

ENSAIO DE TOXICIDADE COM ARTEMIA SALINA EXPOSTAS AO GLIFOSATO, MANCOZEBE, FIPRONIL E SUAS MISTURAS

TOXICITY TEST WITH SALINE ARTEMIA EXPOSED TO GLYPHOSATE, MANCOZEB, FIPRONIL AND THEIR MIXTURES

Brunna Emanuely Gonçalves Ferreira¹
Walter Dias Júnior²

RESUMO: O presente estudo teve como principal objetivo avaliar a mortalidade de náuplios de *Artemia salina* tratados com os agrotóxicos Fipronil, Glifosato e Mancozebe, nas doses estabelecidas pela Ingestão Diária Aceitável (IDA/ANVISA) e o dobro da dose (IDA/ANVISA) e suas misturas. Os náuplios foram obtidos a partir de cistos de *A. salina*, sendo expostos aos agrotóxicos individualmente e em misturas, seguindo protocolos de bioensaio. Os resultados indicaram que a exposição aos agrotóxicos aumentou a mortalidade, sendo mais pronunciada em exposições prolongadas de 48 horas. A avaliação das misturas revelou padrões distintos de toxicidade, destacando a combinação de Glifosato e Mancozebe como a mais tóxica. Surpreendentemente, a duplicação da dose de Mancozebe resultou em uma redução na mortalidade dos microcrustáceos. O teste de resistência ao pH das soluções mostrou que os náuplios apresentaram alta resistência a uma faixa que vario de 5,5 A 9,8. Esses achados ressaltam a complexidade das interações entre agrotóxicos e a importância de avaliar não apenas seus efeitos individuais, mas também suas combinações para compreender abrangentemente os riscos ambientais associados a essas substâncias.

1626

Palavras-chave: Pesticidas. Agrotóxicos. Náuplios.

ABSTRACT: The present study had as its main objective to evaluate the mortality of *Artemia salina* nauplii treated with the pesticides Fipronil, Glyphosate, and Mancozeb, at doses established by the Acceptable Daily Intake (ADI/ANVISA) and twice the dose (ADI/ANVISA), as well as their mixtures. The nauplii were obtained from *A. salina* cysts and were exposed to the pesticides individually and in mixtures following bioassay protocols. The results indicated that exposure to pesticides increased mortality, with a more pronounced effect in prolonged exposures of 48 hours. Evaluation of the mixtures revealed distinct patterns of toxicity, with the combination of Glyphosate and Mancozeb being the most toxic. Surprisingly, doubling the dose of Mancozeb resulted in a reduction in microcrustacean mortality. The pH resistance test of the solutions showed that the nauplii exhibited high resistance within a pH range of 5.5 to 9.8. These findings underscore the complexity of interactions between pesticides and emphasize the importance of assessing not only their individual effects but also their combinations to comprehensively understand the environmental risks associated with these substances.

Keywords: Pesticides. Pesticides. Nauplii.

¹Discente de graduação em Enfermagem –Universidade Estadual de Goiás –Unidade Universitária de Ceres/GO.

²Docente e Pesquisador –Universidade Estadual de Goiás –Unidade Universitária de Ceres/GO.

INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com a saúde humana nas últimas décadas tem sido impulsionada por diversos fatores, sendo a contaminação por agrotóxicos um significativo e recorrente motivo de inquietação. Estudos como os de (Nougadère et al., 2012; Chowdhury et al., 2013; Peng et al., 2014; Guo et al., 2018; Chen et al., 2019) têm destacado a prevalência da ingestão contínua de baixas doses desses compostos, resultantes da presença residual nos alimentos comercializados. Este fenômeno não apenas levanta preocupações sobre a segurança alimentar, mas também suscita questões profundas sobre os potenciais impactos na saúde pública, marcando um desafio significativo para as políticas de saúde e regulamentações ambientais. Neste contexto, a compreensão abrangente dessas implicações torna-se imperativa para desenvolver estratégias eficazes de mitigação e proteção da saúde da população.

Os Agrotóxicos tem grande importância na agricultura, pois contribuem diretamente com o aumento da produtividade agrícola e com a melhoria da aparência dos alimentos. Por outro lado, interferem diretamente na saúde da população, tanto dos trabalhadores das lavouras como dos consumidores finais dos produtos, visto que está comprovada a existência de resíduos nos alimentos que consumimos (Chowdhury et al., 2013).

1627

Tendo em vista que o Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo, surge a necessidade de analisar esses impactos sobre a saúde da população, visto que vários estudos associam o consumo e manejo de agrotóxicos a longo prazo a diversas patologias humanas (Abrasco, 2012).

Os agrotóxicos que serão utilizados neste estudo foram selecionados por terem ampla utilização na agricultura em nosso país e por terem sido encontrados nos alimentos analisados pelo Programa de Análise de Resíduos de Alimentos (PARA) (Anvisa, 2019c) desenvolvido pela Agência de Vigilância Sanitária, pelo qual foi possível identificar quais as classes de xenobióticos mais empregadas na região Centro-Oeste. Assim, os pesticidas que compõem este estudo são as formulações comerciais do Fipronil (Poderoso 25CE-Grupo Kelldrin), o Glifosato (Gliz® 480SL-Dow Agrosience) e o Mancozebe (Dithane®NT-Dow Agrosience) e estão descritos a seguir.

Fipronil pertence a uma nova geração de inseticidas, fenilprizólico de amplo espectro, recomendado para uso agrícola, veterinário, médico e para controlar uma grande variedade de pestes urbanas (Zortéa et al., 2018; Tavares, 2015; Peng et al., 2014; Zhao et al., 2004).

Sua degradação por oxidação metabólica produz a fipronil sulfona e sua degradação por fotólise produz fipronil dessulfínil, havendo pouca diferença de toxicidade entre o fipronil e seus metabólitos (Zortéa et al., 2018). A ação tóxica do fipronil é devida à sua ação bloqueadora e não competitiva dos canais de cloreto ligados aos receptores GABA (ác. gama-aminobutírico) do sistema nervoso (Tavares, 2015; Zhao et al., 2004).

Além do sistema nervoso central, nos mamíferos, o fígado é outro potencial alvo deste inseticida. Sua ação tóxica parece estar relacionada com a inibição da síntese de ATP, atuando como inibidor e desacoplador mitocondrial, além de estimular o efluxo de íons cálcio (Zortéa et al., 2018). A degradação hepática por oxidação é catalisada por enzimas do citocromo P450, e tanto o fipronil como seus metabólitos (fipronil sulfona e fipronil dessulfínil) resultantes da degradação podem induzir a morte de hepatócitos humanos (Leghait et al., 2009; Das et al., 2006).

Seu uso está proibido nos Estados Unidos e na China devido sua toxicidade e aos riscos ecológicos (Chen et al., 2018), como alta mortalidade de abelhas (Holder et al., 2018). Por outro lado, a União Europeia e o Japão permitem um limite máximo de resíduo nos alimentos e produtos agrícolas de aproximadamente $5\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso corporal (Chen et al., 2018), assim como no Brasil, em que a Anvisa determina o limite de $0,2\mu\text{g}/\text{Kg}$ de peso corporal como ingestão diária aceitável (IDA) (Anvisa, 2019b). Na China, apesar de estar proibido há mais de 10 anos, resíduos de fipronil ainda podem ser encontrados nos vegetais, frutas, chá e outros produtos agrícolas, devido à sua persistência no ambiente ou ao seu uso indiscriminado (Chowdhury et al., 2013; Chen et al., 2018).

Já o Glifosato é classificado como um herbicida pós-emergente, pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas, possuindo ação sistêmica. Representam em média 40% do consumo de agrotóxicos no Brasil, e o índice monográfico publicado pela Anvisa, determina uma Ingestão Diária Aceitável (IDA) de $0,042\text{ mg}/\text{Kg p.c.}$ (Anvisa, 2019a).

A agência internacional de pesquisa em câncer (IARC) admite que o glifosato causa câncer em animais de laboratório tratados com esse herbicida. Além disso, o relatório indica o glifosato como potencial causador de alteração na estrutura do DNA e nas estruturas cromossômicas das células humanas (Iarc, 2017; Iarc, 2015; Guyton et al., 2015).

Os fungicidas constituem um dos principais defensivos utilizados na agricultura, sendo o Mancozebe um produto de amplo espectro comercializado em grande escala e indicado para uma ampla variedade de culturas, que vão desde hortaliças até cereais. Seu princípio ativo é o etilenobisditiocarbamato (EBDC) (Grisolla, 2005), e a Anvisa o considera

como um fungicida de classificação ambiental II, ou muito perigoso ao meio ambiente (Goldoni, 2012).

De acordo com dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), os fungicidas da classe dos ditiocarbamatos são compostos derivados do ácido ditiocarbâmico que apresentam baixa toxicidade aguda. No entanto, os EBDCs apresentam riscos associados ao seu principal produto de metabolização, a etilenotiouréia (ETU). Apesar disso, existem fortes evidências de carcinogenicidade, desordens reprodutivas e neurotoxicidade em animais de laboratório ou em trabalhadores rurais expostos ao Mancozebe. De acordo com o índice monográfico publicado pela Anvisa a quantidade de ingestão diária aceitável (IDA) para o mancozebe e de 0,03 mg/Kg de peso corporal (Anvisa, 2020).

É comum ocorrer a infestação de plantas daninhas, pragas e doenças, coincidentemente em uma mesma zona agrícola. Desta forma, o uso de misturas de agrotóxicos se torna uma medida corriqueira e econômica adotada pelos agricultores, ou seja, os alimentos que consumimos muitas vezes estão contaminados com mais de um agrotóxico (Gazzieiro, 2015).

Chalet et al., 2019) comentam que a possibilidade da mistura de glifosato e fipronil é bastante comum, pois o glifosato é normalmente indicado e utilizado para dessecar culturas de arroz, soja, e milho e facilitar a colheita. Por outro lado, no pós-colheita, inseticidas à base de fipronil são utilizados para tratar as sementes dessas mesmas culturas durante o armazenamento em silos. Portanto, é de se esperar que esses grãos, ou seus produtos derivados, cheguem contaminados com esses agrotóxicos à mesa da população brasileira.

Além disso, e o mais grave, é que a exposição da mistura de glifosato e fipronato (Chalet et al., 2019) promove um efeito sinérgico, aumentando os efeitos adversos desses agrotóxicos.

Efeitos sinérgicos também são relatados em vários outros tipos de misturas de agrotóxicos, como glifosato e clorpirifos (Bonifácio et al., 2016), endosulfan e fenanterano (Kim et al., 2018), abamectina e defenoconazole (Sanches et al., 2018), permetrina e cipermetrina (Yang et al., 2014), clorpirifós e cipermetrina (Zhang et al., 2017) e várias outras misturas de agrotóxicos (Wang et al., 2017 e 2018).

