



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

Felipe Ogliari Bandeira

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE INDIVIDUAL E EM MISTURA DE
CLOTIANIDINA E NANOPLÁSTICOS DE POLIESTIRENO SOBRE ORGANISMOS
AQUÁTICOS E TERRESTRES**

Florianópolis
2024

Felipe Ogliari Bandeira

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE INDIVIDUAL E EM MISTURA DE
CLOTIANIDINA E NANOPLÁSTICOS DE POLIESTIRENO SOBRE ORGANISMOS
AQUÁTICOS E TERRESTRES**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. William Gerson Matias, Dr.
Coorientador: Prof. Paulo Roger Lopes Alves, Dr.

Florianópolis

2024

Ogliari Bandeira, Felipe

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE INDIVIDUAL E EM MISTURA DE
CLOTIANIDINA E NANOPLÁSTICOS DE POLIESTIRENO SOBRE
ORGANISMOS AQUÁTICOS E TERRESTRES / Felipe Ogliari
Bandeira ; orientador, William Gerson Matias,
coorientador, Paulo Roger Lopes Alves, 2024.

141 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Ambiental, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Engenharia Ambiental. 2. Contaminantes emergentes.
3. Toxicidade de misturas. 4. Neonicotinoides. 5.
Nanopartículas. I. Matias, William Gerson. II. Lopes
Alves, Paulo Roger. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Ambiental. IV. Título.

Felipe Ogliari Bandeira

Avaliação da toxicidade individual e em mistura de clotianidina e nanoplásticos de poliestireno sobre organismos aquáticos e terrestres

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado, em 18 de julho de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Silvia Pedroso Melegari, Dra.
Universidade Federal do Paraná

Profa. Júlia Carina Niemeyer, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Maria Elisa Magri, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutor em Engenharia Ambiental.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. William Gerson Matias, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2024.

Dedico este trabalho a todos aqueles que lutam pela ciência.

AGRADECIMENTOS

Tenho muito a agradecer.

Primeiramente, agradeço à minha família. Em especial, aos meus pais, Marlene e Adalberto, e à minha irmã, Fabiele, por nunca medirem esforços para a realização dos meus sonhos. Pelo apoio incondicional em todas as importantes decisões da minha vida. Vocês são a minha inspiração.

À minha companheira, Ruti. Obrigado por sempre estar ao meu lado e me apoiar nos momentos difíceis. Obrigado pela compreensão nos dias que precisei estar ausente. E obrigado por dividir comigo as boas experiências de vida que o doutorado nos trouxe.

Ao meu co-orientador, Paulo Roger. Obrigado por toda a dedicação ao longo destes sete anos de convivência na pós-graduação. Obrigado pela confiança. Por dar direcionamento nos momentos de dúvida, e apoio nas horas de incerteza. Você tornou este processo mais leve.

Ao meu orientador, William, pela oportunidade de fazer parte do seletivo grupo de pesquisadores do LABTOX. Pelo suporte e apoio ao longo do doutorado. Por viabilizar e tornar possível a realização deste projeto.

Aos supervisores do estágio sanduíche na UQAM, Philippe e David, pela espetacular oportunidade de conhecer o Canadá e realizar um doutorado sanduíche. Obrigado por me receberem tão bem. Serei eternamente grato por isso. Thanks a lot!

Aos inúmeros amigos e colegas da Pós, em especial à Thuanne, ao Vitor, ao Camilo, ao Thales, à Ana, ao Alexandre, à Amanda, e a tantos outros que de alguma forma me deram suporte nos momentos de desânimo e preocupação, compartilhando as dificuldades da pós-graduação. Obrigado pela amizade e apoio.

Aos colegas do LABTOX e do Laboratório de Ecotoxicologia do Solo, pelos ensinamentos, ajuda nos experimentos, e pelos bons momentos de descontração e diversão compartilhados ao longo destes 4 anos. Tenham a certeza de que cada um de vocês também é autor desta tese.

Ao CNPq, à CAPES e à FUMDES/UNIEDU, pelo suporte financeiro nas diferentes fases do doutorado.

À UFSC, à UFFS e à UQAM, e a todos os colegas, técnicos e professores destas excelentes instituições que permitiram com que esta tese fosse realizada.

Por fim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho. Eu não poderia ter feito nada disso sozinho. Muito obrigado!

RESUMO

A clotianidina (CLO) é um inseticida neonicotinoide amplamente utilizado no tratamento químico de sementes agrícolas. No entanto, há um crescente número de evidências demonstrando que seus resíduos no solo e nos corpos d'água podem ser tóxicos para organismos não-alvo. Associado a isso, a presença generalizada de partículas de plástico de tamanho reduzido (micro e nanoplásticos) tornou-se um problema de preocupação internacional. Uma vez no meio ambiente, os plásticos podem ser ingeridos por organismos vivos e induzir alterações em sistemas biológicos, bem como interagir com outros poluentes (ex. agrotóxicos) e modificar seu comportamento e toxicidade nos compartimentos do solo e da água. Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos tóxicos individuais, e em mistura, da CLO e de um nanoplástico de poliestireno (NPPS) sobre organismos terrestres e aquáticos. Para isso, foram realizadas quatro etapas experimentais. No experimento I, foram avaliados os efeitos tóxicos crônicos e o risco ecológico da CLO (via formulação comercial pura) sobre invertebrados não-alvo do solo (minhocas *Eisenia andrei*, enquitreídeos *Enchytraeus crypticus* e colêmbolos *Folsomia candida*, *Proisotoma minuta* e *Sinella curviseta*) sob condições padronizadas. No experimento II, foi investigado o efeito da CLO sobre o comportamento de fuga e de locomoção de colêmbolos *F. candida*. No experimento III, os efeitos tóxicos individuais da CLO e do NPPS sobre colêmbolos *F. candida* e enquitreídeos *E. crypticus* foram comparados com os efeitos de ambos em mistura. No experimento IV, os efeitos tóxicos da CLO e do NPPS (isoladamente e em mistura) foram avaliados sobre quatro espécies não-alvo de ecossistemas aquáticos (microcrustáceos *Daphnia magna*, macrófitas *Lemna minor*, microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* e cianobactérias *Microcystis aeruginosa*). Os resultados do experimento I demonstraram que os colêmbolos foram o grupo mais sensível à CLO, seguidos por minhocas e enquitreídeos. Além disso, a concentração ambiental prevista da CLO em solos agrícolas foi 33 vezes maior do que aquelas que poderiam ser consideradas protetivas para a maioria (95%) das espécies investigadas, revelando um risco significativo para uso agrícola deste composto. Os resultados do experimento II revelaram que a CLO não causou fuga de colêmbolos; ao invés disso, uma preferência pelo lado contaminado foi constatada, o que reforça a exposição dos organismos a este contaminante. Além disso, os indivíduos expostos apresentaram uma capacidade de locomoção reduzida em comparação aos não expostos. No experimento III, verificou-se que a toxicidade do NPPS para ambas as espécies foi relativamente baixa. Além disso, as misturas de NPPS e CLO causaram efeito aditivo em todas as concentrações testadas. Os testes do experimento IV apontaram que os microcrustáceos *D. magna* e as cianobactérias *M. aeruginosa* apresentaram maior sensibilidade ao nanoplástico, seguido das microalgas *C. reinhardtii*, enquanto que as macrófitas *L. minor* foram a espécie menos sensível. Em relação à CLO, a toxicidade foi relativamente baixa para as macrófitas, microalgas e cianobactérias, e apenas nos testes crônicos e de natação com *D. magna* é que efeitos tóxicos foram observados em concentrações inferiores a 20 mg L⁻¹. Os testes de mistura apontaram que a interação toxicológica entre NPPS e CLO é predominantemente antagônica para *D. magna* e *C. reinhardtii*, e antagônica/aditiva para *M. aeruginosa* e *L. minor*. Os testes multigeracionais de recuperação com *D. magna* indicam que a exposição da geração parental não causa prejuízos significativos sobre os filhotes. Os resultados desta tese contribuirão para o avanço no conhecimento dos efeitos tóxicos e risco ambiental de misturas de contaminantes emergentes, indicando que no ambiente aquático a interação é predominantemente antagônica e o risco é baixo para as espécies testadas, enquanto que no solo, a clotianidina causa riscos significativos e pode ter efeitos ainda mais severos quando em combinação com o nanoplástico.

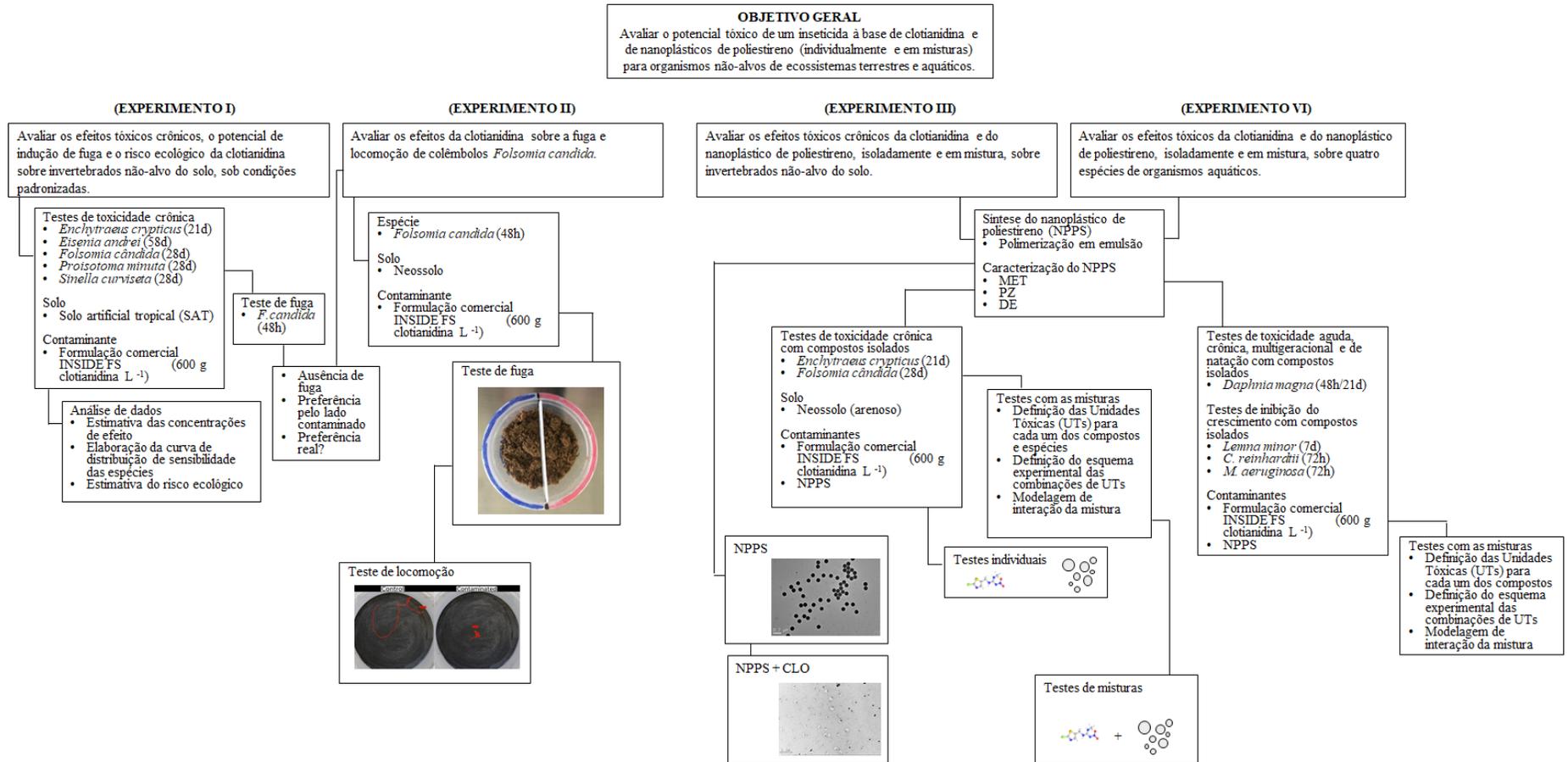
Palavras-chave: Contaminantes emergentes; Toxicidade de misturas; Nanopartículas; Neonicotinoides; Efeito aditivo; Antagonismo.

ABSTRACT

Clothianidin (CLO) is a neonicotinoid insecticide widely used in the chemical treatment of agricultural seeds. However, there is a growing number of evidence showing that its residues in soil and water bodies could be toxic to non-target organisms. Associated with this, the ubiquitous presence of small-scale plastic particles (i.e., micro- and nanoplastics) has become an issue of international concern. Once in the environment, they can be ingested by living organisms and induce alterations on biological systems, as well as interact with other pollutants (e.g., pesticides) and modify its behavior and toxicity in soil and water compartments. In this context, this study aims to assess the single and combined effects of two contaminants of emerging concern, namely, CLO and polystyrene nanoplastic (NPPS) on soil and aquatic organisms. In the experiment I, the chronic toxic effects and the ecological risk of CLO (commercial formulation) toward non-target soil invertebrates (earthworms *Eisenia andrei*, enchytraeids *Enchytraeus crypticus*, and collembolans *Folsomia candida*, *Proisotoma minuta* and *Sinella curviseta*) were assessed under standard conditions. In the experiment II, the effect of CLO on the avoidance and locomotion behavior of collembolans *F. candida* was assessed. In the experiment III, the individual toxic effects of CLO and NPPS on collembolans *F. candida* and enchytraeids *E. crypticus* were compared with the effect of both in mixture. In the experiment IV, the toxic effects of CLO and NPPS (individually and in mixture) were assessed on four aquatic species (microcrustaceans *Daphnia magna*, macrophytes *Lemna minor*, microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* and cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*). The results of the experiment I showed that collembolans were the most sensitive group to CLO, followed by earthworms and enchytraeids. In addition, the predicted environmental concentration of CLO in agricultural soils was 33-times higher than the level considered protective for the majority (95%) of the soil species, revealing a significant risk of this compound for the soil environment. The results of the experiment II revealed that CLO didn't cause collembolans' avoidance; instead, a preference for the contaminated side was observed. Additionally, the exposed individuals showed a reduced locomotion capacity compared to the non-exposed ones. The experiment III showed that the NPPS toxicity for both soil species is relatively low. Also, the NPPS and CLO mixtures caused additive effects at all concentrations tested. The tests of the experiment IV showed that the microcrustaceans *D. magna* and the cyanobacteria *M. aeruginosa* had a greater sensitivity to NPPS, followed by microalgae *C. reinhardtii*, whereas the macrophytes *L. minor* were the least sensitive organisms. For CLO, the toxicity was relatively lower for macrophytes, microalgae and cyanobacteria, and only in the chronic and swimming behavior assays with *D. magna*, the toxic effects were observed in concentrations below 20 mg L⁻¹. The mixture toxicity tests showed that the toxicological interaction between NPPS and CLO is predominantly antagonistic for *D. magna* and *C. reinhardtii*, and antagonistic/additive for *M. aeruginosa* and *L. minor*. In addition, the multigenerational recovery tests with *D. magna* indicate that the exposure of the parental generation haven't caused significant impacts on the neonates from the subsequent generations. The results of this thesis can contribute to advancing knowledge of the toxic effects and environmental risk of mixtures of emerging contaminants, indicating that in the aquatic environment the NPPS-CLO interaction is predominantly antagonistic and the risk is low for the tested species, whereas in the soil, CLO causes significant risks to the tested species and the effects can be even more severe in the presence of NPPS.

Keywords: Emerging contaminants; Mixture toxicity; Nanoparticles; Neonicotinoids; Additive effect; Antagonism.

ESQUEMA CONCEITUAL



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1.1 - Estrutura química da clotianidina.	31
Figura 2.2.1 - Estrutura molecular do poliestireno.	40
Figura 3.1.1 - Representação esquemática das etapas e ações relativas ao experimento I.	51
Figura 3.2.1 - Representação esquemática das etapas e ações relativas ao experimento II.	52
Figura 3.3.1 - Representação esquemática das etapas e ações relativas ao experimento III.	53
Figura 3.4.1 - Representação esquemática das etapas e ações relativas ao experimento IV. ...	54
Figura 3.5.1 - Estrutura utilizada para a síntese do nanoplástico de poliestireno (NPPS).	56
Figura 3.6.1 - Esquema demonstrativo dos procedimentos experimentais para os ensaios ecotoxicológicos terrestres. A) representa a imagem do Neossolo, e B) do Solo artificial tropical [SAT], utilizados nos ensaios. Imagem C) ilustra o processo de preparo das soluções contaminadas com volumes pré-calculados, e D) o procedimento de aplicação da solução contaminada nas amostras de solo.	58
Figura 3.6.2 - Esquema representativo das principais etapas necessárias para a realização de um teste de toxicidade com minhocas: A) fotografia contendo um indivíduo adulto e um juvenil, bem como os casulos da espécie <i>E. andrei</i> ; B) caixas plásticas contendo substrato de criação de <i>E. andrei</i> ; C) exemplo de como é realizada a pesagem individual das minhocas; D) fotografia imediatamente após a inserção dos organismos nas unidades experimentais; E) fotografia do conjunto de unidades experimentais do teste de toxicidade crônica com <i>E. andrei</i> ; F) fotografia do procedimento de avaliação dos ensaios em banho maria.	60
Figura 3.6.3 - Esquema representativo com fotografias das principais etapas necessárias para a realização de um teste de toxicidade com enquitreideos: A) Meio de criação contendo enquitreideos <i>E. crypticus</i> ; B) procedimento para a separação de indivíduos adultos em água para posterior inserção nas unidades do teste; C) procedimento de adição do corante rosa bengala para coloração dos juvenis gerados no teste; D) procedimento de contagem dos indivíduos gerados no teste em microscópio estereoscópio; (E) imagem ampliada dos enquitreideos com coloração rosa durante o procedimento de avaliação.	62
Figura 3.6.4 - Esquema representativo com fotografias das principais etapas necessárias para a realização de um teste de toxicidade com colêmbolos: A) indivíduos da espécie <i>F. candida</i> no meio de criação; B) imagem de exemplo da superfície do solo	

- dentro das unidades experimentais, após a inserção de colêmbolos *F. candida*;
- C) imagem após o procedimento de imersão do conteúdo das unidades experimentais em água com tinta de caneta, para visualização dos juvenis gerados; D) Equipamento utilizado para fotografar os colêmbolos gerados em cada unidade experimental; E) ampliação da fotografia do recipiente de avaliação contendo colêmbolos adultos e juvenis..... 63
- Figura 3.6.5 - Esquema ilustrativo do teste de fuga, demonstrando o lado A contendo solo controle, o lado B contendo solo contaminado, e a inserção dos colêmbolos na linha divisória dos solos. 64
- Figura 3.6.6 - Esquema representativo dos ensaios de locomoção com *F. candida*: A) ilustração do esquema utilizado para a gravação dos movimentos dos colêmbolos; B) imagem obtida do software Kinovea durante a análise dos vídeos para obtenção das trajetórias e distâncias percorridas pelos colêmbolos. 65
- Figura 3.7.1 - Estrutura de suporte utilizada para a gravação dos vídeos de natação de *D. magna*, contendo haste metálica e garra para suporte da câmera (A). Aparência do programa Kinovea, utilizado para o rastreamento dos movimentos das daphnias no software Kinovea (B). Eixo de coordenadas de referência do programa para a extração da distância e trajetória percorridas (C). Exemplo de trajetória percorrida pelas daphnias (D). 69
- Figura 3.7.2 - *Daphnia magna* (A). Recipientes contendo meio de criação e organismos *D. magna*, mantidos em BOD com temperatura e fotoperíodo controlados (B). Algas utilizadas como alimento para *D. magna* (C). Lâmpada utilizada para a atração de neonatos de *D. magna* para a lateral do béquer (D). Coleta de organismo com pipeta volumétrica (E). Teste crônico com *D. magna* em andamento (F). 70
- Figura 3.7.3 - Cultura de macrófitas aquáticas *Lemna minor* em meio de criação (A). Unidades experimentais dos ensaios contendo as soluções contaminadas (B). Estrutura utilizada para a avaliação final do teste de crescimento com lemnas, contendo o suporte para a câmera fotográfica e o recipiente para inserção das lemnas (C). Foto do conteúdo de uma réplica de um ângulo superior, para posterior contagem das frondes geradas durante o ensaio (D). Esquema utilizado para a medição do comprimento das raízes (E). 72
- Figura 3.7.4 - Preparo das unidades experimentais dos testes com microalgas e cianobactérias dentro do fluxo de ar estéril, com as soluções contaminadas (A). Vista frontal do

