuperação de duas áreas após 26 e 45 anos de recuperação de desmatamento. Já Kede *et al.* (2014) utilizou anelídeos para conseguir definir se um solo contaminado por cádmio e chumbo, após o fitorremediação, ainda apresentava toxicidade para os organismos.

Os anelídeos têm se mostrado excelentes bioindicadores de contaminação do solo. Dentre as vantagens apresentadas para o uso desse organismo, podemos desatacar: facilidade em seu cultivo, sensibilidade, ensaios padronizados e consequentemente, facilidade na comparação com estudos internacionais, além de ser utilizado na análise de uma série de contaminantes (pesticidas, petróleo, fármacos, metais pesados, resíduos orgânicos, entre outros) (ANDREA, 2010).

Os ensaios mais comumente realizados com anelídeos são o ensaio de contato, onde é avaliada a CL₅₀ do composto (Concentração Letal necessária para matar 50% da população exposta); ensaio agudo, no qual o organismo fica em contato com o composto entre 7-14 dias; e o ensaio crônico, em que o organismo fica exposto ao composto pelo período de 45 dias (OECD 207, 1984; ISO 11268-1, 2012; ISO 11268-2, 2012). Contudo, há outros ensaios que podem complementar análises de toxicidade, como o ensaio de fuga, no qual são avaliadas alterações comportamentais dos organismos (ISO 17512-1, 2011). Todos esses testes determinam se o composto analisado provoca mortalidade dos organismos, alterações na reprodução, variações na biomassa, perda de habitat, anomalias morfológicas, entre outras alterações (PEREIRA *et al.*, 2017). Além desses parâmetros, também é possível avaliar se um composto provoca danos ao organismo em níveis celulares e moleculares. Para isso são realizadas as análises de biomarcadores.

1.5. BIOMARCADORES

Biomarcadores ou marcadores biológicos podem ser definidos, de acordo com Martin-Diaz *et al.* (2004), como sendo respostas biológicas quantitativas a efeitos de produtos tóxicos ou estressores ambientais, que podem ocorrer em níveis moleculares ou celulares. Os autores destacam como sendo uma das principais vantagens no uso de biomarcadores o fato destes possibilitarem o início de estratégias de biorremediação antes que a contaminação atinja níveis nos quais populações, comunidades ou mesmo ecossistemas sofram com danos ambientais irreversíveis. Além disso, os autores também comentam que, no que diz respeito ao monitoramento ambiental, monitorar um parâmetro pelo biomarcador é mais favorável do que monitorar os diversos poluentes existentes em determinado ambiente.

Os biomarcadores podem ser divididos em 3 classes, biomarcadores de exposição, efeito e suscetibilidade. Os biomarcadores de exposição irão indicar se o organismo foi

exposto a algum tipo de poluente, através da interação entre o poluente e/ou seus produtos da biotransformação em algum órgão ou tecido alvo. Biomarcadores de efeito, estão relacionados a magnitude de resposta dos organismos, isso inclui alterações bioquímicas, fisiológicas, comportamentais, entre outras. Ou seja, enquanto o biomarcador de exposição indica se determinado organismo está ou não sendo exposto a um contaminante, o biomarcador de efeito aponta como o contaminante está afetando os processos fisiológicos. Por fim, os biomarcadores de suscetibilidade são habilidades inerentes ou adquiridas de um organismo que respondem a um poluente específico, como por exemplo, fatores genéticos (OMS, 1993; Lowry, 1995). Dentre os biomarcadores mais utilizados, podemos destacar as proteínas e enzimas de estresse oxidativo.

O estresse oxidativo é causado por espécies reativas de oxigênio (ERO), como radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$); e espécies reativas de nitrogênio (ERN), como óxido nítrico (NO), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-). A presença de tais compostos em altas concentrações nos organismos pode provocar alterações em lipídios, proteínas e até mesmo no DNA. Dentre as alterações podem-se destacar: interações com DNA, causando mutações e produção de oncogêneses; alterações em aminoácidos, fazendo com que os mesmos percam ou assumam outra atividade; oxidação de lipídios presentes na membrana, podendo gerar interferência no transporte de substâncias, ruptura da membrana ou mesmo a morte da célula (BERG *et al.*, 2004; BARREIROS *et al.*, 2006).

Para evitar e também combater os danos causados pelo estresse oxidativo algumas enzimas são produzidas para atuar como agentes antioxidantes. Sendo assim, a detoxificação dos organismos, em relação a compostos xenobióticos que provocam o estresse oxidativo, ocorre em três fases distintas, porém intimamente ligadas (Figura 6). Na fase I, ocorrem reações de oxidação, redução e/ou hidrólise do composto, geralmente, mediadas por enzimas presentes no citocromo P450 (GUENGERICH, 1990). Em seguida, na fase II, enzimas atuam na catalisação de reações de conjugação com o objetivo de tornar os produtos primários, oriundos da reação de fase I, mais hidrofílicos e menos tóxicos. Posteriormente, estes metabólitos são transportados para o exterior da célula e finalmente excretados, consolidando assim a reação de fase III (SHEEHAN *et al.*, 2001).

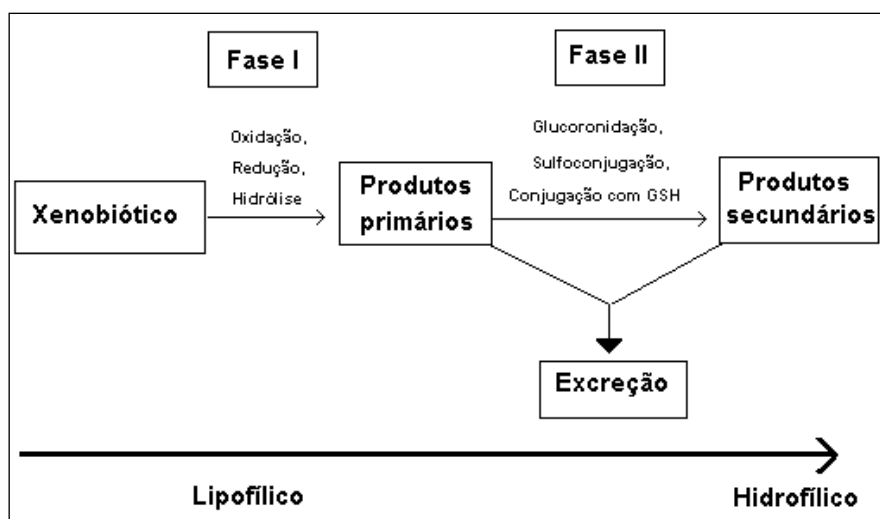


Figura 6: Representação esquemática das fases de biotransformação de xenobióticos. Adaptado de BASTOS, 2006.

Atualmente, são conhecidos três sistemas enzimáticos antioxidantes (Figura 7). O primeiro é composto por enzimas superóxido dismutase (SOD), estas atuam catalisando a transformação do radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), convertendo o mesmo em oxigênio e peróxido de hidrogênio. O segundo sistema, é composto pela enzima catalase (CAT). Esta irá realizar a dismutação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), gerado pela ação do SOD, em oxigênio (O_2) e água (H_2O). E o terceiro e último sistema é formado pela glutathione (GSH) em conjunto com as enzimas glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione reduzida (GR). Estas enzimas, assim como a CAT, irão atuar sobre o peróxido de hidrogênio e reduzi-lo a água (H_2O) (BARREIROS *et al.*, 2006; HUBER & ALMEIDA, 2008).

Contudo, deve-se destacar que caso não haja a atuação das enzimas CAT ou GPx, pode ocorrer do organismo sofrer com danos oxidantes. Isto acontece, pois apesar do H_2O_2 não ser muito reativo a moléculas orgânicas, o mesmo pode atravessar a membrana celular e gerar o radical hidroxila ($\bullet OH$). Além disso, quando está na presença de metais de transição, como o Fe^{2+} e Fe^{3+} , ocorre uma reação Fenton. A partir desta reação há a formação de radicais hidroxilas ($OH\cdot$) que, como comentado anteriormente, podem provocar danos ao organismo (BERG *et al.*, 2004; BARREIROS *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2010).

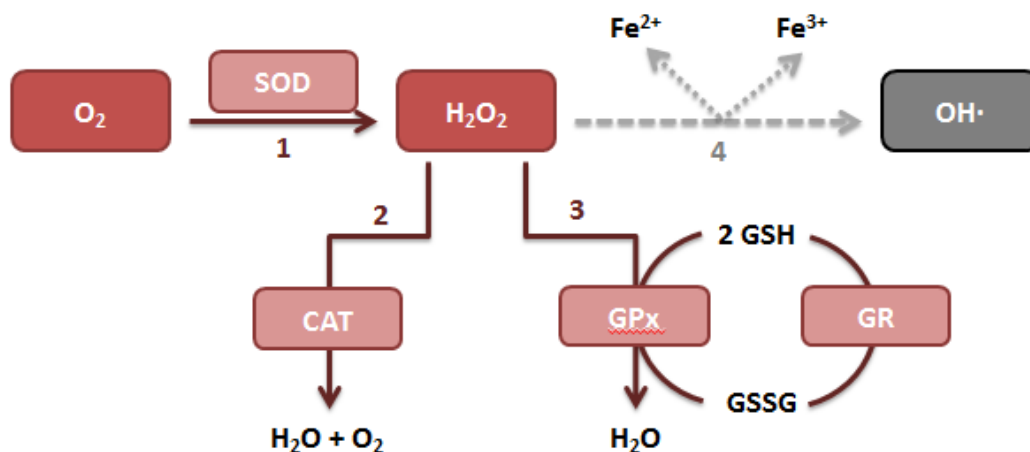


Figura 7 - Sistema de defesa enzimático contra o estresse oxidativo. Adaptado de BARREIROS *et al.*, 2006.

Outra enzima que também irá auxiliar na detoxificação celular de organismos expostos a xenobióticos, é a glutathione-S-transferase (GST). A GST atua em reações de fase II do sistema de biotransformação, e tem como objetivo diminuir a toxicidade destes compostos no organismo e torna-los mais solúveis em água para que ocorra a excreção do mesmo. Além disso, esta enzima também tem a função de corrigir efeitos danosos ocasionados por compostos xenobióticos (CARLETTI *et al.*, 2008).

Em anelídeos, além de análises de enzimas de estresse oxidativo, também é possível realizar análises do fluido celômico. O fluido celômico de anelídeos tem como principal função atuar como esqueleto hidrostático, contudo também atua facilitando o transporte interno de nutrientes e diferentes tipos de células. Dentre estas, podemos destacar as células do sistema imunológico (RUPPERT & BARNES, 2005). Além de tais funções, o fluido celômico também pode atuar como biomarcador em ensaios ecotoxicológicos, pois, devido as proporções dos tipos das células imunocompetentes (coelomócitos), pode indicar ocorrência ou ausência de toxicidade por xenobióticos.

Existem dois tipos de células imunocompetentes presentes no fluido celômico: amebócitos e eleócitos. Contudo, as células do tipo amebócito podem ser divididas em amebócitos hialinos e amebócitos granulares. Estes irão atuar na eliminação de materiais exógenos, seja por fagocitose ou encapsulamento, além de promover a coagulação, cura de feridas, citotoxicidade, formação de granulomas, entre outros. Os eleócitos, por sua vez, são células responsáveis pelo armazenamento de materiais endógenos, como glicogênio e lipídeos. Também atuam na regulação do pH, acúmulo

de metais e destoxificação do tecido das minhocas. (KUREK *et al.*, 2007; BILEJ *et al.*, 2000-2013).

1.6. IMAZALIL

O Imazalil, (RS)-1-(β -allyloxy-2,4-dichlorophenylethyl) imidazole, é definido como fungicida sistêmico, ou de penetração, pois é absorvido pelas folhas ou raízes da planta e em seguida transportado até o sistema condutor, onde será distribuído por toda a estrutura do vegetal. O composto pertencente ao grupo químico imidazol, sendo muito utilizado em pós-colheita de frutas como, banana, citros, maçã, mamão, melancia, entre outras; além de também ser aplicado no tratamento de sementes, principalmente de trigo e cevada (EPA, 2005).

Como pode ser observado na Figura 8, o imazalil (IMZ) possui uma molécula que apresenta um centro estereogênico, ou seja, seu carbono está ligado a quatro grupos diferentes, tornando-o assim uma molécula quiral. Sua configuração pode ser tanto levogira ((R)-(-)-Imazalil), desviando a luz polarizada para a direita, quanto dextrógira ((S)-(+)-Imazalil), desvio de luz polarizada para esquerda (NELSON *et al.*, 2000). Isto pode implicar em diversos aspectos biológicos e ambientais, tais como, a toxicocinética e a toxicodinâmica do composto, pois, de acordo com a enantioseletividade, a metabolização ou degradação do composto pode ocorrer de maneiras diferentes e, conseqüentemente, gerando produtos distintos (CASAS *et al.*, 2016).

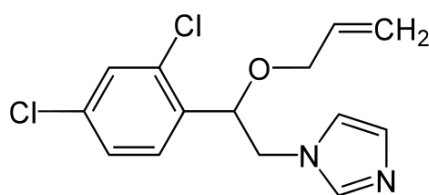


Figura 8 - Estrutura química do IMZ.

De acordo com a FAO (2001) o IMZ possui massa molar de 297,18 g.mol⁻¹; sua solubilidade varia de acordo com o pH, ou seja, quanto menor o pH da solução maior sua solubilidade (180 mg.L⁻¹ em pH 7,6) e seu pKa é de aproximadamente 6,53 em pH 7. Em relação ao seu comportamento no ambiente, quando presente no solo, até 50% do composto pode ser degradado entre 4-5 dias. No entanto, para atingir uma taxa de pelo menos 90% de degradação são necessários cerca de 54-68 dias. Apesar de degradado,

apenas uma pequena fração do composto (9%) é totalmente mineralizada ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$) após 115 dias, os outros 91% são transformados em produtos de degradação, perdidos por lixiviação ou escoamento. Quando em contato com a água, o IMZ é relativamente estável à hidrólise, mas apresenta taxa de degradação de 50% após 18h de exposição contínua a irradiação solar em ambientes de água doce. Contudo, necessita de 4-5 meses para ser completamente degradado (BELENGUER *et al.*, 2014).

A presença do IMZ em corpos d'água pode estar associada a campos de agricultura próximos, principalmente quando há intensificação da irrigação desses campos, ou mesmo, através do descarte de efluentes indústrias (DIAZ *et al.*, 2013; BELENGUER *et al.* 2014). Em estudos recentes foi identificado em concentrações que variaram de 1,28 ng.L^{-1} a 15 $\mu\text{g.L}^{-1}$ em rios da China, Espanha e Costa Rica (CASTILLO *et al.*, 2006; GAO, *et al.*, 2012; BELENGUER *et al.*, 2014; CCANCCAPA *et al.*, 2016).

Há cerca de 15 produtos registrados contendo o IMZ em sua formulação. O Magnate, por exemplo, possui de 98,5 - 98,9% de ingrediente ativo em sua composição. Sua classificação de acordo com a FAO foi definida como um produto Classe II – Moderadamente perigoso. No Brasil, sua classificação, em relação à saúde humana, determinada pela ANVISA foi de um produto Classe III – Medianamente tóxico. Em relação ao meio ambiente, a classificação definida pelo IBAMA foi de um produto de Classe II – Muito perigoso ao meio ambiente, além de determinar que pode ser altamente persistente no ambiente e altamente tóxico para organismos aquáticos.

O IMZ é definido como um contaminante emergente. Isto significa que o fungicida ainda não possui critérios ou normas de qualidade e os conhecimentos sobre seus efeitos no ambiente ou na biota são escassos. De acordo com Sauvé & Desrosiers (2014), o IMZ poderia ser classificado, dentro de contaminante emergente, como um composto de preocupação emergente, ou seja, um contaminante que está presente no ambiente há algum tempo, mas que apenas recentemente a comunidade científica vem estudando seus possíveis efeitos no ambiente.

Devido a essas preocupa  es, diversos ensaios toxicológicos começaram a ser realizados com o IMZ para definir qual seu nível de periculosidade e como afetam diversos organismos. Ensaios utilizando alevinos de *Danio rerio*, por exemplo, comprovam que o pesticida pode afetar negativamente a sobrevivência de embriões, provocar anomalias morfológicas como, ondula  es na notocorda, torço no tronco e na cauda e edema cardíaco (  I  MAN E T  RKEZ, 2010). Em adultos da mesma espécie foi identificado que o fungicida pode comprometer a locomo  o (JIN *et al.*, 2016).

Ensaios em ratos verificaram efeitos adversos em parâmetros reprodutivos e neurocomportamentais (TANAKA, 1995), danos no DNA (VINDAS *et al.*, 2004) e indução a genotoxicidade (TURKEZ *et al.* 2011). Um ensaio realizado por Dikic *et al.* (2012) destaca ainda que devido a efeitos sinérgicos com outros compostos o IMZ pode apresentar potencial genotóxico mesmo em baixas concentrações.

Além disso, também foi identificado que o composto pode afetar o desenvolvimento de outras espécies, pois atua na inibição da enzima CYP51 (esterol 14 α -desmetilase) do citocromo P450 (EPA, 2005). A enzima CYP51 está presente em diversos organismos atuando na homeostasia, fluidez e permeabilidade da membrana celular, logo, a inibição da mesma interfere na permeabilidade celular influenciando em funções vitais dos organismos. Nos fungos o composto atua desmetilando os precursores do ergosterol, inibindo o crescimento e, conseqüentemente, causando a morte do indivíduo (ZARN *et al.*, 2003). Contudo, não foram encontrados estudos que contemplem os efeitos do IMZ nesta mesma enzima em quaisquer outros organismos.

Após ensaios *in vitro*, foi identificado que o IMZ é capaz de provocar danos no DNA de células de leucócitos humanos (VINDAS *et al.*, 2004). Em ratos foi indicado que o fungicida pode causar danos severos ao DNA de hepatócitos após exposição prolongada (DIKIC *et al.*, 2012). Em células de microalgas, foi observado um aumento considerável de células cloróticas (ausência de clorofila) além de danos em seu DNA (PRADO *et al.*, 2015).

1.7. PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS (POA'S)

Na maioria das vezes, os tratamentos indicados para remoção de poluentes de rios ou de águas residuais estão relacionados a métodos biológicos (ARAÑA *et al.* 2007). No entanto, a toxicidade de diversos compostos orgânicos não é eficientemente removida pelos métodos convencionais de tratamento. Logo, novas metodologias têm sido estudadas, dentre elas, os Processos Oxidativos Avançados – POA's, com o objetivo de promover a mineralização ou mesmo a diminuição da toxicidade de compostos orgânicos (SAIEN & KHEZRIANJOO, 2008; ROCHA *et al.*, 2013; SAGGIORO *et al.*, 2014). Os POA's são tecnologias baseadas em reações não seletivas que visam a degradação de compostos orgânicos através da formação do radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$) (Figura 9).

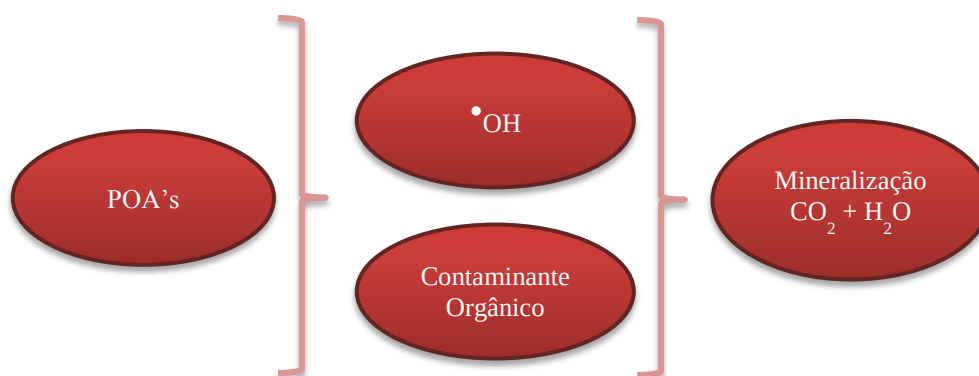


Figura 9 – Esquema da oxidação e mineralização de contaminantes orgânicos através dos POA's.

As reações de oxidação podem ocorrer tanto em fase aquosa e gasosa ou até mesmo em fase sólida (COMNINELLIS *et al.*, 2008) e os POA's podem ser divididos em sistemas homogêneos ou heterogêneos, como demonstrado na figura 10. As reações podem ocorrer na ausência ou presença de luz ultra-violeta (UV), além disso, a radiação pode variar entre ultra-violeta visível (UV-Vis) e ultra-violeta-C (UVC). Sendo assim, são possíveis várias combinações e para cada uma delas, há a geração de produtos de fotodegradação distintos, assim como diferentes tempos para mineralização total de um mesmo composto (COMNINELLIS *et al.*, 2008; SAGGIORO *et al.*, 2014).