Partindo desse pressuposto, torna-se de suma importância estudar a ação de misturas de diferentes agrotóxicos em organismos vivos.

Em vista do exposto acima, experimentos que permitem a avaliação dos efeitos de baixas doses de pesticidas, isolados ou combinados, simulando as concentrações encontradas

no ambiente, ou que a legislação brasileira permite como resíduo em alimentos, certamente contribuirá para uma melhor compreensão da dinâmica desses compostos no meio ambiente, seus efeitos nos organismos vivos, e conseqüentemente para a saúde humana.

Em vista disso, modelos experimentais como a *Artêmia salina* L., um microcrustáceo da ordem Anostraca encontrado em águas salgadas, tem sido usado desde 1956 em experimentos laboratoriais como bioindicador de toxicidade, devido seu baixo custo, alta sensibilidade e fácil manuseio (Cavalcante et al., 2000).

A letalidade desse organismo tem sido utilizada para identificação de repostas biológicas, cujas variáveis como a morte ou vida são as únicas envolvidas (Meyer et al., 1982; Carvalho et al., 2009). O ensaio de toxicidade com *Artemia salina* consiste em avaliar a toxicidade aguda do composto testado e por isso é fator determinante em bioensaios.

Do exposto acima, estudos das interações de pesticidas esclarecem a forma com que a agroindústria prejudica a saúde no Brasil e no mundo, e faz com que seja ainda mais necessário o estudo extensivo de xenobióticos, como também, a forma com que a população busca a restituição da saúde.

O comprometimento da saúde da população por meio da ingestão residual de agrotóxicos nos alimentos, apesar dos órgãos competentes determinarem que são aceitáveis e inócuas, faz necessária a elucidação dos reais efeitos dessas baixas doses, e a comprovação de que são realmente seguras.

Portanto, o objetivo do nosso trabalho foi avaliar a mortalidade de náuplios de *Artêmia salina* tratados com agrotóxicos Fipronil, Glifosato e Mancozebe nas doses de IDA/ANVISA e o dobro da IDA/ANVISA, assim como suas misturas.

MATERIAIS E METODOS

OBTENÇÃO DOS NÁUPLIOS DE ARTÊMIA SALINA

Os cistos de *A. salina* foram adquiridos pela doação da Empresa Artêmia salina do RN, Rio Grande do Norte/RN. Para eclosão, os cistos foram colocados em solução salina 3,5%, 0,06mg de extrato de levedura, e pH entre 8 e 9, o que já é alcançado somente com a utilização do sal marinho da marca Ocean Tech, sem necessidade de ajuste do pH. Dessa forma, obtivemos a solução salina final padronizada para eclosão e incubação dos cistos e para a diluição dos agrotóxicos. A salina padronizada com os cistos ficaram em um funil de separação (artemilheiro), continuamente aerada, iluminada com uma lâmpada fluorescente

de 40W e com temperatura mantida entre 26 a 30°C, durante 24 horas, quando se tinha início a eclosão dos cistos.

Após a eclosão os náuplios foram agrupados devido a atração pela luz (ainda dentro do artemilheiro) e coletados com auxílio de uma pipeta de Pasteur, sendo transferidos para uma placa de petri com salina fresca (adaptado de MOLINA-SALINAS *et al.*, 2006), para separação dos náuplios com natação mais ativa, que eram coletados para compor o teste de toxicidade.

BIOENSAIO COM ARTÊMIA SALINA

Para o teste de toxicidade foi feita uma adaptação do recomendado por Molina-Salinas *et al.*, (2006); Meyer *et al.*, (1982) e pelo Teste 202: *Daphnia sp.*, Acute Immobilization Test (OECD, 2004).

Nesse teste, foi utilizada uma microplaca com 96 poços, nos quais eram colocados 400µL de solução teste (agrotóxicos isolados e suas combinações), controle negativo (salina 3,5%) e controle positivo de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$ - 0,001M - 0,4mg/mL). As soluções teste de agrotóxicos eram compostas de uma diluição dos produtos comerciais correspondente à IDA (Ingestão Diária Aceitável) determinada pela Anvisa e publicada no Índice Monográfico/Anvisa. As misturas foram feitas a partir de combinações duas a duas e das três formulações de forma a manter a dose correspondente à IDA para cada componente da mistura.

A solução teste de mancozebe era composta de uma diluição do produto comercial DITHANE®NT-Dow Agrosience na concentração de 0,03ppm (mg/Kg de peso corporal) de mancozebe, que é a dose correspondente à IDA (Ingestão Diária Aceitável (ANVISA, 2020).

A solução teste glifosato era composta de uma diluição do produto comercial Gliz®480SL-Dow Agrosience na concentração de 0,042 mg/Kg de peso corporal de Gifosato, que é a dose correspondente a IDA (Ingestão Diária Aceitável) (Anvisa, 2019a).

E a solução teste Fipronil era composta de uma diluição do produto comercial Poderoso 25CE-Grupo Kelldrin), na concentração de 0,2µg/Kg de peso corporal que é a dose correspondente à IDA (Ingestão Diária Aceitável (Anvisa, 2019b).

O cada tratamento foi constituído de 6 repetições (poços) com 10 náuplios cada, de acordo com o recomendado pelo Teste 202 (OECD, 2004). Após 24 e 48h de incubação foi realizada a contagem do número de náuplios mortos/imóveis para análise dos resultados.

Os resultados estão apresentados como Média±Desvio padrão da média, e a eles foi aplicada uma análise de variância (ANOVA) seguido do Teste t com 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ENSAIO DE TOXICIDADE COM AGROTÓXICOS, GLIFOSATO, FIPRONIL E MANCOZEBE NAS DOSES DE INGESTÃO DIÁRIA ACEITÁVEL (IDA/ANVISA)

Ao analisarmos os dados de mortalidade dos náuplios de artemias tratados com os agrotóxicos isolados durante 24 e 48h, nas doses de Ingestão Diária Aceitável (IDA) determinadas pela ANVISA como seguras, foi possível observar que a exposição durante 24 e 48h proporcionou uma mortalidade dos crustáceos expostos aos agrotóxicos em relação aos seus respectivos controles negativos, os quais não apresentaram nenhuma mortalidade. Assim, quando analisamos a mortalidade dos náuplios expostos durante 24h (*) e 48h (#) (Figura 1) verificamos que todos os agrotóxicos (Mancozebe, Fipronil e Glifosato) causaram mortalidade de aproximadamente $1,2 \pm 3,3\%$ em 24h de exposição e $3,43 \pm 5,74\%$ em 48 horas de exposição ($p < 0,05$).

No entanto, é importante destacar que somente as moléculas de Mancozebe e Fipronil demonstraram aumento da mortalidade quando comparamos os efeitos tóxicos entre a exposição durante 24h com a exposição durante 48 horas (♦) (Figura 2).

1632

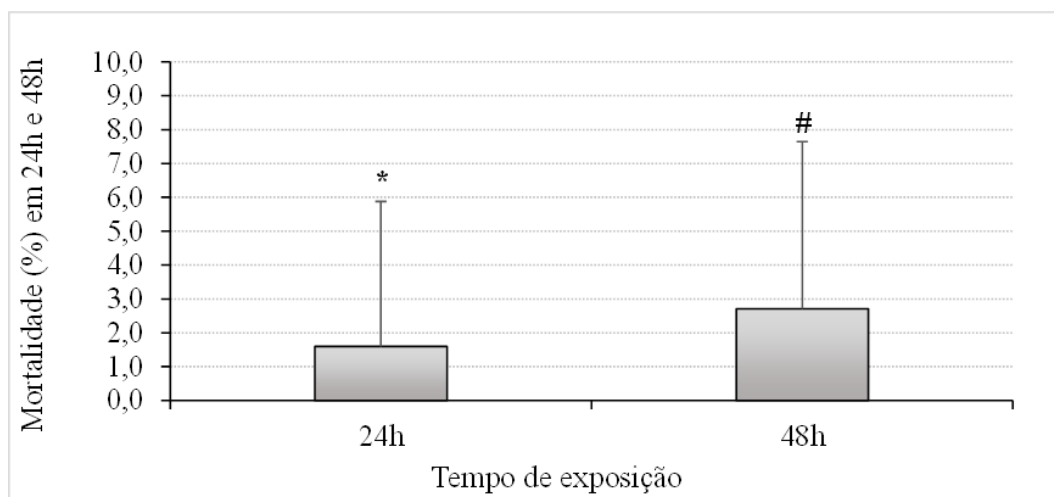


Figura 1: Mortalidade (%) dos náuplios de *Artemia salina* expostos às formulações comerciais de agrotóxicos nas doses de Ingestão Diária Aceitável (IDA/Anvisa) (Glifosato: 0,042mg/Kg p.c.; Fipronil: 0,2µg/Kg p.c.; Mancozebe: 0,03mg/Kg p.c.) durante 24 e 48h. ($p < 0,05$) versus Controle negativo/24h; #($p < 0,05$) versus Controle negativo/48h.

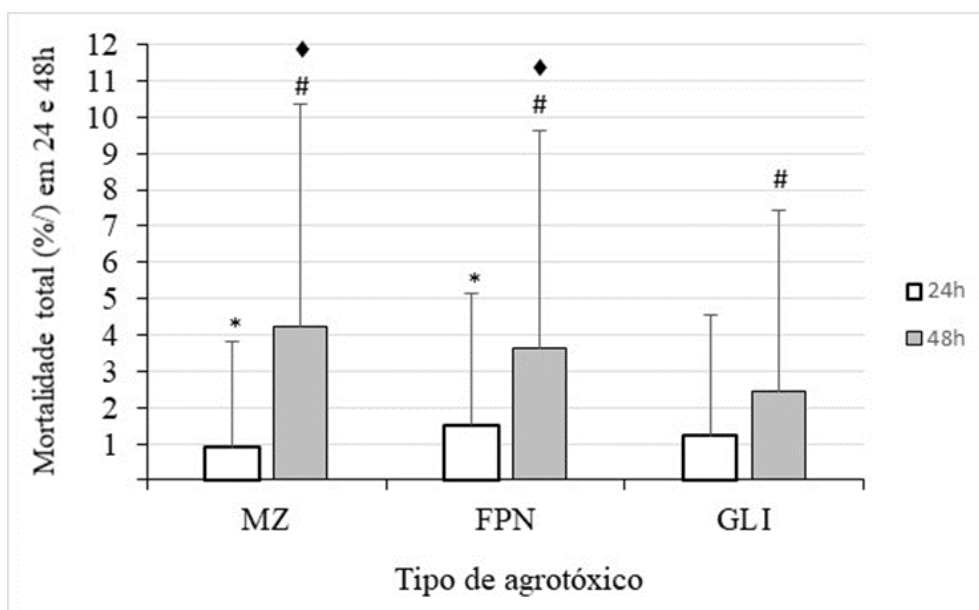


Figura 2: Mortalidade (%) dos náuplios de *Artemia salina* expostos às formulações comerciais de agrotóxicos isoladamente nas doses de Ingestão Diária Aceitável (IDA/Anvisa) (Glifosato: 0,042mg/Kg p.c.; Fipronil: 0,2µg/Kg p.c.; Mancozebe: 0,03mg/Kg p.c.) durante 24 e 48h. GLI=Glifosato; FPN=Fipronil; MZ=Mancozebe. * ($p < 0,05$) versus Controle negativo/24h; #($p < 0,05$) versus Controle negativo/48h; ♦ ($p < 0,05$) para 24h x 48h.