- equipamento Multisizer 3, utilizado para a contagem de células nas soluções (B). Gráfico com o pico de concentração de microalgas/cianobactérias na amostra (C), através do qual se quantificou a concentração de algas ou cianobactérias em cada réplica, e posteriormente a taxa de crescimento das espécies. 73
- Figura 4.1.1 – Número médio de juvenis de *Enchytraeus crypticus*, *Eisenia andrei*, *Folsomia candida*, *Proisotoma minuta* e *Sinella curviseta* (\pm desvio padrão; barras baseadas no eixo Y da esquerda) e biomassa de *E. andrei* (\pm desvio padrão; barras baseadas no eixo Y da direita) encontrados após a exposição a concentrações crescentes de clotianidina em um solo tropical artificial (SAT). Asterisco (*) indica diferença significativa comparado ao respectivo tratamento controle (teste de Dunnett, $p \leq 0,05$). 81
- Figura 4.1.2 - Resposta de fuga de colêmbolos *F. candida* após 48 h de exposição a solos contaminados com clotianidina. Asterisco (*) indica preferência significativa pelo solo contaminado. 82
- Figura 4.1.3 - Curva de distribuição de sensibilidade das espécies (DSE) baseada em valores de CE_{10} obtidos de testes de toxicidade crônica com clotianidina, com cinco espécies de invertebrados do solo. CAE: concentração ambiental esperada. CP_5 e CP_{50} : concentrações de perigo para 5 e 50% das espécies, respectivamente. 83
- Figura 4.2.1 - Resposta de fuga de colêmbolos *Folsomia candida* submetidos às concentrações crescentes de clotianidina (A). Distância de locomoção de colêmbolos expostos à clotianidina (B). Trajetórias de locomoção de colêmbolos expostos à clotianidina (C). 85
- Figura 4.3.1 – Imagem da microscopia eletrônica de transmissão (MET) das nanopartículas de poliestireno (NPPS) (A). Histograma de distribuição do diâmetro das NPPS (B). 88
- Figura 4.3.2 - Número médio de juvenis de enquitreídeos *Enchytraeus crypticus* (esquerda) e colêmbolos *Folsomia candida* (direita) (\pm desvio padrão) encontrados após a exposição a concentrações crescentes de nanoplástico de poliestireno (NPPS) (cinza) e clotianidina (branco) em Neossolo. Asterisco (*) indica diferença significativa comparado ao respectivo tratamento controle (teste de Dunnett, $p \leq 0,05$). 89
- Figura 4.3.3 - Número médio de juvenis de enquitreídeos *Enchytraeus crypticus* (cinza) e colêmbolos *Folsomia candida* (branco) (\pm desvio padrão) encontrados após a

exposição a concentrações crescentes de nanoplastico de poliestireno (NPPS), clotianidina (CLO) e suas misturas (NPPS + CLO) em Neossolo. Asterisco (*) indica diferença significativa comparado ao respectivo tratamento controle (teste de <i>Dunnet</i> , $p \leq 0,05$).....	92
Figura 4.4.1 - Comparativo das imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) do nanoplastico de poliestireno (NPPS) e sua mistura com clotianidina (NPPS + CLO).....	96
Figura 4.4.2 - Distâncias e trajetórias de natação dos neonatos de <i>D. magna</i> (média ± desvio padrão; n = 10) após 48h de exposição a concentrações crescentes (expressas em unidades tóxicas – UT) de nanoplastico de poliestireno (NPPS), clotianidina (CLO) e suas misturas (NPPS + CLO). Asterisco (*) indica diferença significativa entre o controle e o respectivo tratamento (teste de <i>post-hoc</i> de Dunnett, $p < 0,05$).	103
Figura 4.4.3 - Distâncias e trajetórias de natação das <i>D. magna</i> adultas (média ± desvio padrão; n = 10) após 21 dias de exposição (teste crônico) a concentrações crescentes de nanoplastico de poliestireno (NPPS), clotianidina (CLO) e suas misturas (NPPS + CLO). Asterisco (*) indica diferença significativa entre o controle e o respectivo tratamento (teste de <i>post-hoc</i> de Dunnett, $p < 0,05$).	104
Figura 4.4.4 - Resultados dos testes de inibição de crescimento com <i>Lemna minor</i> expostas (7 dias) a concentrações crescentes de nanoplastico de poliestireno (NPPS), clotianidina (CLO) e suas misturas em termos de número de frondes (A) e comprimento de raízes (B).....	107
Figura 4.4.5 - Fotografia das raízes de <i>Lemna minor</i> , 7 dias após a exposição a concentrações crescentes de nanoplastico de poliestireno (NPPS), clotianidina (CLO) e suas misturas.....	107
Figura 4.4.6 - Resultados dos testes de inibição de crescimento com microalgas <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (A) e cianobactérias <i>Microcystis aeruginosa</i> (B) após 72 h de exposição a concentrações crescentes de nanoplastico de poliestireno (NPPS), clotianidina (CLO) e suas misturas.	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1.1 - Revisão de estudos avaliando os efeitos tóxicos da clotianidina para diferentes organismos terrestres e aquáticos.....	38
Tabela 2.2.1 - Revisão de estudos avaliando os efeitos tóxicos de nanoplásticos (< 100 nm) para diferentes organismos terrestres e aquáticos.....	45
Tabela 2.3.1 - Revisão dos estudos ecotoxicológicos avaliando os efeitos de microplásticos em combinação com neonicotinoides, sobre organismos aquáticos.....	49
Tabela 3.6.1 - Características físicas e químicas (n = 2) do solo artificial tropical (SAT) e Neossolo, usados nos testes ecotoxicológicos deste estudo.	57
Tabela 3.6.2 - Concentrações de CLO, NPPS, e NPPS + CLO utilizadas nos testes ecotoxicológicos com as espécies do solo, em cada um dos experimentos da tese.	59
Tabela 3.7.1 - Concentrações de nanoplástico de poliestireno (NPPS), clotianidina (CLO) e suas misturas (NPPS + CLO) utilizadas nos testes de toxicidade com <i>D. magna</i> , <i>L. minor</i> , <i>C. reinhardtii</i> e <i>M. aeruginosa</i>	67
Tabela 4.1.1 - Parâmetros ecotoxicológicos (CEO, CENO, CE ₁₀ e CE ₅₀) obtidos para a clotianidina através dos testes de toxicidade crônica com cinco espécies de invertebrados não-alvo do solo realizados em solo artificial tropical (SAT). Os intervalos de confiança de 95% estão apresentados entre parênteses.	80
Tabela 4.3.1 - Valores de CE ₅₀ (mg kg ⁻¹) obtidos para <i>Enchytraeus crypticus</i> e <i>Folsomia candida</i> com base nos testes de toxicidade crônica com os compostos isolados (clotianidina e nanoplástico de poliestireno) em Neossolo, e utilizados para a definição das unidades tóxicas (UTs) para os testes de misturas.....	89
Tabela 4.3.2 - Porcentagem de efeito inibitório induzido pelo nanoplástico de poliestireno (NPPS), clotianidina (CLO) e suas misturas (NPPS + CLO) na reprodução de <i>Enchytraeus crypticus</i> e <i>Folsomia candida</i> . Interação toxicológica estimada com base no modelo de Abbott.	93
Tabela 4.4.1 - Potencial Zeta (PZ), Diâmetro Efetivo (DE) e Índice de Polidispersão (IPD) obtidos para o nanoplástico de poliestireno isolado (NPPS) e na presença da clotianidina (CLO), nos diferentes meios utilizados nos ensaios.	97
Tabela 4.4.2 - Porcentagem de efeito inibitório induzido pelo nanoplástico de poliestireno (NPPS), clotianidina (CLO) e suas misturas (NPPS + CLO) na imobilização e	

	natação de <i>D. magna</i> (48 h de exposição), crescimento de <i>Lemna minor</i> (7 dias de exposição) e crescimento de <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> e <i>Microcystis aeruginosa</i> (72 h de exposição).....	98
Tabela 4.4.3 - Resultados do teste de toxicidade crônica com nanoplastico de poliestireno (NPPS) em termos de longevidade, crescimento e reprodução (média ± desvio padrão; n = 10). CENO: concentração de efeito não observado. CEO: concentração de efeito observado. Asterisco (*) indica diferença significativa entre o tratamento e o respectivo controle (teste de post-hoc de <i>Dunnet</i> ; p < 0,05).	100
Tabela 4.4.4 - Resultados do teste de toxicidade crônica com clotianidina (CLO) em termos de longevidade, crescimento e reprodução (média ± desvio padrão; n = 10). CENO: concentração de efeito não observado. CEO: concentração de efeito observado. Asterisco (*) indica diferença significativa entre o tratamento e o respectivo controle (teste de post-hoc de <i>Dunnet</i> ; p < 0,05).	101
Tabela 4.4.5 - Resultados do teste de toxicidade crônica com a mistura (NPPS + CLO) em termos de longevidade, crescimento e reprodução (média ± desvio padrão; n = 10). Asterisco (*) indica diferença significativa entre o tratamento e o respectivo controle (teste de post-hoc de <i>Dunnet</i> ; p < 0,05).	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARA	Avaliação de Risco Ambiental
CAE	Concentração ambiental estimada
CE ₁₀	Concentração de efeito de 10%
CE ₅₀	Concentração de efeito de 50%
CENO	Concentração de efeito não observado
CEO	Concentração de efeito observado
CLO	Clotianidina
CTC	Capacidade de troca de cátions
DE	Diâmetro efetivo
DSE	Curva de distribuição de sensibilidade das espécies
DT ₅₀	Tempo de meia-vida do agrotóxico no solo
CP ₅	Concentração de perigo para 5% das espécies
CP ₅₀	Concentração de perigo para 50% das espécies
QP	Quociente de perigo
i.a.	Ingrediente ativo
LABTOX	Laboratório de Toxicologia Ambiental (UFSC)
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MO	Matéria orgânica
MP	Microplásticos
MPPE	Microplástico de polietileno
MPPS	Microplástico de poliestireno
NP	Nanoplásticos
NPPS	Nanoplásticos de Poliestireno
OR	Osmose Reversa
pH	Potencial Hidrogeniônico
PZ	Potencial Zeta
ERO	Espécies reativas de oxigênio
SAT	Solo Artificial Tropical
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
T _{esp}	Toxicidade esperada
T _{obs}	Toxicidade observada
UT	Unidade Tóxica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA DA TESE.....	20
1.2	PROBLEMÁTICA	21
1.3	JUSTIFICATIVA	27
1.4	HIPÓTESES.....	28
1.5	OBJETIVOS.....	28
1.5.1	Objetivo geral.....	28
1.5.2	Objetivos específicos	29
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	30
2.1	INSETICIDAS NEONICOTINOIDES	30
2.1.1	Clotianidina.....	31
2.1.2	Distribuição dos neonicotinoides no ambiente.....	32
2.1.3	Efeitos de neonicotinoides sobre organismos terrestres e aquáticos	35
2.2	PLÁSTICOS COMO FONTE DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL.....	39
2.2.1	Poliestireno.....	40
2.2.2	Distribuição dos plásticos no ambiente	40
2.2.3	Efeitos de plásticos sobre organismos terrestres e aquáticos	42
2.3	MISTURA DE CONTAMINANTES NO MEIO AMBIENTE.....	46
3	METODOLOGIA.....	50
3.1	EXPERIMENTO I.....	50
3.2	EXPERIMENTO II.....	51
3.3	EXPERIMENTO III	52
3.4	EXPERIMENTO IV	53
3.5	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO NANOPLÁSTICO DE POLIESTIRENO (NPPS)	55
3.5.1	Materiais da síntese	55

3.5.2	Síntese do NPPS	55
3.5.3	Caracterização do NPPS.....	56
3.6	TESTES ECOTOXICOLÓGICOS COM ORGANISMOS TERRESTRES	56
3.6.1	Coleta, preparo e contaminação das amostras de solo	57
3.6.2	Testes com minhocas <i>Eisenia andrei</i>	59
3.6.3	Testes com enquitreídeos <i>Enchytraeus crypticus</i>	61
3.6.4	Testes com colêmbolos	62
3.7	TESTES TOXICOLÓGICOS COM ORGANISMOS AQUÁTICOS	66
3.7.1	Preparo das soluções contaminadas	66
3.7.2	Testes com microcrustáceos <i>D. magna</i>	67
3.7.3	Testes com macrófitas aquáticas <i>Lemna minor</i>	71
3.7.4	Testes com microalgas <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	72
3.7.5	Testes com cianobactérias <i>Microcystis aeruginosa</i>	74
3.8	ANÁLISE DOS DADOS	74
3.8.1	Experimento I	74
3.8.2	Experimento II.....	76
3.8.3	Experimento III	76
3.8.4	Experimento IV.....	77
4	RESULTADOS DA TESE.....	79
4.1	RESULTADOS E DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO I: Efeitos crônicos e risco ecológico da clotianidina sobre invertebrados não-alvo do solo	79
4.1.1	Testes de ecotoxicidade crônica	79
4.1.2	Teste de fuga com colêmbolos	81
4.1.3	Curva DSE e cálculo do quociente de perigo (QP)	82
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO II: efeitos da clotianidina sobre a fuga e locomoção de colêmbolos.....	85

4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO III: Efeitos individuais e em mistura da clotianidina e do nanoplástico de poliestireno sobre invertebrados do solo	88
4.3.1	Caracterização das NPPS	88
4.3.2	Testes de ecotoxicidade crônica	89
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO IV: Efeitos individuais e em mistura da clotianidina e do nanoplástico de poliestireno sobre quatro espécies de organismos aquáticos	96
4.4.1	Caracterização das NPPS isoladas e em mistura com CLO.....	96
4.4.2	Testes de toxicidade com <i>D. magna</i>.....	97
4.4.3	Testes de inibição de crescimento com <i>L. minor</i>.....	106
4.4.4	Testes de inibição do crescimento com <i>C. reinhardtii</i> e <i>M. aeruginosa</i>	108
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	112
5.1	CONCLUSÕES.....	113
5.2	LIMITAÇÕES DO TRABALHO	115
5.3	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	116
	REFERÊNCIAS.....	117
	APÊNDICE A – Artigo publicado referente à tese (artigo 1).....	140
	APÊNDICE B – Artigo publicado referente à tese (artigo 2).....	141

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO TEMA DA TESE

Nos últimos anos, a presença de contaminantes emergentes no ambiente e, em especial, seus impactos sobre sistemas vivos, vêm recebendo atenção de pesquisadores do mundo todo. Por se tratar de um tema de relevância global, o grupo de pesquisa do Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX) da UFSC, sob coordenação do prof. Dr. William Gerson Matias, vêm desenvolvendo pesquisas a respeito dos efeitos toxicológicos e mecanismos de ação de uma variedade de contaminantes emergentes há, pelo menos, dez anos. Dentro da ampla gama de contaminantes emergentes, os nanoplásticos e os agrotóxicos representam contaminantes de especial interesse para os pesquisadores do grupo. Neste contexto, Trabalhos de Conclusão de Curso (TCCs), dissertações de mestrado e teses de doutorado foram desenvolvidas no LABTOX dentro desta temática e resultaram em publicações de alta relevância a respeito dos impactos toxicológicos de plásticos (VICENTINI et al., 2019; VAZ et al., 2021), agrotóxicos (DA SILVA et al., 2021) e suas misturas (NOGUEIRA et al., 2022) sobre organismos aquáticos.

Ainda, dentro do contexto da toxicologia aquática, o LABTOX conta com uma duradoura parceria que está completando 15 anos com laboratórios e pesquisadores da *Université du Québec à Montréal* (UQAM), iniciada com a realização do pós-doc do prof. William Gerson Matias em 2009, supervisionado pelo prof. Radovan Popovic. Durante estes anos de colaboração, projetos do LABTOX oportunizaram para seis alunos (as) de doutorado matriculados no PPGEA, a realização de estágio-sanduíche na UQAM e um aluno da Universidade canadense realizou doutorado sanduíche no LABTOX/PPGEA. Ainda, dois doutores da equipe LABTOX realizaram estágio pós-doutoral na UQAM, desenvolvendo pesquisas sobre o efeito toxicológico de poluentes emergentes sobre microalgas, microcrustáceos, cianobactérias e macrófitas aquáticas (PERREAULT et al., 2010; ROSSETTO et al., 2014; COSTA et al., 2016; CANUEL et al., 2021).

Os estudos citados acima foram desenvolvidos dentro do contexto da toxicologia aquática. Contudo, sabe-se que a contaminação por plásticos e agrotóxicos não se restringe ao compartimento aquático, sendo necessário, portanto, expandir as avaliações para outros compartimentos, tal como o solo. Assim, o Laboratório de Botânica, Ecologia e Entomologia

da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), sob coordenação do prof. Dr. Paulo Roger Lopes Alves, vêm desenvolvendo pesquisas a respeito dos efeitos ecotoxicológicos e risco ecológico de agrotóxicos sobre organismos não-alvo da fauna do solo. Trabalhos recentes de TCC e dissertações de mestrado também culminaram em importantes publicações sobre o tema (BANDEIRA et al., 2020a, b; HENNIG et al., 2020; 2022)

Neste contexto, os estudos publicados e trabalhos desenvolvidos por ambos os grupos de pesquisa deram sustentação à atual proposta de tese, a qual foi planejada dentro de uma perspectiva de cooperação entre Universidades Federais do Brasil e a Universidade do Quebec em Montreal (UQAM), através da integração de conhecimentos da área da ecotoxicologia aquática (LABTOX – UFSC e *Ecotoxicology of Aquatic Microorganisms Laboratory* - UQAM) e da ecotoxicologia terrestre (Laboratório de Botânica, Ecologia e Entomologia – UFFS). Sendo assim, a proposta desta tese visa dar continuidade na construção do conhecimento acerca deste importante tema.

1.2 PROBLEMÁTICA

Nos últimos anos, um dos problemas ambientais de grande relevância a nível mundial está relacionado com a ocorrência e os potenciais efeitos tóxicos dos chamados contaminantes emergentes (ou contaminantes de preocupação emergente - CEs) em diferentes compartimentos ambientais. Tratam-se de compostos utilizados no dia-a-dia da sociedade, tal como farmacêuticos, produtos veterinários, agrotóxicos, plásticos, produtos de higiene pessoal e outros, e que apesar de serem estudados por especialistas e pesquisadores, ainda não possuem regulações ambientais/intervenções legais específicas para a sua presença no ambiente (ROUT et al., 2021; TAHERAN et al., 2018). Desta forma, os CEs nem sempre são considerados em normas e diretrizes ambientais de preservação da qualidade ambiental, sendo que muitos não possuem critérios de classificação e limites máximos permitidos no ambiente (TAHERAN et al., 2018). Neste contexto, o entendimento acerca dos seus potenciais impactos sobre organismos vivos é essencial para um melhor gerenciamento dos danos que estas substâncias podem causar sobre o meio ambiente.

Entre os contaminantes de preocupação emergente, destacam-se os agrotóxicos, que de acordo com a Lei nº 7802/89 (lei dos agrotóxicos), tratam-se de produtos e agentes cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos. Atualmente, estes produtos são essenciais para a produção

de alimentos em grande escala. Na agricultura convencional, os agrotóxicos são usados através de formulações comerciais com atividade inseticida, fungicida, herbicida e outros, e são aplicados de diferentes formas, tal como aplicação foliar, aplicação direta no solo, no sulco de plantio e também no revestimento de sementes agrícolas.

Até então, o registro de novos agrotóxicos e a revisão periódica da licença destas substâncias no Brasil passa por uma análise conjunta de três agências: o Ministério da Agricultura (MAPA), responsável pela checagem da eficiência agrônômica do produto; a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), responsável pela classificação toxicológica; e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), responsável pela avaliação do risco ambiental do composto (BRAGA et al., 2020). Contudo, em 2018, a Câmara dos Deputados aprovou o Projeto de Lei nº6299/2002, que visa, dentre outros pontos, a flexibilização da entrada de novas substâncias no país e a centralização da análise e fiscalização no MAPA. Neste viés, desde 2019, pelo menos 475 novos produtos comerciais foram aprovados para uso no Brasil, muitas das quais têm seu uso restrito na Europa (BRAGA et al., 2020), tal como os neonicotinoídeos.

Os neonicotinoídeos representam uma classe de inseticidas que atuam no sistema nervoso central dos insetos, impedindo a transmissão de impulsos nervosos e causando paralisia e eventual morte dos organismos expostos (JESCHKE et al., 2011; PISA et al., 2015). Em áreas de produção agrícola, os neonicotinoídeos são utilizados através de formulações comerciais para aplicação foliar, diretamente no solo e para o revestimento de sementes, apresentando alta seletividade e eficiência no controle de insetos e artrópodes que causam prejuízos às culturas agrícolas (GOULSON, 2013; SIMON-DELSO et al., 2015). A clotianidina (CLO) é um inseticida neonicotinoídeo de amplo uso comercial, que vêm se destacando por apresentar efetiva ação de bloqueio da transmissão de impulsos nervosos e, conseqüentemente, uma elevada atividade inseticida, se comparado aos demais inseticidas desta classe (IHARA et al., 2004). Embora seja utilizada em vários países do mundo (BONMATIN et al., 2014), alguns estudos já demonstraram que a CLO é persistente no solo, com tempos de meia-vida superiores a 100 dias (GOULSON, 2013). Concentrações deste inseticida variando entre 0,002 mg kg⁻¹ (DE PERRE; MURPHY; LYDY, 2015) a 2,06 mg kg⁻¹ (ZHANG et al., 2016) já foram encontradas em solos agrícolas. Existem evidências de que a CLO pode causar efeitos negativos em invertebrados não-alvo da fauna do solo, tal como minhocas, colêmbolos e ácaros; para os colêmbolos, efeitos negativos já foram observados em concentrações ambientalmente relevantes (RITCHIE et al.,

2019; DE LIMA E SILVA et al., 2019; LIU et al., 2017; BASLEY; GOULSON, 2017). Entretanto, até o momento, o potencial tóxico desta substância para espécies edáficas foi avaliado apenas em um número limitado de espécies padronizadas. Além do mais, a maioria dos estudos que avaliaram a toxicidade da CLO foi baseada nos efeitos do ingrediente ativo (i.a.) puro, ao invés de formulações comerciais utilizadas na agricultura, as quais em geral apresentam maior solubilidade devido à presença de aditivos e surfactantes, e podem modificar o efeito tóxico final do composto (GUPTA; GAJBHIYE; GUPTA, 2008; TAKÁCS et al., 2017). Neste contexto, a legislação vigente (Resolução CONAMA n° 420, de 2009) ainda não prevê valores orientadores para esta substância no solo, visando a prevenção da poluição e a minimização de seus impactos (BRASIL, 2009).