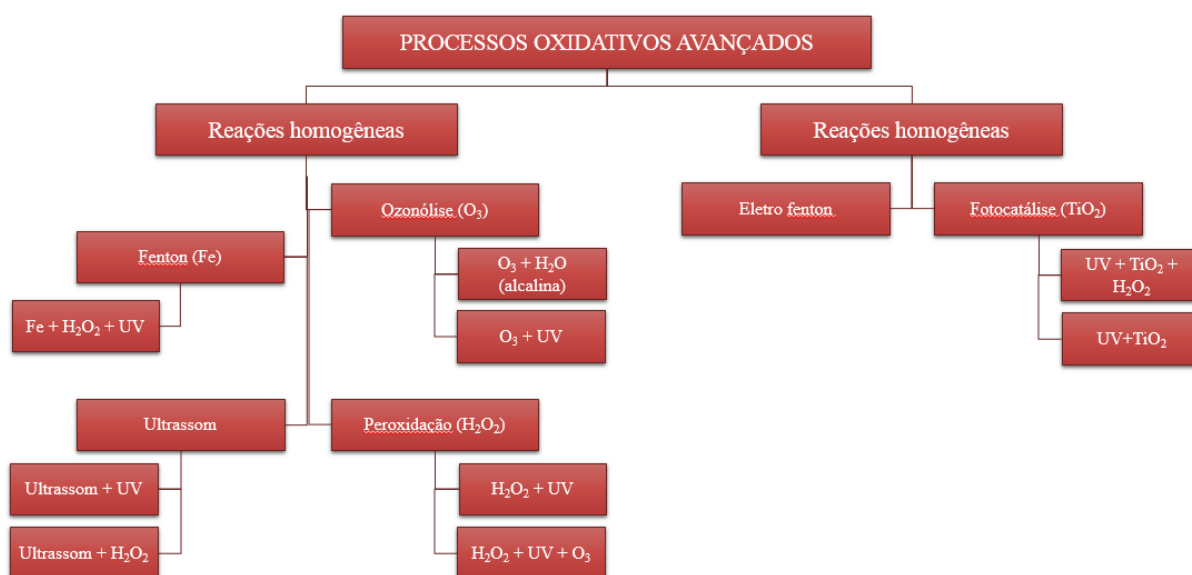


Figura 10 – Diferentes metodologias de aplicação de Processos Oxidativos Avançados (POA's).

Os POA's, no geral, possuem diversas vantagens, como a degradação ou a remoção completa de compostos orgânicos e a mudança de valência de metais tóxicos, também podem atuar em processos de desinfecção de água, possuem baixo custo de instalação, e

são adaptáveis a pequenas escalas para países em desenvolvimento (KOMMINENI *et al.* 2008). No entanto, também é importante destacar que existem algumas desvantagens em relação a sua aplicação, tais como: custo de operação relativamente elevado, possível formação de intermediários de degradação potencialmente tóxicos, necessidade de mão-de-obra especializada para montagem e operação do sistema. Além disso, como são uma tecnologia emergente, são ainda necessárias muitas pesquisas para sua aplicação em larga escala (KOMMINENI *et al.* 2008).

Dentre os POA's apresentados na Figura 10, a fotocatalise heterogênea utilizando o dióxido de titânio (TiO_2), tem sido amplamente estudada nos últimos anos devido ao seu baixo custo, ausência de toxicidade e estabilidade fotoquímica. (COMNINELLIS *et al.*, 2008; KOMMINENI *et al.*, 2008).

Alguns estudos já foram realizados para analisar como ocorre a fotocatalise do IMZ, tanto em águas ultra puras (HAZIME *et al.*, 2012; HAZIME *et al.*; 2014), quanto em águas residuais (JIMENEZ *et al.*, 2014) e outros comparando as duas (SANTIAGO *et al.*, 2013; SANTIAGO *et al.*, 2014). Nestes estudos, foram analisadas a eficiência de diferentes metodologias que buscavam a otimização da degradação do IMZ. Porém, além da otimização alguns trabalhos também verificam quais produtos intermediários são gerados durante a fotodegradação do composto (HAZIME *et al.*, 2012; HAZIME *et al.*, 2014; CABO *et al.*, 2018). Nos estudos realizados por Hazime *et al.* (2012) e Santiago *et al.* (2013), os autores destacam que, durante o processo de fotocatalise do IMZ, são formados compostos clorados, nitritos, nitratos, ácidos carboxílicos, hidroxibenzenos e imidazol.

2 JUSTIFICATIVA

Devido ao uso intensivo de agrotóxicos, estas substâncias têm sido detectadas em análises de água, no solo/sedimento e na biota. Sluijs *et al.* (2015) comentam em seu estudo, que o impacto de pesticidas sistêmicos no meio ambiente e em seus serviços ecossistêmicos ainda são incertos. Além disso, destacam que o acúmulo desta classe de pesticidas no solo pode provocar impactos na fauna edáfica e que isto, consequentemente pode afetar a saúde, estrutura do solo e a ciclagem de nutrientes.

A maioria dos ensaios de toxicidade realizados com pesticidas são focados em exposição aguda enquanto que os efeitos a longo prazo são mais relevantes para o cenário ambiental. No caso do IMZ, a maioria dos ensaios utilizaram organismos vertebrados, poucos foram os que verificaram como o pesticida atua em invertebrados (CASTILLO *et al.*, 2006; PENNATI *et al.*, 2006; ZEGA *et al.*, 2009) e apenas um (LEEMPUT *et al.*, 1989) analisou a toxicidade do mesmo em organismo edáfico.

Contudo, o IMZ não está presente apenas no solo. Devido a sua dispersão por diferentes vias, incluindo pulverização, escoamento de terras agrícolas (BARTH *et al.*, 2008) e sedimentos contaminados (BERMÚDEZ-COUSO *et al.*, 2007), fontes de poluição classificadas como difusas, favorece sua dispersão e sua determinação em diferentes corpos d'água. Além destas fontes, existem as chamadas fontes de poluição pontuais, como o caso de indústrias que processam alimentos, que podem gerar efluentes nos quais contêm, dentre outros compostos, agrotóxicos (JIMÉNEZ *et al.* 2014).

Apesar das fontes pontuais apresentarem vantagens as fontes difusas, no que diz respeito à facilidade no monitoramento, os tratamentos convencionais modernos aplicados em estações de águas residuais, não foram projetados e não possuem eficiência suficiente para eliminar alguns compostos presentes nos efluentes.

Dentre diferentes processos que têm sido sugeridos para melhoria de eficiência no tratamento de efluentes industriais temos a fotocatalise. O processo de fotocatalise possui grande capacidade destrutiva de moléculas orgânicas, devido à produção de radicais hidroxila, demonstrando potencial para tratar água residuais contaminadas com poluentes orgânicos persistentes (SAGGIORO *et al.* 2014). No Brasil há uma carência de estudos sobre degradação química de compostos emergentes presentes em águas (MBOULA, 2013). Em geral, contaminantes emergentes possuem efeitos ecotoxicológicos pouco conhecidos, além disso, efeitos citotóxicos e de estresse oxidativo costumam ser pouco pesquisados. Deve-se levar em consideração que não é

sempre que um processo oxidativo avançado (POA) consegue reduzir ou eliminar a toxicidade de efluentes, logo, torna-se importante a avaliação ecotoxicológica do efluente tratado.

Muitos pesquisadores têm estudado sobre a degradação do IMZ através da utilização de POA's, visando analisar a eficiência da degradação do fungicida sob diferentes metodologias e comparando diferentes matrizes. Contudo, não foram encontrados estudos que analisassem a toxicidade do composto após a degradação. Tendo em vista que, em alguns casos, a mineralização completa do composto não é atingida, a toxicidade dos fotoprodutos gerados pelos processos de degradação deve ser também analisada em ensaios ecotoxicológicos (HAZIME *et al.*, 2012; SANTIAGO *et al.*, 2013; HAZIME *et al.*, 2014; JIMENEZ *et al.*, 2014; SANTIAGO *et al.*, 2014; SANTIAGO *et al.*, 2015).

Sendo assim, os resultados provenientes de testes ecotoxicológicos utilizando anelídeos podem ser importantes em vários aspectos. Poderão determinar quais os danos causados à espécie, além de seus possíveis efeitos ao ecossistema a qual determinado organismo está inserido. Também poderão servir de subsidio para tomadas de medida frente a esses contaminantes, uma vez que a informação acerca sobre essa classe ainda é incipiente e por fim, incentivar organizações, como ABNT, a padronizar uma variedade maior de ensaios com organismos terrestres.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo avaliar a toxicidade do fungicida IMZ e de seus fotoprodutos de degradação por POA no organismo terrestre *Eisenia andrei*.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a eficiência na degradação do IMZ, em relação ao tempo de exposição, utilizando diferentes metodologias de fotodegradação;
- Estudar a toxicidade aguda e crônica; CL_{50} ; e alterações comportamentais em organismo terrestres da espécie *Eisenia andrei* após exposição ao fungicida IMZ e seus fotoprodutos;
- Analisar os efeitos subletais do IMZ e dos seus fotoprodutos por meio de biomarcadores de estresse oxidativo e células do fluido celômico no organismo *Eisenia andrei*.

3.3. HIPÓTESES

No único estudo de toxicidade do IMZ com anelídeos realizado por Leemput *et al.* (1989), foi observado que a CL_{50} de anelídeos expostos ao imazalil ocorreu na concentração 541 mg.Kg^{-1} do composto durante o ensaio agudo. Sendo assim, espera-se que, durante os ensaios, principalmente o ensaio crônico, sejam observadas alterações celulares e enzimáticas para os organismos expostos ao IMZ. Além disso, levando em consideração que o objetivo da fotocatalise a ser aplicada é a mineralização do composto, presume-se que a toxicidade do IMZ diminuirá após o tratamento com POA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. FOTODEGRADAÇÃO DO IMAZALIL

4.1.1. MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Primeiramente, foram realizadas análises espectrofotométricas, visando determinar o comprimento de onda máximo no qual o composto seria identificado. Para isso foi utilizado espectrofotômetro Shimadzu UV-1601PC. A identificação do comprimento de onda foi baseada no estudo realizado por Santiago (2013), que determinou IMZ λ máx. = 225 nm. Em seguida, o IMZ foi identificado e quantificado por cromatografia líquida utilizando HPLC-DAD Agilent 1200 Series, coluna Zorbax C18 Plus (5 μ m – 4.6 x 250 nm) e metodologia de acordo com a tabela 3. O limite de quantificação e detecção do IMZ foi de 5 μ g.L⁻¹ e 2 μ g.L⁻¹, respectivamente.

Foram realizadas duas curvas analíticas para determinar a concentração do IMZ durante a fotocatalise. A primeira curva com concentrações variando de 1 - 6 mg.L⁻¹ e a segunda variando de 0,5 - 0,005 mg.L⁻¹, ambas com ajuste de R² acima de 0,997.

Tabela 3 - Método cromatográfico utilizado na identificação e quantificação do IMZ.

Método cromatográfico	
Fase móvel A	Ácido Fórmico (25 mM)
Fase móvel B	Acetonitrila (100%)
Tipo de fase móvel	Gradiente (70:30)
Fluxo	1 mL/min
Volume de injeção (faixa de concentração)	20 μ L (1-6 mg.L ⁻¹) / 100 μ L (5-500 μ g.L ⁻¹)

4.1.2. FOTODEGRADAÇÃO COM RADIAÇÃO UV-VIS

Foi preparada uma solução de IMZ PESTANAL® (Sigma-aldrich, 99,8% de pureza) no volume de 100 mL e concentração de 5 mg.L⁻¹. A diluição foi realizada utilizando água ultrapura. A solução foi irradiada em reator de luz UV-Vis utilizando lâmpada de vapor de mercúrio de 125 W. A solução ficou em agitação e sob irradiação pelo período de 180 minutos. Em tempos pré-determinados (0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 180 minutos) alíquotas de 5 mL foram coletadas e levadas para serem analisadas em HPLC-DAD.

4.1.3. FOTOCATÁLISE COM TiO_2 – FOTOCATÁLISE I E II

Para este ensaio foram utilizadas duas soluções de imazalil PESTANAL® (Sigma-aldrich, 99,8% de pureza). Na primeira solução o composto foi diluído em água ultrapura (Fotocatálise I). Na segunda solução a diluição ocorreu primeiramente com 1 mL de solvente (metanol) e foi completado com água ultrapura (Fotocatálise II). Ambas soluções apresentaram volume final de 100 mL e concentração de 5 mg.L^{-1} . Após a diluição foi adicionado a cada solução TiO_2 P25 (Evonik) na concentração de 200 mg.L^{-1} (SAGGIORO *et al.*, 2014). As soluções foram deixadas em temperatura ambiente, no escuro e sob agitação pelo período de 30 minutos, para que ocorresse o equilíbrio de adsorção/dessorção. Em seguida, as soluções foram submetidas a irradiação por lâmpada de vapor de mercúrio 125W. Em tempos pré-determinados (0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180 minutos), alíquotas de 5 mL eram coletadas, filtradas em filtro de seringa nylon (Analítica-0,22 μm -13 mm) para retirada do TiO_2 , e analisadas individualmente em HPLC-DAD.

4.1.4. FOTOCATÁLISE COM TiO_2 SUPORTADO – FOTOCATÁLISE III

Neste experimento foram utilizadas como substrato de aderência do TiO_2 esferas de vidro borosilicatadas de 6 mm de diâmetro. As esferas foram previamente lavadas com água ultrapura e sabão para eliminação de poeira. Em seguida, foram imersas em solução de ácido sulfúrico durante 30 minutos, para que assim houvesse a formação de poros. Após, foi realizada a lavagem com água ultrapura e as esferas foram secas a 60°C (JIMÉNEZ *et al.*, 2014).

- Síntese do TiO_2

Para realização da síntese do TiO_2 foi utilizada a técnica de sol-gel (GOMIS *et al.*, 2014). Nesta técnica foi feita a acidificação de 1,8 L de água com 13 mL de ácido nítrico, homogeneizada sob agitação magnética. Em seguida, foi adicionado butóxido de titânio (IV) ($\geq 97\%$, Sigma–Aldrich) a solução e mantida sob agitação pelo período de 24 h para que ocorresse a diluição completa do composto. Depois da solução formada, foi adicionado polietileno glicol diluído em isopropanol na concentração de 20 mg.L^{-1} . A acidez da solução então foi regulada para pH 2,4-2,5 e adicionado 10 g.L^{-1} de TiO_2 (Evonik P-25) e mantida a agitação (JIMÉNEZ *et al.*, 2014).

- Recobrimento

A aderência da substância às esferas de vidro foi realizada utilizando o método dip-coating. Para isso, as esferas foram imersas por 60 segundo no TiO₂ previamente sintetizado. Após recobertas, as esferas foram secas à 110°C pelo período de 90 minutos e em seguida submetidas a temperatura de 400°C durante 5 horas, para que assim ocorresse a calcinação, ou seja, a eliminação de impurezas e, principalmente, a ligação do titânio com a sílica presente nas esferas. Ao final, as esferas foram lavadas com água ultrapura para retirada do excesso de TiO₂. Ao final, foi obtida a concentração de 0,6 mg de TiO₂ na superfície da esfera.

Para o ensaio da fotocatalise foi utilizado um bécker de 200 mL no qual foi depositado em seu fundo um agitador magnético e uma rede de plástico para atuar como suporte das esferas de vidro. Foram utilizadas aproximadamente 25 esferas de vidro para 100 mL de solução de IMZ na concentração de 5 mg.L⁻¹. Após a adição das esferas de vidro e da solução, o recipiente ficou em local escuro e foi mantido sob agitação constante pelo período de 30 minutos. Em seguida, foi levado para ser irradiado por lâmpada vapor de mercúrio de 125W. Em tempos pré-determinados (0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 e 180 minutos) foram retiradas alíquotas de 5 mL e levadas para análise em HPLC-DAD.

4.1.5. ANÁLISE DE DADOS

Em todos os experimentos foi realizado o cálculo do percentual de degradação de acordo com a equação I.

$$\text{Equação I: } \frac{Abs_{inicial} - Abs_{final} * 100}{Abs_{inicial}}$$

Também foram calculadas as concentrações de IMZ após as degradações, para isso foram utilizadas as equações II e III, para altas e baixas concentrações, respectivamente.

$$\text{Equação II: } y = 18317x + 122,58 \text{ (R}^2 = 0,9979\text{)}$$

$$\text{Equação III: } y = 1636,4x + 99,677 \text{ (R}^2 = 0,9472\text{)}$$

Os tempos de degradação utilizados nos ensaios ecotoxicológicos foram definidos de acordo com a concentração de IMZ presente em cada tempo de fotodegradação. Sendo

assim, foram utilizados os tempos de 6, 18, 35 e 90 minutos de fotocatalise por apresentarem, respectivamente, 70; 35; 10 e 0 % da concentração inicial de IMZ utilizada para fotodegradação.

4.2. ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

4.2.1. SOLO

Para os ensaios de fuga, agudo e crônico foi utilizado o solo coletado no campo experimental da Embrapa Agroecologia, localizada no município de Seropédica – RJ. O solo foi analisado pelo laboratório da Embrapa Solos (RJ) para determinar o teor de areia, silte, argila e matéria orgânica (Tabela 4).

Tabela 4 - Características do Latossolo Vermelho amarelo.

Características	Concentração (g.Kg ⁻¹)
Teor de areia	605,5
Teor de silte	106,7
Teor de argila	287,7
Matéria orgânica	8,3

De acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação de Solo (EMBRAPA, 2013), o solo coletado e utilizado nos experimentos foi determinado como Latossolo Vermelho-amarelo e foi escolhido por ser o mais representativo do território brasileiro. No Laboratório de Ecotoxicologia do CESTEH (Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana) na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) foi determinada a capacidade de campo (CC) e o pH do solo em água (5,7). A umidade foi corrigida e mantida em 60% (OECD, 1984; USEPA, 1996) e não houve necessidade de correção de acidez.

4.2.2. ORGANISMO TESTE

Os anelídeos da espécie *E. andrei* foram adquiridos no minhocário Arbórium (RJ), transportados e cultivados no Laboratório de Ecotoxicologia do CESTEH da Fiocruz. Foi utilizado esterco bovino à 25±2 °C e umidade em 50% da CC, como fonte de

matéria orgânica para os organismos. Apenas organismos adultos foram selecionados para os ensaios, os mesmos tinham aproximadamente 2 meses de idade, clitelo bem desenvolvido e peso individual entre 300 e 600 mg (ISO 11268-1, 2012). Previamente aos ensaios os organismos foram aclimatados (20 ± 2 °C) por 24 h, em seguida foram individualmente lavados com água ultrapura e pesados em balança analítica (Sartorius MC1).

4.2.3. ENSAIO DE CONTATO E CL_{50}

O ensaio de contato em papel de filtro (Figura 11) foi realizado de acordo com a metodologia descrita pela OECD 207 (OECD, 1984). Cada béquer (50 mL) foi forrado com papel de filtro (Whatman N^o.2) no tamanho 12 x 5 cm. Em seguida, o papel de filtro foi umedecido, de maneira uniforme, com 1 mL da solução de IMZ nas concentrações de 0; 0,01; 0,1; 1 e 10 mg.L⁻¹, correspondendo a 0,16; 1,66; 16,6; 166 µg.cm⁻². Para avaliar o efeito dos fotoprodutos da degradação do composto, este ensaio também foi aplicado com 1 mL da solução de IMZ (5 mg.L⁻¹) submetida a 6, 18, 35 e 90 minutos de degradação por fotocatalise mediado por TiO₂. Após o recipiente ser preparado foi adicionado um organismo em cada béquer sendo empregadas 20 replicatas por concentração. Os recipientes foram fechados com parafina e perfurados para que assim evitasse a fuga de organismo e ao mesmo tempo pudesse ocorrer a oxigenação. Os frascos foram mantidos no escuro, à temperatura de ± 25 °C e acomodados na horizontal. Após os períodos de 24, 48 e 72 horas os organismos foram pesados, identificando o número de indivíduos mortos e anomalias morfológicas. Ambos os ensaios foram realizados com amostras controle umedecidas com água ultrapura.



Figura 11 - Esquema do ensaio de contato realizado com o IMZ e os diferentes tempos de fotocatalise.

4.2.4. ENSAIO DE FUGA

O teste de fuga foi realizado de acordo com o procedimento proposto pela ISO 17512-1 (2011) nas concentrações de 0,1; 1, 10 mg.kg⁻¹ de IMZ e com a solução inicial de 5 mg.L⁻¹ submetida aos tempo de degradação de 6, 18, 35 e 90 minutos (Figura 12). Em um recipiente dividido em duas seções, separadas por uma divisória, foram depositadas amostras de solo com 200 g cada. Uma das seções teve o solo umedecido com água ultrapura e a outra umedecida com as diferentes soluções testadas. Após o preparo, a divisória foi retirada e no espaço deixado foram depositados 10 organismos, em cada recipiente, possibilitando o livre deslocamento dos indivíduos. Os recipientes foram fechados com tecido microperfurado para favorecer a oxigenação e evitar fuga. Após 48 h do início da exposição, em cada seção de solo, os organismos foram retirados, pesados e quantificados os vivos e mortos. Foi utilizado o delineamento experimental completamente casualizado, com três repetições.



Figura 12 - Esquema do teste de fuga realizado com IMZ e os diferentes tempos de fotocatalise

A resposta de fuga às diferentes concentrações foi obtida através da equação IV (ISO, 2011), onde, uma resposta líquida (RL) positiva significa fuga enquanto que uma RL negativa significa "não resposta" ou "atração" pela substância química testada. De acordo com a ISO 17512-1 (2011), há uma possível perda na função de habitat quando o percentual de fuga dos organismos é acima de 80 %.