Os resultados sugerem que os agrotóxicos Mancozebe, Fipronil e Glifosato têm efeitos semelhantes na sobrevivência dos náuplios de artemias, com o tempo de exposição desempenhando um papel crucial. Ao analisarmos a toxicidade dos agrotóxicos devemos considerar não apenas as doses, mas também a duração da exposição, para avaliar adequadamente os riscos ambientais associados a esses produtos químicos.

No caso de Mancozebe, o alto índice de mortalidade dos náuplios expostos a esse agrotóxico corrobora com o estudo de Van Genuchten e Peña (2017), que enfatiza a relevância de Mancozebe como poluente devido à sua composição metálica e à indução do desequilíbrio redox. Isso reforça a ideia de que íons metálicos, especificamente o Zn, no caso do mancozebe, podem provocar estresse oxidativo, o que pode explicar os efeitos adversos observados nas artemias.

Um estudo de exposição de peixes ao Zn realizado por (Zheng et al., 2015) ressalta seu efeito no metabolismo lipídico, mostrando as alterações causadas pela presença desse íon em ambientes aquáticos. Os resultados indicaram impactos diferentes nas atividades enzimáticas relacionadas ao metabolismo lipídico em órgãos como o fígado e os músculos.

No fígado, a redução das atividades enzimáticas lipogênicas sugeriu uma diminuição na quantidade de lipídios, acompanhando a diminuição do conteúdo lipídico hepático (Zheng et al., 2015). A diminuição da atividade da Lipoproteína Lipase (LPL) após a ingestão

dietética do zinco mostrou uma menor disponibilização de lipídios para o fígado, alinhando-se com a diminuição da sua deposição hepática (Zheng et al., 2015).

Comparativamente à exposição dietética, a exposição do Zn via água (exposição ambiental) aumentou a atividade das enzimas Glicose-6-fosfato-desidrogenase (G6PD) e Ácido 6-fosfogluconico (6PGD), sem impacto notável nas atividades da Ácido Graxo Sintase (FAZ) e LPL. Já no músculo, a exposição ao Zn por ingestão dietética, em comparação com a exposição ambiental na água, mostrou uma tendência de aumento na expressão de mRNA de Receptores Gama Ativados por Proliferadores de Peroxissoma (PPAR γ). O PPAR é um fator de transcrição ativado por ligante que se liga aos elementos de resposta correspondentes, ativando genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos (Zheng et al., 2015).

Ao correlacionar os resultados do experimento com o trabalho de (Atamaniuk et al., 2014), que estudou os efeitos da contaminação de peixes com Mancozebe, podemos concluir que a alta mortalidade observada nos náuplios de artemias expostos aos agrotóxicos pode ser atribuída a um possível estresse oxidativo. Esse autor também destaca a importância de considerar o estresse oxidativo como um alerta para um monitoramento ambiental mais específico. No contexto do nosso trabalho, isso implica que a exposição aos agrotóxicos pode não apenas impactar a sobrevivência direta dos náuplios, mas também desencadear respostas fisiológicas adversas. Além disso, os resultados de Atamaniuk et al., (2014) destacam que peixes expostos ao Mancozebe podem sofrer mudanças comportamentais e fisiológicas, diminuindo o estresse oxidativo cerebral. A partir do exposto, concluímos que o monitoramento ambiental diante da presença xenobióticos como o Mancozebe, alerta para potenciais efeitos negativos no ambiente, sendo que as artemias possuem grande potencial como modelo experimental para esse tipo de monitoramento.

Essa correlação entre os estudos destaca a complexidade das respostas biológicas aos agrotóxicos, especificamente ao Mancozebe, e ressalta a importância de considerar não apenas os compostos químicos em si, mas também as condições de exposição e os efeitos a longo tempo no metabolismo dos organismos aquáticos. A compreensão dessas interações é essencial para uma avaliação abrangente dos riscos ambientais associados aos agrotóxicos.

A análise do Fipronil em nosso trabalho também revelou um alto índice de mortalidade nos náuplios de *Artemia salina*, especialmente após 48 horas. Esses resultados estão em concordância com as conclusões apresentadas por Dallarés et al., (2020), que revelou que a exposição ao Fipronil teve impactos prejudiciais nos biomarcadores

fisiológicos e metabólicos do robalo europeu, incluindo aumento do estresse oxidativo. Assim, o trabalho de Dallarés et al., (2020) e os nossos resultados sugerem que o Fipronil pode representar uma ameaça para as espécies de peixes em ecossistemas estuarinos.

Por fim, ao analisar os resultados do Glifosato, podemos concluir que este herbicida teve um efeito positivo na mortalidade dos náuplios, conforme ilustrado na Figura 2. No entanto, o período de exposição não teve influência na mortalidade dos microcrustáceos, que manteve uma média de $2,4 \pm 5,0$ náuplios mortos para ambos os tempos testados (24 e 48 horas).

Rodrigues (2016) avaliou a mortalidade dos náuplios de *Artemia salina* expostos a diferentes concentrações de herbicidas a base de glifosato, Glifosato puro (GLI), Formulação equivalente – Glifosato AKB 480 (AKB) e Formulação de referência – Roundup® Original (RUP) ao longo de 48h. Os resultados destacam efeitos letais significativos para todas as três substâncias testadas, especialmente o glifosato puro, que resultou em uma mortalidade de 80% aos microcrustáceos expostos a uma dose de 100 mg/L. Porém, a composição Formulação de referência – Roundup® Original foi identificado como o mais tóxico, apresentando alta mortalidade desde a dose inicial de 10 mg/L, superando a formulação equivalente (AKB) e o glifosato puro (GLI).

1635

Essas descobertas foram respaldadas pelos valores das concentrações letais médias (CL_{50}), proporcionando uma avaliação quantitativa da toxicidade. A classificação da toxicidade aquática, conforme os critérios do GHS (Globally Harmonized System, 2007), realça as preocupações relacionadas ao uso indiscriminado de herbicidas, com potencial para causar desequilíbrios nos ecossistemas. Isso sublinha a importância da avaliação do risco ambiental, especialmente em relação às formulações de glifosato que contêm surfactantes, como o POEA (Polioxietileno amina).

Os nossos resultados são diferentes dos apresentados por Rodrigues (2016) que encontrou para uma formulação comercial do Glifosato uma mortalidade mais alta, contrário ao encontrado em nosso trabalho, ressaltando o efeito individual de cada agrotóxico. Isso pode ser devido à dose e à formulação utilizada, a qual pode apresentar uma proporção diferente de seus componentes, e isso levar a um antagonismo ou sinergismo na ação do produto comercial.

Dessa forma, nossos dados mostram que a exposição aos agrotóxicos resultou em mortalidade em ambos os períodos de tempo (24 e 48 horas) para todos os produtos químicos

testados, ressaltando que a toxicidade dessas substâncias para os náuplios de artêmias são maiores após 48 horas, mesmo em doses consideradas seguras pela ANVISA.

ENSAIO DE TOXICIDADE COM AS MISTURAS DOS AGROTÓXICOS, GLIFOSATO, FIPRONIL E MANCOZEB NAS DOSES DE INGESTÃO DIÁRIA ACEITÁVEL (IDA/ANVISA)

As misturas compostas pela combinação de dois e três agrotóxicos promoveram efeitos de diferentes maneiras na mortalidade dos náuplios de artemias nos dois tempos de exposição (24 e 48h) (Figura 3). Não foi observado efeito das misturas Fipronil e Mancozebe (FP+MZ), Glifosato e Fipronil (GLI+FP) e Glifosato, Fipronil e Mancozebe (GLI+FP+MZ) nos náuplios expostos durante 24h, e nem na mistura Glifosato e Fipronil (GLI+FP) nos náuplios expostos durante 48h, sendo observado uma mortalidade média de $(2,46 \pm 4,97\%)$ em relação ao controle, o qual apresentou nenhuma mortalidade. Porém, observamos uma mortalidade de $3,6 \pm 6,4\%$ para os náuplios expostos à mistura de Glifosato e Mancozebe (GLI+MZ) durante 24h em relação ao seu controle.

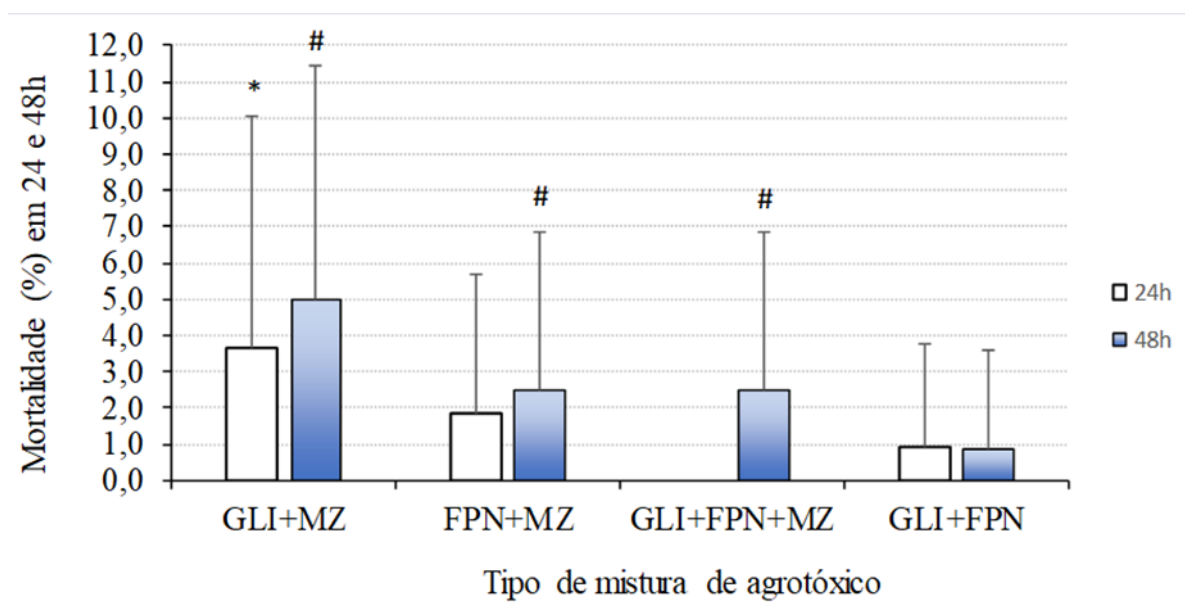


Figura 3: Mortalidade (%) dos náuplios de *Artemia salina* expostos às formulações comerciais de agrotóxicos e suas misturas, nas doses de Ingestão Diária Aceitável (IDA/Anvisa) (Glifosato: $0,042\text{mg/Kg p.c.}$; Fipronil: $0,2\mu\text{g/Kg p.c.}$; Mancozebe: $0,03\text{mg/Kg p.c.}$) durante 24 e 48h. GLI+MZ=Glifosato e Mancozebe; FPN+MZ=Fipronil e Mancozebe; GLI+FPN+MZ=Glifosato, Fipronil e Mancozebe; GLI+FPN= Glifosato e Fipronil. *($p < 0,05$) versus Controle negativo/24h; # ($p < 0,05$) versus Controle negativo/48h.