A CLO é solúvel em água e, especialmente quando utilizada através de formulações comerciais, pode apresentar alta mobilidade no solo (SUMITOMO, 2016). Em virtude disto, dependendo do solo ao qual for introduzida, este inseticida pode ser transportado para compartimentos aquáticos por lixiviação ou por escoamento superficial e, conseqüentemente, causar impactos sobre a fauna de ecossistemas aquáticos (BONMATIN et al., 2014; RABY et al., 2018; MORRISSEY et al., 2015). Apesar do risco iminente, em termos de padrão de qualidade da água, este inseticida ainda não teve valores máximos estabelecidos na legislação vigente (Resolução CONAMA n° 357 de 2005; BRASIL, 2005). O risco de contaminação é maior em corpos hídricos que possuem áreas agrícolas em seu entorno, os quais estão propensos a receberem maiores cargas deste inseticida principalmente após eventos intensos de chuva (MORRISSEY et al., 2015). Em mananciais próximos a áreas agrícolas, já foram reportadas concentrações de CLO variando entre 0,04 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 55,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ (SCHAAFSMA et al., 2015; SAMSON-ROBERT et al., 2014). Apesar disso, há poucos estudos que exploram a interação entre compartimentos terrestres e aquáticos no que diz respeito à translocação de contaminantes do solo para a água, e como isto pode influenciar os níveis de tolerância e de toxicidade de xenobióticos para organismos aquáticos. Além disso, em virtude da sua elevada persistência no ambiente (VAN DER SLUIJS et al., 2015), a CLO tem potencial para se acumular no ambiente após sucessivas aplicações, bem como existir em combinação com outros poluentes também presentes no solo e na água, como, por exemplo, metais tóxicos, outros agrotóxicos, entre outras moléculas orgânicas tal como é o caso dos plásticos (WOOD; GOULSON, 2017).

Associado à presença dos neonicotinoides no ambiente, há de se considerar que nos últimos anos, fragmentos plásticos vêm sendo encontrados em ecossistemas terrestres e aquáticos (NG et al., 2018; DE SÁ et al., 2018), o que se deve principalmente à utilização

desenfreada destes materiais em diversos segmentos da indústria e do comércio. Em 2016, mais de 300 milhões de toneladas de plástico foram fabricadas (JU; ZHU; QIAO, 2019), e em 2050, essa quantidade deverá ultrapassar 34 bilhões de toneladas (SIDDIQUI et al., 2023). O uso extensivo de embalagens plásticas descartáveis no cotidiano da sociedade favorece a difusão destes materiais para o meio ambiente. Dos resíduos de origem antropogênica liberados para o ambiente, os plásticos podem constituir mais de 50% em massa (HORTON et al., 2017).

Grande parte dos plásticos utilizados no dia-a-dia pelos seres humanos é descartada de maneira inadequada e acabam por atingir o solo. Resíduos plásticos também podem ser descartados diretamente no ambiente aquático, especialmente em regiões onde ocorrem atividades de pesca, turismo e recreação. Em virtude da radiação ultravioleta e da abrasão mecânica ao qual ficam sujeitos no ambiente, os plásticos sofrem fragmentação e originam materiais de menores dimensões, classificados como microplásticos (MP: > 100 nm e < 5 mm) e nanoplásticos (NP: < 100 nm) (IVAR DO SUL; COSTA, 2014). Devido às menores dimensões e peso reduzido, estes fragmentos são facilmente transportados entre os compartimentos (ex. do solo para os rios através do escoamento superficial e pela ação do vento, bem como dos rios para os solos através de inundações e tempestades), resultando em uma contaminação generalizada do ambiente (HORTON et al., 2017).

Além do mais, MPs e NPs são utilizados em processos industriais e na fabricação de produtos de limpeza e cosméticos. Estes produtos acabam por serem levados pelo sistema de drenagem industrial ou doméstica de águas residuárias e, como não são facilmente degradados, permanecem no lodo de esgoto ou no efluente (NIZZETTO; FUTTER; LANGAAS, 2016). Desta forma, os fragmentos plásticos podem atingir os rios através da descarga de efluentes tratados. Portanto, a utilização de efluentes tratados e dos bio sólidos na irrigação e fertilização orgânica de solos agrícolas, também podem representar importantes fontes de entrada de plásticos em áreas agrícolas (MOHAPATRA et al., 2016; HORTON et al., 2017; NIZZETTO; FUTTER; LANGAAS, 2016). Outras fontes de plásticos em solos agrícolas incluem a utilização de filmes e lonas plásticas para cobertura do solo (RILLIG, 2012), polímeros utilizados no revestimento de sementes (BOSKER et al., 2019), além de recipientes e embalagens plásticas utilizadas em atividades agrícolas e que possuem potencial para se dispersar no ambiente.

Uma vez no ambiente, vários organismos podem ser expostos aos MPs e NPs. O tamanho reduzido destes materiais facilita sua ingestão por diversos invertebrados edáficos e

aquáticos (NG et al., 2018) e como, em geral, não são totalmente digeridos nem decompostos, tendem a se acumular no sistema digestivo dos organismos (ELTEMSAH; BØHN, 2019). Alguns estudos indicam que a exposição de invertebrados a MPs e NPs pode induzir processos inflamatórios, causar alterações no comportamento e na atividade alimentar, diminuir a reprodução e o crescimento de invertebrados aquáticos/terrestres, e até mesmo levar à morte (ZOCCHI; SOMMARUGA, 2019; BESSELING et al., 2014; JU; ZHU; QIAO, 2019; RODRIGUEZ-SEIJO et al., 2017).

Devido à sua permanência durante longos períodos nos ecossistemas aquáticos e terrestres, os plásticos podem coexistir com os agrotóxicos (WANG et al., 2019). A ocorrência combinada de plásticos e agrotóxicos é esperada principalmente em solos agrícolas nos quais a entrada de fragmentos plásticos - via aplicação de biossólidos, resíduos de filmes plásticos ou através de outro meio - tenha ocorrido, e que tenham recebido manejos com agrotóxicos para o controle de pragas e doenças. Neste viés, a literatura indica que, até o momento, o plástico não tende a ser um grande problema ecotoxicológico quando tratado isoladamente, mas pode ser um agravador quando misturado com outros compostos (CHENG et al., 2020; NOGUEIRA et al., 2022; JU et al., 2023). Tendo em vista que os efeitos tóxicos dos fragmentos plásticos e dos neonicotinoides pode ser bastante variável entre as espécies do solo (ALVES et al., 2013; 2014; ZHU et al., 2018a; JU, ZHU, QIAO, 2019), nas avaliações ecotoxicológicas preditivas envolvendo estes contaminantes, é importante que sejam incluídas espécies de diferentes grupos taxonômicos, as quais podem possuir diferentes mecanismos de exposição e detoxificação e, conseqüentemente, diferentes níveis de sensibilidade aos contaminantes. Já se sabe, por exemplo, que entre os organismos da fauna do solo, os colêmbolos representam um dos grupos mais sensíveis aos neonicotinoides, enquanto que os enquitreídeos apresentam maior tolerância a esta classe de agrotóxicos (BANDEIRA et al., 2021), representando, portanto, extremos distintos de sensibilidade.

Em virtude da solubilidade e do potencial de mobilidade de alguns agrotóxicos (tal como a CLO), bem como da distribuição generalizada de fragmentos plásticos no ambiente, associações de plásticos e agrotóxicos também podem ocorrer em compartimentos aquáticos, especialmente em corpos hídricos adjacentes a áreas agrícolas. Entretanto, os estudos a respeito dos efeitos de plásticos sobre espécies bioindicadoras da qualidade da água ainda são incipientes, assim como os seus efeitos quando combinados com outros contaminantes (LU et al., 2018; KIM; CHAE; AN, 2017; BANAEI et al., 2019; BELLINGERI et al., 2019; LEE et al., 2013; MAGARA et al., 2019; ZHANG et al., 2019). Embora ainda não se conheça a fundo

as diferenças de sensibilidade entre as espécies aquáticas, sabe-se que organismos filtradores, tal como os microcrustáceos, tendem a internalizar fragmentos plásticos e outros contaminantes durante o processo de ingestão do zooplâncton, levando ao acúmulo destas substâncias no seu trato digestivo (NOGUEIRA et al., 2022). Por outro lado, organismos unicelulares, tal como microalgas e cianobactérias, podem internalizar os contaminantes presentes na água através dos processos de endocitose (especialmente aqueles mediados pela clatrina) ou mesmo pela difusão passiva dos contaminantes através da estrutura porosa da parede celular (YAN, TANG & WANG, 2021). Associado a isso, estes organismos geralmente possuem mecanismos mais simplificados de detoxificação, como por exemplo, a regulação da pressão osmótica intracelular e a degradação de proteínas (YANG et al., 2021), o que os torna organismos potencialmente mais suscetíveis aos efeitos tóxicos dos contaminantes emergentes.

No que diz respeito a misturas de plásticos com pesticidas, embora um número limitado de estudos tenham sido realizados até o momento (YANG et al., 2019; GARRIDO et al., 2019; ZOCCHI; SOMMARUGA, 2019), já foi verificado que a presença de partículas microplásticas pode potencializar os efeitos tóxicos de neonicotinóides no ambiente aquático (SCHERER et al., 2020; SUN et al., 2024), especialmente em virtude de fenômenos de complexação dos pesticidas pelas partículas plásticas, facilitando sua internalização nos organismos expostos. Por outro lado, no solo, por se tratar de uma matriz mais complexa, com maior número de sítios de adsorção disponível para os contaminantes, é esperada uma menor interação entre os plásticos e os neonicotinóides, reforçada ainda pela diferença de hidrofobicidade entre os plásticos (hidrofóbicos) e neonicotinóides (hidrofilicos). De qualquer forma, uma série de estudos aponta que as interações entre estes grupos de contaminantes são complexas, pois dependem do tipo de material usado no plástico, características químicas da molécula do agrotóxico, entre outros (GARRIDO et al., 2019; ZOCCHI; SOMMARUGA, 2019; NOGUEIRA et al., 2022; HORTON et al., 2018). Além disso, em adição aos efeitos tóxicos induzidos na geração de organismos expostos, há de se considerar ainda que estes compostos possuem potencial de mutagenicidade e genotoxicidade, podendo, a longo prazo, induzirem efeitos sob gerações filiais não expostas (NOGUEIRA et al., 2022). Portanto, ainda precisam ser mais profundamente exploradas e melhor compreendidas as relações entre esses CEs.

Com base nesta contextualização, as principais perguntas de pesquisa propostas neste trabalho são: 1) Quais são os potenciais efeitos ecotoxicológicos de nanoplásticos de

poliestireno e da clotianidina sobre organismos terrestres e aquáticos? E 2) Quais são as consequências toxicológicas das misturas dos dois contaminantes para os organismos terrestres e aquáticos? Testes ecotoxicológicos aquáticos e terrestres dos compostos individuais e da mistura foram realizados visando contribuir para a busca de respostas à essas perguntas de pesquisa, de forma a elucidar os níveis de toxicidade e as possíveis interações existentes entre os componentes, bem como para estabelecer limites seguros de exposição para as espécies de invertebrados a serem testadas.

1.3 JUSTIFICATIVA

Esta tese tem relação direta com pelo menos quatro dos dezessete Objetivos do Desenvolvimento Sustentável no Brasil, tal como “Fome zero e Agricultura Sustentável”, “Água Potável e Saneamento”, “Vida na Água” e “Vida na Terra”. Desta maneira, o presente trabalho se justifica, pois contribui para o desenvolvimento de uma agricultura mais sustentável, com maior proteção dos ecossistemas e dos organismos vivos do compartimento aquático e terrestre.

Esta tese se encontra inserida no contexto do atual projeto, contribuindo para a formação de recursos humanos em nível de doutorado, e para a geração e publicação de conhecimento científico. No âmbito legal, esta pesquisa pode contribuir na atualização de normas ambientais de regulação da qualidade da água e do solo (BRASIL, 2005; 2009), através da geração de dados acerca dos níveis máximos permitidos no ambiente dos contaminantes-alvo deste trabalho.

No âmbito social, os resultados deste trabalho poderão auxiliar agricultores, técnicos, gestores ambientais e tomadores de decisão, na escolha de alternativas de manejo agrícola mais sustentáveis, de maneira a respeitar os limites máximos estabelecidos para a proteção do equilíbrio do ecossistema terrestre e aquático.

Dentro do contexto universitário, esta tese está embasada no Programa Institucional de Internacionalização (CAPES – PrInt - EDITAL N°41/2017 – PROCESSO N° 88887.694329/2022-00), e contribuiu para a internacionalização e fortalecimento das relações internacionais da UFSC a partir do estágio de doutorado sanduíche desenvolvido em Montreal, Canadá. Este trabalho foi fomentado pelo projeto “*Estudo do mecanismo de ação tóxica de nanoplasticos em misturas com contaminantes emergentes*”, aprovado no Edital de Chamada Pública FAPESC n° 12/2020.

No âmbito científico, os resultados dos testes de toxicidade poderão contribuir para um melhor entendimento dos impactos destas substâncias sobre organismos terrestres e aquáticos, tanto de maneira isolada quanto em mistura. A partir destes resultados, será possível visualizar quais espécies são mais sensíveis aos contaminantes, merecendo proteção prioritária. Além disso, poderão ser estabelecidos níveis aceitáveis das substâncias no ambiente, bem como definir quais níveis de mistura dos compostos são mais críticos para os organismos, e estabelecer se modelos de concentração aditiva predizem a ecotoxicidade da mistura.

1.4 HIPÓTESES

1. Os efeitos tóxicos da mistura de clotianidina e nanoplásticos sobre espécies terrestres são correspondentes à soma dos efeitos dos compostos isolados (efeito aditivo). A clotianidina causa risco significativo às espécies do solo e induz efeitos comportamentais sobre os colêmbolos;
2. Os efeitos tóxicos da mistura de clotianidina e nanoplásticos sobre espécies aquáticas são superiores à soma dos efeitos dos compostos isolados (efeito sinérgico). A toxicidade dos contaminantes é maior para organismos unicelulares (microalgas e cianobactérias) em comparação às macrófitas e microcrustáceos. Os efeitos tóxicos sobre a geração parental de invertebrados aquáticos (F0) não são transferidos para as gerações futuras (F1 e F2).

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial ecotoxicológico de um inseticida à base de clotianidina e de nanoplásticos de poliestireno (individualmente e em misturas) para organismos não-alvos de ecossistemas terrestres e aquáticos.

1.5.2 Objetivos específicos

1. Avaliar os efeitos de ecotoxicidade crônica, o potencial de indução de comportamento de fuga e o risco ecológico da clotianidina sobre invertebrados não-alvo do solo (minhocas *Eisenia andrei*, enquitreideos *Enchytraeus crypticus* e colêmbolos *Folsomia candida*, *Proisotoma minuta* e *Sinella curviseta*);
2. Investigar os efeitos comportamentais induzidos pela clotianidina sobre colêmbolos *Folsomia candida*.
3. Avaliar os efeitos de ecotoxicidade crônica da clotianidina e do nanoplástico de poliestireno, isoladamente e em mistura, sobre a reprodução de invertebrados do solo (colêmbolos *F. candida* e enquitreideos *E. crypticus*);
4. Avaliar os efeitos tóxicos da clotianidina e do nanoplástico de poliestireno, isoladamente e em mistura, sobre quatro espécies de organismos aquáticos (microcrustáceos *Daphnia magna*, macrófitas *Lemna minor*, microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* e cianobactérias *Microcystis aeruginosa*), e se os organismos unicelulares apresentam maior susceptibilidade às misturas comparados aos demais;
5. Avaliar se a exposição da geração parental de *D. magna* (F0) aos diferentes níveis tóxicos dos contaminantes (individualmente e em mistura) acarreta em efeitos deletérios sobre as gerações subsequentes (F1 e F2);
6. Caracterizar as interações toxicológicas (efeitos: aditivo, sinérgico ou antagônico) decorrentes da mistura de clotianidina e nanoplásticos para *F. candida* e *E. crypticus* (ambiente terrestre) e *D. magna*, *L. minor*, *C. reinhardtii* e *M. aeruginosa* (ambiente aquático);
7. Identificar concentrações seguras de exposição para espécies aos poluentes individuais e em mistura no solo e na água.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 INSETICIDAS NEONICOTINOIDES

Os inseticidas neonicotinoides foram inicialmente registrados em 1990, em resposta ao aumento da resistência de pragas aos inseticidas existentes e às preocupações relacionadas com a exposição aos inseticidas organofosforados e carbamatos (MORRISSEY et al., 2015). No sistema nervoso central dos insetos, os neonicotinoides competem com o neurotransmissor acetilcolina pela ligação aos receptores nicotínicos pós-sinápticos. Desta maneira, causam bloqueio dos receptores e consequente impedimento da transmissão de impulsos nervosos, levando à paralisia e eventual morte dos organismos expostos (JESCHKE et al. 2011; IHARA; MATSUDA, 2018). Os neonicotinoides apresentam baixa toxicidade para mamíferos e elevada seletividade e eficiência no controle de insetos e outros artrópodes-praga, em comparação a outras classes de inseticidas, o que fez com que sua utilização tenha se expandido globalmente e, atualmente, são registrados para uso em mais de 120 países (JESCHKE et al., 2011).

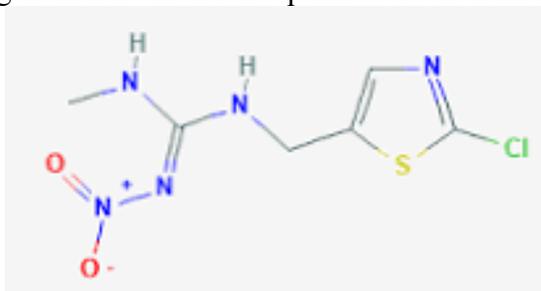
Os neonicotinoides são moléculas relativamente pequenas que apresentam solubilidade moderada a alta (geralmente $> 300 \text{ mg L}^{-1}$), baixo potencial de volatilização e, em geral, alta persistência no ambiente (PISA et al., 2015; BONMATIN et al., 2014). Estes inseticidas são bastante versáteis em relação à forma de uso. Em áreas agrícolas, podem ser usados em pulverizações foliares, em grânulos ou soluções para aplicação direta no solo ou em águas de irrigação; são usados também em formulações comerciais de uso doméstico para a eliminação de baratas e formigas e no controle de parasitas externos incidentes sobre animais domésticos (SIMON-DELISO et al., 2015). Entretanto, o uso majoritário ocorre no tratamento de sementes (60% dos neonicotinoides são usados desta maneira; JESCHKE et al., 2011), em uma ampla variedade de culturas, tal como trigo, aveia, milho, arroz, cevada, soja e outros. O revestimento químico de sementes confere proteção a pragas e patógenos existentes no solo, garantindo um desenvolvimento satisfatório das culturas no estágio inicial de crescimento. Por se tratar de um método de fácil aplicação e também por requerer menor ação e contato do agricultor com os agrotóxicos (JESCHKE et al., 2011), é frequentemente adotado em sistemas agrícolas brasileiros, especialmente em áreas de produção intensiva. No Brasil, por exemplo, mais de 90% das sementes de soja destinadas ao plantio agrícola recebem algum tipo de tratamento químico (HUNGRIA et al., 2020).

Quando utilizados no tratamento químico de sementes, uma parte do inseticida neonicotinoide aplicado é solubilizada quando em contato com a água dos poros do solo, e esses resíduos podem permanecer no solo após a germinação das sementes. Em seguida, as moléculas também podem ser absorvidas pelas raízes e transportadas para os tecidos da planta, fornecendo um período de proteção prolongado às culturas agrícolas e reduzindo o dano causado por pragas durante meses após o plantio das sementes (GOULSON, 2013; WOOD; GOULSON, 2017). Dentre os inseticidas neonicotinoídeos de uso comercial mais difundido, destacam-se o imidacloprido, o tiametoxam, o tiaclopride, o acetamiprido, o dinotefuran, o nitenpiram e a clotianidina.

2.1.1 Clotianidina

A clotianidina (CLO; IUPAC: (E)-1-(2-chloro-1,3-thiazol-5-ylmethyl)-3-methyl-2-nitroguanidine; fórmula bruta: $C_6H_8ClN_5O_2S$; Figura 2.1.1) é um dos neonicotinoídeos pertencentes ao grupo das N-nitroguanidinas, ao qual estão inclusos também o imidacloprido, o tiametoxam e o dinotefuran (GOULSON, 2013). No Brasil, atualmente existem duas formulações comerciais contendo o i.a. CLO registradas para uso, ambas na forma de suspensão concentrada para o tratamento de sementes (Inside FS e Poncho; www.agrofit.agricultura.gov.br). Entretanto, em outros países, o uso desta molécula também é feito através de formulações na forma de pó molhável e grânulos dispersíveis em água para aplicações foliares e no sulco de plantio (EFSA, 2018; GUO et al., 2021).