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

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

4.2.5. ENSAIO AGUDO E CRÔNICO EM SOLO

Os testes agudo e crônico foram realizados segundo as normas ISO 11268-1 e 11268-2 (ISO, 2012) com algumas adaptações. Os experimentos foram realizados em condições controladas de temperatura (25 °C) e em circuito fechado, ou seja, sem a renovação do composto durante o ensaio. Em béqueres de 400 mL acrescidos com 200 g de solo foram pipetados 35 mL da solução de IMZ nas concentrações de 0,01; 0,1; 1 e 10 mg.kg⁻¹ ou com 35 mL de solução inicial de 5 mg.L⁻¹ de IMZ submetida aos períodos de 6, 18, 35 e 90 minutos de degradação. Após a homogeneização foram adicionados dez organismos por béquer e cada concentração dispôs de seis replicatas (Figura 13). Os béqueres foram cobertos com tecido microperfurado para permitir a oxigenação durante o experimento e evitar a saída dos organismos.

O ensaio agudo foi avaliado no 15º dia de experimento, no qual foi observada a mortalidade dos indivíduos e a variação de biomassa. Para realização do ensaio crônico foi feito o prolongamento do ensaio agudo, sob as mesmas condições, pelo período de 45 dias. Neste ensaio foi realizada a contagem e pesagem dos organismos a cada 15 dias para posteriormente avaliar a taxa de mortalidade, variação da biomassa e anomalias morfológicas. Em ambos os ensaios houve a regulação da umidade e adição de esterco a cada 7 dias.

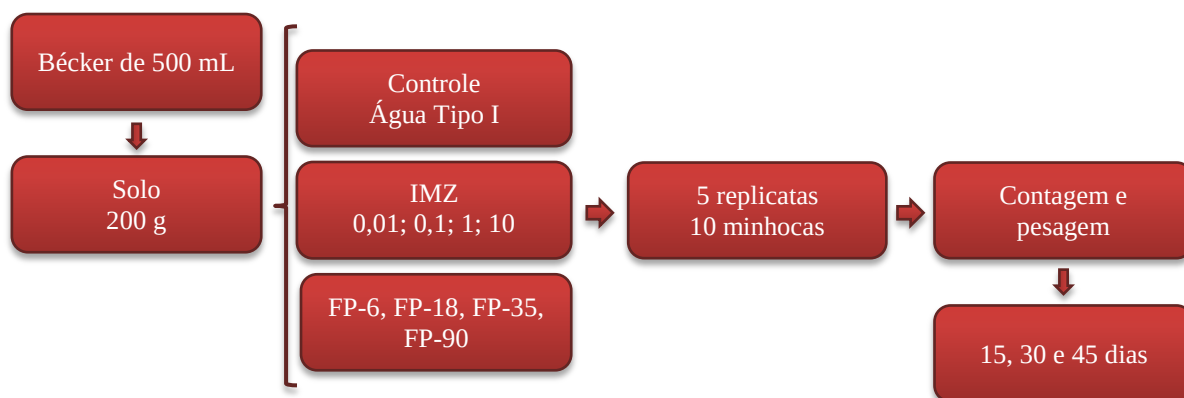


Figura 13 - Esquema do ensaio agudo e crônico realizado com o IMZ e os diferentes tempos de fotocátalise

4.2.6. ENSAIO DE REPRODUÇÃO

O ensaio de reprodução foi realizado sob as mesmas condições dos ensaios agudo e crônico. No entanto, foram utilizadas apenas 3 replicatas de cada concentração e a sua duração foi de 90 dias (Figura 14). Ao final, o experimento foi aberto para então ser analisada a presença ou ausência de casulos e indivíduos jovens. Com o objetivo de apresentar dados comparativos e validar os ensaios, estes testes foram acompanhados de amostras controle umedecidas com água ultrapura. Semanalmente foi realizada a adição de esterco e correção da umidade.

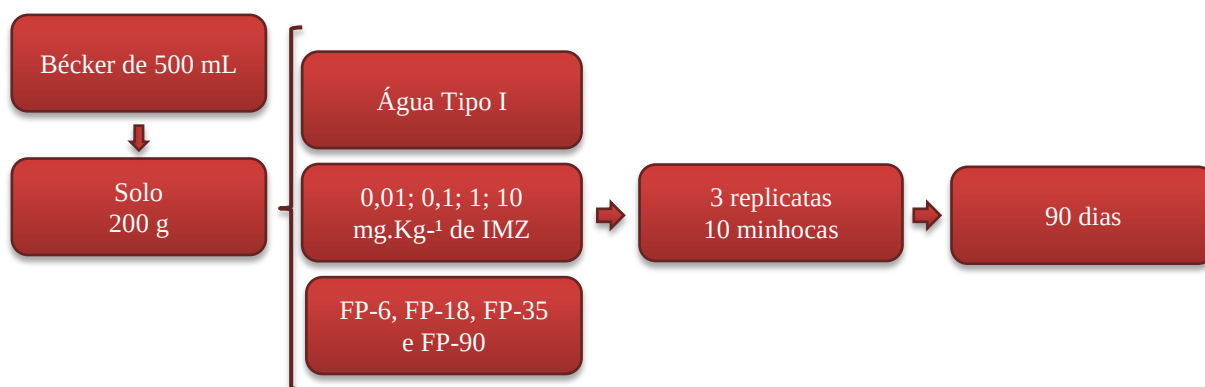


Figura 14 - Esquema do ensaio de reprodução realizado com o IMZ e seus diferentes tempos de fotocátalise

4.3. DETERMINAÇÃO DOS BIOMARCADORES

4.3.1. COLETA DO FLUIDO CELÔMICO

Durante os ensaios de contato (item 3.2.3), agudo (item 3.2.4) e crônico (item 3.2.5), os organismos expostos ao IMZ e seus fotoprodutos foram submetidos à coleta de fluido celômico pelo método de extrusão adaptado de Eyamber *et al.* (1991). Três organismos de cada concentração foram utilizados neste ensaio. Cada organismo era transferido para um tubo de ensaio e a este pipetado 200 µL de solução de extrusão. O meio de extrusão consiste de 5,0 % de etanol em solução salina (0,85 g de NaCl qs 100 mL H₂O), acrescido com 2,5 mg.mL⁻¹ de EDTA, 10 mg.mL⁻¹ do agente mucolítico guaiacol glicerol éter, e ajustado a pH 7,3 com solução de NaOH 0,01 mol.L⁻¹. Após 3 min, 800 µL de LBSS (*Lumbricus Balanced Salt Solution* - 4,18 g NaCl; 0,35 g KCl; 0,27 g MgSO₄.7H₂O, 0,054 g KH₂PO₄; 0,08 g Na₂HPO₄.7H₂O, 0,35 g NaHCO₃ em 1 L de água tipo 1 e pH 7,3 ajustado com solução de NaOH) foi adicionado em cada tubo e o organismo retirado em seguida, conforme adaptação do método de Stein *et al.* (1982). A solução foi mantida refrigerada (4 °C) e após repouso por 30 min 700 µL do sobrenadante foi retirado e a amostra homogeneizada no vórtex para execução de dois procedimentos posteriores (Figura 15).



Figura 15 - Esquema da análise de fluido celômico de anelídeos expostos ao IMZ e seus diferentes tempos de fotocatalise

- Densidade e Viabilidade

O primeiro procedimento determinou a densidade e a viabilidade dos coelomócitos. Para isso foram adicionados 30 µL da amostra com mais 30 µL de corante Tryplan Blue

em Eppendorf e desta mistura foram retirados 20 µL de alíquota para serem depositados em Neubauer espelhada. A câmara de Neubauer foi observada em microscópio (Olimpux CX31) com aumento de 10x, acoplado a uma câmera (Olympus Camedia C-5060 Wide Zoom) para registro fotofigura das células. Foram contabilizados números totais de células coradas e não coradas para determinar, a densidade ($C_{total} - C_{corada}$) e a viabilidade celular ($C_{total}/C_{corada} \times 100$) dos organismos expostos ao IMZ e a seus fotoprodutos.

- Tipagem celular

O segundo procedimento foi realizado para determinar os tipos e a proporção das células presentes no sistema imunológico do organismo *E. andrei*. Neste procedimento foram pipetados 20 µL de amostra do fluido coelomócito, em lâmina microscópica para arraste da amostra. Após 24 h de secagem em temperatura ambiente, as lâminas foram submersas em metanol por 10 min e lavadas com água tipo 1. Com a retirada do excesso de água, as laminaas foram submersas em um recipiente com corante Guemsa 5 % durante 10 min. As células coradas foram analisadas com auxílio do microscópio (Olimpus CX31) com aumento de 100x, e identificadas as proporções das células do sistema imunológico do organismo.

Todos os procedimentos foram realizados em duplicatas e analisados em comparação às amostras controle.

4.3.2. ENZIMAS DE ESTRESSE OXIDATIVO

Assim como nas análises de fluido celômico, as enzimas analisadas foram obtidas de organismos expostos às diferentes concentrações de IMZ e seus fotoprodutos após os ensaios de contato, agudo e crônico. Para quantificação das enzimas GST e CAT, o organismo foi adicionado a um tubo de ensaio de plástico e a este pipetado 2.000 µL de solução LBSS. Em seguida, o mesmo foi homogeneizado por aproximadamente 2 minutos a 10.000 rpm, utilizando para isso o triturador Ultra Turrax IKA T18 Basic. Após, o homogeneizado foi levado para centrifuga (CIENITEC CT 6000) e centrifugados por 10 minutos a 3.000 rpm e a fase líquida foi separada para posterior análise dos biomarcadores de estresse oxidativo em espectrofotômetro (Shimadzu UV-VIS 1601) utilizando para isso cubetas de quartzo de 3 mL (Figura 16).

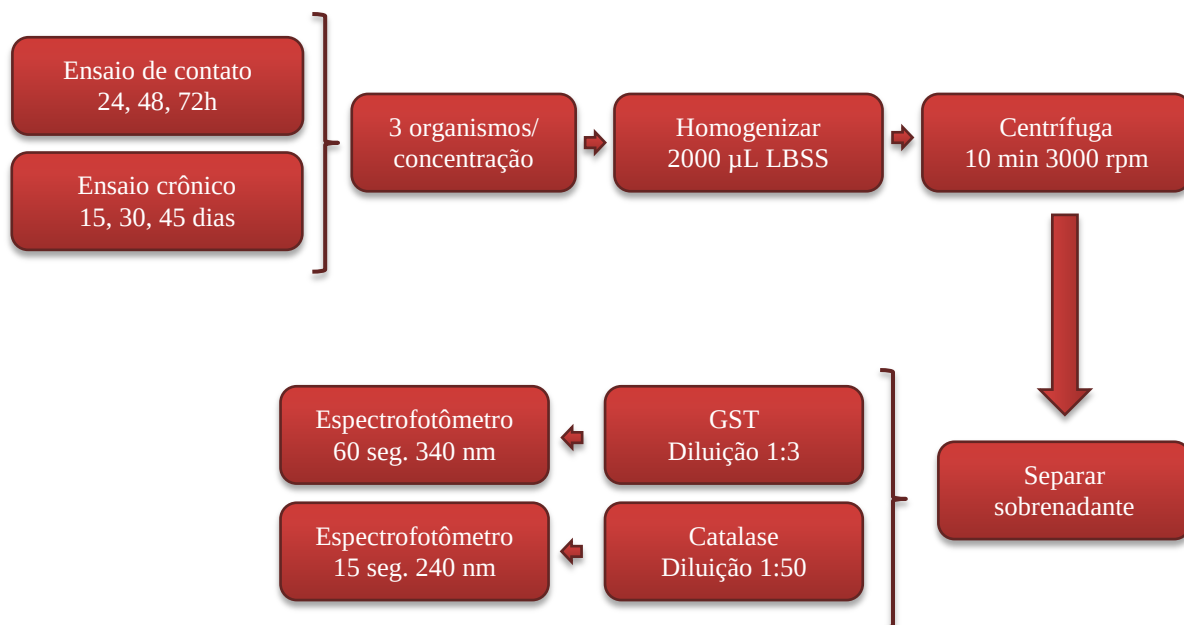


Figura 16 - Esquema da análise de enzimas de estresse oxidativos de anelídeos expostos ao IMZ e seus diferentes tempos de fotocatalise

- Glutathione S-transferase (GST)

Para determinação da GST foi utilizada a metodologia descrita por Habig *et al.* (1984), para isso foi necessário realizar a diluição da fase líquida extraída previamente dos organismos, tal diluição foi feita na proporção 1:3 (100 µL da amostra para 300 µL de água ultrapura). Na leitura em espectrofotômetro primeiro foi determinado o branco, que consistiu em 2.800 µL de solução tampão fosfato de potássio 100 mM (11,3 g de KH_2PO_4 ; 2,96 g de K_2HPO_4 diluído em água ultrapura e pH 6,5), 100 µL de L-glutathione reduzida – GSH (0,0461 g diluído em 5 mL de solução tampão fosfato de potássio 100 mM) e 100 µL de s-chloro-2,4-dinitrobenzene – CDNB (0,06089 g diluído em 10 mL de etanol). Em seguida, determinadas as amostras utilizando em 2700 µL de solução tampão fosfato de potássio 100 mM, 100 µL de GSH, 100 µL de amostra previamente diluída e 100 µL de CDNB. Todas as amostras foram lidas no modo cinético durante 60 segundos e em comprimento de onda de 340 nm. Ao final da leitura foram anotados os valores de $\Delta\text{Abs}/\text{min}$. Todas as amostras foram determinadas em triplicata e a leitura de cada amostra foi realizada pelo menos duas vezes.

- Catalase (CAT)

Nesta análise, realizada de acordo com a metodologia de Aebi (1984), 500 µL da fase líquida obtida previamente foi pipetada para um balão volumétrico de 25 mL e este completado com água ultrapura. Este preparado, também definido como lisado, foi analisado por espectrofotometria. Para isto foram utilizadas duas cubetas de quartzo de

3 mL, a primeira sendo a cubeta de referência e a segunda cubeta contendo a amostra. Na cubeta de referência foram adicionados 1 mL de tampão fosfato 50mM (4,16 g de KH_2PO_4 ; 2,74 g de Na_2HPO_4 , em 1 L de água ultrapura e pH 7,0 ajustado com solução NaOH) e 2 mL de lisado, enquanto que na cubeta da amostra foram adicionados 1 mL de substrato de trabalho (85 μ L de H_2O_2 em balão volumétrico de 25 mL, completado com solução tampão fosfato de sódio 50 mM) e 2 mL do lisado. Para obtenção do branco foram adicionados 1 mL de tampão fosfato de sódio 50mM e 2 mL de água ultrapura na cubeta de referência e na cubeta da amostra foram adicionados 1 mL de substrato de trabalho e 1 mL de água ultrapura. A leitura foi realizada no modo cinético com duração de 15 segundos e comprimento de onda de 240 nm. Todas as amostras foram obtidas em triplicata e cada leitura foi realizada pelo menos duas vezes. O valor de $\Delta\text{Abs}/\text{min}$ foi anotado para posterior análise.

4.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizados diferentes testes estatísticos para os diversos experimentos executados. A expressão dos resultados obtidos com os dados das análises de biomassa e mortalidade (NBR 15537/ ABNT, 2014), foram analisados através de ANOVA (Análise de Variância) com teste de Bonferroni, utilizando o programa Prism 5. As análises estatísticas dos resultados oriundos do ensaio de reprodução e dos biomarcadores foram realizadas pelo programa R 3.4.3 utilizando Kruskal-Wallis com pós teste de Fisher. Todas as análises foram realizadas com intervalo de confiança de 95% e as amostras comparadas com o controle.

5 RESULTADOS

5.1. FOTODEGRADAÇÃO DO IMAZALIL

Os ensaios de fotodegradação possibilitaram observar a degradação do IMZ após a utilização de diferentes metodologias (Figura 17).

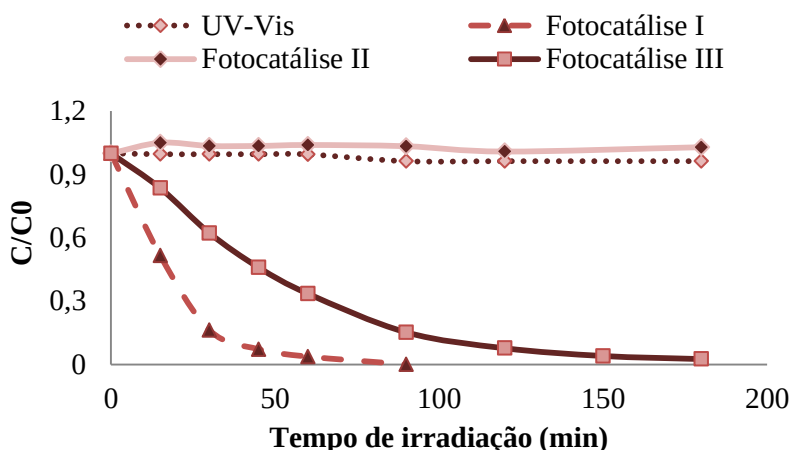


Figura 17 - Gráfico comparativo das diferentes fotodegradações realizadas.

Fotocatálise I: UV-Vis + TiO_2 ; Fotocatálise II: UV-Vis + TiO_2 + MeOH; Fotocatálise III: UV-Vis + TiO_2 suportado. $[\text{TiO}_2] = 200 \text{ mg.L}^{-1}$.

C: Concentração final; C_0 : Concentração inicial.

Na primeira metodologia aplicada, o ensaio utilizando somente a irradiação por luz UV-Vis, foi possível observar que ao longo de 200 minutos de exposição ao reator, houve uma diminuição de apenas 4% na concentração de IMZ. Ou seja, houve degradação do composto, mas a mesma ocorreu de modo lento. Tal comportamento foi semelhante ao observado no ensaio de fotocatálise II, este utilizando além da radiação UV-Vis, o TiO_2 e o metanol. O ensaio não apresentou degradação alguma ao longo de todo o tempo de exposição ao reator. Contudo, tanto a fotocatálise I, utilizando UV-Vis e TiO_2 em suspensão, quanto a fotocatálise III, utilizando luz UV-Vis e TiO_2 suportado, apresentaram níveis de degradação bem acima dos observados nos ensaios de UV-Vis e fotocatálise II.

Na fotocatálise I foi possível observar que nos primeiros 45 minutos de exposição houve a degradação de aproximadamente 95% do IMZ. Após esse período, ocorreu uma diminuição na velocidade de reação, sendo então necessário o mesmo tempo de exposição para degradação de uma quantidade menor do composto (5%). A partir dos

90 minutos não foi possível quantificar por cromatografia líquida com HPLC-DAD a presença do IMZ na solução.

A fotocátalise III apresentou uma degradação gradual ao longo do tempo. A cada 15 minutos foi observado que a degradação do IMZ variava entre 16-22% em relação à concentração anterior, isto ocorreu até os 90 minutos de exposição. Após esse tempo, assim como na fotocátalise I, a velocidade da reação diminuiu e a degradação passou a variar entre 7-3%. O composto não foi mais identificado pela cromatografia após 180 minutos de fotocátalise.

5.2. ENSAIO DE CONTATO: IMAZALIL

Durante o ensaio de contato realizado com o IMZ não foi possível estabelecer a CL_{50} devido ao baixo número de mortes dos organismos. Além disso também não foi observada diferença, ao longo do tempo, na biomassa dos organismos expostos ao pesticida quando comparados ao controle (Figura 18).

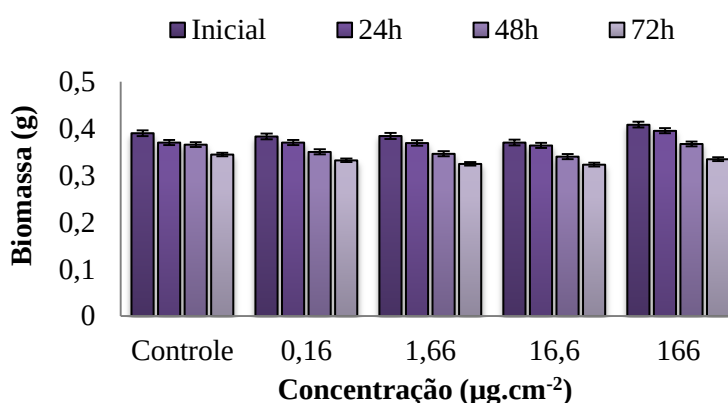


Figura 18 – Gráfico da variação da biomassa de anelídeos expostos ao IMZ durante o ensaio de contato.

No entanto, foram observadas anomalias morfológicas em organismos expostos a todas as concentrações de IMZ. Dentre as anomalias, foi possível identificar inchaços (Figura 19a), principalmente na região clitelar dos anelídeos expostos a todas as concentrações de IMZ. Além disso, também foi observada perda de pigmentação (Figura 19b) e estrangulamento (Figura 19c). Em alguns casos os organismos sofreram extrusão do fluido celômico (Figura 19d). Além das anomalias morfológicas, foi observado que alguns organismos apresentavam letargia e sensibilidade ao toque, quando estimulado com uma pinça.