Com o aumento de mais 24h no período de exposição houve um aumento da mortalidade dos crustáceos. Dessa forma, o tempo de exposição de 48h exerceu um efeito significativo na mortalidade dos náuplios quando comparados com seus controles, sendo que, foi observado um aumento de 38,89% na mortalidade dos crustáceos expostos com as

misturas, Glifosato e Mancozebe (GLI+MZ) e Fipronil e Mancozebe (FP+MZ). Já para a mistura de Glifosato, Fipronil e Mancozebe (GLI+FP+MZ) foi observado um aumento de 100% na mortalidade dos náuplios quando comparado com seu respectivo controle.

Ao compararmos a mortalidade dos microcrustáceos entre os tempos de exposição 24 e 48h só observamos um aumento significativo ($p < 0,05$) da mortalidade para a mistura de Glifosato, Fipronil e Mancozebe (GLI+FP+MZ), a qual não exerceu efeito tóxico nos náuplios expostos durante 24h, porém promoveu uma mortalidade de $2,5 \pm 4,3\%$ no período de 48h de exposição.

O período de 48h de exposição às misturas de pesticidas foi o que apresentou maior porcentagem de mortalidade aos náuplios. Por isso, fizemos uma comparação entre elas para saber qual apresentaria a maior toxicidade. Assim, foi possível notar que a mistura de Glifosato e Mancozebe (GLI+MZ) foi a que se mostrou mais tóxica, exibindo os maiores valores de mortalidade ($5,0 \pm 6,5\%$) (Figura 4). Porém, essa mistura mostrou apresentar a mesma toxicidade ($p > 0,05$) que as misturas Fipronil e Mancozebe (FP+MZ) e Glifosato, Fipronil e Mancozebe (GLI+FP+MZ), as quais apresentaram uma mortalidade de aproximadamente $2,5 \pm 4,3\%$, ou seja, 50% menor. Por outro lado, a mistura de Glifosato e Fipronil (GLI+FP) foi a que apresentou a menor porcentagem de mortalidade para os náuplios ($0,8 \pm 2,8\%$), mas foi significativamente diferente da mistura de Glifosato e Mancozebe (GLI+MZ) ($p < 0,05$), a qual apresentou uma toxicidade aproximadamente seis vezes maior que a de Glifosato e Fipronil (GLI+FP) (Figura 4).

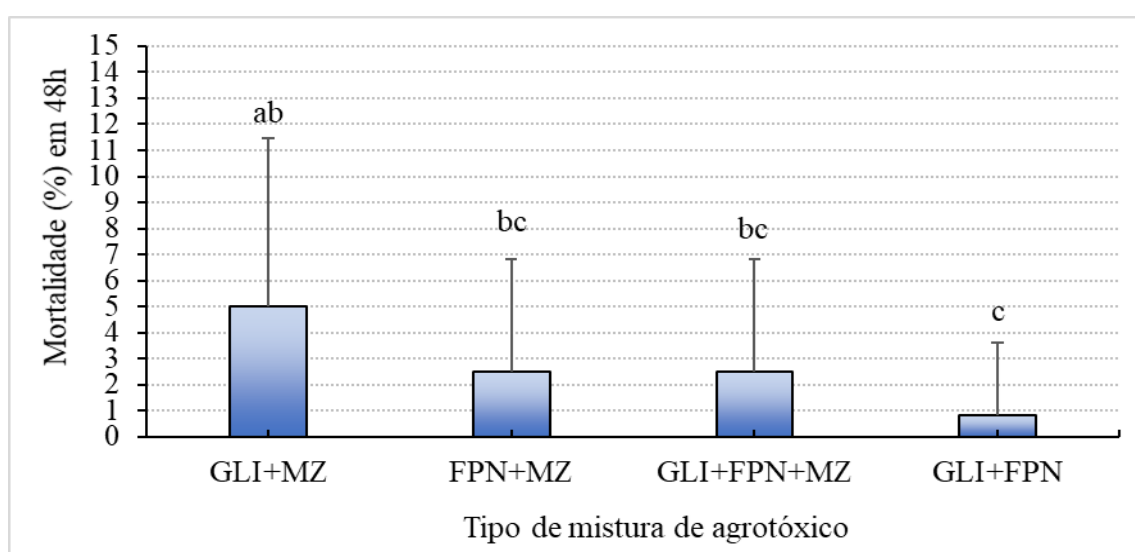


Figura 4: Mortalidade (%) dos náuplios de *Artemia salina* expostos às formulações comerciais de agrotóxicos e suas misturas, nas doses de Ingestão Diária Aceitável (IDA/Anvisa) (Glifosato: $0,042\text{mg/Kg p.c.}$; Fipronil: $0,2\mu\text{g/Kg p.c.}$; Mancozebe: $0,03\text{mg/Kg p.c.}$) durante 48h. GLI+MZ=Glifosato e Mancozebe; FPN+MZ=Fipronil e Mancozebe; GLI+FPN+MZ=Glifosato, Fipronil e Mancozebe; GLI+FPN= Glifosato e Fipronil. Médias seguidas de mesmas letras ($p > 0,05$) e letras diferentes ($p < 0,05$).

A partir disso é possível concluir que a mistura de Glifosato e Fipronil (GLI+FP) nas doses de Ingestão Diária Aceitável (IDA/Anvisa) não são tóxicas para náuplios de artêmias, mesmo expostas durante 48h consecutivas, e conseqüentemente aparentam ser a mais segura. Porém, a mistura de Glifosato e Mancozebe (GLI+MZ) foi a que apresentou maior porcentagem de mortalidade dos microcrustáceos, sendo a que apresentou maior toxicidade aos náuplios expostos, tanto em 24h como em 48h de exposição.

Os resultados obtidos destacam a importância de avaliar a toxicidade não apenas de agrotóxicos individuais, mas também de suas combinações, pois os efeitos podem ser diferentes quando esses produtos são usados em conjunto. Com isso concluímos que a mistura GLI+FP nas doses de Ingestão Diária Aceitável (IDA/Anvisa) não é tóxica para os náuplios de artêmias é relevante do ponto de vista da segurança ambiental, sugerindo que essa combinação específica pode ser uma opção menos prejudicial.

Os resultados de nosso experimento indicam que a mistura de agrotóxicos, especificamente a combinação de glifosato e mancozebe (GLI+MZ), apresentou maior toxicidade para as artemias em comparação com outras combinações, como glifosato e fipronil (Gli+FPN). Além disso, a combinação de glifosato e mancozeb (GLI+MZ) pareceu exibir sinergismo, enquanto a combinação de glifosato e fipronil (GLI+FPN) demonstrou antagonismo.

No estudo de Laetz et al., (2009), ao expor juvenis de salmão prateado (*Oncorhynchus kisutch*) a concentrações de dois produtos químicos, Diazinon e Malathion, 0,5 vezes acima de suas Concentrações Efetivas (CE_{50}) - com dose de 1,0 $\mu\text{g/L}$ - foi observado efeito sinérgico, resultando em 100% de mortalidade e uma inibição de 29% na atividade da acetilcolinesterase (AChE). Este sinergismo foi evidente não apenas para essa combinação, mas também para todas as combinações dos cinco pesticidas avaliados: Diazinon, Clorpirifos, Carbaril, Carbofurano e Malathion. O número de combinações que mostraram sinergismo significativo aumentou com o aumento das concentrações. Embora o estudo tenha explicado o sinergismo entre ésteres de fosfato e carbamatos devido a diferentes alvos bioquímicos, não afirmou que esse fenômeno se aplica igualmente aos efeitos sinérgicos observados entre dois ésteres de fosfato ou dois carbamatos. A pesquisa destaca a complexidade dos efeitos sinérgicos, especialmente entre classes distintas de pesticidas.

Esses achados sustentam nossos resultados na mistura de glifosato e mancozebe (GLI+MZ), na qual a composição dessa mistura, que contém carbamatos, possivelmente

contribuiu para os efeitos sinérgicos observados e ilustrados na Figura 4. Isso é evidenciado quando comparamos os resultados dessa mistura com a única mistura que não possui carbamato, que é a mistura de glifosato e fipronil (GLI+FPN), a qual apresentou o menor índice de mortalidade.

As interações entre herbicidas e inseticidas organofosforados usando a lentilha-d'água (*Lemna minor*) e a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* como organismos-teste foram observadas por Munkegaard et al., (2008). Notavelmente, quando foram testadas as combinações dos herbicidas bentazona e dos inseticidas malation, endosulfan ou clorpirifós foi observado um efeito antagônico. Esse antagonismo foi constatado tanto na soma das concentrações dos componentes quanto nos efeitos esperados de cada componente quando usados isoladamente. Importante destacar que essas misturas de substâncias, que não eram por si só, tóxicas, se mostraram adversamente interativas quando combinadas.

A composição das misturas de produtos químicos desempenha um papel crucial nos efeitos observados em organismos-teste, destacando a importância da composição química na toxicidade resultante. Essas observações destacam a complexidade das interações químicas e a necessidade de avaliar não apenas os efeitos individuais de substâncias, mas também os efeitos combinados quando utilizadas em misturas. Essas descobertas têm implicações importantes para a segurança ambiental e a regulamentação de produtos químicos agrícolas, enfatizando a necessidade de uma avaliação abrangente de riscos em situações de exposição múltipla.

ENSAIO DE TOXICIDADE COM AGROTOXICOS, GLIFOSATO, FIPRONIL E MANCOZEBE EM DOSE DUPLICADA (IDA/ANVISA)

Os dados referente à exposição dos náuplios com o dobro da dose IDA/Anvisa estão apresentados nas Figuras 5 e 6. Ao dobrar a dose (IDA/Anvisa) dos agrotóxicos, mantendo os mesmos períodos de exposição (24 e 48h) (Figura 5), notamos que, quando comparadas com seus respectivos controles, não foi observado aumento na porcentagem de mortalidade dos náuplios expostos durante 24h ($1,4 \pm 3,5\%$) e nem aos expostos durante 48h ($2,2 \pm 4,2\%$), entre os diferentes pesticidas (glifosato, fipronil e mancozebe).