Figura 2.1.1 - Estrutura química da clotianidina.



Fonte: PubChem [<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>].

Assim como os demais neonicotinoídeos, a CLO atua como agonista dos receptores nicotínicos de acetilcolina no sistema nervoso central dos insetos. Entretanto, alguns estudos

vêm mostrando que esta molécula pode apresentar maior ação agonista e atividade inseticida do que outros neonicotinoides (IHARA et al., 2004). Em condições de temperatura e pH controlados (20 °C, pH 7), a CLO apresenta solubilidade moderada em água (304 mg L⁻¹; log Kow = 0,91; <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) e baixo potencial para volatilização. Esta molécula possui um peso molecular de 249,7 g mol⁻¹ e uma afinidade de adsorção ao solo baixa a intermediária (log Koc = 2,08), além de ser altamente polar e hidrofílico (log Kow = -0,041). Sua persistência no solo geralmente é elevada, com tempos de meia-vida (DT₅₀) variando de centenas a milhares de dias (GOULSON, 2013). Em água, a CLO é rapidamente degradada via fotólise, mas é estável à hidrólise, especialmente em condições anaeróbicas (BONMATIN et al., 2014; MORRISSEY et al., 2015).

2.1.2 Distribuição dos neonicotinoides no ambiente

Estudos a respeito da dinâmica e do comportamento dos neonicotinoides no solo indicaram que menos de 20% do conteúdo total aplicado nas sementes é, de fato, absorvido pelas culturas agrícolas, e que, portanto, pelo menos 80% do conteúdo residual permaneça no solo ou seja transportado para outros compartimentos ambientais (SUR; STORK, 2003; ALFORD; KRUPKE, 2017).

A persistência dos neonicotinoides no solo depende das taxas de degradação fotolítica, hidrolítica e microbiana, as quais estão relacionadas com fatores altamente variáveis no ambiente, tal como a radiação ultravioleta, a temperatura e o pH (BONMATIN et al., 2014). Por conta disto, o tempo de permanência destes inseticidas no solo pode ser bastante variável. De acordo com a revisão feita por Goulson (2013), o DT₅₀ dos neonicotinoides varia de 200 a mais de 1000 dias no solo. Para a CLO, o DT₅₀ varia entre 148 e 6931 dias em laboratório, enquanto que, em campo, os relatos indicam uma variação do tempo de meia-vida entre 277 e 1386 dias. Embora bastante variáveis, estes valores indicam uma longa persistência da CLO no solo e revelam que há potencial para acumulação desta substância no solo ao longo de sucessivas aplicações em áreas agrícolas. Em virtude da lenta degradação dos neonicotinoides no solo, níveis detectáveis destas substâncias (próximos a 0,01 mg kg⁻¹) já foram encontrados em solos agrícolas após um ano do plantio de sementes tratadas (WOOD; GOULSON, 2017).

As concentrações residuais de neonicotinoides no solo são dependentes principalmente da quantidade de inseticida aplicado e variam com o tipo de solo, com a umidade e temperatura

do local. Algumas semanas após o plantio de sementes tratadas com neonicotinoides em quantidades recomendadas comercialmente, a concentração destas substâncias no solo geralmente situa-se na faixa de 0,1 a 0,9 mg de i.a. kg⁻¹ (DONNARUMMA et al., 2011; PISA et al., 2015). Por exemplo, os autores Chowdhury, Mukhopadhyay e Bhattacharyya (2012) encontraram concentrações médias de 0,45 mg de CLO kg⁻¹ logo após o plantio de sementes de chá tratadas com este inseticida. Além disso, considerando que a distribuição dos neonicotinoides no solo é heterogênea, é possível que em regiões mais próximas das sementes tratadas as concentrações sejam ainda maiores (PISA et al., 2015).

Devido à majoritária utilização da CLO no tratamento de sementes agrícolas, é esperado que sua dissipação ocorra inicialmente no compartimento terrestre, o que confere uma substancial preocupação acerca dos potenciais impactos sobre as espécies que vivem no solo. Entretanto, em virtude da sua solubilidade em água, este inseticida pode ser transportado para compartimentos aquáticos por lixiviação ou por escoamento superficial e, conseqüentemente, causar impactos sobre a fauna de ecossistemas aquáticos (BONMATIN et al., 2014; RABY et al., 2018). Há vista a importância de as partículas do solo atuarem como um filtro para os poluentes orgânicos, as propriedades de cada tipo de solo exercem importante modulação na liberação de substâncias químicas tanto para as frações de água contida nos poros do solo, quanto para o meio líquido e para os compartimentos aquáticos adjacentes. Sabe-se, por exemplo, que solos argilosos e siltosos normalmente apresentam uma capacidade mais elevada de retenção de neonicotinoides (WOOD; GOULSON, 2017), enquanto que solos predominantemente arenosos poderão apresentar maior lixiviação devido à reduzida capacidade de adsorção que possuem (SELIM; JEONG; ELBANA, 2010; MÖRTL et al., 2016).

Estudos demonstraram que, em condições ambientais simuladas, os neonicotinoides podem migrar das sementes tratadas para o solo adjacente (RADOLINSKI et al., 2018), além de apresentarem potencial de lixiviação, especialmente quando introduzidos a solos com baixos teores de matéria orgânica (MO) (ASEPERI et al., 2020). Além disso, em condições de campo, os neonicotinoides são utilizados através de formulações comerciais, as quais geralmente contêm adjuvantes e surfactantes adicionados à formulação com o propósito de aumentar a solubilidade, estabilidade e/ou dispersão dos ingredientes ativos (KACZMAREK et al., 2021), o que pode favorecer ainda mais sua difusão no ambiente. Além do mais, os níveis de contaminação dos corpos d'água podem ser ainda aumentados pelo transporte de partículas pelo vento durante pulverizações foliares e pela dissipação da poeira de sementes tratadas (KRUPKE et al., 2012). A presença de neonicotinoides em corpos d'água tem sido reportada desde 1990,

e alguns estudos de revisões recentes indicam que contaminações em níveis ambientalmente inaceitáveis vêm ocorrendo com frequência em diversos países do mundo (MORRISSEY et al., 2015; WOOD; GOULSON, 2017). O risco de contaminação é ainda mais expressivo para os corpos hídricos que possuem áreas agrícolas em seu entorno, os quais estão sujeitos a receberem maiores cargas de neonicotinoides principalmente após eventos intensos de chuva, devido ao escoamento superficial e/ou à drenagem de áreas agrícolas (GOULSON, 2013; MORRISSEY et al., 2015). Este fenômeno pode ainda ser agravado em contextos de práticas inadequadas de manejo do solo, como a retirada da vegetação ciliar e revolvimento do solo, que acentuam a erosão do solo (WEN et al., 2023) e favorecem o transporte destas substâncias para os corpos hídricos.

Morrissey et al. (2015) realizaram um levantamento dos níveis médios e de pico de neonicotinoides reportados em 29 estudos de nove países em diferentes corpos d'água, os quais eram adjacentes ou recebiam água de áreas agrícolas. O estudo levou em consideração córregos, rios, água de drenagem, águas subterrâneas, pântanos, lagoas e outros. A concentração média de neonicotinoides nas águas superficiais foi de $0,13 \mu\text{g L}^{-1}$, com picos médios atingindo $0,63 \mu\text{g L}^{-1}$. Em uma investigação de águas subterrâneas situadas abaixo de campos agrícolas contendo milho tratado com CLO, De Perre, Murphy, Lydy (2015) relataram picos de concentração que chegaram a $0,06 \mu\text{g L}^{-1}$, enquanto que Schaafsma et al. (2015) encontraram níveis de CLO que chegaram a $0,04 \mu\text{g L}^{-1}$ em águas superficiais ao redor de campos de milho no Canadá. Níveis mais elevados de contaminação por CLO foram relatados por Samson-Robert et al. (2014), onde poços adjacentes a campos agrícolas contendo sementes tratadas com este inseticida apresentaram concentrações máximas de $55,7 \mu\text{g L}^{-1}$.

Embora a CLO apresente alta susceptibilidade à degradação através da fotólise (BONMATIN et al., 2014), alguns estudos indicaram uma baixa taxa de degradação em condições naturais, possivelmente devido aos níveis mais altos de turbidez dos corpos hídricos que dificultam a entrada de luz (WOOD; GOULSON, 2017). Nestas condições, a CLO também pode apresentar alta persistência, além de potencial para acumulação ao longo do tempo (MORRISSEY et al., 2015).

2.1.3 Efeitos de neonicotinóides sobre organismos terrestres e aquáticos

Embora os inseticidas neonicotinóides contribuam para a proteção das culturas e para garantir níveis elevados de produção de alimentos, sua utilização em áreas agrícolas pode causar efeitos negativos em organismos não-alvo da fauna do solo. Vários estudos já demonstraram que esta classe de inseticidas tem potencial para causar efeitos deletérios em invertebrados do solo, tal como minhocas, colêmbolos, enquitreídeos, isópodes, ácaros e outros (ALVES et al., 2013; ALVES et al., 2014; DE LIMA E SILVA et al., 2017; CHEVILLOT et al., 2017; VAN GESTEL et al., 2017; GE et al., 2018; BANDEIRA et al., 2020a). Os efeitos prejudiciais sobre os organismos edáficos merecem atenção, à medida que se constata que estas espécies são responsáveis por realizar e/ou dar suporte a processos de decomposição da MO e de ciclagem de nutrientes, além de contribuírem para a melhoria da estruturação, da porosidade e da aeração do solo (OGUNGBEMI; VAN GESTEL, 2018).

Os organismos expostos aos neonicotinóides podem sofrer uma série de efeitos deletérios, incluindo inibição do crescimento, perda de peso, danos no DNA, redução da fecundidade e da reprodução (WANG et al., 2015a, b; WANG et al., 2016; RENAUD et al., 2018; BANDEIRA et al., 2020a). Dentre os neonicotinóides com maior potencial para afetar os organismos não-alvo, a CLO merece destaque devido ao alto potencial tóxico sobre invertebrados não-alvo do solo (Tabela 2.1.1). Wang et al. (2012) constataram que, entre um total de 45 agrotóxicos avaliados, este inseticida foi o mais tóxico para minhocas *Eisenia fetida*. De maneira semelhante, De Lima e Silva et al. (2019) observaram que entre cinco neonicotinóides testados (CLO, imidacloprido, tiacloprido, tiametoxam e acetamiprido), a CLO foi o inseticida mais tóxico para colêmbolos *Folsomia candida* e, assim como no estudo de Ritchie et al. (2019), os efeitos letais e subletais foram observados para a espécie em concentrações ambientalmente relevantes (aproximadamente 0,05 mg kg⁻¹) (DE LIMA E SILVA et al., 2019; RITCHIE et al., 2019).

Entretanto, cabe ressaltar que as avaliações de toxicidade da CLO realizadas até o momento foram conduzidas em sua maioria com espécies padronizadas, desconsiderando a sensibilidade de espécies alternativas do ecossistema. Apesar da redundância funcional de certas espécies/grupos taxonômicos no suporte aos serviços ecossistêmicos (ERTIBAN, 2019), o conhecimento acerca dos impactos deste inseticida em um maior número de espécies é fundamental para a geração de curvas de distribuição de sensibilidade das espécies (DSE), as quais são distribuições probabilísticas ajustadas a dados de toxicidade obtidos a partir de testes

de laboratório com múltiplas espécies (POSTHUMA et al., 2002). Neste sentido, a DSE vem se tornando uma ferramenta de grande relevância na análise de risco ecológico de agrotóxicos, pois permite quantificar o risco através de uma perspectiva de ecossistema, reduzindo a incerteza associada às diferenças de respostas toxicológicas entre espécies. Países como Estados Unidos, Holanda e Nigéria já possuem diretrizes bem estabelecidas para a elaboração de curvas DSE no contexto de análise de risco (USEPA, 2005; NEPC, 2011; RIVM, 2007).

Através das DSEs, é possível derivar concentrações de perigo (CPs) para uma certa porcentagem de espécies, as quais consistem em informações úteis para agências regulatórias na definição de limites máximos permitidos para agrotóxicos no ambiente (USEPA, 2005; NEPC, 2011). Além do mais, as CPs podem ser comparadas com concentrações dos poluentes potencialmente presentes no ambiente através de abordagens de cálculo do risco, tal como o quociente de perigo (QP), o que permite estimar a magnitude dos efeitos que os níveis esperados do agrotóxico no solo poderão causar sobre os organismos. Ainda há, contudo, uma lacuna de conhecimento nesta área, pois no Brasil, até o momento ainda não existe uma norma de orientação técnica que estabeleça como devem ser elaboradas as DSEs para organismos do solo, e as metodologias de avaliação de risco ecológico ainda precisam ser consolidadas.

Além das lacunas existentes em relação à avaliação do risco ecológico, há de se considerar ainda a limitação de técnicas para a avaliação dos efeitos de contaminantes sobre o comportamento dos organismos. Até o momento, os parâmetros biológicos utilizados em avaliações ecotoxicológicas são, em grande parte, focados na sobrevivência, crescimento e reprodução dos organismos, enquanto que parâmetros comportamentais, como a resposta de fuga e a capacidade de locomoção dos organismos, ainda são menos consideradas nas avaliações de risco. Neste contexto, a locomoção é essencial para que os invertebrados do solo realizem suas funções de suporte aos serviços ecossistêmicos, tal como a fragmentação e incorporação do material orgânico no interior do solo e distribuição de comunidades microbianas no perfil do solo (ENGENHEIRO et al., 2005). Sendo assim, existe uma grande necessidade do desenvolvimento de metodologias que permitam avaliar os impactos dos agrotóxicos – especialmente aqueles causadores de paralisia tal como os neonicotinoides – sobre a locomoção dos organismos do solo, uma vez que ainda não existem normas nacionais de padronização (por exemplo, normas ABNT) para esse tipo de ensaio no Brasil.

Como mencionado anteriormente, os organismos dos ecossistemas aquáticos também podem ser expostos aos neonicotinoides, especialmente aqueles que vivem em corpos hídricos

que recebem água drenada de áreas agrícolas. Neste contexto, existem uma série de grupos que vêm sendo considerados em estudos de toxicidade aquáticos para a avaliação do potencial tóxico de contaminantes emergentes. Dentre eles, destaca-se a *Daphnia magna*, microcrustáceo de águas doces que vem sendo amplamente utilizado como espécie modelo em ensaios toxicológicos aquáticos em virtude da sua posição chave na cadeia alimentar em ecossistemas aquáticos, além do ciclo de vida curto, fácil cultivo em laboratório e elevada sensibilidade a uma série de contaminantes (HARRIS; BARTLETT; LLOYD, 2011; LV et al., 2017). Além disso, as microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* e cianobactérias *Microcystis aeruginosa* são organismos unicelulares com boa adaptabilidade aos ambientes laboratoriais e rápida taxa de reprodução que também vem sendo empregados em estudos ecotoxicológicos (DIMITRI et al., 2021; YAN et al., 2021). Além disso, outros organismos relevantes no contexto do ecossistema aquático são as macrófitas aquáticas – tal como a espécie *Lemna minor*, as quais desempenham papéis importantes na produção de biomassa, ciclagem de nutrientes e controle de qualidade da água (LALAU et al., 2020).

De maneira geral, a toxicidade aguda e crônica dos neonicotinóides pode variar muito entre os organismos aquáticos, com concentrações de efeito $< 1 \mu\text{g L}^{-1}$ até valores superiores a $100.000 \mu\text{g L}^{-1}$ (MORRISSEY et al., 2015). Uma síntese dos estudos que avaliaram os efeitos tóxicos da clotianidina sobre organismos aquáticos está apresentada na Tabela 2.1.1. Em alguns estudos, *D. magna* apresentou baixa sensibilidade a diferentes neonicotinóides, com efeitos negativos sendo observados apenas em concentrações muito acima daquelas potencialmente presentes no ambiente (MORRISSEY et al., 2015). Entretanto, grande parte destes trabalhos utilizaram ingredientes ativos (i.a.) puros ao invés de formulações comerciais (RABY et al., 2018). No estudo de Takács et al. (2017), por exemplo, os autores encontraram um valor da concentração que causa efeito deletério em 50% dos organismos (CE_{50}) para *D. magna* de $531,4 \text{ mg L}^{-1}$ para o i.a. puro, e de $11,43 \text{ mg L}^{-1}$ para a formulação comercial APACHE 50 WG, indicando que a formulação inseticida contendo CLO foi 46,5 vezes mais tóxica à *D. magna* do que o i.a. puro. Já Hayasaka et al. (2013), utilizando a formulação comercial DANTOTSU (CLO 50% WDG), encontraram uma CE_{50} de $67,6 \text{ mg L}^{-1}$, revelando que as toxicidades destas formulações podem ser bastante variáveis.

Tabela 2.1.1 - Revisão de estudos avaliando os efeitos tóxicos da clotianidina para diferentes organismos terrestres e aquáticos.

Organismo	Tipo de teste, duração e endpoint	Faixa de concentrações testadas	Efeitos observados	Referência
<i>Folsomia candida</i>	Solo - Crônico (28d) – sobrevivência de adultos, número de juvenis produzidos	0,04 – 10,0 mg kg ⁻¹	Diminuição na reprodução (EC50 = 0,05 (0,05-0,06) mg kg ⁻¹)	De Lima e Silva et al. (2019)
<i>Eisenia andrei</i>	Crônico (56d) – sobrevivência de adultos, número de juvenis produzidos	0,04 – 10,0 mg kg ⁻¹	Diminuição na reprodução (EC50 = 0,70 [0-2,0] mg kg ⁻¹)	
<i>Folsomia candida</i>	Solo - Crônico (28d) – sobrevivência de adultos, número de juvenis produzidos	0,00066 – 0,13 mg kg ⁻¹	Diminuição na reprodução (EC50 = 0,069 [0,039–0,12] mg kg ⁻¹)	Ritchie et al. (2019)
<i>Eisenia andrei</i>	Solo - Crônico (56d) – sobrevivência de adultos, número de juvenis produzidos	0,0033 – 0,81 mg kg ⁻¹	Diminuição na reprodução (EC50 = 0,26 [0,22–3,18] mg kg ⁻¹)	
<i>Oppia nitens</i>	Solo - Crônico (28d) – sobrevivência de adultos, número de juvenis produzidos	92 mg kg ⁻¹	Nenhum efeito tóxico até 92 mg kg ⁻¹	
<i>Bombus terrestris audax</i>	Solo - Teste de campo (3d) – dose crônica	2.1 ppb	Acumulação de clotianidina no cérebro.	Moffat et al. (2015)
<i>Folsomia fimetaria</i>	Solo - Crônico (21d) – sobrevivência de adultos, número de juvenis produzidos	-	Diminuição na reprodução (EC50 = 0,676 mg kg ⁻¹)	Chèvre et al. (2017)
<i>Daphnia magna</i>	Água – agudo (48h) – teste de imobilização	-	Imobilização (EC50 = 67,564 (48,762–98,441) mg L ⁻¹)	Hayasaka et al. (2013)
<i>Daphnia pulex</i>	Água – agudo (48h) – teste de imobilização	-	Imobilização (EC50 = 31,448 (20,881–46,463) mg L ⁻¹)	
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Água – agudo (48h) – teste de imobilização	-	Imobilização (EC50 = 1691.3 (1077,1–19,844) mg L ⁻¹)	
<i>Ceriodaphnia reticulata</i>	Água – agudo (48h) – teste de imobilização	-	Imobilização (EC50 = 29,474 (21,076–49,968) mg L ⁻¹)	
<i>Moina macrocopa</i>	Água – agudo (48h) – teste de imobilização	-	Imobilização (EC50 = 61,106 (42,582–106,290) mg L ⁻¹)	
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Água – crônico (6d) – sobrevivência, número de neonatos produzidos	1,56 – 100 mg L ⁻¹	Diminuição do número de neonatos a partir de 12,5 mg L ⁻¹	
<i>Daphnia magna</i>	Água – agudo (48h) – teste de imobilização	-	Imobilização (EC50 = 531,4 mg L ⁻¹ [clotianidina pura]; 11,43 [7,18- 14,19] mg L ⁻¹)	

2.2 PLÁSTICOS COMO FONTE DE CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

Os plásticos são polímeros sintéticos derivados da polimerização de monômeros extraídos de óleos ou gases (COLE et al., 2011). Eles surgiram há mais de 100 anos e, atualmente, vem sendo amplamente utilizados por segmentos da indústria e da agricultura (JU; ZHU; QIAO, 2019). Os plásticos se tornaram ideais para uma ampla variedade de aplicações devido à sua versatilidade, leveza, baixo custo, alta duração e resistência à corrosão (IVAR DO SUL; COSTA, 2014), o que faz com que seu uso seja frequente no dia-a-dia da população. Sua produção vem aumentando e, somente em 2016, 335 milhões de toneladas de plástico foram produzidas a nível global (JU; ZHU; QIAO, 2019). Apesar dos benefícios, níveis significativos de poluição do ambiente são provocados pelo uso e descarte inadequado destes materiais. Entre 1950 e 2015, estima-se que os resíduos de plástico tenham atingido 6300 milhões de toneladas (GEYER; JAMBECK; LAW et al., 2017).