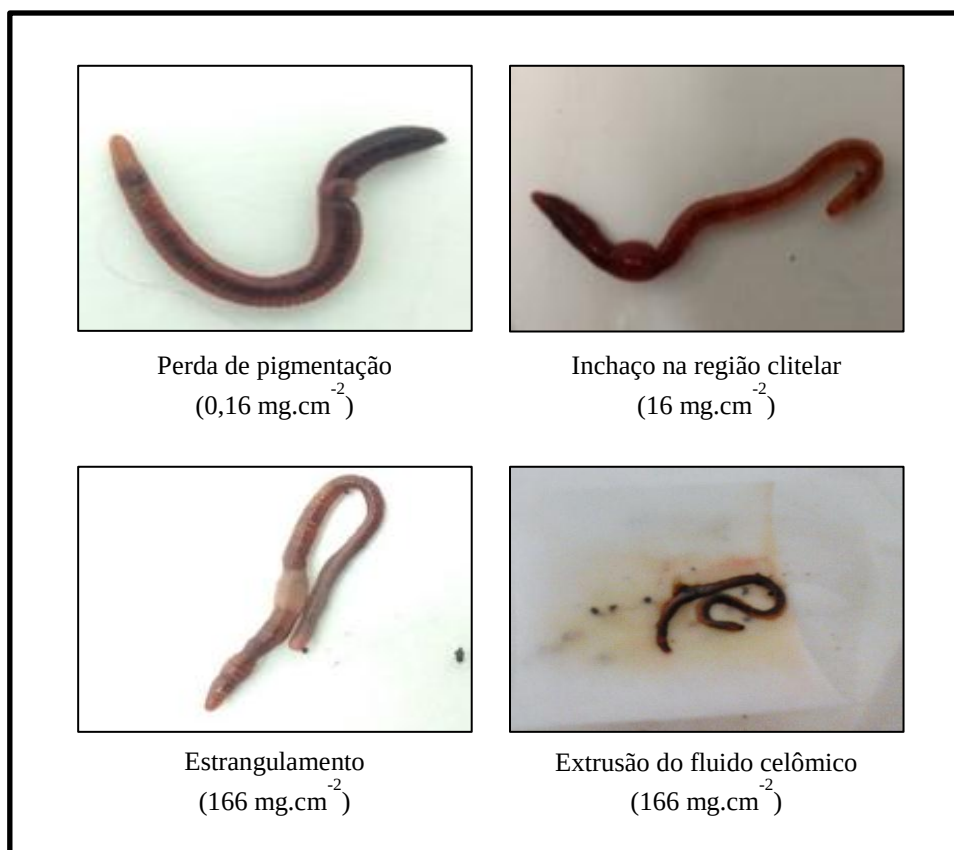


Figura 19 - Alterações morfológicas observadas em anelídeos expostos ao IMZ durante o ensaio de contato.

5.2.1. FLUIDO CELÔMICO

No decorrer dos ensaios foram observados três tipos de células do sistema imunológico presentes no fluido celômico dos anelídeos da espécie *E. andrei*. Estas foram identificadas, de acordo com Kurek *et al.* (2007), como sendo: Eleócitos (Figura 20a), Amebócitos Hialinos (Figura 20b) e Amebócitos Granulares (Figura 20c).

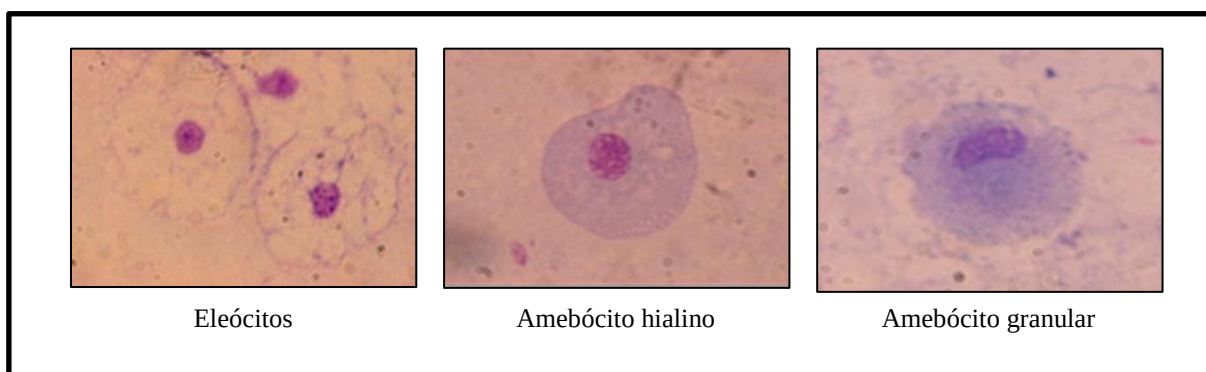


Figura 20: Células do sistema imunológico de anelídeos da espécie *E. andrei*.

Ao decorrer do ensaio de contato realizado com o IMZ não foi observada variação das células presentes no sistema imunológico de anelídeos nas primeiras 24 horas (Figura 21a) de exposição ao fungicida ($p > 0,05$). Todas as concentrações, neste período, apresentavam uma proporção de células do tipo Eleócito que variaram entre 31 – 21%. No entanto, após 48 horas (Figura 21b) houve um aumento na proporção de Eleócitos ($p < 0,05$). Em relação ao controle, este aumento foi de 15 e 32% para as concentrações de 1,66 e 16,6 $\mu\text{g.cm}^{-2}$, respectivamente. Ao final das 72 horas de exposição (Figura 21c), apenas os anelídeos expostos à concentração mais alta (166 $\mu\text{g.cm}^{-2}$) apresentaram uma diminuição no número de Amebócitos ($p < 0,01$).

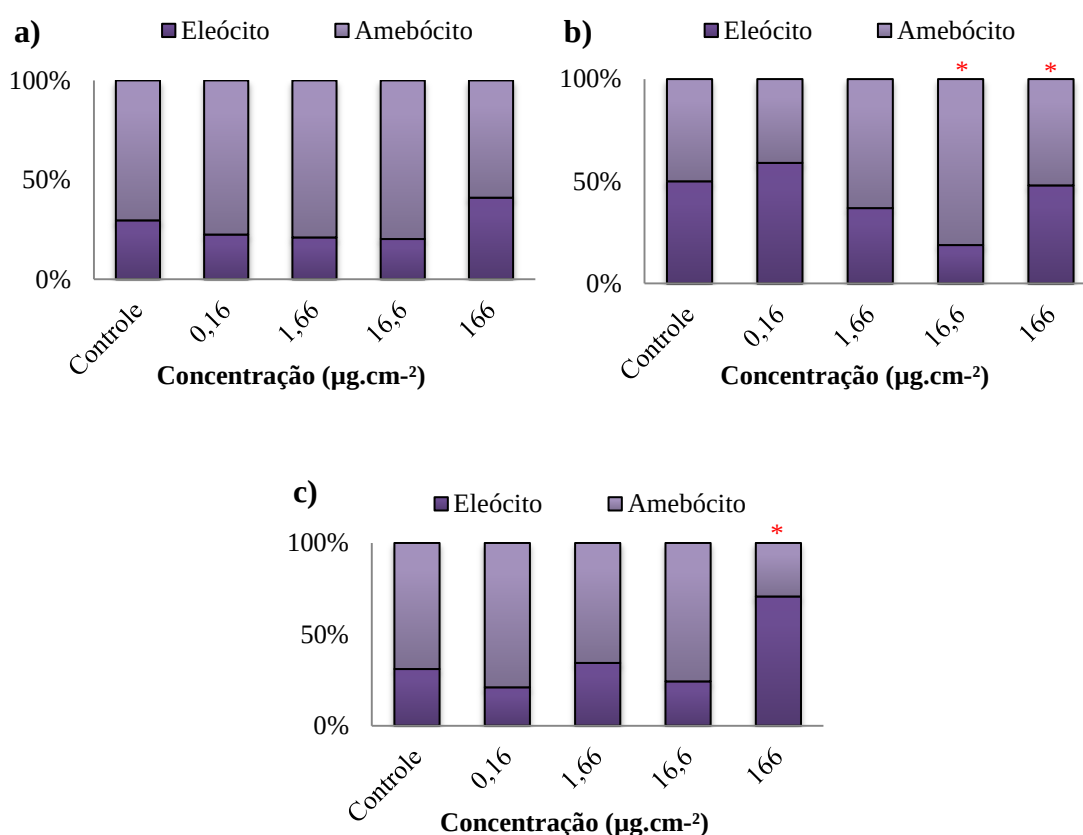


Figura 21 – Gráfico da proporção de células encontradas no fluido celômico de anelídeos da espécie *E. andrei* expostos ao IMZ durante o ensaio de contato: (a) 24 h; (b) 48 h; (c) 72 h. * *Difere estatisticamente do controle ($p < 0,05$)*

Durante o ensaio também foi observada a variação da densidade e da viabilidade celular nos organismos exposto ao IMZ. A densidade (Figura 22a) não apresentou qualquer variação em nenhuma das concentrações nas primeiras 48 horas de exposição ao fungicida ($p > 0,05$). Porém, após 72 horas, houve um aumento ($p < 0,05$) na densidade celular dos organismos expostos à concentração mais alta (166 $\mu\text{g.cm}^{-2}$) do fungicida.

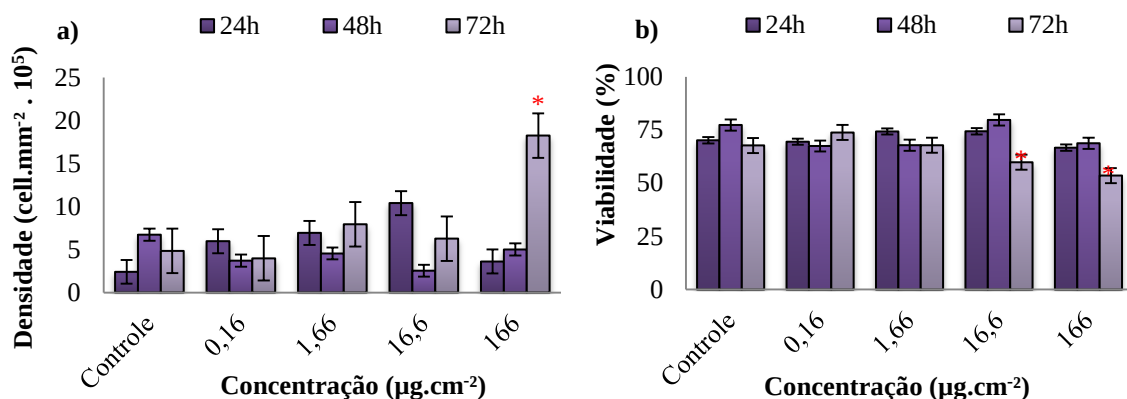


Figura 22 – Gráfico da (a) densidade e (b) viabilidade celular dos organismos exposto ao IMZ durante o ensaio de contato. * *Difere estatisticamente do controle (p < 0,05)*

Quanto à viabilidade celular (Figura 22b), assim como ocorreu com a densidade, não houve variação durante as primeiras 48 h ($p > 0,05$). Contudo, os organismos expostos às duas concentrações mais altas (16,6 e 166 $\mu\text{g.cm}^{-2}$) demonstraram um declínio na viabilidade das células após 72 h de contato com o composto ($p < 0,01$).

5.2.2. ESTRESSE OXIDATIVO

Ao analisar os biomarcadores de estresse oxidativo durante o ensaio de contato realizado com o IMZ, pode-se observar o decaimento da atividade enzimática da GST (Figura 23a) ao longo do tempo quando comparado ao controle. Essa diminuição ($p < 0,01$) ocorreu em anelídeos expostos às concentrações de 1,66; 16,6; 166 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ de IMZ durante o período de 24-72 h. Após 72 h de exposição, os organismos expostos a concentração de 0,16 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ também apresentaram queda ($p < 0,01$) da atividade enzimática da GST.

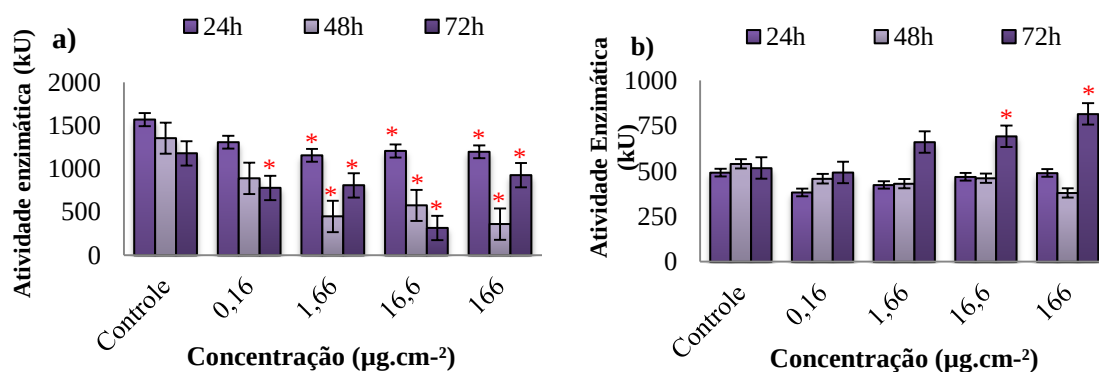


Figura 23 – Gráfico da quantificação de (a) GST e (b) CAT em anelídeos expostos ao IMZ durante o ensaio de contato. * *Difere estatisticamente do controle (p < 0,05)*

Em relação à atividade enzimática da CAT (Figura 23b), não houve variação significativa da mesma durante os períodos de 24 h e 48 h para qualquer uma das concentrações que os anelídeos foram expostos. Contudo, às 72 h de exposição houve um aumento dessa atividade enzimática nas concentrações de 16,6 e 166 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ ($p < 0,01$).

5.3. ENSAIO DE CONTATO: PRODUTOS DE FOTOCATÁLISE

Não foi observada mortalidade ou variação na biomassa (Figura 24) nos anelídeos expostos aos diferentes tempos de fotocatalise do IMZ, quando comparado ao controle. Também não foram observadas alterações morfológicas nestes organismos.

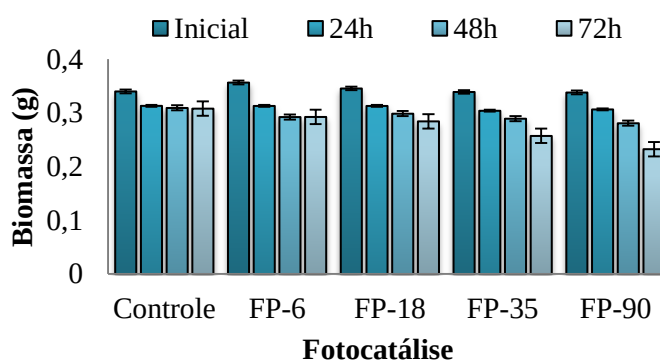


Figura 24 – Gráfico da variação da biomassa de anelídeos expostos aos diferentes tempos de fotocatalise durante o ensaio de contato. *FP-6. Fotoproduto de 6 min. FP18. Fotoproduto de 18 min. FP-35. Fotoproduto de 35 min. FP-90. Fotoproduto de 90 min.

5.3.1. FLUIDO CELÔMICO

No ensaio de contato realizado com os diferentes tempos de fotocatalise do IMZ, foi observado um aumento ($p < 0,05$) na concentração de Eleócitos durante as primeiras 24 horas (Figura 25a) de exposição em FP-90 (90 min de fotodegradação). Após 48 horas de exposição (Figura 25b), os organismos expostos ao FP-18 (18 min de fotodegradação), FP-35 (35 min de fotodegradação) e FP-90 demonstraram um aumento na proporção de Eleócitos ($p < 0,001$) em comparação ao controle. Ao decorrer das 72 horas (Figura 25c), as células do tipo Eleócitos de organismos expostos ao FP-18 voltaram a se equiparar com o controle. Entretanto, não foi possível contabilizar e analisar as células coletadas dos organismos expostos ao FP-35 e FP-90 devido a sua escassez.

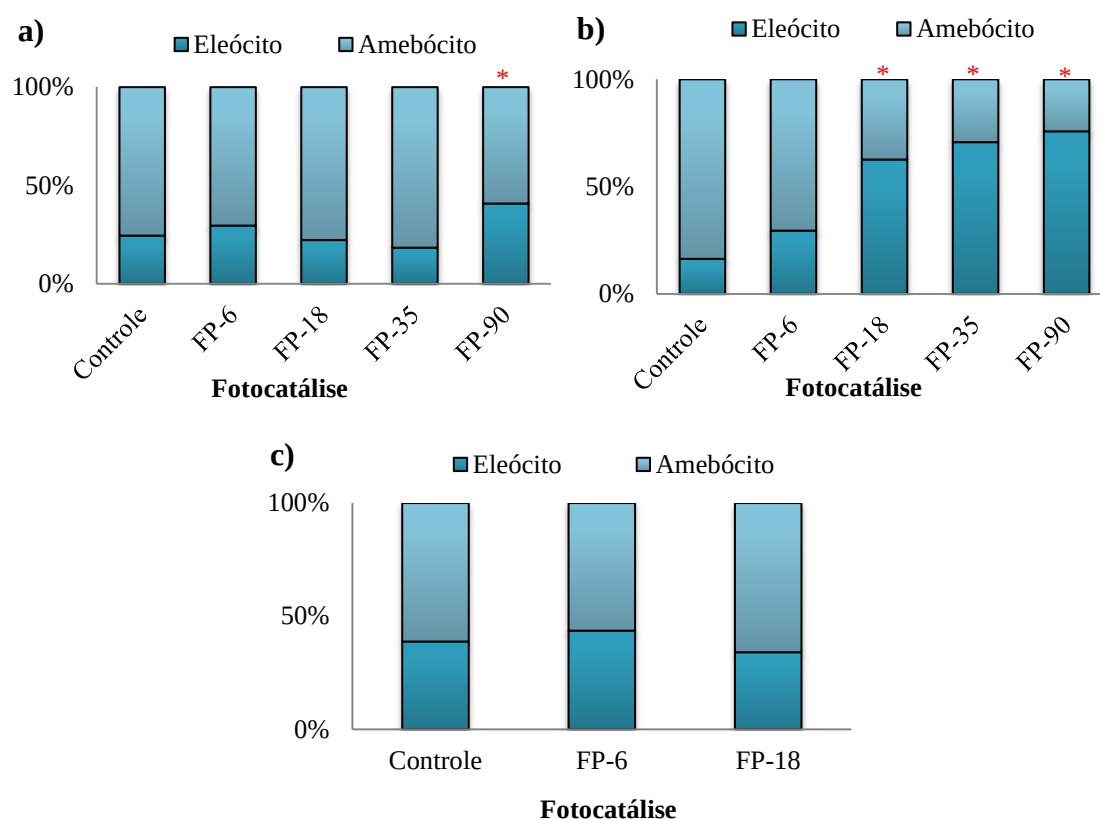


Figura 25 – Gráfico da proporção de células encontradas no fluido celômico de anelídeos expostos a diferentes tempos de fotocatalise do IMZ durante o ensaio de contato: (a) 24 h (b) 48 h (c) 72 h. * *Difere estatisticamente do controle ($p < 0,05$)*. FP-6. Fotoproduto de 6 min. FP18. Fotoproduto de 18 min. FP-35. Fotoproduto de 35 min. FP-90. Fotoproduto de 90 min.

Quanto à determinação da densidade celular desses organismos (Figura 26a), variações significativas foram observadas apenas a partir das 48 h exposição aos fotoprodutos da fotocatalise ($p > 0,05$). Neste período foi possível observar um aumento ($p < 0,05$) na densidade celular de organismos expostos ao FP-18 e FP-35. Ao final do experimento, 72 horas, não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) entre o controle e FP-6 a FP-35. Contudo, não foi possível calcular a densidade celular para os organismos expostos ao FP-90, pois o fluido celômico coletado não apresentava células suficientes.

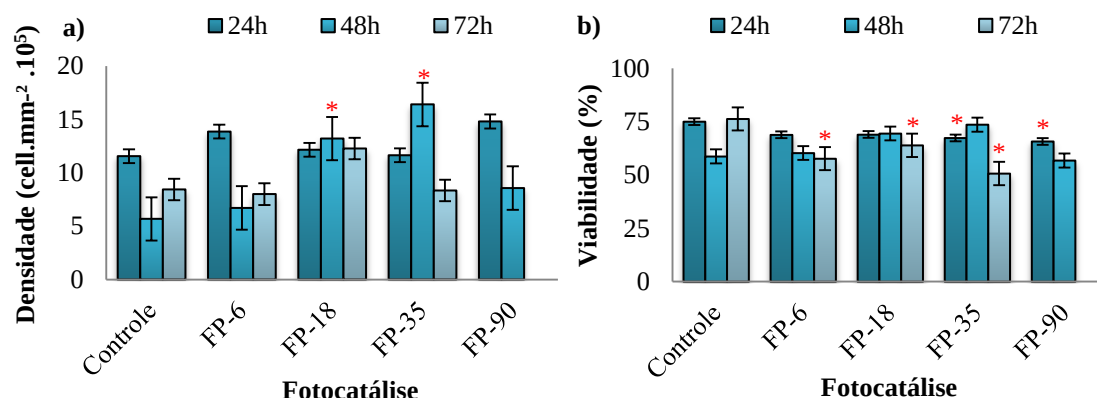


Figura 26 – Gráfico da (a) densidade e (b) viabilidade celular de organismos expostos aos diferentes tempos de fotocatálise do IMZ durante o ensaio de contato. * *Difere estatisticamente do controle ($p < 0,05$).* FP-6. Fotoproduto de 6 min. FP18. Fotoproduto de 18 min. FP-35. Fotoproduto de 35 min. FP-90. Fotoproduto de 90 min.