Porém, é possível constatar um aumento de 94% na mortalidade em função do acréscimo do tempo de exposição somente para o Glifosao ($p < 0,05$) (Figura 5).

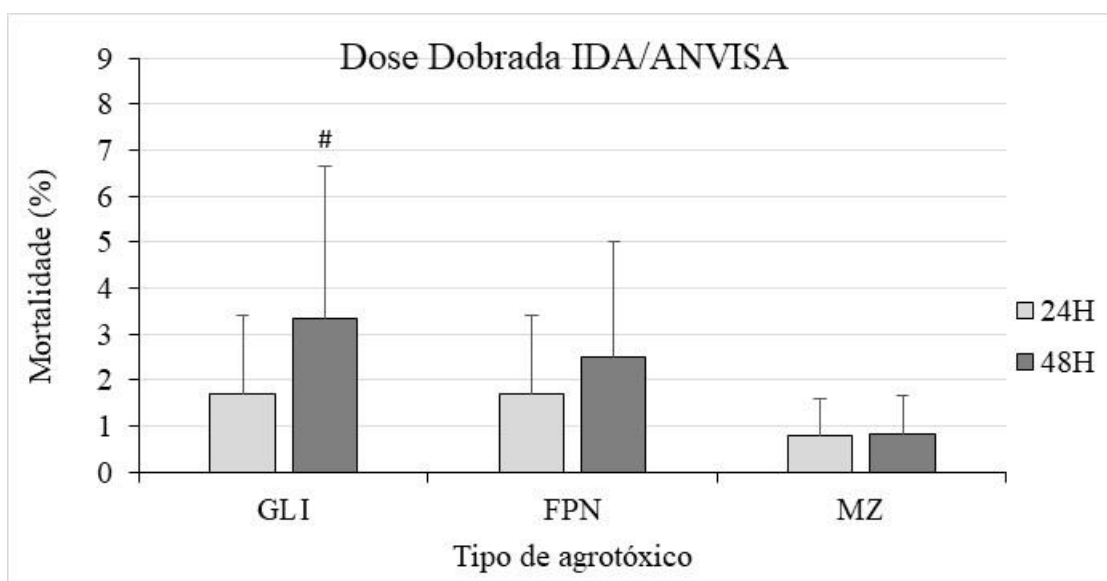


Figura 5: Mortalidade (%) dos nauplios de *A. salina* expostos durante 24 e 48h à formulações comerciais de agrotóxicos isolados, com dose dobrada de Ingestão Diária Aceitável (IDA/Anvisa): (Glifosato: 0,084mg/Kg p.c.; Fipronil: 0,4µg/Kg p.c.; Mancozebe: 0,06mg/Kg p.c.). GLI=Glifosato; FPN=Fipronil; MZ=Mancozebe; p.c=peso corporal. #($p < 0,05$) versus Controle negativo/48h.

Além disso, nós também comprovamos que a exposição dos náuplios ao Glifosato durante 48h seguidas promoveu um aumento de 33% ($p < 0,05$) na mortalidade em relação aos seus controles.

Freitas (2019) demonstrou uma relação clara entre a concentração de glifosato e a mortalidade dos crustáceos *V. serrata*. Os testes cujos tratamentos variavam as concentrações do herbicida (Glifosato - Roundup), mostraram aumento de 80% na mortalidade ao comparar uma concentração de 0,05 mg/L com a de 0,51 mg/L, ou seja, quando houve um aumento de 10 vezes na concentração do hericida. Isso sugere um evidente efeito de dose-resposta, possivelmente relacionado à hipóxia causada pelo glifosato, afetando a respiração celular e o sistema endócrino dos crustáceos (*V. serrata*), o que inviabiliza a sobrevivência devido à falta de oxigênio para as funções necessárias.

No estudo de Deepananda et al., (2011) o zooplâncton *Phyllodiaptomus annae* foi submetido a diferentes concentrações de Roundup® (0,1, 0,2, 0,4, 0,8 e 1,6 mg/L) por 48 horas em recipientes de vidro contendo água com características específicas. Os resultados demonstraram uma CL_{50} aguda de 1,059 mg/L em 48 horas. Esses achados são consistentes com os resultados de nosso estudo, indicando uma relação entre concentração e tempo de exposição.

Ao comparamos as doses IDA/Anvisa com o dobro do seu valor (Figura 6) para cada um dos agrotóxicos separadamente, verificamos que o aumento da dose dos pesticidas não promove aumento da mortalidade dos náuplios de artemias expostos durante 24 e 48h. Porém, surpreendentemente constatamos que, ao dobrarmos a dose do mancozebe houve uma queda de 81% na mortalidade dos náuplios ($p < 0,05$) expostos por 48h (Figura 6). Esse fenômeno contraria nossa expectativa, e não sabemos ainda o motivo da redução da mortalidade dos náuplios ao aumentarmos a dose do fungicida, como também não foi encontrada nenhuma publicação com um resultado semelhante.

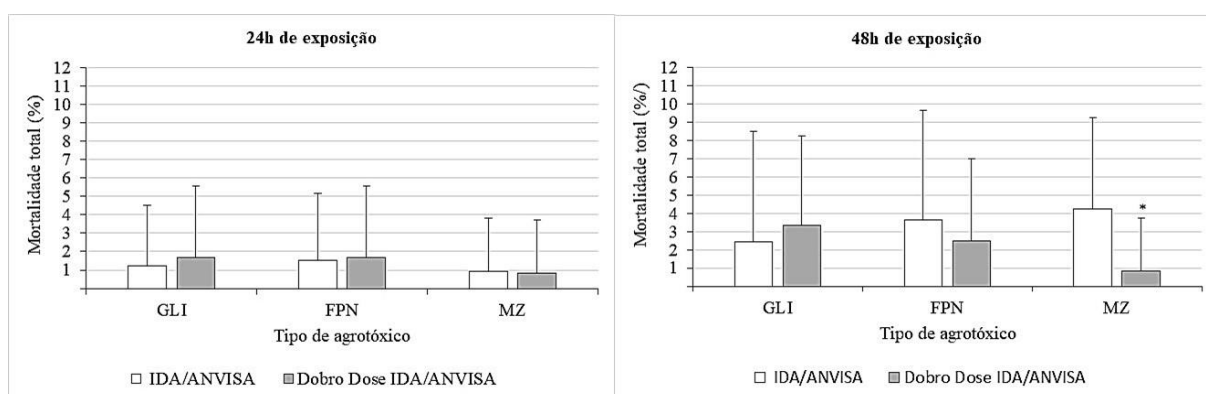


Figura 6: Mortalidade (%) dos nauplios de *A. salina* expostos durante 24 e 48h às formulações comerciais de agrotóxicos isoladamente, com dose de Ingestão Diária Aceitável (IDA/Anvisa) (Glifosato: 0,042mg/Kg p.c.; Fipronil: 0,2µg/Kg p.c.; Mancozebe: 0,03mg/Kg p.c.) e dobro da dose IDA/Anvisa: (Glifosato: 0,084mg/Kg p.c.; Fipronil: 0,4µg/Kg p.c.; Mancozebe: 0,06mg/Kg p.c.). GLI=Glifosato; FPN=Fipronil; MZ=Mancozebe; p.c.=peso corporal. #($p < 0,05$) versus Controle negativo/48h.

(Mello, 2018) fala que a exposição de embriões de zebrafish às concentrações de 10 e 20 µg/L de Mancozebe não promoveu letalidade esperada, indicando que essas concentrações foram subletais. No entanto o numero de eclosões em 72 horas após a fertilização diminuiu, aumentando a probabilidade de danos no desenvolvimento embrionário resultante da exposição. Essa descoberta destaca a importância de considerar não apenas a mortalidade, mas também as alterações no desenvolvimento dos organismos teste ao avaliar os impactos desse fungicida.

O aumento da dose dos agrotóxicos em nossos testes não resultou em aumento imediato na mortalidade dos náuplios de artêmias, mas o tempo de exposição teve um impacto significativo nesse aspecto. Além disso, a redução inesperada na mortalidade com o Mancozebe, quando a dose foi dobrada, destaca a complexidade das interações entre agrotóxicos e organismos, enfatizando a necessidade de pesquisas adicionais para entender esses fenômenos.

ENSAIO DE TOXICIDADE COM AS MISTURAS DOS AGROTOXICOS, GLIFOSATO, FIPRONIL E MANCOZEBE EM DOSE DUPLICADA (IDA/ANVISA)

Os náuplios expostos às misturas de pesticidas durante 48h consecutivas apresentaram maior porcentagem de mortalidade (Figura 7), ou seja, o tempo de exposição promove um efeito tóxico letal aos microcrustáceos. Comparando as mortalidades entre as misturas para determinar a mais tóxica, ficou evidente que a combinação Glifosato e Fipronil (GLI+FPN), para 48h de exposição, apresentou a maior toxicidade, registrando uma porcentagem de mortalidade de $3,3 \pm 4,9\%$ ($p < 0,05$) (Figura 7).

Ao compararmos a mortalidade dos náuplios nos períodos de exposição de 24 e 48 horas, especificamente para a mistura de Glifosato + Fipronil (GLI+FPN), observamos um aumento notável de $94,12\%$ ($p < 0,05$) na mortalidade após 48h de exposição (Figura 7). Curiosamente, a mistura de Glifosato e Fipronil (GLI+FPN) não exerceu um efeito tóxico nos náuplios expostos durante as primeiras 24 horas, promovendo uma menor mortalidade ($1,7 \pm 3,9\%$) ($p \geq 0,05$) dos microcrustáceos.