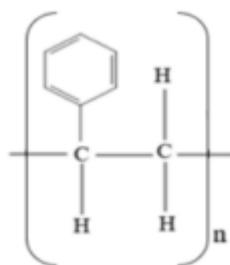
Embora a maioria dos plásticos apresente resistência à biodegradação, estes podem sofrer transformações por outros processos naturais, como, por exemplo, a radiação ultravioleta e a abrasão mecânica (FADARE et al., 2019), o que pode enfraquecer a integridade estrutural e favorecer a fragmentação dos plásticos em componentes de menores dimensões tais como os microplásticos (MPs) e os nanoplásticos (NPs). Os MPs são fragmentos plásticos geralmente caracterizados com diâmetro entre 100 nm e 5 mm, enquanto que os NPs são fragmentos plásticos ainda menores, com diâmetro < 100 nm (WRIGHT; THOMPSON; GALLOWAY, 2013; RILLIG, 2012). Apesar disso, ainda existem muitas discussões na literatura a respeito destas definições, e alguns autores assumem que materiais com tamanho inferior a 1000 nm já são considerados nano (GIGAULT et al., 2018).

A fabricação de diversos produtos também utiliza MPs ou NPs como constituintes. Estes materiais são bastante variáveis em relação à forma, tamanho e composição, e são frequentemente utilizados na indústria de cosméticos e em tecnologias de jateamento de ar, em equipamentos eletrônicos, adesivos, revestimentos e outros (COLE et al., 2011).

2.2.1 Poliestireno

O poliestireno (PS, fórmula química $(C_8H_8)^n$; Figura 2.2.1) é um polímero plástico derivado do estireno e utilizado em uma grande variedade de produtos, tal como esfoliantes, sabonetes para lavar as mãos, produtos de limpeza, pasta de dentes ou produtos biomédicos. O amplo uso se deve especialmente à sua alta resistência à tração, propriedades químicas estáveis, grande área superficial e viabilidade econômica, sendo considerado um polímero de longa duração (SIDDIQUI et al., 2023).

Figura 2.2.1 - Estrutura molecular do poliestireno.



Fonte: Monkul & Özhan (2021)

O PS é o tipo de polímero que é tipicamente usado para a fabricação de plásticos duros, como embalagens de alimentos, marmitas, copos para bebidas, pratos e utensílios de laboratório. Além disso, o poliestireno expandido é um dos materiais de preenchimento leves mais utilizados em aplicações geotécnicas, incluindo construções de aterros para estradas e pontes, estabilização de encostas e aterros de muros de contenção. No entanto, uma vez que os resíduos plásticos à base de PS são liberados no ambiente, eles podem ser fragmentados em partículas menores e transportados para a atmosfera, solo e compartimentos aquáticos (MONKUL & ÖZHAN, 2021).

2.2.2 Distribuição dos plásticos no ambiente

Os MPs e os NPs podem entrar no ambiente como materiais primários – aqueles fabricados intencionalmente com pequenas dimensões – e também como materiais secundários, originados da fragmentação de plásticos maiores (RILLIG, 2012; DE SÁ et al., 2018). Embora importantes para diversos setores comerciais e industriais, os MPs e os NPs são atualmente

considerados poluentes emergentes globais, em virtude da sua ampla ocorrência em compartimentos terrestres e aquáticos (JU; ZHU; QIAO, 2019). Muitos polímeros sintéticos comumente usados na composição dos plásticos, como o polietileno (PE), polipropileno (PP), poliestireno (PS) e o cloreto de polivinil (PVC) apresentam alta resistência à degradação e, por isso, possuem potencial de acumulação nos compartimentos ambientais (NG et al., 2018).

No compartimento terrestre, os solos agrícolas representam um importante destino dos plásticos. A entrada destes materiais pode ocorrer pelo uso de películas de plástico em estufas, filmes plásticos usados na cobertura de solo e lonas plásticas aplicadas na cobertura de alimentos e na vedação de tanques (BLÄSING; AMELUNG, 2018; RILLIG, 2012; HUERTA LWANGA et al., 2016). Apesar de auxiliarem na redução da evapotranspiração e permitirem melhor controle da temperatura do solo e das ervas daninhas, o uso frequente destes materiais nos ciclos de plantio favorece o acúmulo de resíduos plásticos em solos agrícolas. Nestes casos, práticas de manejo que envolvam revolvimento do solo, tal como a aração e a gradagem, podem ainda favorecer a fragmentação mecânica dos plásticos e o surgimento de MPs (XU et al., 2019).

Além disso, a aplicação de águas residuárias e de biossólidos, respectivamente, na irrigação e fertilização orgânica de solos agrícolas, representam importantes fontes de entrada de plásticos nestas áreas (MOHAPATRA et al., 2016; HORTON et al., 2017). Segundo Nizzetto, Futter, Langaas (2016), cerca de 63 a 430 mil toneladas de microplásticos são introduzidos anualmente em agroecossistemas através de biossólidos na Europa. Em um estudo recente de revisão, Xu et al. (2019) reportaram concentrações de MPs em solos agrícolas variando de 0,008 a 51,1 mg MP kg⁻¹ solo. Os NPs podem ser originados da fragmentação de MPs e, portanto, também devem estar presentes em solos agrícolas, entretanto sua quantificação ainda é dificultada pela falta de um método viável (NG et al., 2018).

A presença de fragmentos plásticos vem sendo principalmente reportada em ecossistemas aquáticos nos últimos anos (ANDRADY, 2011). Os MPs presentes em produtos cosméticos ou em processos industriais podem entrar em corpos hídricos através da drenagem de águas domésticas ou industriais (HORTON et al., 2017). O lançamento de efluentes de estações de tratamento de águas residuais também contribui para a contaminação de rios por microplásticos, pois uma grande proporção destes acaba passando pelos sistemas de filtração (NIZZETTO; FUTTER; LANGAAS, 2016). Outra fonte considerável de detritos plásticos provém da fabricação de produtos que contém grânulos e *pellets* de resina, que podem entrar no meio aquático pelo derramamento acidental durante o transporte e pela liberação direta em

córregos ou rios nas plantas de processamento (COLE et al., 2011). Atividades de pesca, turismo e recreação também favorecem a entrada de plásticos em ambientes aquáticos, principalmente devido ao descarte incorreto dos materiais nestas ocasiões (ANDRADY, 2011). O destino final destes plásticos são os oceanos, que acabam recebendo cerca de 10% de todo o material plástico produzido no mundo (COLE et al., 2011).

A composição dos plásticos é uma importante característica que regula sua distribuição no meio aquático e as taxas de intemperismo e degradação ao qual estará sujeito. Plásticos com densidades menores do que a da água, como o polietileno (PE) de baixa densidade e o polipropileno (PP), tendem a flutuar na superfície e, com isso, podem estar expostos a maiores temperaturas e radiação UV, enquanto que plásticos mais densos, tal como poliésteres (PET) e o policloreto de vinila (PVC), tendem a se depositar no fundo dos corpos hídricos (COLE et al., 2011; HAEGERBAEUMER et al., 2019; HORTON et al., 2017).

Após entrarem no ambiente aquático, os plásticos ficam suscetíveis à fragmentação por conta da abrasão e da turbulência existente no meio (BARNES et al., 2009). Como este processo é contínuo, a tendência é que sejam originados fragmentos cada vez menores ao longo do tempo. Pequenos fragmentos plásticos geralmente apresentam elevada área superficial em relação ao seu volume, o que os torna altamente reativos no ambiente. Por exemplo, MPs e NPs podem atuar como adsorventes de contaminantes presentes no meio aquático. Além disso, alguns aditivos e produtos químicos que costumam ser incorporados ao plástico para aumento da resistência ao calor, ao stress oxidativo e à degradação microbiana (tal como éteres, nonilfenóis e agentes bacteriostáticos) ficam mais suscetíveis à liberação para o meio aquático à medida que se aumenta a área reativa (HAEGERBAEUMER et al., 2019; ZOCCHI; SOMMARUGA, 2019).

2.2.3 Efeitos de plásticos sobre organismos terrestres e aquáticos

MPs e NPs são partículas pequenas o suficiente para serem absorvidos por muitos organismos, além de possuírem potencial para bioacumulação e biomagnificação (NG et al., 2018). Alguns estudos demonstraram ocorrer ingestão de microplásticos por organismos aquáticos e terrestres (ROCH; BRINKER, 2017; HUERTA LWANGA et al., 2016). Embora os MPs também possam oferecer risco às espécies expostas, os NPs podem ser ainda mais

perigosos, tendo em vista que apresentam alta reatividade e, em virtude de suas dimensões, podem atravessar algumas barreiras biológicas essenciais à vida (EFSA, 2016).

A exposição a MPs pode causar efeitos deletérios em invertebrados do solo. Ju, Zhu, Qiao (2019) observaram que colêmbolos *Folsomia candida* apresentaram comportamento de fuga a solos contaminados com 0,5% e 1% de microplásticos de polietileno (MPPE, < 500 µm). Além disso, a reprodução desta espécie foi inibida a partir da concentração de 0,1%. Colêmbolos podem usar os MPs como sítios para oviposição (MAAß et al., 2017) e, desta maneira, a diminuição na reprodução pode ter ocorrido devido à colocação dos ovos na superfície dos MPs pelos colêmbolos adultos, o que pode ter inviabilizado a eclosão e ocasionado a menor geração de juvenis (ZHU et al., 2018b).

MP também causaram diminuição da reprodução e mortalidade de minhocas *Lumbricus terrestris*, provavelmente devido à abrasão e obstrução do trato digestivo destes organismos causado pela ingestão de MPs, resultando em perdas de assimilação de energia (HUERTA LWANGA et al., 2016). Cao et al. (2017) observaram inibição do crescimento e mortalidade de minhocas *Eisenia foetida*, em concentrações de 1% e 2% de microplástico de poliestireno (MPPS, 58 µm), respectivamente. Inflamações no intestino de minhocas *Eisenia andrei* foram observadas por Rodriguez-Seijo et al. (2017) quando esta espécie foi exposta a uma concentração de 0,0125% de MPPE (tamanho entre 250 e 1000 µm). Os estudos dos efeitos de NPs em organismos do solo são ainda mais incipientes (Tabela 2.2.1), contudo, Zhu et al. (2018a) verificaram redução de peso e alteração na microbiota intestinal em enquitreídeos *Enchytraeus crypticus* alimentados com aveia contendo 10% de nanoplástico de poliestireno (NPPS, 0,05 a 0,1 µm). Barreto et al. (2023) verificaram que NPPS (45 nm) não causaram efeitos tóxicos sobre a sobrevivência, número de juvenis e fuga de colêmbolos *F. candida* até 600 mg kg⁻¹, contudo um aumento significativo da LPO foi observado quando os organismos foram expostos a 0,015 mg kg⁻¹. Além disso, os efeitos de fragmentos plásticos sobre invertebrados do solo ainda são desconhecidos em solos tropicais.

Em virtude de sua ampla distribuição em ecossistemas aquáticos, os plásticos também podem causar efeitos negativos em organismos deste compartimento. Na Tabela 2.2.1, são apresentados estudos que avaliaram os efeitos tóxicos de nanoplásticos sobre diferentes organismos do ecossistema aquático. Em um estudo dos efeitos da exposição de *D. magna* à MPPS, Eltemsah e Bøhn (2019) observaram que a taxa de crescimento de adultos e o tamanho corporal de recém-nascidos diminuíram com o aumento da dose de MPPS (6 µm). Fadare et al. (2019) compararam a toxicidade de MPPS (1.0 – 1.3 µm) e NPPS (0.10 – 0.12 µm) para

neonatos de *D. magna* e observaram que os NPs causaram maior toxicidade. Enquanto a exposição a 10 mg L⁻¹ de NPPS causou mais de 70% de mortalidade em 96 h, concentrações tão altas quanto 400 mg L⁻¹ de MPPS não causaram mortalidade. De maneira semelhante, Besseling et al. (2014) reportaram redução no número e no tamanho de neonatos de *D. magna*, além de um aumento no número de malformações após exposição a 150 mg NPPS L⁻¹ (tamanho aproximado de 70 nm). Efeitos subletais de MPs e NPs também já foram observados em ostras (SUSSARELLU et al., 2016), copépodes (COLE et al., 2015; LEE et al., 2013) e em outras espécies de microcrustáceos tal como *Daphnia pulex* (LIU et al., 2019a, b) e *Daphnia galeata* (CUI; KIM; AN, 2017).

Um fator agravante na dinâmica do plástico no ambiente aquático está relacionado com a incapacidade de diversos organismos separarem as partículas plásticas dos alimentos. Um exemplo são os organismos filtradores – aqueles que se alimentam de partículas suspensas na água, passando-a por uma estrutura filtrante especializada, tal como as *D. magna* – que podem naturalmente ingerir pequenos plásticos em suspensão, e que acabam por se acumular no intestino, tendo em vista que não podem ser digeridos nem decompostos (ELTEMSAH; BØHN, 2019). A acumulação de MPs no interior de *D. magna* já foi observada por Rist, Baun, Hartmann (2017), a qual pode levar a uma série de efeitos prejudiciais como deficiências na assimilação de energia, indução de processos inflamatórios, além de alterações na atividade alimentar (ZOCCHI; SOMMARUGA, 2019). Além dos organismos filtradores, organismos unicelulares, tal como as microalgas e as cianobactérias, também podem ser afetados pelos nanoplásticos pois possuem mecanismos e barreiras limitadas de proteção. Os NPs também podem ser um problema para macrófitas aquáticas, uma vez que podem bloquear os poros das raízes, dificultando a absorção de nutrientes essenciais (ATUGODA et al., 2023).

Além dos efeitos pouco conhecidos dos NPs sobre organismos aquáticos, há de se compreender melhor a sua dinâmica de forma complexa, quando em presença de outros contaminantes, visto que já existem evidências de que ocorrem em mistura com outros poluentes (MALONEY et al., 2018; GARRIDO et al., 2019).

Tabela 2.2.1 - Revisão de estudos avaliando os efeitos tóxicos de nanoplasticos (< 100 nm) para diferentes organismos terrestres e aquáticos.

Organismo	Tipo de teste, duração e endpoint	Tamanho e Faixa de concentrações testadas	Efeitos observados	Referência
<i>Enchytraeus crypticus</i>	Solo - Crônico (7d) – Peso, reprodução e perfil microbiômico	0,025, 0,5, e 10% (tamanho de partículas 50 – 100 nm)	Redução no peso e mudança no perfil microbiômico dos enquitreídeos (10%); aumento da reprodução (0,025%).	Zhu et al. (2018a)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Solo – Agudo (24h) – número de filhotes	0,01 a 100 mg kg ⁻¹ (42 nm)	Reprodução significativamente diminuída em 100 mg kg ⁻¹ .	Kim et al. (2020)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Solo – Crônico (96h) – Crescimento, reprodução (número de ovos no útero, eclodibilidade), acumulação das NPs	1 - 1000 mg kg ⁻¹ (tamanho: 100 nm)	Redução significativa no número de ovos no útero e na eclodibilidade dos ovos a partir de 1 mg kg ⁻¹ ; nenhum efeito no crescimento até 1000 mg kg ⁻¹ .	Huang et al. (2022)
<i>Folsomia candida</i>	Solo – Crônico (28d) – Sobrevivência, número de juvenis, fuga, CAT, GST, LPO e AChE	0,015 e 600 mg kg ⁻¹ (tamanho: 45 nm)	Nenhum efeito sobre a sobrevivência, número de juvenis e fuga até 600 mg kg ⁻¹ ; aumento significativo da LPO em 0,015 mg kg ⁻¹	Barreto et al. (2023)
<i>Daphnia magna</i>	Água – Agudo (48h) e crônico (21d) – imobilidade, sobrevivência, comprimento, número de neonatos, idade da primeira ninhada	31,25 – 500 mg L ⁻¹ (agudo); 1,6 – 26,6 mg L ⁻¹ (crônico) (tamanho: 90,1 nm)	Imobilização (EC50 = 266 [240,4 – 294,4] mg L ⁻¹ ; redução significativa no comprimento e número de neonatos por ninhada em 26.6 mg L ⁻¹ .	Vicentini et al. (2019)
<i>Daphnia magna</i>	Água – Agudo e natação (48h), crônico (21d), multigeracional (63d) – imobilidade, sobrevivência, comportamento de natação, comprimento, número de neonatos, idade da primeira ninhada; ROS	15,6 – 500 mg L ⁻¹ (agudo); 1,65 – 13.24 mg L ⁻¹ (crônico) (tamanho: 72.84 nm)	Imobilização (EC50 = 244 [232,10 – 255,40] mg L ⁻¹ ; redução significativa da distância nadada (183 mg L ⁻¹), número de neonatos por ninhada (13.24 mg L ⁻¹); aumento da geração de ROS (122 mg L ⁻¹).	Nogueira et al. (2022)
<i>Daphnia magna</i>	Água – Crônico (21d) - sobrevivência, comprimento, número de neonatos, número de neonatos malformados	0,22–150 mg L ⁻¹	Nenhum efeito na sobrevivência; 67,7% de neonatos malformados quando expostos a 32 mg L ⁻¹	Besseling et al. (2014)
<i>Scenedesmus obliquus</i>	Água – Crônico (72h) – taxa de crescimento	4,4–1100 mg L ⁻¹	Inibição de 2,5% na maior concentração testada.	

<i>Daphnia magna</i>	Água – Agudo (96h) – imobilização ou mortalidade.	1, 10, 50, 100, 200 e 400 mg L ⁻¹	Sobrevivência significativamente reduzida a partir de 10 mg L ⁻¹	Fadare et al. (2019)
<i>Lemna minor</i>	Água – Crônico (7d) – crescimento, estresse oxidativo	100 e 200 mg L ⁻¹ ¹ (tamanho: 230- 260 nm)	Nenhum efeito na taxa de crescimento em 100 mg L ⁻¹ ; diminuição de 42% na taxa de crescimento em 200 mg L ⁻¹	Arikan et al. (2022)
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Água – Crônico (96h) – taxa de crescimento	50, 250 e 500 mg L ⁻¹ (tamanho: 100 nm)	Inibição de 61.7% na taxa de crescimento quando expostas a 500 mg L ⁻¹	Yan et al. (2021)
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Água – Crônico (96h) – taxa de crescimento, estresse oxidativo	1, 12.5, 25, 50, e 100 mg L ⁻¹ (tamanho: 50- 100 nm)	Redução significativa na densidade algal (taxa de crescimento) a partir de 1 mg L ⁻¹	Zheng et al. (2023)

2.3 MISTURA DE CONTAMINANTES NO MEIO AMBIENTE

Estudos de monitoramento ambiental evidenciam que diferentes tipos de contaminantes vêm sendo encontrados simultaneamente em ecossistemas aquáticos e terrestres (WANG et al., 2015c; MALONEY et al., 2018), indicando que os organismos que vivem nestes compartimentos provavelmente são expostos a uma mistura de contaminantes, ao invés de compostos individuais. Alguns estudos vêm considerando, por exemplo, a co-ocorrência de agrotóxicos (tal como inseticidas, fungicidas e herbicidas) no mesmo ambiente e seus potenciais impactos sobre organismos vivos (HLADIK; KOLPIN; KUIVILA, 2014; SCHREINER et al., 2016; SHAHID; LIESS; KNILLMANN, 2019; CHEN et al., 2014; SANTOS; SOARES; LOUREIRO, 2010). Além disso, os agrotóxicos podem estar misturados com outros tipos de poluentes, tal como adjuvantes (DE SANTO et al., 2018, 2019), antibióticos (QIN et al., 2018), metais potencialmente tóxicos (UWIZEYIMANA et al., 2017; CHEN et al., 2015; WANG et al., 2015c; YU et al., 2019) e, inclusive, com fragmentos plásticos (GARRIDO et al., 2019; YANG et al., 2019).

Até o momento, a maioria dos estudos envolvendo a ocorrência e o destino dos plásticos no ambiente vem monitorando estes compostos de maneira isolada, sem considerar a existência de outras substâncias em conjunto (XU et al., 2019; COLE et al., 2011). Entretanto, são conhecidos os efeitos combinados de plásticos e metais sobre organismos aquáticos e terrestres (BANAEI et al., 2019; BELLINGERI et al., 2019; KIM; CHAE; AN, 2017; LEE et

al., 2019; LU et al., 2018; WANG et al., 2019), e há indícios de que MPs/NPs e inseticidas neonicotinoides podem estar presentes simultaneamente em solos agrícolas (GUO et al., 2020).

A co-ocorrência de plásticos e inseticidas no solo é esperada principalmente em áreas que recebam pulverizações de pesticidas ou contenham sementes revestidas com estas substâncias, e nas quais ocorre também a entrada de fragmentos plásticos, tal como áreas que utilizam práticas de cobertura do solo com películas ou filmes plásticos, em que alguns resíduos permanecem no solo mesmo após a colheita. Além do mais, em diversos países, a aplicação de biossólidos e de efluentes do tratamento de águas residuárias em solos agrícolas é uma prática comum, porém, ambos podem conter MPs ou NPs que acabam por ser introduzidos no solo (HUERTA LWANGA et al., 2016).

Como foi visto, os plásticos são muito persistentes, podendo permanecer no solo anos após a sua entrada. Desta maneira, em áreas agrícolas onde coberturas e revestimentos plásticos do solo foram utilizadas anteriormente ao cultivo convencional envolvendo aplicação de agrotóxicos, também apresentam potencial para coexistência de plásticos e inseticidas (CHENG et al., 2020). Existem ainda novas tecnologias nas quais os plásticos estão sendo adicionados como nano-revestidores das sementes, juntamente com fertilizantes e pesticidas (BOSKER et al., 2019).