Em relação à viabilidade das células presentes no fluido celômico (Figura 26b), houve uma diminuição nas primeiras 24 horas para os organismos expostos ao FP-35 e FP-90. Ao passar de 48 horas de exposição, não foi identificada qualquer variação na viabilidade em relação ao controle. Entretanto, ao longo das 72 horas ocorreu uma diminuição da mesma para todos os fotoprodutos de fotocatálise. O FP-90, assim como ocorreu na tipagem e densidade celular, não apresentou número de células suficiente para realizar a análise da viabilidade às 72 horas de exposição aos fotoprodutos.

5.3.2. ESTRESSE OXIDATIVO

No ensaio de contato realizado com os diferentes fotoprodutos de fotocatálise do IMZ foi observado que a atividade enzimática da GST (Figura 27a) foi menor para os organismos expostos ao FP-35 e FP-90 no período de 24 h ($p < 0,01$). Após as 48 h de exposição foi observado que o FP-35 não apresentava mais diferença em relação ao controle ($p > 0,05$). Contudo, os anelídeos expostos ao FP-90 continuaram apresentando valores menores de atividade enzimática quando comparados aos organismos do controle ($p < 0,01$). As minhocas expostas ao FP-18 também apresentaram queda da atividade enzimática da GST no período de 48 h ($p < 0,01$). Ao término do experimento, 72 h de exposição, nenhum dos anelídeos analisados apresentou diferença comparado ao controle em relação à GST ($p > 0,05$).

Durante todas as análises realizadas comparando a atividade enzimática da CAT (Figura 27b), não foi observada qualquer alteração significativa da enzima ao longo do tempo para qualquer uma das concentrações estudadas ($p > 0,05$).

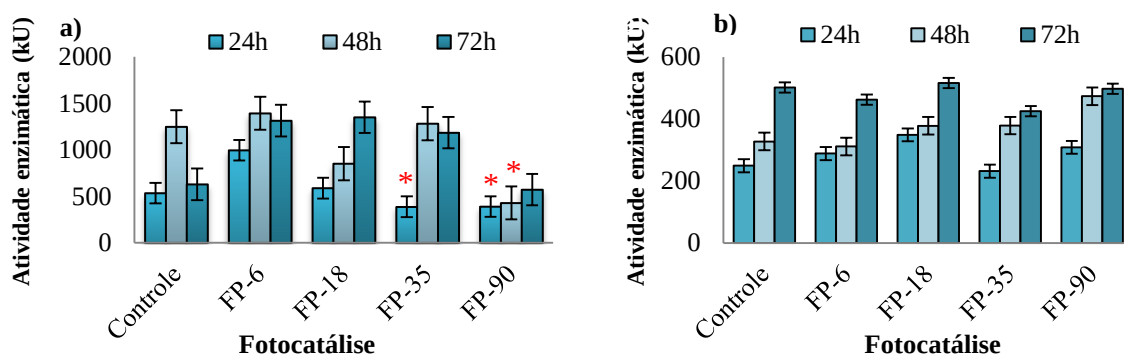


Figura 27 – Gráfico da atividade enzimática de (a) GST e (b) CAT em organismos expostos aos diferentes tempos de fotocatálise do IMZ durante o ensaio de contato. * *Difere estatisticamente do controle ($p < 0,05$)*. FP-6. Fotoproduto de 6 min. FP18. Fotoproduto de 18 min. FP-35. Fotoproduto de 35 min. FP-90. Fotoproduto de 90 min.

5.4. ENSAIO DE FUGA: IMAZALIL E SEUS PRODUTOS DE FOTOCATÁLISE

Após o ensaio de fuga realizado, tanto o cálculo de RL para o IMZ (Figura 28a), quanto para seus fotoprodutos de degradação (Figura 28b), demonstraram que resposta líquida obtida variou entre -40 e 53%. Indicando assim que os organismos expostos não apresentaram qualquer repulsa aos compostos. De acordo com a ISO 17512-1 (2011), pode ocorrer uma possível perda na função de habitat quando o percentual de fuga, determinado pela RL, ultrapassa o valor de 80%.

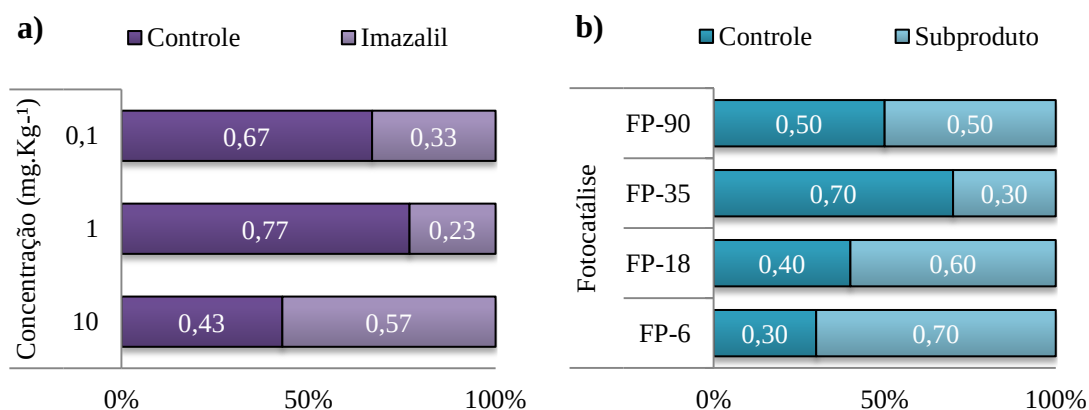


Figura 28 – Gráfico com o percentual de fuga dos organismos expostos a diferentes concentrações (a) IMZ e (b) tempos de fotocatálise. FP-6. Fotoproduto de 6 min. FP18. Fotoproduto de 18 min. FP-35. Fotoproduto de 35 min. FP-90. Fotoproduto de 90 min.

5.5. ENSAIO AGUDO E CRÔNICO: IMAZALIL

Ao decorrer do ensaio agudo realizado com o IMZ foi verificado que houve diminuição da biomassa ao 15º dia de exposição quando comparado ao tempo inicial ($p < 0,05$). Esta perda de biomassa foi significativa para todas as concentrações, incluindo o controle. No ensaio crônico não foi observada nenhuma diferença significativa na variação de biomassa a partir do 30º dia de exposição (Figura 29). Também não foi observado número de mortes significativas dos organismos.

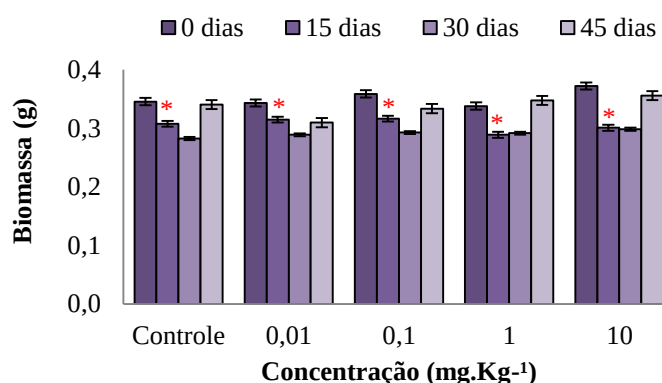


Figura 29 – Gráfico da variação da biomassa de anelídeos expostos ao IMZ durante o ensaio agudo e crônico. * *Difere estatisticamente do tempo inicial ($p < 0,05$).*

5.5.1. REPRODUÇÃO

Em relação ao ensaio de reprodução realizado com o IMZ, foi possível observar que a quantidade de juvenis presentes nas amostras controle até a concentração de 0,1 mg.Kg⁻¹ manteve-se relativamente estável. Contudo, a partir da concentração de 1 mg.Kg⁻¹ houve uma diminuição no número de juvenis com o aumento da concentração (Figura 30), indicando uma tendência do composto. Apesar disso, os cálculos estatísticos apresentaram $p > 0,05$ para todas as concentrações quando comparadas ao controle. Não foram observados casulos em qualquer uma das concentrações, incluindo o controle.

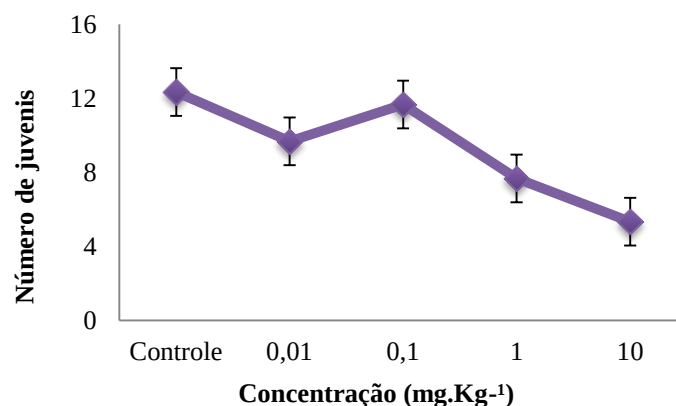


Figura 30 – Gráfico com o total de juvenis encontrados em cada concentração após ensaio de reprodução com IMZ.

5.5.2. FLUIDO CELÔMICO

Durante o ensaio crônico, ao 15º dia de exposição ao IMZ, as proporções de células presentes no controle e nas concentrações testadas foram estatisticamente iguais (Figura 31a). No 30º dia de exposição ao composto, todas as concentrações a partir de 0,1 mg.Kg⁻¹ apresentaram diferença em relação ao controle ($p < 0,001$). Enquanto os anelídeos expostos a concentração de 0,1 demonstraram uma diminuição na proporção de Eleócitos, os organismos expostos as concentrações de 1 e 10 mg.Kg⁻¹ apresentaram um aumento na proporção destas mesmas células (Figura 31b). Neste mesmo período foram observadas algumas anomalias a partir da concentração de 0,1 mg.Kg⁻¹, tais como, formação de grandes colônias (Figura 32a), grânulos no núcleo e no citoplasmas (Figura 32b) e em alguns casos o rompimento da membrana plasmática (Figura 32c). Ao 45º dia, a partir da concentração de 0,1 mg.Kg⁻¹ não mais foi possível realizar a contagem das células pois as mesmas encontravam-se com a membrana rompida (Figura 31c).

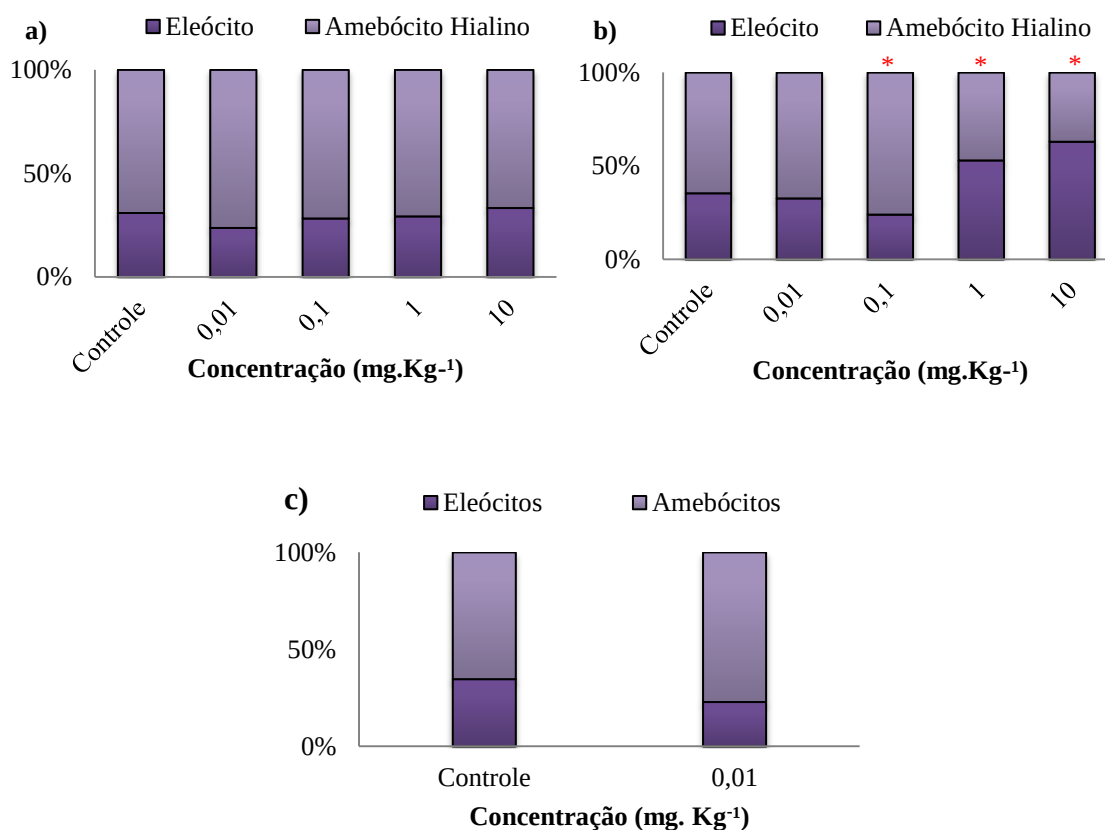


Figura 31 – Gráfico com proporção de células encontradas no fluido celômico de anelídeos expostos ao IMZ durante o ensaio agudo e crônico: (a) 15 dias (b) 30 dias (c) 45 dias. * *Difere estatisticamente do controle ($p < 0,05$).*

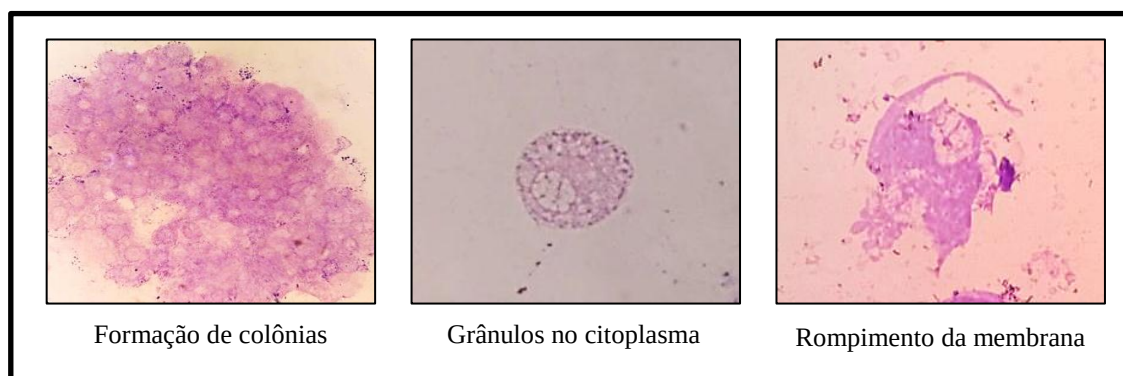


Figura 32 - Anomalias celulares observadas em coelomócitos de anelídeos expostos ao IMZ durante o ensaio agudo e crônico.

Além das análises da proporção de células presentes no fluido celômico dos anelídeos expostos, também foram realizadas análise de densidade (Figura 33a) e viabilidade celular (Figura 33b) com diferentes concentrações de IMZ. Tais análises demonstraram que, a densidade celular dos organismos não sofreu alteração nos primeiros 15 dias de exposição ao composto ($p > 0,05$). Contudo, ao longo do experimento foi possível observar alterações ($p < 0,05$) nas duas concentrações mais altas (1 e 10 mg.Kg⁻¹). No

30º dia de exposição houve um aumento considerável da densidade celular na concentração de 10 mg.Kg⁻¹, seguida de uma drástica diminuição da mesma ao 45º dia. Esta diminuição também ocorre para a concentração de 1 mg.Kg⁻¹, contudo, é observada em escala menor.

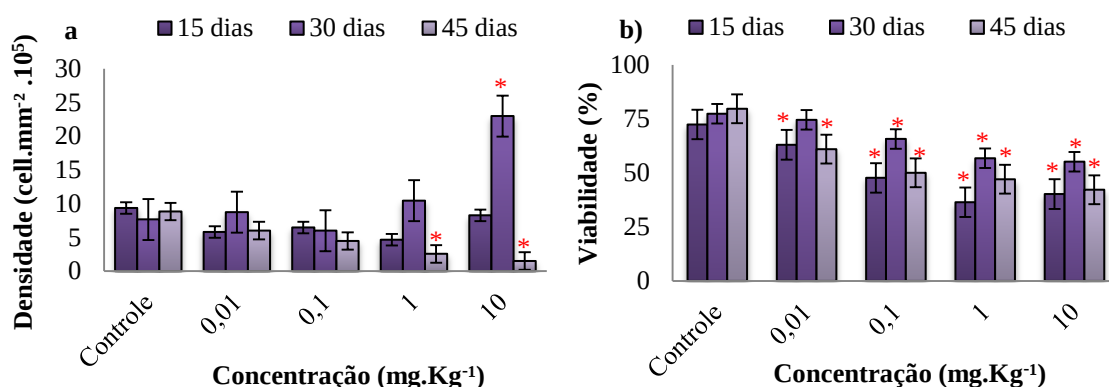


Figura 33 – Gráfico de (a) densidade e (b) viabilidade celular dos organismos expostos as diferentes concentrações de IMZ durante ensaio crônico. * Difere estatisticamente do controle ($p < 0,05$).

Na análise de viabilidade, foi possível observar uma diminuição, ao 15º dia do ensaio, para todas as concentrações de IMZ quando comparadas ao controle ($p < 0,01$). Esta diminuição permaneceu para todas as concentrações, a partir de 0,1 mg.Kg⁻¹, durante todo o período do experimento (30 e 45 dias). A concentração de 0,01 mg.Kg⁻¹ não demonstrou diferença na viabilidade celular apenas ao 30º dia do ensaio.

5.5.3. ESTRESSE OXIDATIVO

Após as análises de GST de anelídeos expostos ao ensaio crônico com IMZ (Figura 34a), não foram observadas alterações ($p > 0,05$) em nenhuma das concentrações nos primeiros 15 dias de exposição. Contudo, houve uma diminuição ($p < 0,01$) da atividade enzimática, ao 30º, dia para os organismos expostos ao solo contaminado com as concentrações de 1 e 10 mg.Kg⁻¹ do fungicida. A taxa de atividade enzimática destas concentrações permaneceu menor ($p < 0,001$) que o controle até o final do experimento, ao 45º dia de exposição. Além das concentrações citadas, a concentração de 0,01 mg.Kg⁻¹ também apresentou queda ($p < 0,0001$) da atividade enzimática da GST ao 45º dia.

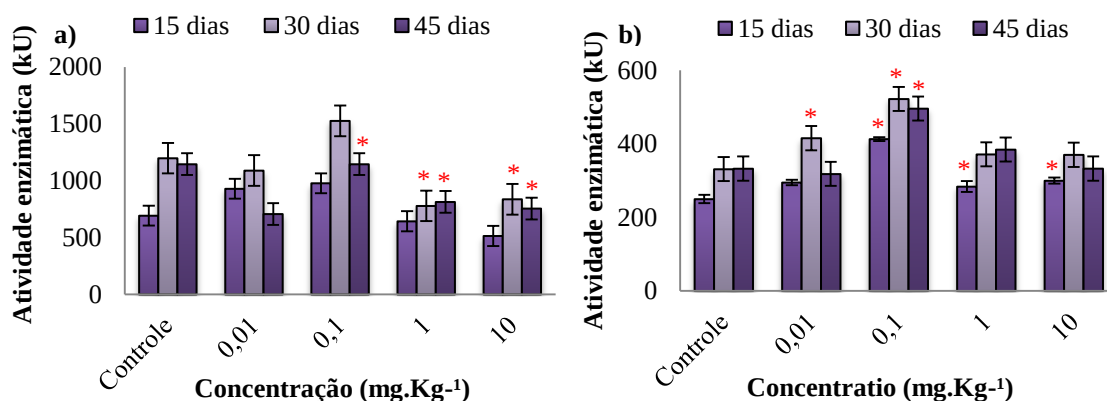


Figura 34 – Gráfico da atividade enzimática da (a) GST e (b) CAT de anelídeos expostos ao IMZ durante o ensaio agudo e crônico. * *Difere estatisticamente do controle ($p < 0,05$).*

Além da atividade enzimática da GST, também foi realizada a análise da atividade enzimática da CAT (Figura 34b). Nesta foi observada que os organismos expostos a concentração de 0,1 mg.Kg⁻¹ apresentaram um aumento da atividade enzimática ($p < 0,001$) nos primeiros 15 dias de exposição ao composto. Entretanto, o oposto ocorreu com as concentrações de 1 e 10 mg.Kg⁻¹, que apresentaram uma diminuição ($p < 0,001$) da atividade enzimática da CAT neste mesmo período. A partir do 30º dia as concentrações mais altas (1 e 10 mg.Kg⁻¹) estabilizaram sua atividade enzimática em níveis estatisticamente similares ao controle. No entanto as concentrações mais baixas (0,01 e 0,1 mg.Kg⁻¹) continuaram demonstrando um aumento progressivo, quando comparadas ao controle ($p < 0,01$). Ao final do experimento, 45 dias de exposição, apenas os organismos expostos a concentração de 0,1 mg.Kg⁻¹ apresentaram alterações na atividade enzimática da CAT ($p < 0,05$).