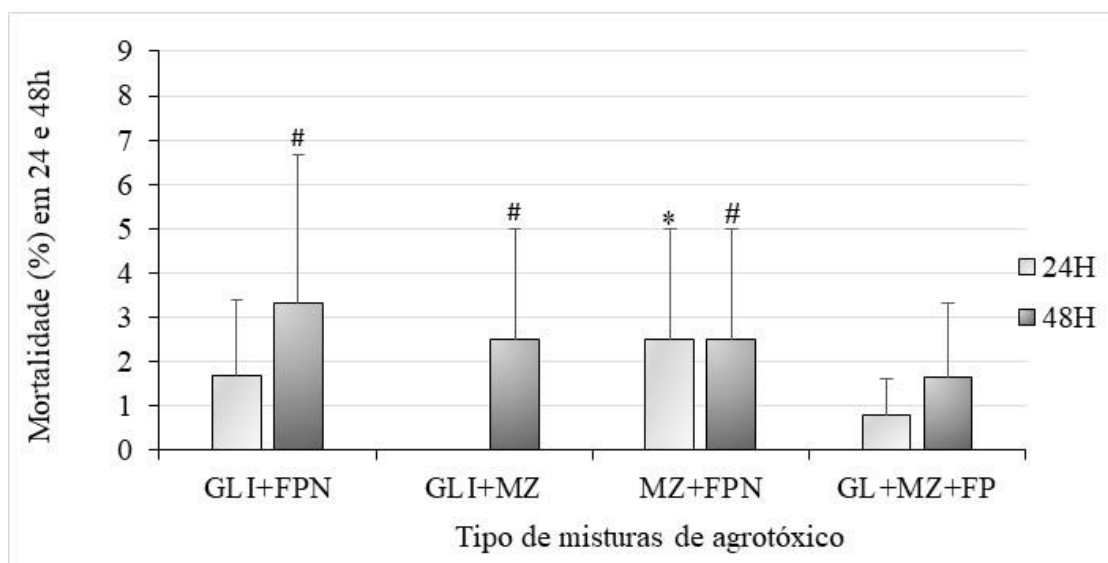


FIGURA 7: Mortalidade (%) dos náuplios de *Artemia salina* expostos às formulações comerciais de agrotóxicos e suas misturas nas doses dobrada de Ingestão Diária Aceitável (IDA/Anvisa): (Glifosato: $0,084\text{mg/Kg p.c.}$; Fipronil: $0,4\mu\text{g/Kg p.c.}$; Mancozebe: $0,06\text{mg/Kg p.c.}$). GLI=Glifosato; FPN=Fipronil; MZ=Mancozebe; p.c=peso corporal. *($p < 0,05$) versus Controle negativo/24h; #($p < 0,05$) versus Controle negativo/48h.

No entanto, esta combinação específica (GLI+MZ) demonstrou baixos níveis de toxicidade, comparáveis ($p > 0,05$) à mistura de Glifosato e Fipronil (GLI+FPN) para o tempo de exposição de 24h. Porém, quando expostos durante 48h a essa mesma mistura (GLI+MZ) observamos um efeito tóxico, que promoveu uma mortalidade de $2,5 \pm 4,5\%$ ($p < 0,05$). Por outro lado, a mistura de Mancozebe e Fipronil (MZ+FP) mostrou ser uma mistura tóxica,

promovendo uma mortalidade de $2,5 \pm 4,5\%$ ($p < 0,05$), independente do tempo de exposição (Figura 7).

Interessante notar que, apesar das misturas (GLI+FP), (GLI+MZ) e (MZ+FP) apresentarem toxicidade, principalmente após 48h de exposição, a mistura dos 3 pesticidas juntos (GLI+MZ+FPN) não mostrou ser tóxica em nenhum dos dois tempos de exposição (24 e 48h), apresentando uma porcentagem máxima de mortalidade de $1,7 \pm 3,9\%$ ($p > 0,05$).

Os resultados indicam que a toxicidade das misturas de agrotóxicos pode variar significativamente, dependendo da combinação específica e da duração da exposição, mesmo com o dobro da dose IDA/Anvisa. A combinação de Glifosato e Fipronil (GLI+FPN) foi a mais tóxica. Já a mistura de (GLI+MZ) mostrou toxicidade somente após 48 horas de exposição, enquanto a combinação de (MZ+FP) demonstrou alta toxicidade já em 24 horas de exposição, destacando sua relevância tanto em 24 quanto em 48 horas. Por outro lado, a mistura tripla (GLI+MZ+FP) não revelou toxicidade, enfatizando a complexidade das interações entre agrotóxicos e a importância de regulamentações rigorosas e avaliações de risco adequadas.

O estudo de Da Costa Chaulet et al. (2019) em zebrafish validou nossos resultados, evidenciando uma maior interação entre o herbicida Glifosato e o inseticida Fipronil. Os autores

1643

demonstraram que, tanto o herbicida à base de glifosato, quanto o inseticida à base de Fipronil, afetaram o comportamento do zebrafish, induzindo um padrão ansiolítico. O Glifosato levou os peixes a passarem mais tempo na superfície da água e menos tempo no fundo, enquanto o Fipronil teve efeitos semelhantes, porém em concentrações baixas e médias. Assim, esses pesquisadores comprovaram o sinergismo desses pesticidas, quando observaram que exposição combinada do herbicida e do inseticida amplificou os efeitos ansiolíticos observados previamente nos pesticidas isolados, resultando em um aumento da imobilidade dos peixes e tornando-os mais suscetíveis aos predadores.

Da mesma forma, Cedergeen et al., (2006) também mostraram que houve interação entre duas misturas diferentes, entre um fungicida (Procloraz), um inseticida (Esfenvalerato) e um herbicida (Diquat), sendo que ambas eram compostas com o fungicida (fungicida+inseticida e fungicida+herbicida). A dose-resposta das misturas binárias de pesticidas, estudadas por Cedergeen et al., (2006), mostrou que houve maior sinergismo quando o fungicida estava presente na mistura, sendo que, a combinação com o inseticida

Esfenvalerato demonstrou sinergia notável, com uma eficácia quatro vezes maior do que o esperado. Além disso, o fungicida Procloraz também demonstrou sinergia com o herbicida Diquat, porém apresentando uma interação menos efetiva.

Enfim, a combinação de pesticidas Mancozebe, Fipronil e Glifosato com o dobro da dose IDA/Anvisa leva a efeitos sinérgicos, exacerbando seus impactos individuais. Nossos resultados reforçam a importância de considerar a interação entre pesticidas na avaliação de riscos ambientais e na formulação de políticas de manejo desses produtos químicos.

EFEITO DO pH NA MORTALIDADE DOS NÁUPLIOS.

A Figura 8 mostra os valores de pH das soluções dos agrotóxicos e suas misturas. É possível notar que a variação de pH das soluções teste variou entre 8,8 a 9,9, sendo a mistura de Glifosato e Mancozebe (pH=9,9) a que apresentou uma diferença significativa em relação ao controle negativo. Assim, podemos afirmar que apenas a solução com a mistura de Glifosato e Mancozebe apresentou um pH mais alcalino ($p < 0,05$).

As artemias possuem uma grande resistência ao pH do ambiente. Pan et al., (2007) ressaltam que os crustáceos têm a capacidade de se adaptar às variações no pH e na salinidade, mantendo sua homeostasia e sobrevivência, principalmente por mecanismos de transporte iônico e osmorregulação.

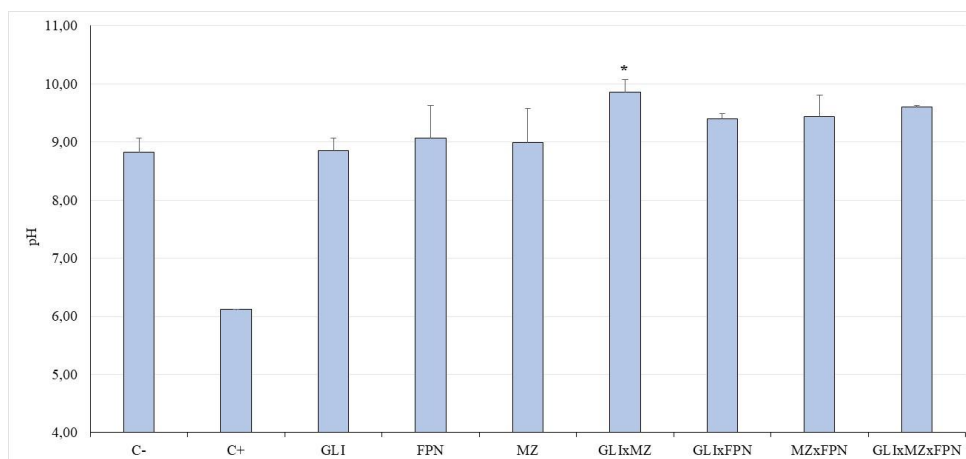


Figura 8: Valores de pH do meio de incubação das soluções de agrotóxicos e suas misturas. C-: Controle negativo; C+: Controle positivo; GLI: Glifosato; FPN: Fipronil; MZ: Mancozebe; GLIxMZ: mistura de glifosato e Mancozebe; GLIxFPN: mistura de glifosato e Fipronil; MZxFPN: mistura de Mancozebe e Fipronil; GLIxMZxFPN: mistura de glifosato com Mancozebe e Fipronil. * ($p < 0,05$) versus Controle negativo (C-).

Já Han et al., (2018) destacam que a resistência de outra espécie de crustáceo, o camarão *Litopenaeus vannamei* ao pH alcalino (8,20– 9,81) pode ser comprometida com o aumento gradual do pH. No entanto, também observou que a mortalidade do camarão V.

parahaemolyticus ao pH gradual-baixo diminuiu com sua exposição contínua. Isso sugere que a resistência ao pH elevado pode variar, e que a alta capacidade osmorreguladora foi o principal mecanismo de adaptação da espécie *V. parahaemolyticus* ao pH gradual-baixo.

O estudo de Conte et al., (1988) com artemia Australiana (*Parartemia reveral* e *P. zietziana*) mostra que esses invertebrados zooplanton apresentam notável resistência ao pH ácido, porém pouca resistência às variações de pH, observando seu ótimo desenvolvimento em pH próximo de 8,0, ou seja, alcalino. Porém, outra espécie de microcrustáceo, a *P. contracta*, possui baixa resistência às variações de salinidade, mas grande resistência às variações de pH, sobrevivendo em ambientes com pH abaixo de 3,5. Essas descobertas ressaltam a capacidade adaptativa dessas espécies de crustáceos a ambientes desafiadores, destacando sua notável resistência ao pH alcalino em condições de salinidade variável.

Assim, em função da variação do pH observamos que o efeito de diferentes valores de pH para nossas condições experimentais, sendo a solução controle padronizada com HCl 0,1N (ácido clorídrico) para uma faixa de pH que variou entre 5,5 a 9,8 (controle negativo). Os resultados desse teste estão apresentados na Figura 9, na qual é possível constatar que a variação de pH de 5,5 a 9,8 não promoveu mortalidade ($p > 0,05$) nos náuplios, corroborando as informações sobre a grande resistência desse microcrustáceo às variações ambientais e a ambientes alcalinos. Também gostaríamos de salientar que o pH médio das soluções controle negativo em todos os experimentos apresentou um valor de $9,6 \pm 0,2$.