Os plásticos também podem atuar como adsorventes de substâncias orgânicas e inorgânicas, incluindo uma série de compostos potencialmente tóxicos, tal como os pesticidas. Guo et al. (2020), por exemplo, detectaram três inseticidas neonicotinoides (acetamiprido, tiacloprido e tiametoxam) em amostras de resíduos de filmes plásticos em 20 solos agrícolas da China. Plásticos podem representar focos de altas concentrações de pesticidas. Compostos orgânicos aderidos a partículas plásticas podem ser transportados através do solo e também para outros compartimentos ambientais (XU et al., 2019). A presença de MPs no solo pode aumentar a mobilidade e a biodisponibilidade de contaminantes orgânicos, por reduzir a capacidade de sorção destes componentes pelos solos naturais (HÜFFER et al., 2019).

Misturas de plásticos e inseticidas neonicotinoides também podem estar ocorrendo em ecossistemas aquáticos. O potencial de coexistência destes compostos em compartimentos aquáticos se deve a algumas características em especial, tal como: (1) a solubilidade e mobilidade relativamente alta dos neonicotinoides, o que aumenta a chance destes inseticidas atingirem corpos hídricos, além de sua ampla aplicação em solos agrícolas e elevada persistência; e (2) a quantidade expressiva de detritos plásticos que entram em ambientes aquáticos, tanto em macro quanto em microescala, aliada à sua lenta degradação e ao potencial

para acúmulo nestes ambientes. Alguns estudos já identificaram pesticidas aderidos à MPs em águas doces e marinhas, embora a maioria destes tenha estudado pesticidas organoclorados e não consideraram outras classes de pesticidas (TEUTEN et al., 2007; BARNES et al., 2009; HIRAI et al., 2011). A Tabela 2.3.1 apresenta uma revisão dos estudos de ecotoxicidade de misturas de microplásticos e inseticidas neonicotinoides.

Embora incipientes, alguns estudos vêm buscando elucidar os efeitos toxicológicos de associações de plásticos com pesticidas (YANG et al., 2019; GARRIDO et al., 2019; ZOCCHI; SOMMARUGA, 2019). Yang et al. (2019) investigaram o transporte do herbicida glifosato e do ácido aminometilfosfônico (AMPA) pelas minhocas, na presença de diferentes concentrações de MPPE. Embora a combinação de glifosato e MPPE tenha causado efeito negativo sobre a geração de galerias pelas minhocas, a contribuição dos microplásticos no transporte do glifosato não pôde ser completamente elucidada no estudo. Zocchi e Sommaruga (2019) observaram que a toxicidade de uma formulação comercial de glifosato (Roundup Gran) para *D. magna* aumentou quando combinada com microesferas de polietileno (PE) e fibras de tereftalato de polietileno / poliamida (PET / PA). Segundo os autores, a aplicação dos MPs pode ter aumentado a biodisponibilidade de glifosato para *D. magna*, mas o mecanismo pelo qual isso pode ter ocorrido não foi esclarecido. Horton et al. (2018) constataram que a toxicidade aguda de dois inseticidas (dimetoato e deltametrina) para *D. magna* não foi afetada pela presença de MPPS. Por outro lado, Garrido et al. (2019) observaram que a toxicidade do inseticida organofosforado clorpirifós para microalgas *Isochrysis galbana* diminuiu na presença de MPPE. A redução na toxicidade foi atribuída à alta sorção do clorpirifós na superfície dos microplásticos, o que diminuiu a quantidade de inseticida biodisponível para as microalgas. Nogueira et al. (2022) verificaram que a mistura de NPPS e glifosato induziram um aumento na imobilização e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em *D. magna*. Os autores também observaram que houve um aumento da toxicidade dos componentes individuais quando eles estiverem presentes em mistura, indicando um sinergismo entre os contaminantes, especialmente quando presentes em maiores proporções.

Além dos efeitos que os compostos em misturas podem causar diretamente sobre a população de organismos expostos, há de se considerar ainda os efeitos que poderão surgir ao longo das gerações. Até o momento, a grande maioria dos estudos de mistura vêm focando nos efeitos imediatos, sem considerar que os agrotóxicos e nanoplásticos podem induzir efeitos genotóxicos, o que poderia acarretar em problemas de formação nas gerações subsequentes.

Neste contexto, os microcrustáceos *D. magna* são modelos toxicológicos promissores para o estudo de efeitos tóxicos em escala multigeracional, pois já possuem sua biologia bem conhecida e uma elevada capacidade de reprodução, permitindo a obtenção de filhotes para ensaios subsequentes de maneira relativamente fácil (DA SILVA et al., 2021). Assim, embora já exista um número considerável de estudos multigeracionais com *D. magna*, os efeitos tóxicos de misturas ainda são relativamente pouco estudados a nível multigeracional (NOGUEIRA et al., 2022).

Desta maneira, verifica-se que, embora os efeitos individuais e em mistura de pesticidas e de plásticos já venham sendo estudados sobre organismos aquáticos e edáficos, parece existir uma grande complexidade nas interações entre as moléculas orgânicas, não sendo possível assumir uma conclusão generalista para o assunto. Fica evidente que ainda existem muitas questões a respeito dos seus potenciais impactos a serem elucidadas, e faz-se necessário um número maior de estudos sob perspectiva de abordagem mais aprofundada para que se possa avançar no conhecimento deste tópico.

Tabela 2.3.1 - Revisão dos estudos ecotoxicológicos avaliando os efeitos de microplásticos em combinação com neonicotinoides, sobre organismos aquáticos.

Organismo	Tipo de teste, duração e endpoint	Misturas	Efeitos observados	Referência
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Água – Agudo (genotoxicidade – 24h), subcrônico (toxicidade reprodutiva – 7d)	Microplásticos de poliestireno (MP-PS) + imidacloprid (IMI)	Antagonismo observado no teste de genotoxicidade; efeito aditivo nos testes de reprodução (número de filhotes gerados)	Nugnes et al. (2022)
<i>Dario rerio</i>	Água – Subcrônico – frequência cardíaca, locomoção, atividade de enzimas antioxidantes e expressão de genes das larvas	Microplásticos de poliestireno envelhecidos (MP-PS) + tiametoxam (TMX)	A combinação de 1 µg L ⁻¹ MP-PS + 1.5 µg L ⁻¹ TMX causou efeitos tóxicos sinérgicos na velocidade de locomoção, atividade de enzimas e expressão de genes.	Sun et al. (2024)
<i>Dario rerio</i>	Água – Crônico (21d) – Crescimento, indicadores bioquímicos de estresse oxidativo e metabolismo glicolipídico	Microplásticos de poliestireno (MP-PS) + imidacloprid (IMI)	A combinação de 100 µg L ⁻¹ de IMI com 20 µg L ⁻¹ de MP-PS não causou efeito sobre o comprimento e peso corporal, mas aumentou a oxidação lipídica e a atividade da catalase no fígado dos peixes.	Luo et al. (2021)
<i>Chironomus riparius</i>	Água, sedimento – Crônico (28d) – número de filhotes emergidos	Microplásticos de cloreto de polivinila (PVC) + imidacloprid (IMI)	Interação significativa 2 mg L ⁻¹ IMI + 20% MP-PVC resultaram em uma redução de peso dos organismos entre 32 e 38%.	Scherer et al. (2020)

3 METODOLOGIA

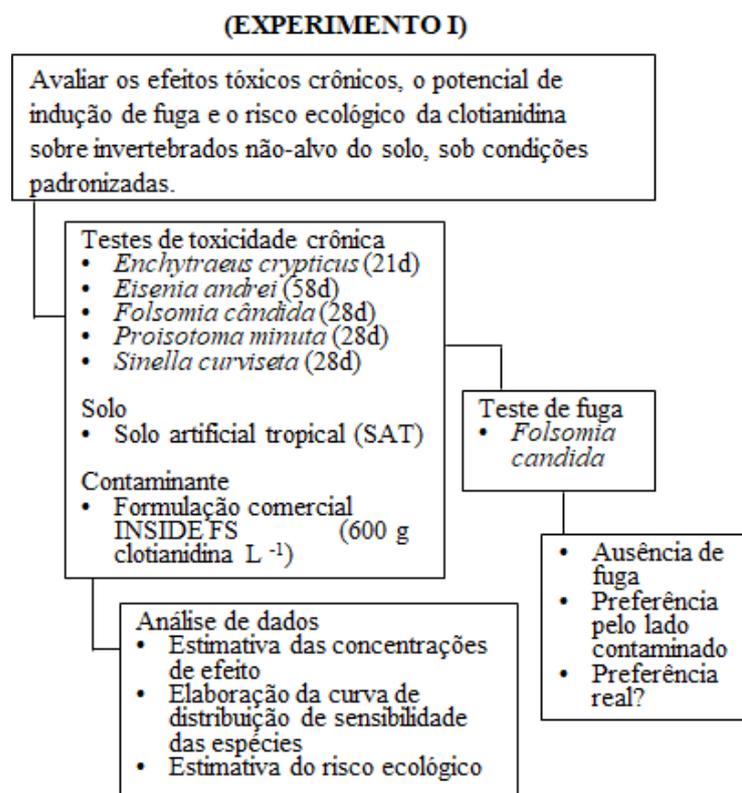
Para testar as hipóteses levantadas nesta tese, foram planejadas quatro etapas experimentais distintas, cada qual designada para atingir a um ou mais objetivos específicos apresentados na seção 1.5. O experimento I foi realizado com o intuito de caracterizar os efeitos tóxicos crônicos, o potencial de fuga e o risco ecológico da clotianidina (CLO) sobre invertebrados não-alvo do solo, sob condições padronizadas (objetivo 1); o experimento II foi realizado com o intuito de avaliar o efeito da clotianidina sobre a resposta de fuga e a locomoção de colêmbolos *Folsomia candida* (objetivo 2); o experimento III visou comparar os efeitos tóxicos crônicos da CLO e do nanoplástico de poliestireno (NPPS) sobre os invertebrados do solo com aqueles causados pela mistura de ambos (NPPS-CLO) (objetivo 3); já o experimento IV foi realizado com o intuito de avaliar os efeitos tóxicos da CLO e do NPPS, isoladamente e em mistura, sobre quatro organismos aquáticos (objetivos 4 e 5). Os experimentos III e IV permitirão, também, caracterizar as possíveis interações entre os poluentes (objetivo 6) e identificar concentrações seguras de exposição para as espécies (objetivo 7).

3.1 EXPERIMENTO I

Este experimento consistiu em uma caracterização ecotoxicológica dos efeitos crônicos, do potencial de fuga e do risco ecológico da CLO sobre invertebrados não-alvo da fauna do solo. Para isso, testes de toxicidade crônica com cinco espécies (nomeadamente, minhocas *Eisenia andrei*, enquitreídeos *Enchytraeus crypticus* e colêmbolos *F. candida*, *Sinella curviseta* e *Proisotoma minuta*) foram realizados sob condições padronizadas, de acordo com as diretrizes das normas ISOs 11268-2, 16387, e 11267, respectivamente (ISO, 2004; 2012; 2014), em um solo artificial tropical (SAT), substrato padrão recomendado para testes ecotoxicológicos em regiões de clima tropical, preparado em laboratório e composto por 75% de areia fina, 20% de caulim e 5% de pó de casca de coco. Também foi realizado um ensaio de fuga com colêmbolos *F. candida* para verificar se a CLO causa repelência dos organismos expostos. A fórmula comercial para tratamento de sementes INSIDE FS (600 g de clotianidina L⁻¹) foi em todos os experimentos desta tese, da qual preparou-se uma solução estoque (10 mg mL⁻¹) para a contaminação das amostras de solo. Os dados de toxicidade obtidos nos testes de toxicidade crônica foram utilizados para a geração de uma curva de distribuição

de sensibilidade das espécies (DSE), empregada para avaliar o risco ecológico deste composto. O fluxograma das etapas e ações deste experimento é apresentado na Figura 3.1.1. Uma descrição detalhada dos procedimentos adotados nos testes ecotoxicológicos terrestres é apresentada na seção 3.6.

Figura 3.1.1 - Representação esquemática das etapas e ações relativas ao experimento I.



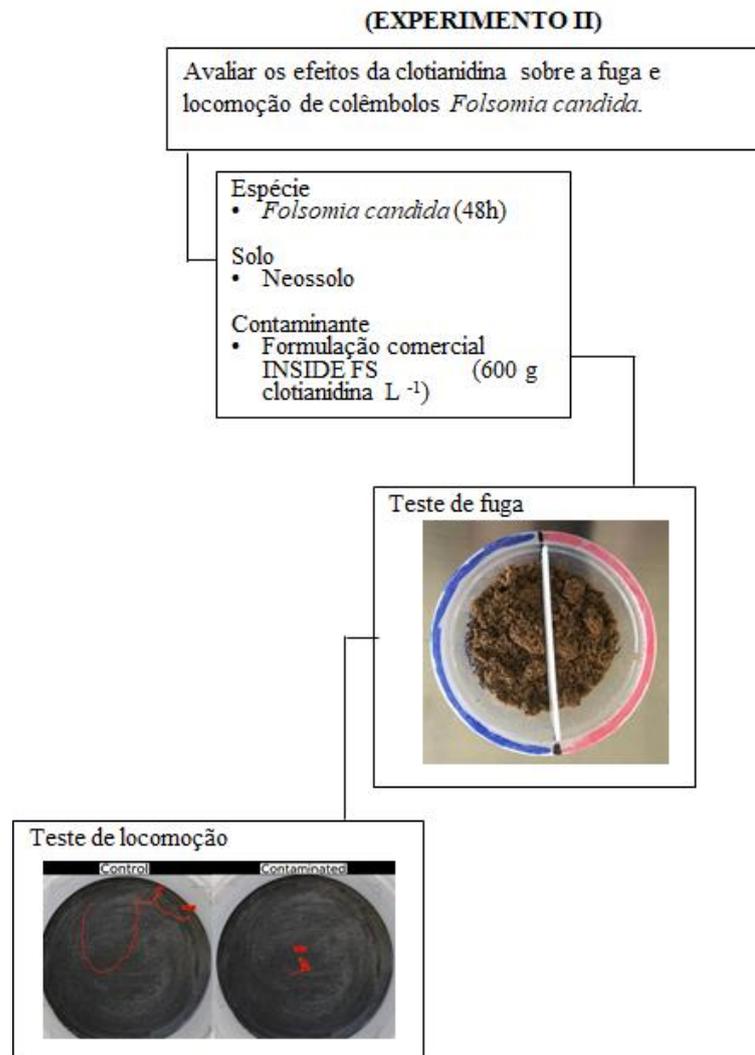
Fonte: elaborado pelo autor (2022).

3.2 EXPERIMENTO II

Este experimento foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito da clotianidina sobre a resposta de fuga e a locomoção de colêmbolos *F. candida* (objetivo 2) e, com isso, testar a hipótese 1. Testes de fuga foram realizados seguindo as diretrizes da ISO 17512-2 (2011) com um solo natural arenoso (Neossolo), coletado na cidade de Araranguá (29° 00' S 49° 31' W). Foram testadas cinco concentrações da clotianidina, para avaliar se a presença da CLO no solo causava fuga dos colêmbolos. Os indivíduos que foram encontrados no lado contaminado foram coletados e seus movimentos foram gravados durante um minuto, com o intuito de verificar se a exposição à CLO causava inibição da capacidade de locomoção. A distância total percorrida pelos colêmbolos foi utilizada como parâmetro de medição. Os procedimentos dos testes de

fuga e de locomoção estão detalhados na seção 3.6.4. Uma representação das etapas e ações relativas ao experimento II é apresentada na Figura 3.2.1.

Figura 3.2.1 - Representação esquemática das etapas e ações relativas ao experimento II.



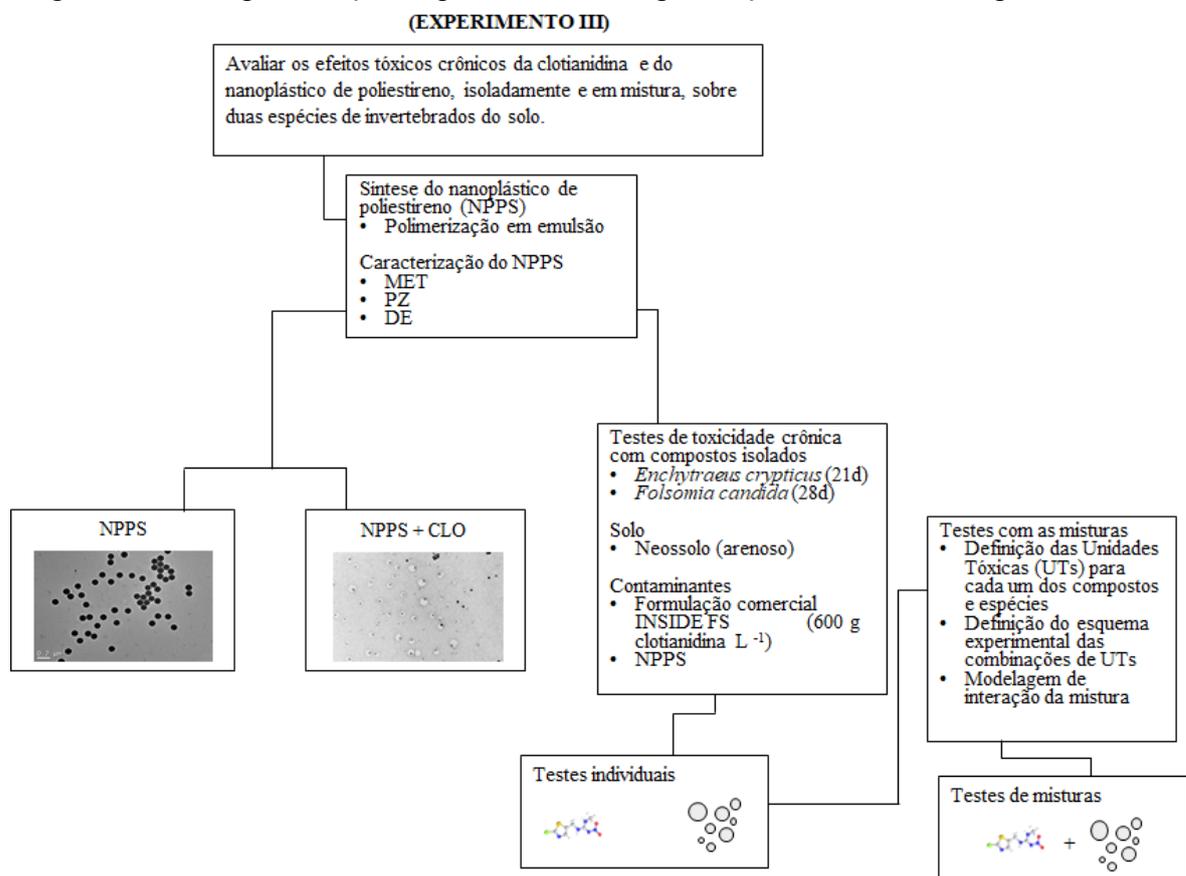
Fonte: elaborado pelo autor (2024).

3.3 EXPERIMENTO III

Este experimento foi realizado com o objetivo de comparar os efeitos tóxicos crônicos da CLO e do NPPS sobre invertebrados do solo (colêmbolos *F. candida* e enquitreídeos *E. crypticus*) com aqueles induzidos pelas suas misturas (NPPS-CLO), e com isso, atender aos objetivos 3, 6 e 7 da tese, bem como testar a hipótese 1. Para isso, testes de toxicidade crônica com ambas as espécies foram realizados seguindo as diretrizes ISOs 16387 e 11267 (ISSO,

2004; 2014) com os compostos isolados e em mistura, em um solo natural arenoso (Neossolo). Os valores de CE_{50} estimados com base nos testes com os compostos individuais (NPPS e CLO, separadamente) foram utilizados para definir as concentrações usadas nos testes com a mistura binária (NPPS + CLO). As concentrações foram convertidas em unidades tóxicas (UT), sendo que 1 UT equivale ao valor de CE_{50} . Na Figura 3.3.1, é apresentado o fluxograma das etapas e ações do experimento III. Uma descrição detalhada dos procedimentos adotados para a síntese e caracterização do NPPS utilizado nos ensaios, bem como dos testes ecotoxicológicos terrestres é apresentada nas seções 3.5 e 3.6, respectivamente.

Figura 3.3.1 - Representação esquemática das etapas e ações relativas ao experimento III.