5.6. ENSAIO AGUDO E CRÔNICO: PRODUTOS DE FOTOCATÁLISE

Nos ensaios agudo e crônico realizados com os diferentes tempos de irradiação do IMZ, não foi observado diferença significativa na variação da biomassa (Figura 35) ao longo do tempo ou mesmo quando comparadas ao controle ($p > 0,05$).

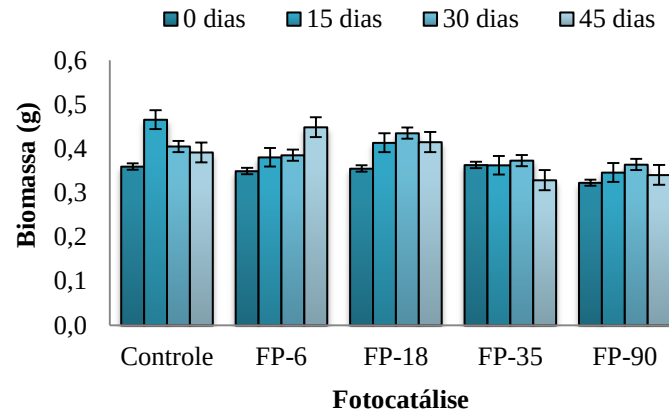


Figura 35 – Gráfico da variação da biomassa de anelídeos expostos aos diferentes tempos de fotocatalise do IMZ durante o ensaio agudo e crônico. *FP-6. Fotoproducto de 6 min. FP18. Fotoproducto de 18 min. FP-35. Fotoproducto de 35 min. FP-90. Fotoproducto de 90 min.*

5.6.1. REPRODUÇÃO

O ensaio de reprodução realizado com os fotoproductos do IMZ indicou um aumento do número de juvenis para o FP-18, quando comparados ao controle. Contudo, este aumento não se mostrou significativo, por outro lado, foi observado uma queda acentuada da reprodução de anelídeos expostos ao FP-90, quando comparado ao controle ($p < 0,05$) (Figura 36). Não foram observados casulos em qualquer uma das concentrações, incluindo o controle.

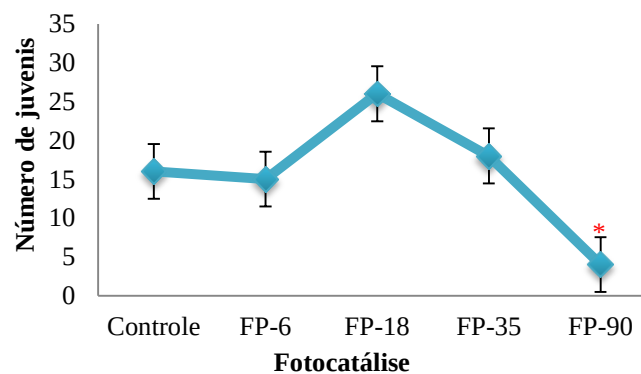


Figura 36 – Gráfico com o total de juvenis de anelídeos encontrados nos diferentes tempos de fotocatalise durante o ensaio de reprodução. * *Difere estatisticamente do controle ($p < 0,05$).* *FP-6. Fotoproducto de 6 min. FP18. Fotoproducto de 18 min. FP-35. Fotoproducto de 35 min. FP-90. Fotoproducto de 90 min.*

5.6.2. FLUIDO CELÔMICO

Durante o ensaio crônico realizado com os diferentes tempos de fotocatalise do IMZ, não foram observadas alterações nas proporções de células coletadas do fluido celômico de anelídeos expostos durante os períodos de 15 (Figura 37a), 30 (Figura 37b) e 45 dias (Figura 37c).

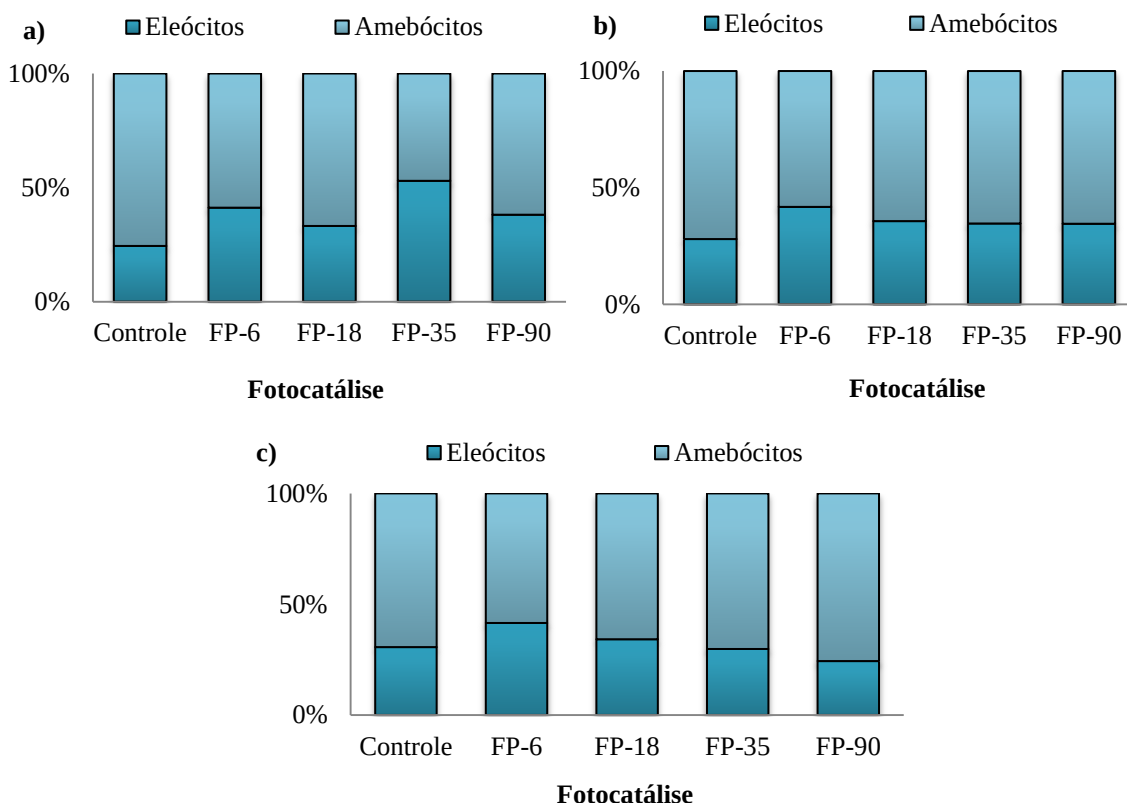


Figura 37 – Gráfico da proporção de células encontradas no fluido celômico de anelídeos expostos aos diferentes tempos de fotocatalise do IMZ durante o ensaio agudo e crônico: (a) 15 dias (b) 30 dias (c) 45 dias. FP-6. Fotoproduto de 6 min. FP18. Fotoproduto de 18 min. FP-35. Fotoproduto de 35 min. FP-90. Fotoproduto de 90 min.

Entretanto nas análises de densidade (Figura 38a) e viabilidade celular (Figura 38b) foi possível observar algumas variações, sendo estas mais perceptíveis em organismos expostos aos compostos com maiores tempos de fotocatalise. Ocorreu uma diminuição ($p < 0,05$) da densidade celular aos 15 dias para os organismos expostos ao FP-90. Esta diminuição também ocorreu ao 45º dia para os anelídeos expostos ao FP-35 e FP-90 ($p < 0,05$).

A viabilidade também apresentou queda para os organismos expostos ao FP-90, contudo, esta ocorreu apenas nos primeiros 15 dias do experimento ($p < 0,05$).

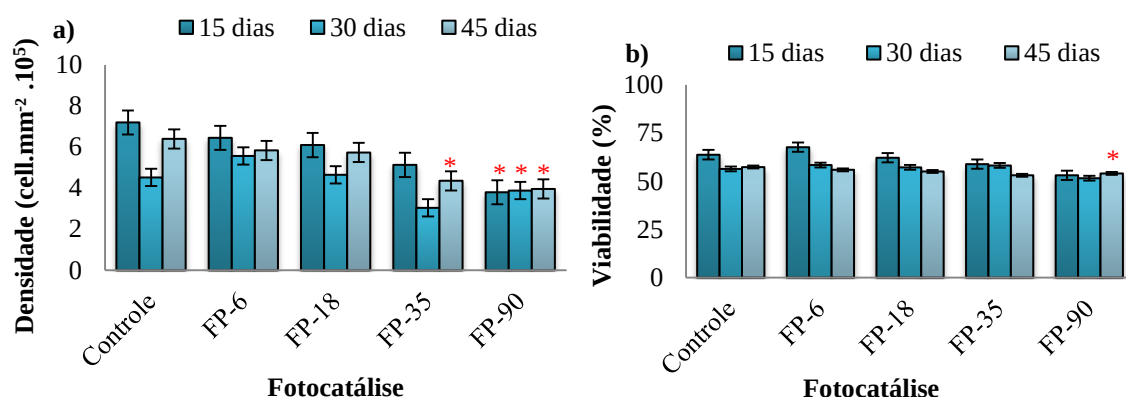


Figura 38 – Gráfico da (a) densidade e (b) viabilidade celular de organismos expostos aos diferentes tempos de fotocatalise durante o ensaio agudo e crônico. * Difere estatisticamente do controle ($p < 0,05$). FP-6. Fotoproducto de 6 min. FP18. Fotoproducto de 18 min. FP-35. Fotoproducto de 35 min. FP-90. Fotoproducto de 90 min.

5.6.3. ESTRESSE OXIDATIVO

Durante o ensaio crônico realizado com os fotoproductos oriundos da fotocatalise do IMZ, foi observada uma diminuição ($p < 0,01$) da atividade enzimática da GST ao 15º dia para os organismos expostos ao FP-18 e FP-90. A segunda análise, realizada ao 30º dia, demonstrou que houve diferença ($p < 0,01$) para todas as concentrações quando comparadas ao controle. Contudo, ao final do experimento (45 dias) somente os organismos expostos ao FP-90 apresentaram uma diminuição da atividade enzimática da GST em relação ao controle ($p < 0,05$) (Figura 39a).

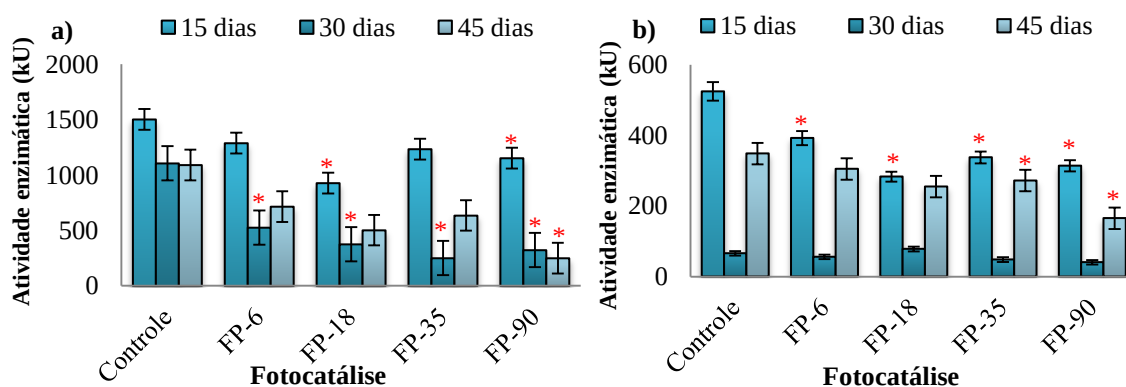


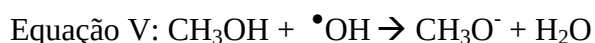
Figura 39 - Gráfico da atividade enzimática da (a) GST e (b) CAT de organismos expostos aos diferentes tempos de fotocatalise do IMZ durante o ensaio agudo e crônico. * Difere estatisticamente do controle ($p < 0,05$). FP-6. Fotoproducto de 6 min. FP18. Fotoproducto de 18 min. FP-35. Fotoproducto de 35 min. FP-90. Fotoproducto de 90 min.

As análises da CAT ao 15º dia de exposição demonstraram que os organismos expostos a todos fotoprodutos de IMZ sofreram diminuições em sua atividade enzimática quando comparadas ao controle ($p < 0,05$). Em contrapartida, as análises realizadas ao 30º dia não demonstraram alterações significativa ($p > 0,05$). No 45º dia de exposição, somente os organismos expostos ao FP-90, que apresentaram diminuição da atividade enzimática ($p < 0,05$) (Figura 39b).

6 DISCUSSÃO

Durante o a fotodegradação realizada somente com a luz UV-Vis foi observado que apenas 4% do IMZ havia sido degradado após cerca de 180 minutos de irradiação. Este resultado corrobora com o observado por Hazime *et al.* (2012) que também descreveram que a degradação do IMZ apenas sob a luz UV-Vis ocorre de maneira lenta. Isso porque a radiação emitida pela lâmpada UV-Vis degrada somente compostos que absorvem a radiação em seu espectro de luz (300 – 400 nm). Como foi comentado anteriormente, o IMZ possui λ máx. = 225 nm, logo não sofre fotólise por esse tipo de lâmpada no qual o espectro era de 365 nm. Para que ocorresse a fotólise do composto, seria então necessária uma lâmpada UVC (CABO *et al.*, 2018).

Na fotocatalise II, foi possível observar que a adição do metanol inibiu a fotodegradação. Tal comportamento pode ser justificado devido ao fato de que o metanol irá sequestrar o radical hidroxila gerado pela ação do catalisador, inibindo desta forma a oxidação do IMZ. Ou seja, ao invés do radical hidroxila gerado pelo catalisador (TiO_2) atuar na oxidação do IMZ, o mesmo irá se ligar ao metanol para produzir água (H_2O) e ânion metóxi (CH_3O^-) ao final da reação (Equação V) (SETVIN *et al.*, 2017).



Ao comparar as taxas de degradação da fotocatalise I em relação à fotocatalise III, foi possível observar que a primeira apresentou uma maior taxa de degradação. Isto porque o TiO_2 em suspensão possui uma maior superfície de contato quando comparado ao TiO_2 suportado, ou seja, o TiO_2 suspenso proporciona uma maior quantidade de sítios ativos para ligação do IMZ e com isso aumenta a eficiência da fotocatalise (BAHREINE *et al.*, 2016).

Em relação à diminuição da taxa de degradação do IMZ ao longo do tempo para ambas as fotocatalises (I e III), isto pode ser explicado pelo fato de que compostos ligados aos sítios ativos do TiO_2 diminuem a produção de radical hidroxila. Ou seja, quando o IMZ é degradado, os fotoprodutos gerados pela fotocatalise são adsorvidos pelas moléculas do TiO_2 , impedindo assim a geração de radicais hidroxilas. Com a diminuição de espécies oxidantes ($\text{OH}\bullet$) na solução, há também a diminuição na eficiência da degradação (SAGGIORO, 2015).

Tendo em vista que a degradação com a fotocatalise I foi mais eficiente do ponto de vista que a degradação do IMZ ocorreu em menor tempo, esta foi selecionada para a realização dos ensaios ecotoxicológicos.

As concentrações utilizadas nos ensaios ecotoxicológicos levaram em consideração a quantidade de IMZ encontrada no meio ambiente. Estas tiveram como base o estudo de Gao *et al.* (2012), que identificou a presença de IMZ em alguns rios na concentração de até 15 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (equivalente a 0,015 mg.L^{-1}) e de Maisa *et al.* (2015), que determinou a presença de IMZ em sedimentos na concentração média de 813 ng.g^{-1} (equivalente a 0,8 mg.Kg^{-1}). No estudo realizado Hausenbuiler (1978) a concentração de IMZ encontrada no solo era de aproximadamente 0,125 mg.Kg^{-1} (aput LEEMPUT *et al.*, 1989). Tendo em vista tais dados, e levando em consideração que o uso de agrotóxicos teve um aumento considerável da década de 80 até o momento atual, estima-se que no solo sejam encontradas concentrações maiores do que estas citadas.

A partir dos resultados obtidos através dos ensaios ecotoxicológicos foi possível notar que o IMZ pode provocar anomalias morfológicas a anelídeos da espécie *E. andrei* mesmo quando estes são expostos a baixas concentrações. Além disso, mesmo não sendo significativo estatisticamente, ainda foi possível observar um decaimento no número de juvenis gerados pelos organismos expostos a maiores concentrações do contaminante. Tais efeitos em conjunto com o fato de que os anelídeos não apresentaram uma tendência de repulsão ao solo contaminado, contribuem para que haja uma diminuição no índice de sobrevivência da espécie quando exposta ao fungicida. Isto por que ao entrar em contato com o fungicida o organismo pode vir a sofrer com o comprometimento de funções fisiológicas básicas, como o desenvolvimento.

Leemput *et al.* (1989) também analisou o efeito do IMZ sobre anelídeos, contudo, diferente do estudo atual, o autor utilizou a espécie *E. fetida* e no ensaio agudo utilizou solo artificial. Nos ensaios realizados, Leemput *et al.* quantificou a CL_{50} em 12,8 $\mu\text{g.cm}^{-2}$ e 541 mg.Kg^{-1} para o ensaio de contato (48 h) e ensaio de agudo, respectivamente. Ao comparar os resultados foi observado que no ensaio de contato as concentrações da CL_{50} diferem entre os estudos. No atual estudo não foi observado morte em nenhuma das concentrações estudadas, que variou de 0,16 a 166 $\mu\text{g.cm}^{-2}$. Tal resultado pode estar relacionado com as espécies utilizadas em cada estudo serem mais ou menos sensíveis ao fungicida. Isto justificaria o fato de que no atual trabalho foram observadas apenas anomalias morfológicas, estas que não são descritas por Leemput *et al.* em seu artigo.

Em relação ao ensaio agudo do trabalho de Leemput *et al.* (1989), o autor não observou alterações significativas em concentrações referentes aquelas encontradas no meio ambiente e indicou que o agrotóxico analisado não oferecia risco do ponto de vista ambiental para a saúde dos anelídeos. Nos atuais ensaios de toxicidade aguda e crônica, também não foram observadas alterações significativas na biomassa em qualquer uma das concentrações de IMZ estudadas. Quanto a reprodução, apesar de não ser observado nenhum resultado significativo, foi evidenciada uma tendência a diminuição de juvenis para as concentrações de 1 e 10 mg.Kg⁻¹.

De acordo com Eyambe *et al.* (1989), em anelídeos da espécie *L. terrestris* a proporção de Eleócitos é superior à de Amebócitos hialinos, seguida pela de Amebócitos Granulares, geralmente ocorrendo em 60:30:10, respectivamente. A mesma proporção foi encontrada por Di Marzio *et al.*, (2005) na espécie *E. fetida*. Contudo, os valores médios para a proporção celular em anelídeos da espécie *E. andrei* obtidos neste estudo indicaram proporções diferentes para Eleócitos (34%), Amebócitos Hialinos (63%) e Amebócitos Granulares (4%).

De acordo com alguns autores (DI, MARZIO *et al.* 2005; OLCHAWA *et al.* 2006; PLYTYCZ *et al.* 2009) as células do tipo Eleócitos são mais sensíveis que as células do tipo Amebócitos quando expostos a um contaminante. Apesar disso, deve-se destacar que durante o ensaio de contato e o ensaio crônico, houve um aumento na proporção de células do tipo Eleócitos para organismos expostos ao IMZ. Tal evento pode estar ligado ao fato de que os Eleócitos são células responsáveis, entre outras coisas, pelo acúmulo de contaminantes e partículas exógenas (BILEJ *et al.*, 2010). Contudo, por estarem expostas ao contaminante por um longo período de tempo (45 dias), as células sofreram danos irreparáveis, como o rompimento da membrana celular, deixando assim de exercer sua função e comprometendo a saúde do organismo.

O IMZ afetou a viabilidade celular dos organismos tanto a curto quanto a médio e longo prazo. Mesmo sendo aplicado em baixas concentrações no solo, onde, devido a sua adsorção, a quantidade de composto biodisponível é menor do que aquela aplicada, o IMZ ainda assim provocou alterações celulares nos organismos expostos. Prado *et al.* (2015) comentam em seu estudo que microalgas da espécie *C. moewussi* apresentaram perda na viabilidade celular, contudo, ocorreu apenas para organismos expostos as altas concentrações do fungicida. Além disso, o autor também identificou danos na membrana celular. Heusinkveld *et al.* (2013), em um estudo com células da medula supra renal (PC12) de ratos, também identificaram alterações na integridade da

membrana celular e perda da viabilidade para as células expostas às concentrações mais altas de IMZ. Ambos os estudos corroboram com os resultados obtidos após os ensaios de contato e crônico do fungicida. Acredita-se que tais danos à membrana celular estejam relacionados ao estresse oxidativo ocasionado pelo composto (HEUSINKVELD *et al.*, 2013; PRADO *et al.*, 2015). Esta afirmação, em relação ao IMZ, é corroborada pelo fato de que este estudo indicou alterações nas enzimas GST e CAT nos ensaios realizados.