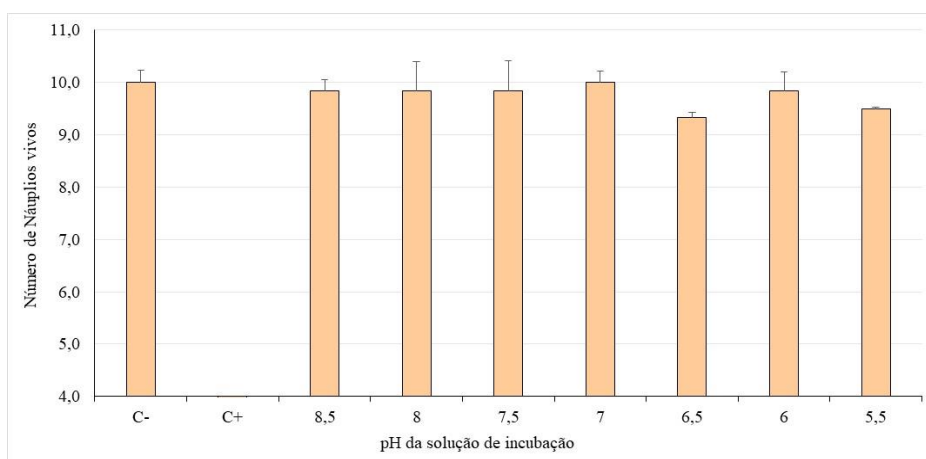


Figura 9: Número de náuplios vivos em função do pH (5,5 a 9,8) da solução de incubação composta por salina 0,35‰ e HCl 0,1N. O Controle negativo (C-) composto pela solução salina básica apresentou valor de pH=9,8.

CONCLUSÃO

A exposição de náuplios de *Artêmia salina* aos agrotóxicos Fipronil, Glifosato e Mancozebe nas doses de Ingestão Diária Aceitável (IDA) Glifosato: 0,042mg/Kg; Fipronil:

0,2µg/Kg; Mancozebe: 0,03mg/Kg, durante 24 e 48 horas promove a mortalidade dos microcrustáceos, indicando efeitos tóxicos dessas substâncias, isoladamente, nas doses de IDA/Anvisa.

O tempo de exposição (48h) promove aumento no índice de mortalidade dos náuplios expostos aos agrotóxicos isolados, sendo que os agrotóxicos Mancozebe e Fipronil foram os que apresentaram maior toxicidade independente do tempo de exposição.

A avaliação das misturas dos agrotóxicos na dose de IDA/Anvisa revelou padrões distintos de toxicidade. Combinações como Fipronil e Mancozebe (FPN+MZ), Glifosato e Fipronil (GLI+FPN), e Glifosato, Fipronil e Mancozebe (GLI+FP+MZ) mostram seus efeitos tóxicos somente após um tempo maior de exposição (48h), sendo que a mistura GLI+FPN, demonstrou ser a menos tóxica.

Já a mistura Glifosato e Mancozebe (GLI+MZ) destacou-se como a mais tóxica. Esses resultados sugerem que, apesar de GLI+MZ ser a mistura mais letal, outras combinações, como FPN+MZ e GLI+FPN+MZ, também apresentam impactos significativos na mortalidade dos náuplios expostos durante 48 horas.

As doses mais altas dos agrotóxicos Fipronil, Glifosato e Mancozebe (doses dobradas da Ingestão Diária Aceitável - IDA/Anvisa) também mostraram padrões complexos de resposta, com variações na mortalidade para as exposições individuais, sendo que o Glifosato demonstrou ser o mais tóxico para essa dosagem. Além disso, também mostrou uma resposta temporal específica.

Por outro lado, o Mancozebe, surpreendentemente apresentou uma redução da mortalidade em relação ao tempo de exposição. As razões por trás desse fenômeno ainda não são compreendidas e requerem investigações adicionais.

As misturas dos agrotóxicos com as doses IDA/Anvisa dobrada mostraram que a combinação de Glifosato e Fipronil (GLI+FPN) foi a mais tóxica, somente quando associada ao maior tempo de exposição.

Ainda em relação às misturas com doses mais altas (doses dobradas da Ingestão Diária Aceitável - IDA/Anvisa) a combinação Glifosato e Mancozebe (GLI+MZ) revelou ser tóxica com tempo maior de exposição, enquanto a combinação de Mancozebe e Fipronil (MZ+FPN) demonstrou alta toxicidade aguda, destacando seu impacto relevante tanto em períodos curtos quanto prolongados.

Por outro lado, a mistura tripla (GLI+FPN+MZ) não revelou toxicidade em nenhum dos períodos de exposição (24 e 48 horas), mesmo com a dose dobrada, mostrando que pode haver um efeito antagonístico de seus componentes, diminuindo a toxicidade dessa mistura.

Essas descobertas ressaltam a complexidade das interações entre os agrotóxicos e a importância de avaliar, não apenas os efeitos individuais, mas também os efeitos combinados para uma compreensão abrangente dos riscos ambientais associados a essas substâncias.

Os resultados de nosso trabalho enfatizam que, a variabilidade na toxicidade das misturas de agrotóxicos, depende da combinação específica entre os pesticidas e da duração da exposição. A complexidade das interações entre esses pesticidas destaca a importância de regulamentações rigorosas e avaliações de risco adequadas para mitigar os impactos ambientais desses produtos químicos. Além disso, a observação de efeitos sinérgicos e antagonísticos ao combinar os pesticidas destaca a necessidade de considerar as interações entre os pesticidas ao formular políticas de manejo dessas substâncias. Essas descobertas reforçam a importância de avaliação de riscos ambientais associados ao uso de agrotóxicos, mesmo quando usados em baixas doses.

A resistência dos náuplios a variação do pH foi comprovada mais uma vez em nosso experimento, ressaltando a alta resistência desses microcrustáceos às variações ambientais e ambientes alcalinos.

1647

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Programa de Bolsas de Iniciação Científica PIBIC/UEG Edital nº 034/2020 e ao Laboratório de Fisiologia e Bioquímica Toxicológica da Unidade Universitária de Ceres-Go

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRASCO (2012). ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA. **Dossiê ABRASCO** – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 1 - Agrotóxicos, Segurança Alimentar e Nutricional e Saúde. Carneiro, F. F.; Pignati, W.; Rigotto, R, M.; Augusto, L. G. S.; Rizzolo, A.; Faria, N. M. X.; Alexandre, V. P.; Friedrich, K.; Mello, M. S. C. Rio de Janeiro: ABRASCO, 2012. 88p. Disponível em: https://www.abrasco.org.br/UserFiles/Image/_Dossie%20abrasco%20port.pdf

ANVISA (2019a) Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Índice Monográfico-Goi\226-Glifosato a partir de 08.11.2019.** Disponível em: <

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/Go1%2B%2BGlifosato.pdf/6a549ab8-990c-4c6b-b421-699e8f4b9ab4>

ANVISA (2019b). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Índice Monográfico-F43\226-Fipronil a partir de 18/12/2019.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/F43+%E2%80%93+Fipronil/cee42727-46ab-44a2-b88e-10ea4e8faab9> >

ANVISA (2019c). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos – PARA. Relatório das Amostras Analisadas no período de 217-2018.** Primeiro Ciclo Plurianual 2017-2020. Gerência Geral de Toxicologia. 136p. Brasília. Dez. 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/o/Relat%C3%B3rio+%E2%80%93+PARA+2017-2018_Final.pdf/eidoc988-1e69-4054-9a31-70355109acc9

ANVISA (2020). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Índice Monográfico-Mo2\226-Mancozebe a partir de 03.02.2020.** Disponível em:<<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/Mo2%2B%2BMancozebe.pdf/975fdd18-65fd-477c-ab85-217bcb9a0110> >

ATAMANIUK, T.M.; KUBRAK, O.I.; HUSAK, V.V.; STOREY, K.B.; LUSHCHAK, V.I. The Mancozeb-containing carbamate fungicide tattoo induces mild oxidative stress in goldfish brain, liver, and kidney. **Environ. Toxicol.** v.29, p.1227-1235. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/tox.21853>.

BONIFACIO, A.F.; CAZENAVE, J.; BACCHETTA, C.; BALLESTEROS, M.L.; BISTONI, M.A.; AMÉ, M.V.; BERTRAND, L.; HUED, A.C. Alterations in the general condition: biochemical parameters and locomotor activity in *Cnesterodon decemmaculatus* exposed to commercial formulations of chlorpyrifos, glyphosate and their mixtures. **Ecol Indic.** v.67, p.88-97. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.02.011> >

CARVALHO, C.A.; MATTA, S.L.P.; MELO, F.C.S.A.; ANDRADE, D.C.F.; CARVALHO, L.M.; NASCIMENTO, P.C.; SILVA, M.B.; ROSA, M.B. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* Miers – Bignoniaceae): Estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemia salina*. **Revista Eletrônica de Farmácia.** v.6, n.1, p.51-57, 2009. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/REF/article/view/5861/4561>

CAVALCANTE, M.F.; OLIVEIRA, M.C.C.; VELANDIA, J.R.; ECHEVAERRIA, A.; Síntese de 1,3,5-Triazinas Substituídas e Avaliação da Toxicidade frente a *Artemia salina* Leach-2000. **Sociedade Brasileira de Química - Química Nova.** Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=1401>

CEDERGREEN, N.; KAMPER, A.; STREIBIG, J. C. Is prochloraz a potent synergist across aquatic species? A study on bacteria, daphnia, algae and higher plants. **Aquatic Toxicology.** v.78, n.3, p.243-252, jun. 2006. Disponível em: <[https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16672166/#:~:text=3\)%3A243%2D52,-,doi%3A%2010.1016/j.aquatox.2006.03.007,->](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16672166/#:~:text=3)%3A243%2D52,-,doi%3A%2010.1016/j.aquatox.2006.03.007,->)

CHAULET, F.C., BARCELLOS, H.H.A.; FIOR, D.; KOAKOSKI, G.; ROSA, J.G.S.; FAGUNDES, M.; BARCELLOS, L.F.G. Glyphosate- and Fipronil-Based Agrochemicals

and Their Mixtures Change Zebrafish Behavior. **Arch Environ Contam Toxicol.** v.77, p.443-451. 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00244-019-00644-7>>

CHEN, D W.; LI, S H.; LYU, B.; ZHAO, Y. F.; LI, J.G.; WU, Y.N. The Status and Health Risk Assessment of Dietary Fipronil Contamination Among 20 Provinces of China. **Chinese Journal of Preventive Medicine.** v.53, n.12, p.1242-1246. Dec.2019. Artigo em Chinês.