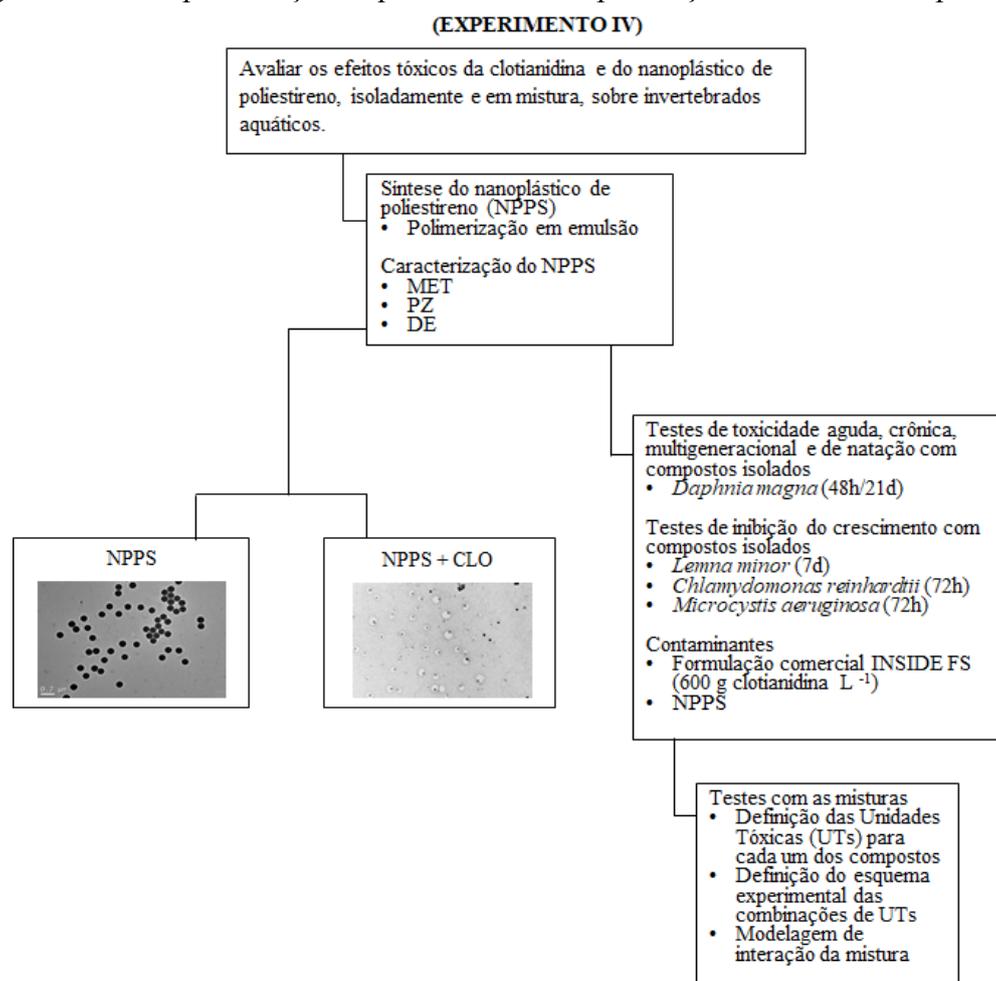
Fonte: elaborado pelo autor (2024).

3.4 EXPERIMENTO IV

Este experimento foi realizado com o intuito de avaliar os efeitos tóxicos da CLO e do NPPS, isoladamente e em mistura, sobre quatro espécies de organismos aquáticos (microcrustáceos *Daphnia magna*, macrófitas *Lemna minor*, microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* e cianobactérias *Microcystis aeruginosa*), e com isso, atender aos objetivos 4 – 7 e

testar a hipótese 2 da tese. Testes de toxicidade aguda, crônica, multigeneracional, de natação (*D. magna*) e de crescimento (demais espécies) foram realizados com os compostos isolados e em combinação (mistura), seguindo as diretrizes das normas internacionais de padronização dos ensaios de toxicidade na esfera aquática (ABNT, 2016; ISO, 2000, 2012; OECD, 2002, 2004, 2011). Sempre que possível, os valores de CE_{50} estimados com base nos testes com os compostos individuais (NPPS e CLO, separadamente), foram utilizados para definir as concentrações usadas nos testes com a mistura binária (NPPS + CLO), que foram baseadas no princípio das Uts (NOGUEIRA et al., 2022). O fluxograma das etapas e ações do experimento IV é apresentado na Figura 3.4.1. Uma descrição detalhada dos procedimentos adotados para a síntese e caracterização do NPPS utilizado nos ensaios, bem como dos testes ecotoxicológicos aquáticos, é apresentada nas seções 3.5 e 3.7, respectivamente.

Figura 3.4.1 - Representação esquemática das etapas e ações relativas ao experimento IV.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

3.5 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO NANOPLÁSTICO DE POLIESTIRENO (NPPS)

3.5.1 Materiais da síntese

Os reagentes utilizados na síntese do NPPS foram o monômero de estireno (pureza > 99%; peso molecular 104,15 g mol⁻¹; obtido de Sigma Aldrich), persulfato de potássio (K₂S₂O₈; pureza > 99%; peso molecular 270,32 g mol⁻¹; obtido de Neon Reagentes Analíticos Ltda.), nanopartículas de Al₂O₃ (pureza > 99%; peso molecular 101,96 g mol⁻¹, tamanho médio 13 nm; obtido de Sigma Aldrich), dodecil sulfato de sódio (SDS; pureza > 95%; peso molecular 288,32 g mol⁻¹; obtido de Neon Reagentes Analíticos Ltda) e água de osmose reversa (OR) com condutividade de 0,1 μS cm⁻¹.

3.5.2 Síntese do NPPS

O NPPS foi sintetizado por polimerização em emulsão convencional do monômero de estireno na superfície de um óxido inorgânico (neste caso, o Al₂O₃). O procedimento foi baseado na metodologia apresentada em Lu, Qu, Forcada (2009), com as adaptações adotadas por Vicentini et al. (2019). A síntese foi conduzida com o monômero de estireno (68 mmol), nanopartículas de Al₂O₃ (0,69 mmol) de 13 nm, SDS (0,49 mmol) utilizado como surfactante, e K₂S₂O₈ (1,5 mmol) usado como iniciador da reação, que foram diluídos em um volume total de 100 mL de água ultrapura. A reação de polimerização foi conduzida sob constante agitação e aquecimento, em um balão volumétrico imerso em banho-maria de óleo mantido a 70 ± 4 °C e com duração de 24 horas. O volume final obtido através da síntese foi de 100 mL, com concentração de 70 g NPPS L⁻¹. Na Figura 3.5.1, é apresentada a estrutura utilizada para a síntese do NPPS (síntese em andamento).

Figura 3.5.1 - Estrutura utilizada para a síntese do nanoplastico de poliestireno (NPPS).



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

3.5.3 Caracterização do NPPS

A caracterização do NPPS foi feita no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. Para a caracterização do NPPS, 100 μL de uma solução de NPPS diluída em água de OR (50 mg L^{-1}) foram adicionadas sobre um *grid* de carbono, e a amostra foi visualizada em um microscópio de transmissão eletrônica (MET; JEOL; JEM 1011, 80 kV) para verificação do tamanho e morfologia das partículas. O diâmetro médio das partículas foi determinado através da análise das imagens obtidas no MET, por meio do software ImageJ. Além disso, foram analisados ainda a estabilidade das partículas em suspensão baseado no potencial zeta (PZ) e o diâmetro efetivo (DE), o qual foi determinado por espalhamento dinâmico de luz (*dynamic light scattering*, DLS) no aparelho Nanobrook 90Plus.

3.6 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS COM ORGANISMOS TERRESTRES

Os testes ecotoxicológicos crônicos e de locomoção com organismos terrestres foram realizados no Laboratório de Botânica, Ecologia e Entomologia da Universidade Federal da

Fronteira Sul (UFFS), em Chapecó, Santa Catarina, sob supervisão do professor Paulo Roger Lopes Alves.

3.6.1 Coleta, preparo e contaminação das amostras de solo

Para a realização dos testes com invertebrados do solo do experimento I, foi utilizado um solo artificial tropical (SAT), composto por 75% de areia fina, 20% de caulim e 5% de pó de casca de coco, adaptado de GARCIA (2004). Já no experimento II, um solo natural arenoso (Neossolo) foi utilizado. Este solo foi coletado da camada superficial do perfil (0-20 cm), em local sem histórico de contaminação por pesticidas, em Araranguá (SC) (29° 00' S, 49° 31' O). O solo natural foi peneirado (# 2 mm) e submetido a três ciclos de congelamento e descongelamento para eliminar os organismos da fauna pré-existent, conforme descrito em Alves et al. (2013). Este solo vem sendo utilizado com sucesso em ensaios ecotoxicológicos realizados pelo grupo de estudos (BANDEIRA et al., 2020a, b; HENNIG et al., 2020), e suas características físicas e químicas, determinadas conforme a ISO 11268-2 (2012a) (pH, capacidade de retenção de água do solo [CRA]) e Tedesco et al. (1995) (demais parâmetros), estão apresentadas na Tabela 3.6.1.

Tabela 3.6.1 - Características físicas e químicas (n = 2) do solo artificial tropical (SAT) e Neossolo, usados nos testes ecotoxicológicos deste estudo.

Parâmetro	SAT	Neossolo
pH (1 M KCl)	5,7 ± 0,3	4,3 ± 0,1
MO (%)	1,4 ± 0,0	2,0 ± 0,0
CTC (cmolc dm ⁻³)	3,3 ± 0,2	6,9 ± 0,8
Argila (%)	14,3 ± 0,0	8,0 ± 1,4
Silte (%)	18,5 ± 0,0	1,7 ± 1,4
Areia (%)	67,2 ± 0,0	90,3 ± 2,8
CRA (%)	42,3 ± 3,1	31,6 ± 1,1

MO: matéria orgânica; CTC: capacidade de troca de cátions; CRA: capacidade máxima de retenção de água do solo.

Uma formulação comercial de CLO para uso no tratamento de sementes (INSIDE FS®, Sumitomo Chemical, 600 g i.a. L⁻¹) foi utilizada nos testes ecotoxicológicos de todos os experimentos. Além disso, NPPS sintetizados por polimerização em emulsão (VICENTINI et al., 2019; LU; QU; FORCADA, 2009) foram também utilizados nos testes.

Para a contaminação das amostras de solo, alíquotas pré-calculadas das soluções estoque (CLO: 0,2 mg mL⁻¹; NPPS: 70 mg mL⁻¹) foram utilizadas para o preparo das soluções

de contaminação, as quais foram preparadas com água destilada e posteriormente foram homogeneamente aplicadas nas amostras de solo. Para o preparo das soluções contaminadas com as misturas, inicialmente coletou-se uma alíquota da solução estoque de CLO, e em seguida, da solução estoque de NPPS (após 1 min de agitação por inversão manual), as quais foram inseridas em balões volumétricos que foram posteriormente completados com água destilada, para subsequente aplicação nas amostras de solo. A homogeneização do solo contendo as soluções aplicadas foi feita em sacos plásticos. O volume das soluções contaminadas (ou apenas água destilada, no caso dos tratamentos controle) foi previamente definido para que se atingissem valores próximos a 60% da capacidade de retenção de água (CRA) máxima do solo. A Figura 3.6.1 ilustra as etapas de contaminação dos diferentes solos utilizados no estudo. As concentrações utilizadas nos testes estão apresentadas na Tabela 3.6.2.

Figura 3.6.1 - Esquema demonstrativo dos procedimentos experimentais para os ensaios ecotoxicológicos terrestres. A) representa a imagem do Neossolo, e B) do Solo artificial tropical [SAT], utilizados nos ensaios. Imagem C) ilustra o processo de preparo das soluções contaminadas com volumes pré-calculados, e D) o procedimento de aplicação da solução contaminada nas amostras de solo.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Tabela 3.6.2 - Concentrações de CLO, NPPS, e NPPS + CLO utilizadas nos testes ecotoxicológicos com as espécies do solo, em cada um dos experimentos da tese.

Organismo	Experimento I CLO mg kg ⁻¹	Experimento II CLO mg kg ⁻¹	NPPS mg kg ⁻¹	Experimento III CLO mg kg ⁻¹	NPPS + CLO mg kg ⁻¹
<i>Folsomia candida</i>	0,08, 0,12, 0,18, 0,27, 0,40, 0,60 (teste crônico) 0,017, 0,026, 0,040, 0,060, 0,090 (teste de fuga preliminar)	1, 2, 4, 8, 16	25, 50, 100, 200, 400 (teste preliminar) 18,75, 37,5, 56,25, 75, 112,5, 150 (teste definitivo)	0,03, 0,06, 0,09, 0,20, 0,30 (teste preliminar) 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,07, 0,09 (teste definitivo)	18,75 + 0,01, 37,5 + 0,02, 56,25 + 0,03, 75 + 0,04, 112,5 + 0,07, 150 + 0,09
<i>Enchytraeus crypticus</i>	2,5, 5, 10, 20, 40, 80		200, 300, 400, 500, 600 (teste preliminar) 64, 128, 192, 256, 384, 512 (teste definitivo)	1,25, 2,5, 5, 10, 20 (teste preliminar) 0,67, 1,33, 2, 2,67, 4, 5,34 (teste definitivo)	64 + 0,67, 128 + 1,33, 192 + 2, 256 + 2,67, 384 + 4, 512 + 5,34
<i>Eisenia andrei</i>	1,5, 2,4, 3,8, 6,1, 9,8, 15,7				
<i>Sinella curviseta</i>	0,08, 0,12, 0,18, 0,27, 0,40, 0,60				
<i>Proisotoma minuta</i>	0,08, 0,12, 0,18, 0,27, 0,40, 0,60				

3.6.2 Testes com minhocas *Eisenia andrei*

3.6.2.1 Cultivo de *E. andrei*

A espécie *E. andrei* (Oligoqueta) foi criada e mantida em laboratório, em caixas plásticas contendo uma mistura de esterco de cavalo, fibra de coco e areia fina na proporção de 2:1:0,3. Cada kg de meio de cultura foi umedecido com 2,5 L de água destilada. As caixas foram mantidas em uma sala com temperatura controlada de 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h, de acordo com as recomendações do método (ISO, 2012a). Semanalmente, os organismos foram alimentados com flocos de aveia cozida, e duas vezes por semana, a umidade do meio de cultura foi corrigida com água destilada.

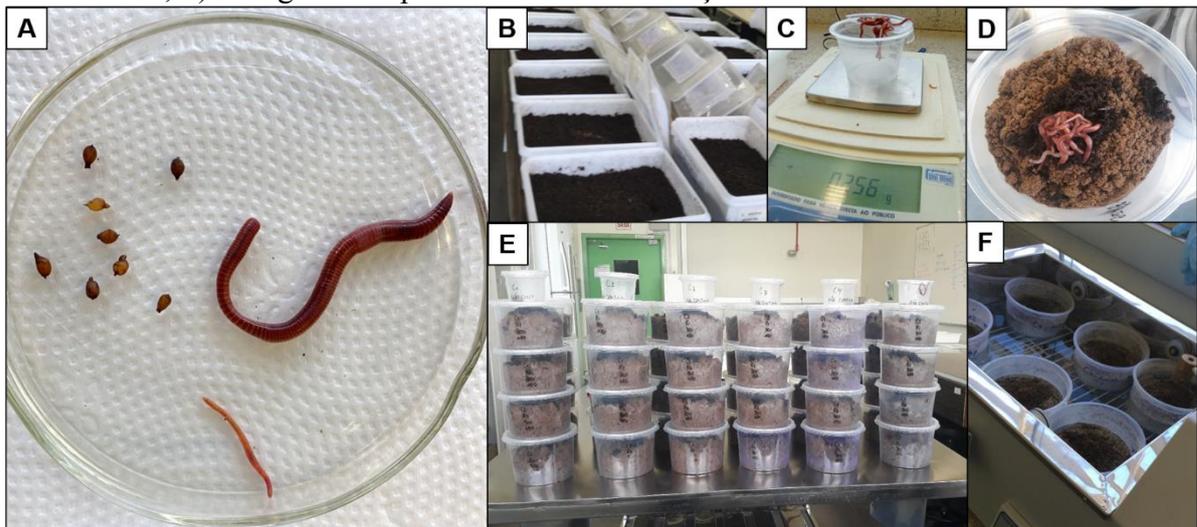
3.6.2.2 Teste de toxicidade crônica com *E. andrei*

Os testes de toxicidade crônica com esta espécie foram realizados com base na ISO 11268-2 (ISO, 2012a), em sala com temperatura controlada de 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h. Dez minhocas adultas (com clitelo aparente), pesando entre 250 e 600 mg, e com idade entre dois e doze meses, foram aleatoriamente selecionadas e inseridas em recipientes plásticos

cilíndricos contendo aproximadamente 600 g de solo úmido contaminado. Para todos os testes, foi realizado um tratamento controle, onde o solo recebeu apenas água destilada. Foram avaliadas seis concentrações do contaminante, com quatro repetições para cada tratamento contaminado e seis para o controle (Tabela 3.6.2). Os indivíduos foram alimentados no início do teste e a cada 7 dias com esterco de cavalo úmido. A umidade do solo de cada réplica foi ajustada semanalmente com base na perda de peso.

Após 28 dias do início do teste, as minhocas sobreviventes foram manualmente removidas, lavadas e pesadas, e a mortalidade e a perda de peso foram determinadas. Após a remoção das minhocas adultas, o solo, os eventuais juvenis gerados e os casulos permaneceram incubados nos recipientes por mais 28 dias. Ao final dos 56 dias de ensaio, os recipientes plásticos foram inseridos em um banho maria ($60 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$) durante 1 hora, para forçar a subida dos juvenis até a superfície, onde foram contabilizados (ALVES et al., 2013). A Figura 3.6.2 apresenta as etapas do teste de toxicidade com minhocas.

Figura 3.6.2 - Esquema representativo das principais etapas necessárias para a realização de um teste de toxicidade com minhocas: A) fotografia contendo um indivíduo adulto e um juvenil, bem como os casulos da espécie *E. andrei*; B) caixas plásticas contendo substrato de criação de *E. andrei*; C) exemplo de como é realizada a pesagem individual das minhocas; D) fotografia imediatamente após a inserção dos organismos nas unidades experimentais; E) fotografia do conjunto de unidades experimentais do teste de toxicidade crônica com *E. andrei*; F) fotografia do procedimento de avaliação dos ensaios em banho maria.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

3.6.3 Testes com enquitreideos *Enchytraeus crypticus*

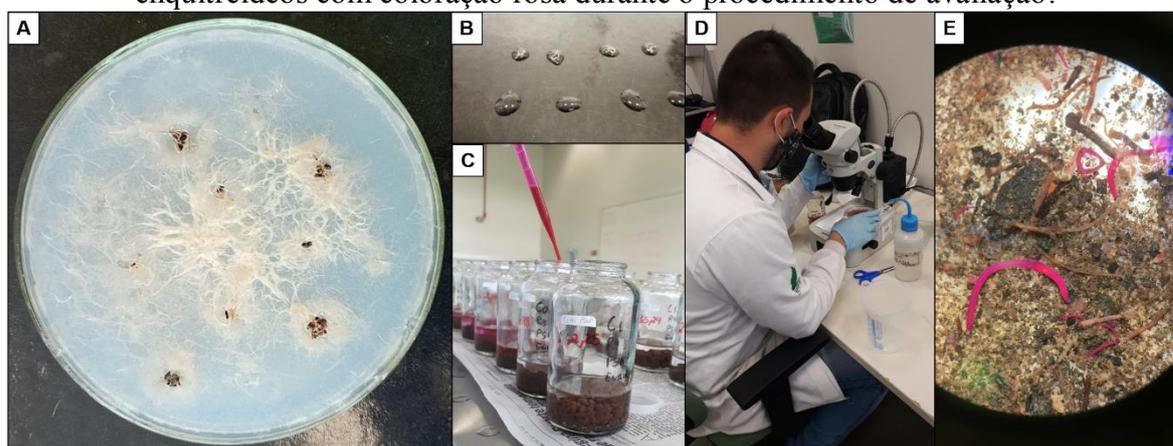
3.6.3.1 Cultivo de *E. crypticus*

Os enquitreideos *E. crypticus* foram mantidos em laboratório, em placas de Petri contendo um meio composto por ágar e uma mistura de 4 soluções de sais (2 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1 mM MgSO_4 , 0,08 mM KCl e 0,75 mM NaHCO_3), conforme a ISO 16387 (ISO, 2004). Os organismos foram alimentados duas vezes por semana com aveia finamente moída e esterilizada. A cultura da espécie foi mantida em uma sala climatizada (20 ± 2 °C) e fotoperíodo de 12 h.

3.6.3.2 Teste de toxicidade crônica com *E. crypticus*

Os ensaios de toxicidade crônica com enquitreideos *E. crypticus* foram realizados de acordo com as diretrizes da ISO 16387 (ISO, 2004), em sala com temperatura controlada de 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h. Dez indivíduos com clitelo visível e comprimento similar foram inseridos em recipiente cilíndricos de vidro do tipo *snap cap* (200 mL) contendo 30 g de solo úmido contaminado ou solo controle (que recebeu apenas água destilada). Semanalmente, cerca de 15 mg de flocos de aveia finamente moída foram ofertados como alimento em cada réplica. Foram preparadas quatro réplicas para os tratamentos contaminados e seis réplicas para o tratamento controle. As concentrações utilizadas nos ensaios com enquitreideos estão apresentadas na Tabela 3.6.2. Após 21 dias de exposição, os enquitreideos foram fixados em etanol (70%) e corados com rosa Bengala (1% em etanol) durante 48 horas. Em seguida, o solo foi lavado através de uma peneira (0,25 mm) com água, e os enquitreideos (adultos e juvenis gerados) foram transferidos a uma placa de Petri, e o número total de enquitreideos foi contabilizado com auxílio de um microscópio estereoscópico. As etapas do teste com *E. crypticus* estão apresentadas na Figura 3.6.3.