O modo como ocorreu a diminuição da atividade enzimática da GST em todos os ensaios, indica que o IMZ atua inibindo a ação desta enzima no organismo por tempo e concentração dependente. Para alguns autores é possível que a diminuição da enzima GST esteja associada a interferências na biossíntese de lipídios, pois a presença desta foi identificada em corpos gordurosos de invertebrados (YAMAMOTO *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2015). Sendo assim, é importante destacar que o IMZ é um composto que irá atuar inibindo a ação da enzima CYP51 presente no citocromo P450 de fungos. A inibição desta altera a síntese do ergosterol, provoca o acúmulo de substâncias na membrana celular e resulta na morte da célula (YOSHIDA, 1988). Tendo em vista que os anelídeos apresentam o citocromo P450 e que o mesmo atua na biossíntese do colesterol, é possível que o fungicida esteja influenciando alguma enzima presente no citocromo, alterando a síntese do colesterol ou outro lipídio e com isso, inibindo a atividade da GST. A inibição da GST pode afetar os processos de biotransformação do imazalil e com isso prejudicar a detoxificação do organismo, além de diminuir a correção de efeitos danosos provocado pelo composto (CARLETTI *et al.*, 2008). Isto pode ocasionar um aumento na $T_{1/2}$ do fungicida e consequentemente um aumento de sua toxicidade para os organismos expostos.

Em relação à CAT, foi observado um aumento da atividade enzimática durante o ensaio de contato para as maiores concentrações (16,6 e 166 $\mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$), associadas aos maiores tempos de exposição. O mesmo ocorreu para as menores concentrações no ensaio crônico (0,01 e 0,1 $\text{mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$), com a diferença de que houve uma posterior estabilização para a concentração de 0,01 $\text{mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$. O aumento da atividade enzimática indica que o organismo está sofrendo com estresse oxidativo devido ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio. Entretanto, o retorno da atividade enzimática para níveis próximos ao do controle sugere que o organismo até aquele momento conseguiu reverter os efeitos da oxidação (ZHANG *et al.*, 2015).

Ao observar a concentração de $0,1 \text{ mg.Kg}^{-1}$, durante o ensaio crônico, foi observado que não houve diminuição da mesma ao longo de todo o experimento. Isto indica que apesar de sofrer com estresse oxidativo, o organismo ainda é capaz de produzir enzimas para evitar que danos sejam causados pelas espécies reativas, eliminando-as (ZHANG *et al.*, 2015). Contudo, danos celulares foram observados ao final do experimento (45 dias), indicando que apesar dos esforços o organismo não conseguia combater completamente as espécies reativas. Os mesmos danos foram observados para as concentrações de 1 e 10 mg.Kg^{-1} . Logo, apesar de apresentarem valores estatisticamente iguais ao controle a partir do 30º dia de exposição, é possível que tenha ocorrido a inibição da CAT.

Nos ensaios realizados com os fotoprodutos de degradação do IMZ, foi observado que não houve diferenças entre os tempos de degradação estudados e o controle durante os ensaios de contato, fuga, agudo e crônico, exceto para as análises de biomarcadores. Contudo houve uma diminuição significativa na taxa de reprodução dos organismos expostos ao FP-90. Isto indica que o IMZ não sofreu completa mineralização durante o processo de degradação, apenas deu origem a outros compostos. Contudo, os fotoprodutos presentes em FP-90 apresentaram toxicidade para os organismos quanto a sua reprodução.

Foi observado que no ensaio de contato houve alterações na proporção de eleócitos, mas no ensaio crônico isto não ocorreu. O que pode ser justificado devido ao fato de que no ensaio de contato o organismo está em contato direto com o contaminante, enquanto que no ensaio crônico os compostos, tanto o IMZ quanto aqueles oriundos da fotocatalise, podem ser adsorvidos pelo solo e com isso apresentar menor biodisponibilidade.

Na viabilidade celular, ao comparar o ensaio de contato com o ensaio crônico, foi observada uma diminuição da toxicidade, que assim como no caso da proporção celular, pode ser atribuída à adsorção dos compostos pelo solo. Porém, para o FP-90 houve toxicidade celular no início do ensaio crônico, observada através da diminuição da viabilidade. Mas, como ao decorrer do ensaio houve estabilização, é possível que ao longo do tempo o sistema imunológico dos anelídeos consiga se recuperar e combater os danos causados pelos fotoprodutos, mesmo com a densidade celular sendo afetada.

Em relação às enzimas de estresse oxidativo, a atividade enzimática da GST apresentou queda em ambos os ensaios, crônico e de contato, contudo esta diminuição foi mais evidente e constante em FP-90. Como comentado anteriormente, Zhang (2015) descreve que a diminuição da GST pode estar relacionada a alterações que estejam ocorrendo na

síntese de lipídios. Logo, apesar de não haver mais presença de IMZ aos 90 minutos de fotocátalise, é possível que os fotoprodutos gerados ainda estejam afetando a síntese de algum lipídio e com isso provocando a diminuição da atividade enzimática. Quanto aos outros tempos de fotocátalise (FP-6; FP-18; FP-35) foram observadas diminuições seguidas de estabilizações, sugerindo que os anelídeos expostos possuem uma capacidade de tolerância ao estresse oxidativo gerado pelos contaminantes (ZHANG *et al.*, 2015).

A atividade enzimática da CAT, diferente da GST, não demonstrou alterações durante o ensaio de contato, mas apresentou diminuição durante o ensaio crônico. A inibição da CAT pode estar relacionada a um acúmulo de H_2O_2 no organismo, ou mesmo de outras espécies reativas, que ultrapassaram a capacidade antioxidante da CAT (SCHRECK *et al.*, 2008). Neste caso, ocorreu principalmente para o maior tempo de fotocátalise (FP-90). Ao longo do ensaio crônico os anelídeos expostos ao FP-6, FP-18 e FP-35 apresentaram recuperação, sugerindo que os fotoprodutos oriundos destes tempos apresentam um menor estresse oxidativos para o organismo quando comparado com o FP-90.

De acordo com Hazime *et al.* (2012) a mineralização completa do IMZ para a concentração de 25 mg.L^{-1} ocorre aos 800 minutos de irradiação em reator UV-Vis e utilizando TiO_2 como catalizador. Santiago *et al.* (2013) destacam que, no estudo que realizaram, os fotoprodutos IMZ não eram mais identificados após 120 minutos de fotocátalise. Com base nestes dados, estima-se que o tempo para mineralização do IMZ para a concentração de 5 mg.L^{-1} seja maior do que os 90 minutos ao qual o fungicida ficou exposto a radiação. Além disso, é provável que ainda houvesse a ocorrência de compostos intermediários da reação.

Santiago *et al.* (2013) em ensaios ecotoxicológicos realizados com fotoprodutos do IMZ observaram toxicidade para organismos da espécie *V.fischeri* e *L. menor* após 60 minutos de fotocátalise. Ao realizar um segundo ensaio somente com o IMZ na concentração referente ao tempo de 60 minutos de fotocátalise, os autores não observaram toxicidade. Indicando assim que neste caso a toxicidade era devido aos fotoprodutos da reação. Durante esses ensaios os autores notaram que a toxicidade do IMZ diminui conforme ocorre a descloração do fungicida, mas volta a aumentar quando compostos como hidroxibenzenos e imidazol são formados, o que geralmente ocorre ao final da reação de fotocátalise.

Apesar dos fotoprodutos terem apresentado menor toxicidade que o IMZ, é importante observar que nos dois casos há riscos para comunidades de anelídeos e outros organismos. Isto porquê os anelídeos servem como um bioindicador de modificações no ambiente, principalmente do ambiente edáfico. Ou seja, alterações ou a ausência desses organismos indicam que o ecossistema ao qual está inserido sofre com alterações ambientais que podem levar a um futuro desequilíbrio ambiental e até perda de biodiversidade.

7 CONCLUSÃO

Ao comparar os resultados dos ensaios ecotoxicológicos do IMZ com os resultados obtidos do tratamento de fotodegradação, foi observado que ambos apresentaram toxicidade para anelídeos da espécie *E. andrei*, mas em diferentes níveis. Enquanto o IMZ provoca alterações morfológicas, quando em contato direto com os anelídeos, os fotoprodutos de degradação apresentam alterações na reprodução desses organismos. Ambos apresentaram alterações celulares e enzimáticas, contudo os efeitos foram mais evidentes e atingiram maiores proporções em organismos expostos ao IMZ. Entre os fotoprodutos estudados, o FP-90 foi o que apresentou maiores efeitos tóxicos para os organismos.

Logo, tanto o IMZ quanto os compostos provenientes da fotocatalise podem ser prejudiciais à sobrevivência de organismos no meio ambiente. Sendo assim, seria necessário criar uma normativa estipulando um limite para a utilização do IMZ em concentrações menores que as atuais, para que assim os efeitos ao meio ambiente sejam minimizados. Além disso, estudos com maiores tempos fotocatalise do IMZ são necessários para que através destes seja possível verificar se há diminuição da toxicidade do composto e de seus produtos de fotocatalise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamo, P, Giordano, S., Vingiani, S., Cobianchi, R. C. e Violante, P. 2003. “Trace element accumulation by moss and lichen exposed in bags in the city of Naples (Italy)”. *Environmental Pollution* 122: 91–103. doi: 10.1016/S0269-7491(02)00277-4
- Aebi, H. 1984. “Catalase in vitro”. *Methods in Enzymology*. (105): 121 – 126.
- Altieri, Miguel A. 1999. “The ecological role of biodiversity in agroecosystems.” *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74: 19-31. doi: 10.1016/S0167-8809(99)00028-6
- Andréa, M. M. 2010. “O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos” *Acta Zoológica Mexicana* 2: 95-107.
- ANVISA- Agência Nacional De Vigilância Sanitária. 1991. “Diretrizes e exigências referentes a autorização de registros, renovação de uso de produtos agrotóxicos”. Portaria nº 3 de Dezembro de 1991.
- ANVISA- Agência Nacional De Vigilância Sanitária. 2006. “Índice Monográfico - Imazalil” Resolução RE nº 3428 de 19/10/06 (DOU de 20/10/06).
- ANVISA- Agência Nacional De Vigilância Sanitária. 2018. “Regularização de produtos agrotóxicos: Monografias autorizadas”. Acessado em Fevereiro de 2018. <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>.
- Araña, J., Garriga i Cabo, C., Fernández Rodríguez, C., Herrera Melián. J. A., Ortega Méndez, J. A., Doña Rodríguez, J. M. e Pérez Peña, J. 2008. “Combining TiO₂-photocatalysis and wetland reactors for the efficient treatment of pesticides.” *Chemosphere* 71: 788-794. doi: 10.1016/j.chemosphere.2007.10.008
- Arias, Ana R. L., Buss, Daniel F., de Albuquerque, Carla., Inácio, Alan F., Freire, Mariana M., Egler, Mariana, Mugnai, Riccardo e Baptista, Darcilio. F. 2007. “Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos”. *Ciência & Saúde Coletiva* 12(1):61-72. doi: 10.1590/S1413-81232007000100011
- Bahreini, Zaker, Heydari, Vahid., Hekmat, Ali L., Taheri, Minoo, Vahid, Behrouz e Moradkhannejhad, Leila. 2016. “A comparative study of photocatalytic degradation and mineralisation of an azo dye using supported and suspended nano-TiO₂ under UV and sunlight irradiations”. *Pigment & Resin Technology* 45(2): 119-125. doi: 10.1108/PRT-03-2015-0024

- Barbosa, Kiriaque B. F., Costa, Neuza M. B., Alfenas, Rita C. G., Paula, Sérgio O. D., Minim, Valéria P. R. e Bressan, Josefina. 2010. “Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios”. *Revista de Nutrição* 23(4):629–643. doi: 10.1590/S1415-52732010000400013
- Barreiros, André. L. B. S., David, Jorge M. e David, Juceni P. 2006. “Estresse oxidativo: Relação entre Geração de espécies reativas e defesa do organismo”. *Química Nova* 29(1): 113–123. doi: 10.1590/S0100-40422006000100021
- Barth, J. A. C., Grathwohl, P., Fowler, H. J., Bellin, A., Gerzabek, M. H. e Lair, G. J. 2009. “Mobility, turnover and storage of pollutants in soils, sediments and waters: achievements and results of the EU project AquaTerra — A review”. *Agronomy Sustainable Development* 29: 161–173. doi: 10.1051/agro:2007060
- Bastos, Frederico F. 2006. “Isoenzimas de glutathione S-transferases como biomarcadores de intoxicação subletal em peixes mugilídeos”. Dissertação. Universidade Estadual do Rio de Janeiro.
- Belenguer, V., Martinez-Capel, F., Masiá, A. e Picó, Y. 2014. “Patterns of presence and concentration of pesticides in fish and Waters of the Júcar Rivers (Eastern Spain)”. *Journal Hazardous Materials* 265: 271-279. doi: 10.1016/j.jhazmat.2013.11.016
- Beketova, M. A., Keffordb, B. J., Schäferc, R. B. e Liessa, M. 2013. “Pesticides reduce regional biodiversity of stream invertebrates”. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(27) 11039 – 43. 2013. doi: 10.1073/pnas.1305618110
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L. e Stryer, L. 2004. *Bioquímica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Bermúdez-Couso, A., Arias-Estévez, M., Nóvoa-Muñoz, J. C., López-Periago, E., Soto-González, B. e Simal-Gándara, J. 2007. “Seasonal distributions of fungicides in soils and sediments of a small river basin partially devoted to vineyards”. *Water Reserch*. 41: 4515–25. doi: 10.1016/j.watres.2007.06.029
- Bilej, M., Procházková, P. e Šilerová, M. 2010. “Earthworm Immunity”. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): *Landes Bioscience*; 2000-2013. Acessado em: Janeiro de 2018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK45034>
- Bonmatin, J. M., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D., Krupke, C., Liess, M., Long, E., Marzaro, M., Mitchell, E., Noome, D., Simon-Delso, N. e Tapparo, A. 2015. “Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil”. *Environmental Science Pollution* 22(1): 35-67. doi: 10.1007/s11356-014-3332-7

- Bosh-Roig, P., Barca, D., Crisci, G. M. e Lalli, C. 2013. "Lichens as bioindicators of atmospheric heavy metal deposition in Valencia, Spain". *Journal Atmospheric Chemistry* 70:373–388. doi: 10.1007/s10874-013-9273-6
- Brasil. 1989. Lei 7.802 de 11 de Julho de 1989. Acessado em: Setembro de 2017. http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L7802.htm.
- Cabo, T.R., Rodríguez, I., Ramil, M., Cela, R. 2018. "Evaluation of the aqueous phototransformation routes of phenyl ethyl azolic fungicides by liquid chromatography accurate mass spectrometry". *Science of the Total Environment* 615: 942-54. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.10.003
- Carletti, E., Sulpizio, M., Bucciarelli, T., Boccio, P. D., Federici, L. e Ilio, C. D. 2008. "Glutathione transferases from Anguilla anguilla liver: Identification, cloning and functional characterization". *Aquatic Toxicology* 90: 48–57. doi: 10.1016/j.aquatox.2008.07.015
- Casas, M. E., Kretschmann, A. C., Andernach, L. e Opatz, T. 2016. "Separation, isolation and stereochemical assignment of imazalil enantiomers and their quantitation in na *in vitro* toxicity test". *Journal Chromatography A*. 1452: 116-120. doi: 10.1016/j.chroma.2016.05.008
- Castillo, L. E., Martínez, E., Ruepert, C., Savage, C., Gilek, M., Pinnock, M. e Solis, E. 2016. "Water quality and macroinvertebrate community response following pesticide applications in a banana plantation, Limon, Costa Rica". *Science of the Total Environment*. 367: 418-432. doi: 10.1016/j.scitotenv.2006.02.052
- Ccancapa, A., Masiá, A., Navarro-Ortega, A., Picó, Y. e Barceló, D. 2016. "Pesticides in the Ebro River basin: Occurrence and risk assessment". *Environmental Pollution* 211: 414-424. doi: 10.1016/j.envpol.2015.12.059
- Chaim, A. 2004. "Capítulo 8: Tecnologia de Aplicação de. *Agrotóxicos*: Fatores que afetam a eficiência e o impacto ambiental". Embrapa: Agrotóxicos e Ambiente.
- Chang, L., Wang, B., Liu, X., Callaham, M. A. e Ge, F. 2017. "Recovery of Collembola in *Pinus tabulaeformis* Plantations". *Pedosphere* 27(1): 129–137. doi: 10.1016/S1002-0160(15)60099-6
- Colabuono, F. I., Vander, S. S., Huncik, K. M., Taniguchi, S., Petry, M. V, Kucklick, J. R. e Montone, R. C. 2016. "Persistent organisc pollutants in blood samples of Southern Giant Petrels (*Macronectes giganteus*) from the South Shetland Island, Antactica". *Environmental Pollution*. 216: 38-45. doi: 10.1016/j.envpol.2016.05.041

Comninellis, C., Kapalka, A., Malato, S., Parsons, S. A., Poullos, I. e Mantzavinos, D. 2008. “Perspective Advanced oxidation processes for water treatment: advances and trends for R&D”. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 83: 769-76. doi: 10.1002/jctb.1873

Dale, V. H., Beyeler, S. C. 2001. “Challenges in the development and use of ecological indicators”. *Ecological Indicators* 1: 3–10. doi: 10.1016/S1470-160X(01)00003-6

De, A., Bose, R., Kumar, A., Mozumdar, S. 2014. “Targeted delivery of pesticides using biodegradable polymeric nanoparticles”. *Springer India*. New York. doi: 10.1007/978-81-322-1689-6

Denoel, M., Libon, S., Kestemont, P., Brasseur, C., Focant, J. F. e Pauw, E. D. 2013. “Effects of a sublethal pesticides exposure on locomotor behavior: a vídeo-tracking analysis in larval amphibians”. *Chemosphere*. 90: 945-51. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.06.037

Di Marzio, W. D., Saenz, M. E., Lemiere, S. e Vasseur, P. 2005. “Improved single-cell electrophoresis assay for detecting DNA damage in *Eisenia fétida*”. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 46: 246–252. doi: 10.1002/em.20153

Diaz, R., Ibáñez, M., Sancho, J. V. e Hernández, F. 2013. “Qualitative validation of a liquid chromatography-quadrupole-time of flight mass spectrometry screening method for organic pollutants in water”. *Journal of Chromatography A*. 1276: 47-57. doi: 10.1016/j.chroma.2012.12.030

Dikic, D., Mojsovic-Cuic, A., Cupor, I., Benkovic, V., Horvat-Knezevic, A., Lisicic, D. e Orsolic, N. 2012. “Carbendazim combined with imazalil or cypermethrin potentiate DNA damage in hepatocytes of mice”. *Human and Experimental Toxicology*. 31(5): 492–505. doi: 10.1177/0960327111417910

Dores e La-Monica Freire. 1999. “Contaminação do ambiente aquático por pesticidas: vias de contaminação e dinâmica dos pesticidas no ambiente aquático”. *Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente*. 9: 1-18. doi: 10.1177/0960327111417910

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 2013. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 3º Ed. Brasília. 2013.

EPA – United States Environmental Protection Agency. 2005. Prevention Pesticides and Toxic Substances. EPA-738-F-04-011. Registration Eligibility Decision (RED).

EPA – United States Environmental Protection Agency. 2010. Solid waste and emergency response glossary- Bioaccumulation: U.S. Environmental Protection Agency.