Disponível em: <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2019.12.008>

CHEN, H.; GAO, G.; YIN, P.; DAI, J.; CHAI, Y.; LIU, X.; LU, C. Enantioselectivity and residue analysis of fipronil in tea (*Camellia sinensis*) by ultra-performance liquid chromatography Orbitrap mass spectrometry, **J. Food Additives & Contaminants: Part A.** v.35, n.10. 2018. DOI: 10.1080/19440049.2018.1497306. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1497306>

CHOWDHURY, M. A. Z.; FAKHRUDDIN, A.N.M.; ISLAM, MD. N.; MONIRUZZAMAN, M.; GAN, S.H.; ALAM, MD.K. Detection of the residues of nineteen pesticides in fresh vegetable samples using gas chromatography mass spectrometry. **Food Control,** v.34, p.457-465. 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.05.006>

CONTE, F. P.; GEDDES, M. C. Acid brine shrimp: Metabolic strategies in osmotic and ionic adaptation. **Hydrobiologia,** v.158, n.1, p.191-200, jan. 1988. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00026277>

DA COSTA CHAULET, F. et al. Glyphosate- and Fipronil-Based Agrochemicals and Their Mixtures Change Zebrafish Behavior. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology,** v.77, n.3, p.443-451, 12jun.2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00244-019-00644-7>

1649

DALLARÉS, S. et al. Multibiomarker approach to fipronil exposure in the fish *Dicentrarchus labrax* under two temperature regimes. **Aquatic Toxicology,** v.219, p.105378, fev.2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.105378>

DAS, P.C.; CAO, Y.; CHERRINGTON, N.; HODGSON, E.; ROSE, R.L. Fipronil induces CYP isoforms and cytotoxicity in human hepatocytes. **Chemico-Biological Interactions.** v.164, n.3, p.200-214. Dec.2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.09.013>>

DEEPANANDA, K. H. M. A. et al. Acute toxicity of a glyphosate herbicide, Roundup®, to two freshwater crustaceans. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka,** v. 39, n. 2, p. 169, 20 jun. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4038/jnsfsl.v39i2.3178>

FREITAS, Marília Jaeline Alves. **Toxicidade aguda no herbicida glifosato (Roundup®) para *Valdivia serrata* (Crustacea, Decapoda).** 2019. 36 f. Orientador: Davidson Sodré. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal Rural da Amazônia, 2019. Disponível em: <http://bdta.ufra.edu.br/jspui/handle/123456789/1592>

GAZZIERO, D. L. P. Misturas de agrotóxicos em tanque nas propriedades agrícolas do Brasil. (Embrapa Soja). **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v.33, n.1, p.83-92, 2015. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/alice/handle/doc/1017959>>

GLOBALY HARMONIZED SYSTEM (GHS). 2007. **Hazardous to the aquatic environment**. Disponível em: <https://unece.org/ghs-rev2-2007>

GOLDONI, A.; SILVA, L.B.; Potencial mutagênico do fungicida mancozebe em *Astyanax jacuhiensis* (Teleostei: Characidae). **Bioscience Journal** Uberlândia, v. 28, n. 2, p. 297-301, Mar./Apr. 2012. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/biosciencejournal/article/view/11651/8491>>

GRISOLIA, C.K.; **Agrotóxicos: Mutações, Câncer e Reprodução**. Brasília: Editora UnB. ISBN: 85-230-0808-X Código: 81, 2005. Disponível em: <https://permuta.bce.unb.br/produto/agrotoxicos-mutacoes-cancer-reproducao/>

GUO, Q.; ZHAO, S.; ZHANG, J.; QI, K.; DU, Z.; SHAO, B. Determination of fipronil and its metabolites in chicken egg, muscle and cake by a modified QuEChERS method coupled with LC-MS/MS. **Food Additives & Contaminants: Part A**. v. 35, n. 8, p. 1543-1552, 19 jun. 2018. DOI: 10.1080/19440049.2018.1472395. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1472395>

GUYTON, K. Z.; LOOMIS, D.; GROSSE, Y.; EL GHISSASSI, F.; BENBRAHIM-TALLAA, L.; GUHA, N.; SCOCCIANI, C.; MATTOCK, H.; STRAIF, K. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. **The Lancet Oncology**. v.16, n.5, p.490-491. 2015. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70134-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70134-8) Disponível em: <[https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045\(15\)70134-8/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/lanonc/article/PIIS1470-2045(15)70134-8/fulltext)>

1650

HAN, S. et al. Adaptation of the white shrimp *Litopenaeus vannamei* to gradual changes to a low-pH environment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 149, p. 203-210, mar. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.052>

IARC (2015). WHO. International Agency for Research Cancer. IARC Monographs. v.112. **Evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides**. March. 2015. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/noticias/recomendacoes-do-inca-sao-baseadas-em-evidencias-cientificas>> Arquivo original: <<https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/07/MonographVolume112-1.pdf>>

IARC. (2017). International Agency for Research on Cancer. **Some organophosphate insecticides and herbicides/IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans Volume 112**. IARC Monographs. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans (2015: Lyon, France). 452p. January.2017. ISBN-13 (PDF): 978-92-832-0178-6. Disponível em: <<https://publications.iarc.fr/549>>

KIM, K.; JEON, H.; CHOI, S. et al. Chemosphere combined toxicity of endosulfan and phenanthrene mixtures and induced molecular changes in adult Zebra fish (*Danio rerio*). **Chemosphere**. v.194, p.30-41. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.128>>

LAETZ, C. A. et al. The Synergistic Toxicity of Pesticide Mixtures: Implications for Risk Assessment and the Conservation of Endangered Pacific Salmon. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, n. 3, p. 348-353, mar. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1289/ehp.0800096>

LEGHAIT J.; GAYRARD V.; PICARD-HAGEN, N.; CAMP, M; PERDU, E.; TOUTAIN, P.L.; VIGUIÉ, C. Fipronil-induced disruption of thyroid function in rats is mediated by increased total and free thyroxine clearances concomitantly to increased activity of hepatic enzymes. **Toxicology**. v.255, n.1-2, p.38-44. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.09.026>

MELLO, R. S. DE. **Comportamento motor como um biomarcador detoxicidade induzida por mancozebe em embriões de peixe-zebra** (*Danio rerio hamilton-buchanan*,1822). Universidade Federal do Pampa, CIÊNCIAS BIOLÓGICAS. 2018 Disponível em: https://oasisbr.ibict.br/vufind/Record/UNIP_5cd120215672dd060434358fc9fccac

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, F.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine Shrimp: A conveniente general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**. v.45, n.5, p.31-34, 1982. DOI: 10.1055/s-2007-971236. Disponível em: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2007-971236>

MUNKEGAARD, M.; ABBASPOOR, M.; CEDERGREEN, N. Organophosphorous insecticides as herbicide synergists on the green algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and the aquatic plant *Lemna minor*. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 1, p. 29-35, 18 out. 2008. Disponível em: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17940868/#:~:text=1\)%3A29%2D35,doi%3A%2010.1007/s10646%2D007%2D0173%2Dx,-](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17940868/#:~:text=1)%3A29%2D35,doi%3A%2010.1007/s10646%2D007%2D0173%2Dx,-)

1651

NOUGADÈRE, A.; SIROT, V.; KADAR, A.; FASTIER, A.; TRUCHOT, E.; VERGNET, C.; HOMMET, F.; BAYLÉ, J.; GROS, P.; LEBLANC, J.C. Total diet study on pesticide residues in France: Levels in food as consumed and chronic dietary risk to consumers. **Environment International**. v.45, p.135-150. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.02.001>

OECD (2004), **Test No. 202: *Daphnia sp.* Acute Immobilisation Test**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264069947-en>. ISSN: 20745761. Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-202-daphnia-sp-acute-immobilisation-test_9789264069947-en

PAN, L.-Q.; ZHANG, L.-J.; LIU, H.-Y. Effects of salinity and pH on ion-transport enzyme activities, survival and growth of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. **Aquaculture**, v. 273, n. 4, p. 711-720, dez. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.07.218>

PENG, W.; ZHAO, L.; LIU, F.; XUE, J.; LI, H.; SHIM K. Effect of paste processing on residue levels of imidacloprid, pyraclostrobin, azoxystrobin and fipronil in winter jujube. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v.31, n.9, p.1562-1567. 2014. DOI:10.1080/19440049.2014.941948. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/19440049.2014.941948>

RODRIGUES, L. B. Efeitos ecotoxicológicos do glifosato e formulações em diferentes organismos. 2016. **71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016. <http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/6825>

SANCHES, A.L.M.; DAAM, M.A.; FREITAS, E.C.; GODOY, A.A.; MEIRELES, G.; ALMEIDA, A.R.; DOMINGUES, I.; ESPÍNDOLA, E.L.G. Lethal and sublethal toxicity of abamectin and difenoconazole (individually and in mixture) to early life stages of zebra fish. **Chemosphere**. v.210, p.531-538. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.07.027>>

TAVARES, M.A. **Mecanismos de toxicidade dos metabólitos do Fipronil, dessulfínil e sulfona, em mitocôndrias Isoladas de fígado de rato**. Dissertação (MS). Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena. 2015. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/136037/000859360.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>

VAN GENUCHTEN, C. M.; PEÑA, J. Mn (II) Oxidation in Fenton and Fenton Type Systems: Identification of Reaction Efficiency and Reaction Products. **Environmental Science & Technology**, v. 51, n. 5, p. 2982-2991, 7 mar. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05584>

WANG, Y. et al. Single and joint toxicity assessment of four currently used pesticides to zebrafish (*Danio rerio*) using traditional and molecular endpoints. **Chemosphere**, v. 192, p. 14-23, fev. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.129>

WANG, Y.; LU, L.; YU, Y.; XU, Z.; WANG, Q.; CAI, L. Single and joint toxic effects of five selected pesticides on the early life stages of zebra fish (*Danio rerio*). **Chemosphere**. v.170, p.61-67. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.025>>

WANG, Y.; WU, S.; CHEN, J.; ZHANG, C.; XU, Z.; LI, G.; CAI, L.; SHEN, W.; WANG, Q. Single and joint toxicity assessment of four currently used pesticides to zebra fish (*Danio rerio*) using traditional and molecular endpoints. **Chemosphere**. v.192, p.14-23. 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.129>>

YANG, Y.; MA, H.; ZHOU, J.; LIU, J.; LIU, W. Joint toxicity of permethrin and cypermethrin at sublethal concentrations to the embryo-larval zebrafish. **Chemosphere**. v.96, p.146-154. 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.10.014>>

ZHAO, X.; YEH, J.Z.; SALGADO, V.L.; NARAHASHI, T. Fipronil Is a Potent Open Channel Blocker of Glutamate-Activated Chloride Channels in Cockroach Neurons. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**. v.310, n.1 p.192-201, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1124/jpet.104.065516> 10.1124/jpet.104.065516. Disponível em: <<http://jpet.aspetjournals.org/content/early/2004/03/10/jpet.104.065516>>

ZHANG, J.; LIU, L.; REN, L.; FENG, W.; LV, P.; WU, W.; YAN, Y. The single and joint toxicity effects of chlorpyrifos and beta-cypermethrin in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. **J. Hazard Mater**. v.334, p.121-131. July.2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.03.055>>

ZHENG, J. et al. Different effect of dietborne and waterborne Zn exposure on lipid deposition and metabolism in juvenile yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco*. **Aquatic Toxicology**, v.159, p.90–98. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.12.003>

ZORTÉA, T.; REIS, T.R.; SERAFINI, S.; SOUSA, J.P.; SILVA, A.S.; BARETTA, D. Ecotoxicological effect of fipronil and its metabolites on *Folsomia candida* in tropical soils. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v.62, p.203–209. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.etap.2018.07.011>