- Eyambe, G.S., Goven, A.J., Venables, B.J. e Cooper, E.L. 1991. “A non-invasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricus terrestris*) leukocytes during subchronic immunotoxicity studies”. *Lab. Anim.* 25: 61-67. doi: 10.1258/002367791780808095
- FAO – Food And Agriculture Organization Of United Nations. 2011. FAO Specifications and Evaluations for Plant Protection Products. Imazalil (±)-allyl-1-(2,4-dichlorophenyl)-2-imidazol-1ylethyl ether.
- FAO – Food And Agriculture Organization Of United Nations. 2017. Pesticide, use; FAOSTAT. Disponível em: <http://ref.data.fao.org/dataset?entryId=5e70fee4-fb65-43b6-8da1-b6de4626b9bd>
- Fay, E. F. e Silva, C. M. M. S. 2004. “Capítulo 3 - Comportamento e destino de agrotóxicos no ambiente solo-água”. Agrotóxicos e Ambiente. *Embrapa*.
- Gao, Z., Wu, Y., Zhao, H., Ji, F., He, Q. e Li, S. 2012. “Concentrations determination of new fungicide in river water by ultrasound-assisted emulsification micro-extraction and reversed-phase high performance liquid chromatography”. *Analytical Methods*. 4: 2365-2368. doi: 10.1039/C2AY25372K
- Garty, J., Tomer, S., Levin, T. e Lehr, H. 2003. “Lichens as biomonitors around a coal-fired power station in Israel”. *Environmental Research* 91: 186–198. doi: 10.1016/S0013-9351(02)00057-9
- Geigera, F., Bengtssonb, J., Berendsea, F.; Weisserc, W. W.; Emmersond, M.; Moralesf, M. B.; Ceryngierg, P.; Liirah, J.; Tscharntkei, T., Winqvistb, C., Eggersb, S., Bommarcob, R., Partb, T., Bretagnollej, V., Plantegenestk, M., Clementc, L. W., Dennisd, C., Palmerd, C., Onatef, J. J., Guerrerof, I., Hawrog, V., Aavikh, T., Thiesi, C., Flohrei, A., Hankei, S., Fischeri, C., Goedhartl, P. W., Inchaustij, P. 2010. “Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland”. *Basic and Applied Ecology*, 11: 97–105. doi: 10.1016/j.baae.2009.12.001
- Gibbs K. E., .2009. “Human land use, agriculture, pesticides and losses of imperiled species”. *Diversity and Distributions* 15(2): 242-53. doi: 10.1111/j.1472-4642.2008.00543.x
- Gomis, J., Prevot, A. B., Montoneri, E., Gonzalez, M.C., Amat, A. M., Martire, D. O., Arques, A., Carlos, L. 2014. “Waste sourced bio-based substances for solar driven wastewater remediation: photodegradation of emerging pollutants”. *Chemical Engineering Journal*. 433: 235-6. doi: 10.1016/j.cej.2013.09.009

- Goulart, M. D. e Callisto, M. 2003. “Bioindicadores de qualidade de água como ferramenta em estudos de impacto ambiental”. *Revista da FAPAM* 2 (1): 153-64.
- Guengerich F. P. 1990. “Enzymatic oxidation of xenobiotic chemicals. Critical Reviews”. *Biochemistry and Molecular Biology*. 25(2): 97-153. doi: 10.3109/10409239009090607
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jacoby, W.B. 1974. “Glutathione S-Transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation”. *The Journal of Biological Chemistry*. 249 (22): 7130-7139.
- Hazime, R., Ferronato, C., Salvador, A., Jaber, F., Chovelon, J. M. 2012. “Photocatalytic degradation of imazalil in an aqueous suspension of TiO₂ and influence of alcohols on the degradation”. *Applied Catalysis B: Environmental* 126: 90– 99. doi: 10.1016/j.apcatb.2012.07.007
- Hausenbuiller, R. L. 1978. “Soil Science, Principles and Practices”, 74-78. In Leemput, L. V., Swysen, E., Woestenborghs, R., Michielsens, L., Meuldermans, W. e Heykants, J. 1989. “On the Terrestrial Toxicity of the Fungicide Imazalil (Enilconazole) to the Earthworm Species *Eisenia fetida*”. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 18: 313-320.
- Hazime, R., Nguyen, Q. H., Ferronato, C., Salvador, A., Jaber, F., Chovelon, J. M. 2014. “Comparative study of imazalil degradation in three systems: UV/TiO₂, UV/K₂S₂O₈ and UV/TiO₂/K₂S₂O₈”. *Applied Catalysis B: Environmental* 144: 286– 291. doi: 10.1016/j.apcatb.2013.07.001
- Heusinkveld, H. J., Molendijk, J., Berg, M. V. D., Westerink, R. H. 2013. “Azole Fungicides Disturb Intracellular Ca²⁺ in an Additive Manner in Dopaminergic PC12 Cells”. *Toxicological Sciences*. 134(2): 374-381. doi: 10.1093/toxsci/kft119
- Huber, P. C., Almeida, W. P., Fátima, A. 2008. “Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos”. *Química Nova* 31(5): 1170-1179. doi: 10.1590/S0100-40422008000500046
- IBAMA - Instituto Brasileiro Do Meio Ambiente E Dos Recursos Naturais Renováveis. 2009. Manual para requerimento de avaliação ambiental: agrotóxicos e afins/ DIQUA CGASQ. – Brasília: IBAMA.
- IBAMA - Instituto Brasileiro Do Meio Ambiente E Dos Recursos Naturais Renováveis. 2017. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2017. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola, Sistema IBGE de Recuperação Automática (SIDRA). Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6588>.

ISO - International Organization For Standardization. 2012. 11268-1, Soil quality: Effects of 560 Pollutants on Earthworms. Part 1: Determination of Acute Toxicity (*Eisenia fetida*/ *Eisenia* 561 *andrei*). Genebra.

ISO - International Organization For Standardization. 2012. 11268-2, Soil quality: Effects of 563 Pollutants on Earthworms. Part 2: Determination of Effects on Reproduction (*Eisenia fetida*/ 564 *Eisenia andrei*).

ISO - International Organization For Standardization. 2011. 17512-1, Soil quality: Avoidance Test 566 for Determining the Quality of Soils and Effects of Chemicals on Behaviour. Part 1: Test with 567 Earthworms (*Eisenia fetida*/ *Eisenia andrei*).

Isenring, R. 2010. “Pesticides and the loss of biodiversity: How intensive pesticide use affects wildlife populations and species diversity”. *Pesticide Action Network Europe*. 2010.

Jeliazkov, A., Mirnet, A., Chargé, R., Jiguet, F., Devistor, V., Chiron, F. 2016. “Impacts of agricultural intensification on Bird communities: New insights from a multi-level and multi-facet approach of biodiversity”. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 2016: 9-22. doi: 10.1016/j.agee.2015.09.017

Jiménez M., Maldonado M.I., Rodríguez E.M., Hernández-Ramírez A., Saggioro E., Carra I., Sánchez-Pérez J. 2014. “A supported TiO₂ solar photocatalysis at semi-pilot scale: degradation of pesticides found in citrus processing industry wastewater, reactivity and influence of photogenerated species”. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 90(1): 149-157. doi: 10.1002/jctb.4299

Jin, C., Zeng, Z., Fu, Z., Jin, Y. 2016. “Oral imazalil exposure induces gut microbiota dysbiosis and colonic inflammation in mice”. *Chemosphere*. 160: 349-358. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.06.105

Kang, J. H., Son, M. H., Hur, S. D., Hong, S., Motoyama, H., Fukui, K., Chang, Y. S. 2012. “Deposition of organochlorine pesticides into the surface snow of East Antarctica.” *Science Total Environmental* 433: 29-5. doi: 10.1016/j.scitotenv.2012.06.037

Katagi T. e Ose K. 2015. “Toxicity, bioaccumulation and metabolism of pesticides in the earthworm”. *Journal of Pesticide Science*. 40(3): 69-81. doi: 10.1584/jpestics.D15-003

- Kede, M. L. F. M., Correia, F. V., Conceição, P. F., Salles Junior, S. F., Marques, M., Moreira, J. C., Pérez, D. V. 2014. "Evaluation of Mobility, Bioavailability and Toxicity of Pb and Cd in Contaminated Soil Using TCLP, BCR and Earthworms". *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 11: 11528-40. doi: 10.3390/ijerph111111528
- Klump, A., Ansel, W., Klumpp, G., Fomim, A. 2001. "Um novo conceito de monitoramento e comunicação ambiental: a rede europeia para a avaliação da qualidade do ar usando plantas bioindicadoras (EuroBionet)". *Revista Brasileira de Botânica* 24(4) 511-18. doi: 10.1590/S0100-84042001000500005
- Knoepp, J.D., Coleman, D.C., Crossey Jr., D.A, Clark, J.S. 2000. "Biological indices of Soil quality: an ecosystem case study of their use". *Forest Ecology and Management* 138: 357-368. doi: 10.1016/S0378-1127(00)00424-2
- Kommineni, S., Zoeckler, J., Stocking, A., Liang, S., Flores, A. e Kavanaugh, M. 2008. "Advanced Oxidation Processes". *National Water Research Institute*.
- Kurek, A., Homa, J., Kauschke, E., Plytycz, B. 2007. "Characteristic of coelomocytes of the stubby earthworm, *Allolobophora chlorotica* (Sav.)". *European Journal Biology* 43: S121-S126. doi: 10.1016/j.ejsobi.2007.08.051
- Leemput, L. V., Swysen, E., Woestenborghs, R., Michielsens, L., Meuldermans, W. e Heykants, J. 1989. "On the Terrestrial Toxicity of the Fungicide Imazalil (Enilconazole) to the Earthworm Species *Eisenia fetida*". *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 18: 313-320.
- Lizotte E. R., Knight S. S., Bryant C. T. 2010. "Sediment quality assessment of Beasley Lake: bioaccumulation and effects of pesticides in *Hyaella azteca*". *Chemistry and Ecology*. 26(6): 411-24. doi: 10.1080/02757540.2010.522997
- Lowry, L. K. 1995. "Role of biomarkers of exposure in the assessment of health risks". *Toxicology Letters* 77: 31-38. doi.org/10.1080/10807039609383604
- Martín-Díaz, M. L.; Blasco, J.; Sales, D.; Delvalls, T. A. 2004. "Biomarkers as tools to assess sediment quality: Laboratory and field surveys". *Trends in Analytical Chemistry*. 23: 10–11. doi: 10.1016/j.trac.2004.07.012
- Masiá, A.; Vásquez, K.; Campo, J.; Picó, Y. 2015. "Assessment of two extraction methods to determine pesticides in soils, sediments and sludges: Application to the Túria River Basin". *Journal of Chromatography A*. 1378: 19–31. 2015. doi: 10.1016/j.chroma.2014.11.079

Mboula, V.M. 2013. "Photocatalytic degradation of endocrine disruptor compounds under simulated solar light." *Water Research*. XX: I-9. doi: 10.1016/j.watres.2013.01.055

Meire, R O., Khairy, M., Targino, A. C., Galvão, P. M. A., Torres, J. P. M., Malm, O., Lohmann, R. 2016. "Use of passive samplers to detect organochlorine pesticides in air and water at wetland mountains regions sites (S-SE Brazil)". *Chemosphere*. 114: 2175-82. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.10.133

Miller, G. T. 2013. *Ciência Ambiental*. 11º edição. Ed Cengage Learning, São Paulo.

MMA - Ministério Do Meio Ambiente. Acessado em Agosto de 2017. <http://www.mma.gov.br/biodiversidade>

MMA - Ministério Do Meio Ambiente. 2018. Acessado em: Fevereiro de 2018. <http://www.mma.gov.br/informma/item/7513-conven%C3%A7%C3%A3o-sobre-diversidade-biol%C3%B3gica-cdb>

Nelson, R. A., Thomas, N. W., Matcham, G. W., Lin, S. L., Zhang, M., Lewis, C. 2000. Preparation of (S)-imazalil as a fungicide. Celene Corporation, USA.

Odum, E. 1988. *Ecologia*. Ed. Guanabara, Rio de Janeiro.

Olchawa, E., Bzowska, M., StuRzembaum, S., Morgan, J., Plytycz, B. 2006. "Heavy metals affect the coelomocyte-bacteria balance in earthworms: environmental interactions between abiotic and tic stressors". *Environmental Pollution*. 142(2): 373-81. doi: 10.1016/j.envpol.2005.09.023

OECD - Organization For Economic Cooperation And Development. 1984. Guideline for Testing of 583 Chemicals Nº 207: Earthworm Acute Toxicity Tests. Paris.

OMS - Organização Mundial da Saúde. 1993. International Programme on Chemical Safety (IPCS), Biomarkers and risk assessment: concepts and principles, Environmental Health Criteria 155, Geneva, Switzerland.

Pennati, R, Groppelli, S, Zega, G, Biggiogero, M, De Bernardi, F, Sotgia, C. 2006. "Toxic effects of two pesticides, Imazalil and triadimefon, on the early development of the ascidian *Phallusia mammillata* (Chordata, Ascidiacea)". *Aquatic Toxicology*. 79(3): 205 - 212. doi: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.05.012>

Pereira, P. C. G., Reimão, R. V., Pavesi, T., Saggiaro, E. M., Moreira, J. C., Veríssimo C. F. 2017. "Lethal and sub-lethal evaluation of Indigo Carmine dye and byproducts after TiO₂ photocatalysis in the immune system of *Eisenia andrei* earthworms". *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 143: 275-82. doi: 10.1016/j.ecoenv.2017.05.043

- Plytycz, B., Lis-Molenda, U., Cygal, M., Kielbasa, E., Grebosz, A., Duchnowski, M. 2009. "Riboflavin content of coelomocytes in earthworm (*Dendrodrilus rubidus*) field populations as a molecular biomarker of soil metal pollution". *Environmental Pollution* 157: 3042-50. doi: 10.1002/jez.1834
- Prado, R., García, R., Rioboo, C., Herrero, C., Cid, A. 2015. "Suitability of cytotoxicity endpoints and test microalgal species to disclose the toxic effect of common aquatic pollutants". *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 114: 117–25. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.01.021
- Rabiet, M., Margoum, C., Gouy, V., Carlier, N., Coquery, M. 2010. "Assessing pesticide concentrations and fluxes in the stream of a small vineyard catchment—Effect of sampling frequency". *Environmental Pollution*. 158: 737–48. doi: 10.1016/j.envpol.2009.10.014
- Rountree, M. D. R. 2015. "Roundoc Rx: Monoculture and loss of biodiversity: effects on health". *Alternative and Complementary Therapies*. 21(1): 6-12. doi: 10.1089/act.2015.21110
- Rocha, O. R. S, Dantas, R. F, Bezerra, D. M. M. M, Lima, D. M. M, Silva, V. L. 2013. "Solar photo-Fenton treatment of petroleum extraction wastewater". *Desalination and Water Treatment*. 51(28-30): 5785-5791. doi: 10.1080/19443994.2013.792136
- Ruppert, E. E., Fox, R. S., Barnes, R. D. 2005. *Zoologia dos Invertebrados*. 7^a ed. Editora Roca, São Paulo.
- Saggioro, E. M., Oliveira, A. S., Pavesi, T., Moreira, J.C. 2015. "Effect of Activated Carbon and Titanium Dioxide on the Remediation of an Indigoid Dye in Model Waters". *Revista de Chimie (Bucharest)*. 65: 237-241.
- Saien, J., Khezrianjoo, S. 2008. "Degradation of the Fungicide Carbendazim in Aqueous Solutions with UV/TiO₂ Process: Optimization, Kinetics and Toxicity Studies. *Journal Hazardous Materials*". 157: 269–276. doi: 10.1016/j.jhazmat.2007
- Santiago, D. E., Donã-Rodríguez, J. M., Araña, J., Fernández-Rodríguez, C., González-Díaz, O., Perez-Peña, J., Silva, A. M. T. 2013. "Optimization of degradation of imazalil by photocatalysis: Comparation between commercial and lab-made photocatalysis". *Applied Catalysis B: Environmental* 138-139: 391-400. doi: 10.1016/j.apcatb.2013.03.024
- Santiago, D. E., Araña, J. González-Díaz, O., Alemán-Dominguez, M. E., Acosta-Dacal, A. C., Fernandez-Rodríguez, C. Pérez-Peña, J., Doña-Rodríguez, M. 2014. "Effect of inorganic ions on the photocatalytic treatment of agro-industrial wastewaters

containing imazalil”. *Applied Catalysis B: Environmental* 156–157: 284–92. doi: 10.1016/j.apcatb.2014.03.022

Santiago, D. E., Espino-Estévez, M. R., González, G. V., Araña, J., González-Díaz, O., Doña-Rodríguez, J. M. 2015. “Photocatalytic treatment of water containing imazalil using na immobilized TiO₂ photoreactor”. *Applied Catalysis A: General* 498: 1–9. doi: 10.1016/j.apcata.2015.03.021

Sauvé, S., & Desrosiers, M. 2014. “A review of what is na emerging contaminant”. *Chemistry Central Journal* 8: 15. doi: 10.1186/1752-153X-8-15

Schröck, E., Geret, F., Gontier, L., Treilhou, M. 2008. “Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*”. *Chemosphere* 71: 1832-39. doi: 10.1016/j.chemosphere.2008.02.003

Secretariado Da Convenção Sobre Diversidade Biológica. 2014. Panorama da Biodiversidade Global 4: Uma avaliação intermediária do processo rumo a implementação do Plano Estratégico para a Biodiversidade 2011-2020. Montréal. ISBN- 92-9225-540-1

Setvin, M., Shi, X., Hulva, J., Simschitz, T., Parkinson, G. S., Schmid, M., Valentin, C. D., Selloni, A., Diebold, U. 2017. “Methanol on anatase TiO₂ (101): Mechanistic insights into photocatalysis”. *American Chemical Society Catalysis*. 7: 7081-91. doi: 10.1021/acscatal.7b02003

Sheehan D., Meade G., Foley V. M., Downd C.A. 2001. “Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily”. *Biochemical Journal*. 15(360): 1-16. doi: 10.1042/0264-6021:3600001

Şişman, T; Türkez, H. 2010. “Toxicologic evaluation of Imazalil with particular reference to genotoxic and teratogenic potentials”. *Toxicology and Industrial Health*. 26(10): 641-648. doi: 10.1177/0748233710375951

Sluijs, J. P., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bijleveld van Lexmond, M. F. I. J., Bonmatin, J-M., Changnon, M., Downs, C. A., Furian, L., Gibbons, D. W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D, P., Krupke, C., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E. A. D., Morrissey, C. A., Noome, D. A., Pisa, L., Settele, J., Simon-Delso, N., Stark, J. D., Tapparo, A., Van Dyck, H., van Praagh, J., Whitehorn, P. R., Wiemers, M. 2015. “Conclusions of the Worldwide Integrated Assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem

functioning”. *Environmental Science Pollution Research* 22: 148-54. doi: s11356-014-3229-5

Tanaka, T. 1995. “Reproductive and neurobehavioral effects of imazalil administered to mice”. *Reproductive Toxicology* 9(3): 281-88. doi: 10.1016/0890-6238(95)00010-8

Turkez, H., Aydin, E., Sisman, T., Aslan, A. 2011. “Role of *Peltigera rufescens* (Weis) Humb. (a lichen) on imazalil-induced genotoxicity: analysis of micronucleus and chromosome aberrations in vitro”. *Toxicology and Industrial Health* 28(6): 492–98. doi: 10.1177/0748233711414615

USEPA - United States Environmental Protection Agency. 1996. 712-C-96-167 (OPPTS 605 850.4200). Seed Germination / Root Elongation Toxicity Test. Ecological effects test 606 guidelines. Washington DC.

Van Leemput, L., Swyen, E., Woestenborghs, R., Michielsens, L., Meuldermans, W., Heykants, J. 1989. “On the terrestrial toxicity of the fungicide imazalil (enilconazole) to the earthworm species *Eisenia fetida*”. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 18: 313-20. doi: 10.1016/0147-6513(89)90025-0

Vieira, I.C., Toledo, P. M., Silva, J. M., Higuchi, H. 2008. “Deforestation and threats to the biodiversity of Amazonia”. *Brazilian Journal Biology* 68: 949-956. doi: 10.1590/S1519-69842008000500004

Vindas, R., Ortiz, F., Ramirez, V., Cuenca, P. 2004. “Genotoxicity of three pesticides used in Costa Rican banana plantations”. *Revista de Biología Tropical*. 52(3): 601-9.

Wang, J., Liang, L., Henkelmann, B., Pfister, G., Schramm, K-W. 2015. “Organochlorine pesticides accumulated by SPMD-based virtual organisms and feral fish in Three Gorges Reservoir, China”. *Environmental Pollution*. 202: 160-67. doi: 10.1016/j.envpol.2015.03.031

Williams, G. R., Troxler, A., Retsching, G., Roth K., Yanez, O., Shutler, D., Neumann, P., Gauthier, L. 2015. “Neonicotinoid pesticides severely affect honey bee queens”. *Nature. Scientific reports* 5. Article number: 14621. doi: 10.1038/srep14621

Wink, C., Guedes, J. V. C., Fagundes, C. K., Rovedder, A. P. 2005. “Insetos edáficos como indicadores da qualidade ambiental”. *Revista de Ciências Agroveterinárias, Lages* 4(1): 60-71.

Yamamoto, K., Tsuji, Y., Aso, Y., Hamasaki, T., Shirahata, S., Katakura, Y. 2011. “Effect of diazinon exposure on antioxidant reactions in the silkworm, *Bombyx mori*”. *Journal of Applied Entomology*. 135: 320–25. doi: 10.1111/j.1439-0418.2010.01549.x

- Yoshida, Y. 1988. "Cytochrome P450 of fungi: primary target for azole antifungal agents". *Current Topics in Medical Mycology* 2: 388–418. doi: 10.1007/978-1-4612-3730-3_11
- Zhang, Q., Zhang, G., Yin, P., Lv, Y., Yuan, S., Chen, J., Wei, B., Wang, C. 2015. "Toxicological effects of soil contaminated with spirotetramat to the earthworm *Eisenia fétida*". *Chemosphere* 139: 138–45. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.05.091
- Zarn, J. A., Bruschweiler, B. J., Schlatter, J. R. 2003. "Azole fungicides affect mammalian steroidogenesis by inhibiting sterol 14 alpha-demethylase and aromatase". *Environmental Health Perspective* 111(3): 255–61. doi: 10.1289/ehp.5785
- Zega, G., De Bernardi, F., Groppelli, S., Pennati, R. 2009. "Effects of the azole fungicide imazalil on the development of the ascidian *Ciona intestinalis* (Chordata, Tunicata): morphological and molecular characterization of the induced phenotype". *Aquatic Toxicology*. 91(3): 255-61. doi: 10.1016/j.aquatox.2008.11.015