Figura 3.6.3 - Esquema representativo com fotografias das principais etapas necessárias para a realização de um teste de toxicidade com enquitreídeos: A) Meio de criação contendo enquitreídeos *E. crypticus*; B) procedimento para a separação de indivíduos adultos em água para posterior inserção nas unidades do teste; C) procedimento de adição do corante rosa bengala para coloração dos juvenis gerados no teste; D) procedimento de contagem dos indivíduos gerados no teste em microscópio estereoscópio; (E) imagem ampliada dos enquitreídeos com coloração rosa durante o procedimento de avaliação.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

3.6.4 Testes com colêmbolos

3.6.4.1 Cultivo de colêmbolos

A espécie de colêmbolos recomendada como um padrão para ensaios ecotoxicológicos *F. candida* e as espécies consideradas com alternativas *S. curviseta* e *P. minuta* foram criadas e mantidas em um substrato contendo carvão ativado em pó, gesso em pó e água destilada, na proporção de 1:10:6. As culturas foram mantidas em um ambiente com temperatura controlada de 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h, de acordo com as recomendações da ISO 11267 (ISO, 2014). Duas vezes por semana, os organismos foram alimentados com levedura granulada e a umidade do meio de cultura foi corrigida com água destilada.

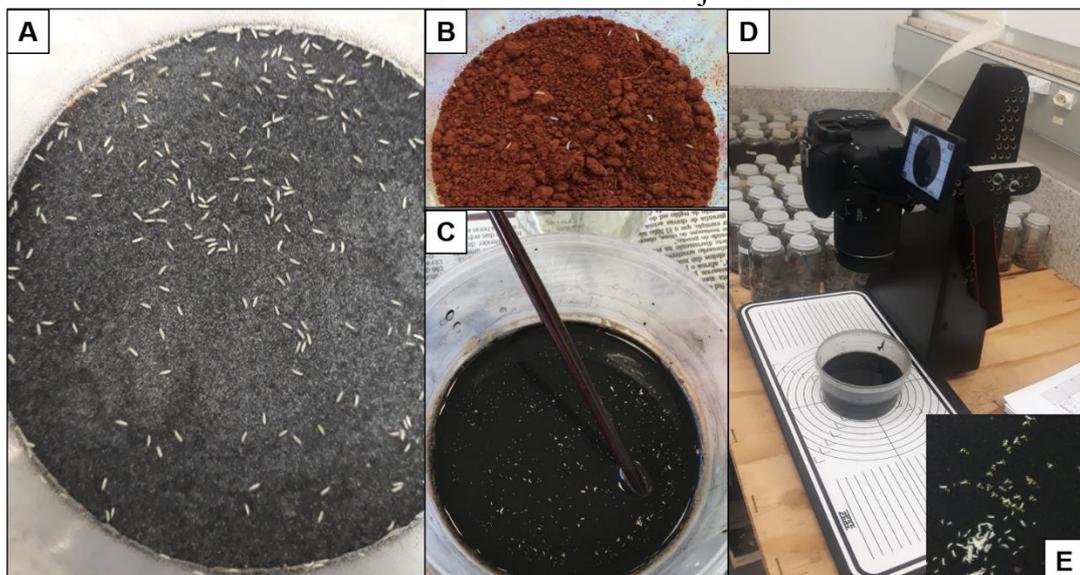
3.6.4.2 Teste de toxicidade com colêmbolos das espécies *Folsomia candida*, *Sinella curviseta* e *Proisotoma minuta*

Os testes de toxicidade crônica com as três espécies foram realizados de acordo com as recomendações da ISO 11267 (ISO, 2014), em sala com temperatura controlada de 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 h. Inicialmente, dez organismos (para *F. candida* e *P. minuta*) ou vinte

organismos (para *S. curviseta*, devido à sua reprodução sexuada) com idade sincronizada entre 10 e 12 dias foram inseridos em recipientes de vidro contendo 30 g de solo úmido contaminado ou solo controle (apenas água destilada). Foram avaliadas seis concentrações de cada contaminante, com cinco réplicas para cada tratamento contaminado e dez réplicas para o controle (Tabela 3.6.2). Os colêmbolos foram alimentados com aproximadamente 2 mg de levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) no início do teste e após 14 dias do início dos ensaios crônicos. Os recipientes permaneceram hermeticamente fechados ao longo dos ensaios e foram abertos apenas duas vezes por semana para renovação do ar interior e ajuste da umidade do solo com água destilada.

Após 28 dias do início do teste, o conteúdo de cada unidade experimental (solo e organismos) foi transferido para um recipiente maior e foi submerso em água com cinco gotas de tinta de caneta preta para facilitar a visualização dos organismos sobreviventes e dos juvenis que flutuaram. Em seguida, as réplicas foram fotografadas e analisadas no software ImageJ® para a contabilização dos juvenis gerados durante o teste. As etapas dos testes de toxicidade com colêmbolos estão apresentadas na Figura 3.6.4.

Figura 3.6.4 - Esquema representativo com fotografias das principais etapas necessárias para a realização de um teste de toxicidade com colêmbolos: A) indivíduos da espécie *F. candida* no meio de criação; B) imagem de exemplo da superfície do solo dentro das unidades experimentais, após a inserção de colêmbolos *F. candida*; C) imagem após o procedimento de imersão do conteúdo das unidades experimentais em água com tinta de caneta, para visualização dos juvenis gerados; D) Equipamento utilizado para fotografar os colêmbolos gerados em cada unidade experimental; E) ampliação da fotografia do recipiente de avaliação contendo colêmbolos adultos e juvenis.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

3.6.4.3 Teste de fuga com colêmbolos *Folsomia candida*

O teste de comportamento de fuga com colêmbolos *F. candida* seguiram o sistema de duas seções descrito na ISO 17512-2 (ISO, 2011). Este teste fez parte dos Experimentos I (teste preliminar) e II (teste definitivo), e foi realizado apenas com clotianidina em Neossolo. Recipientes cilíndricos (7,5 cm de diâmetro e 6 cm de altura) foram divididos em duas partes iguais por um divisor plástico. Um lado da seção foi preenchido com 30 g de solo controle (úmido), enquanto que o lado oposto foi preenchido com a mesma quantidade de solo contaminado. As concentrações utilizadas nos ensaios estão descritas na Tabela 3.6.2. Um tratamento duplo-controle (solo controle em ambos os lados) também foi preparado. Vinte colêmbolos com idade sincronizada (20 – 22 dias) foram inseridos na linha divisória de cada réplica, após a remoção do divisor plástico. Foram preparadas cinco réplicas por tratamento. Os testes foram conduzidos no escuro, em ambiente climatizado com temperatura de 20 ± 2 °C. Após 48 h, o divisor plástico foi inserido na linha de separação das seções, e o solo de cada lado foi submerso em água para forçar a flutuação dos colêmbolos, que foram contabilizados. A estrutura das réplicas utilizadas no teste de fuga está ilustrada na Figura 3.6.5.

Figura 3.6.5 - Esquema ilustrativo do teste de fuga, demonstrando o lado A contendo solo controle, o lado B contendo solo contaminado, e a inserção dos colêmbolos na linha divisória dos solos.

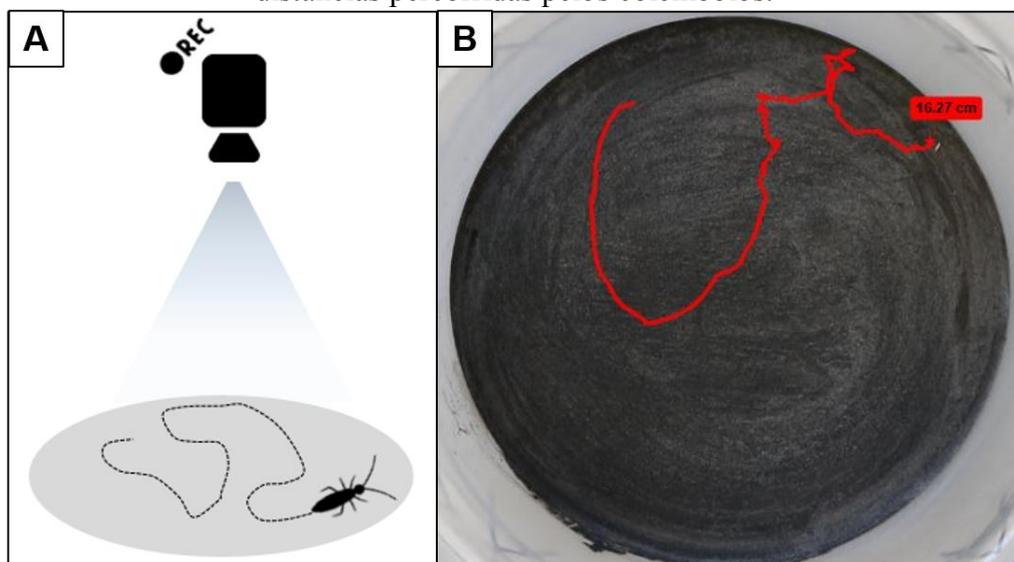


Fonte: elaborado pelo autor (2024).

3.6.4.4 Teste de locomoção com colêmbolos *Folsomia cândida*

O teste de locomoção com colêmbolos (Figura 3.6.6) é uma nova metodologia que foi desenvolvida nesta tese, a partir da experiência obtida com os testes de natação com *D. magna* (PIKUDA et al., 2018; VAZ et al., 2021; NOGUEIRA et al., 2022), sendo esses adaptados para cenários de testes em ambiente terrestre. O comportamento de locomoção dos colêmbolos foi avaliado após 48 h de exposição à clotianidina no teste de fuga. Este teste fez parte do Experimento II. No final do teste de fuga, os colêmbolos encontrados do lado contaminado das réplicas de cada tratamento foram gentilmente coletados e transferidos para uma placa de criação limpa, composta por uma mistura de carvão ativado e gesso de secagem lenta. O mesmo procedimento foi feito para os colêmbolos não expostos, obtidos a partir dos duplo-controles. Após um período de aclimação de 40 minutos, indivíduos sem sinais de danos físicos foram individualmente transferidos para uma placa de criação limpa (8,5 cm de diâmetro), na qual sua locomoção foi gravada durante 60 segundos. Um total de dez colêmbolos por tratamento (selecionados aleatoriamente) tiveram seu comportamento de locomoção individualmente gravado. Os vídeos foram analisados no software Kinovea[®] versão 0.9.5 (CHARMANT et al., 2021). Uma ferramenta de rastreamento do programa foi utilizada para determinar a trajetória de locomoção e a distância caminhada por cada indivíduo.

Figura 3.6.6 - Esquema representativo dos ensaios de locomoção com *F. candida*: A) ilustração do esquema utilizado para a gravação dos movimentos dos colêmbolos; B) imagem obtida do software Kinovea durante a análise dos vídeos para obtenção das trajetórias e distâncias percorridas pelos colêmbolos.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

3.7 TESTES TOXICOLÓGICOS COM ORGANISMOS AQUÁTICOS

Os testes de natação e de toxicidade aguda, crônica e multigeracional com *D. magna* foram executados no Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX/UFSC), em Florianópolis, Santa Catarina, sob a supervisão do professor William Gerson Matias. Os testes de inibição do crescimento com *L. minor*, *C. reinhardtii* e *M. aeruginosa* foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia de Microrganismos Aquáticos da UQAM, em Montreal, Quebec, Canadá, durante o estágio de doutorado sanduíche no exterior, sob a supervisão dos professores Philippe Juneau e David Dewez.

3.7.1 Preparo das soluções contaminadas

Soluções estoque (7 mg mL^{-1} para o NPPS; 10 mg mL^{-1} para a CLO) foram preparadas a partir da solução mãe (no caso do NPPS) ou da formulação comercial INSIDE FS (no caso da CLO). Então, as diluições foram preparadas com base na coleta de alíquotas destas soluções estoque, para o preparo das soluções com quantidades pré-estabelecidas dos compostos, às quais os organismos foram expostos. A Tabela 3.7.1 apresenta as concentrações testadas em cada um dos ensaios com as espécies utilizadas.

Tabela 3.7.1 - Concentrações de nanoplastico de poliestireno (NPPS), clotianidina (CLO) e suas misturas (NPPS + CLO) utilizadas nos testes de toxicidade com *D. magna*, *L. minor*, *C. reinhardtii* e *M. aeruginosa*.

Espécie	Teste agudo			Teste crônico / inibição do crescimento		
	NPPS mg L ⁻¹	CLO mg L ⁻¹	NPPS + CLO mg L ⁻¹	NPPS mg L ⁻¹	CLO mg L ⁻¹	NPPS + CLO mg L ⁻¹
<i>D. magna</i>	25, 50, 75, 99, 149, 199, 298, 398	22, 45, 67, 89, 134, 178, 267, 357	25 + 22, 50 + 45, 75 + 67, 99 + 89, 149 + 134, 199 + 178, 298 + 267, 398 + 357	2,49, 4,97, 9,94, 19,88	2,23, 4,46, 8,92, 17,83	2,49 + 2,23, 4,97 + 4,46, 9,94 + 8,92, 19,88 + 17,83
<i>L. minor</i>				1, 10, 100, 500, 1000	1, 10, 100, 500, 1000	1 + 1, 10 + 10, 100 + 100, 500 + 500, 1000 + 1000
<i>C. reinhardtii</i>				35,2, 70,5, 105,7, 140,9, 211,4	35,2, 70,5, 105,7, 140,9, 211,4	35,2 + 35,2, 70,5 + 70,5, 105,7 + 105,7, 140,9 + 140,9, 211,4 + 211,4
<i>M. aeruginosa</i>				1,9, 3,8, 5,7, 7,6, 11,4	46,9, 93,8, 140,6, 187,5, 281,3	1,9 + 46,9, 3,8 + 93,8, 5,7 + 140,6, 7,6 + 187,5, 11,4 + 281,3

Fonte: elaborado pelo autor (2024).

3.7.2 Testes com microcrustáceos *D. magna*

3.7.2.1 Cultivo de *D. magna*

A manutenção de *D. magna* foi realizada conforme as recomendações da NBR 12713 (ABNT, 2016) e da ISO 6341 (ISO, 2012b). Grupos de aproximadamente 30 organismos adultos foram mantidos em recipientes de vidro de 2 L contendo meio M4 composto de água destilada reconstituída com nutrientes (Figura 3.7.2 B). Três vezes por semana, os meios foram renovados e a espécie foi alimentada com algas *Scenedesmus subspicatus* (Figura 3.7.2C). Os recipientes foram mantidos em ambiente com temperatura de 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 16:8 h claro:escuro.

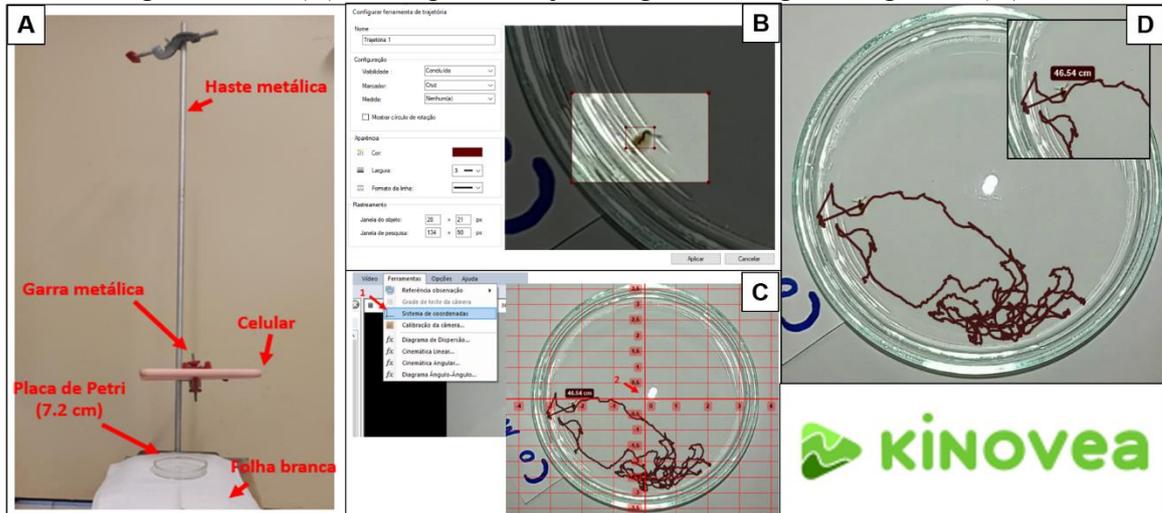
3.7.2.2 *Testes de toxicidade aguda com D. magna*

Os testes de toxicidade aguda com *D. magna* foram realizados conforme as recomendações da OECD 202 (OECD, 2004) e ABNT NBR 12713 (ABNT, 2016). Dez neonatos com idade entre 2 e 26 horas de vida foram inseridos em recipientes plásticos com 25 mL de soluções contendo as concentrações pré-determinadas de CLO ou NPPS, ou ambos, no caso de testes de mistura. Foram testadas oito concentrações de cada contaminante, com duas réplicas para cada tratamento e, em todos os testes, um tratamento controle contendo apenas meio ISO foi preparado (Tabela 3.7.1). Os testes tiveram duração de 48 h e foram conduzidos sem iluminação e alimentação. Ao final do teste, o número de indivíduos imóveis foi contabilizado.

3.7.2.3 *Testes de comportamento de natação com D. magna*

Ao final dos testes agudos (48h) e crônicos (21d), análises de rastreamento de vídeo foram conduzidas para avaliar as potenciais mudanças no comportamento natatório de *D. magna* induzidas pela exposição à CLO, NPPS ou ambos, conforme descrito em Pikuda et al. (2019), Vaz et al. (2021) e Nogueira et al. (2020). Dez organismos por tratamento (selecionados aleatoriamente) foram individualmente transferidos para uma placa de cultura celular (3,6 cm de diâmetro) contendo meio ISO (no caso dos testes agudos) ou M4 (no caso dos testes crônicos). Após um período de aclimação de 3 minutos, a natação de cada organismo foi gravada por 60 segundos. Os vídeos foram analisados no software Kinovea (kinovea.org), e a distância total nadada e trajetória percorrida por cada um dos organismos foi determinada. As etapas dos testes de comportamento de natação estão ilustradas na Figura 3.7.1.

Figura 3.7.1 - Estrutura de suporte utilizada para a gravação dos vídeos de natação de *D. magna*, contendo haste metálica e garra para suporte da câmera (A). Aparência do programa Kinovea, utilizado para o rastreamento dos movimentos das daphnias no software Kinovea (B). Eixo de coordenadas de referência do programa para a extração da distância e trajetória percorridas (C). Exemplo de trajetória percorrida pelas daphnias (D).



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

3.7.2.4 Testes de toxicidade crônica com *D. magna*

Os testes de toxicidade crônica foram realizados de acordo com a ISO 10706 (ISO, 2000), em ambiente com temperatura de 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 16:8 h claro:escuro. Para cada uma das cinco concentrações (as quais foram definidas com base na concentração mais alta do teste agudo em que não houve efeito tóxico; Tabela 3.7.1), 10 réplicas contendo um neonato (2 a 26 horas de vida) foram preparadas. Cada organismo foi inserido em um béquer de vidro com 50 mL de solução contendo concentrações pré-determinadas de CLO ou NPPS, ou ambos, no caso de testes de mistura, além de um tratamento controle. Todos os tratamentos e o controle foram preparados utilizando meio M4. A cada dois dias, o meio de exposição foi renovado e os organismos foram alimentados com algas *S. subspicatus*. Os recipientes foram mantidos nas mesmas condições de cultura (20 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 h), e os meios foram renovados a cada dois dias. Ao final do teste, foram avaliados os parâmetros longevidade (indivíduos adultos sobreviventes após 21 dias de exposição), reprodução (número de filhotes gerados ao longo do teste, número de filhotes por prole, dia da primeira prole) e crescimento (medição do comprimento das *D. magna* sobreviventes em lupa de aumento com escala milimetrada). Uma síntese das etapas de cultivo e de montagem dos testes com *D. magna* é apresentada na Figura 3.7.2.

Figura 3.7.2 - *Daphnia magna* (A). Recipientes contendo meio de criação e organismos *D. magna*, mantidos em BOD com temperatura e fotoperíodo controlados (B). Algas utilizadas como alimento para *D. magna* (C). Lâmpada utilizada para a atração de neonatos de *D. magna* para a lateral do béquer (D). Coleta de organismo com pipeta volumétrica (E). Teste crônico com *D. magna* em andamento (F).



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

3.7.2.5 Testes multigeracionais de recuperação com *D. magna*

Os ensaios crônicos multigeracionais de recuperação com *D. magna* foram realizados utilizando os neonatos produzidos pela geração parental F0 (exposta), em ambiente com temperatura de 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 16:8 h claro:escuro. Neonatos (geração F1) foram obtidos a partir da terceira ninhada produzida pela geração F0 e foram mantidos em meio M4 livre de contaminação, com o intuito de verificar seu potencial de recuperação. O mesmo procedimento foi realizado para a geração de filhotes F2, também obtida a partir da terceira ninhada de filhotes produzidos pela geração F1. Assim como os testes crônicos de exposição, os testes de recuperação tiveram duração de 21 dias, e foram conduzidos com filhotes produzidos pela geração parental exposta ao NPPS, à CLO e às misturas. A cada dois dias, o meio M4 foi renovado e os organismos alimentados com *D. subspicatus*. Os parâmetros de longevidade, reprodução e crescimento dos indivíduos sobreviventes foram avaliados, de maneira semelhante aos ensaios de exposição com a geração F0.

3.7.3 Testes com macrófitas aquáticas *Lemna minor*

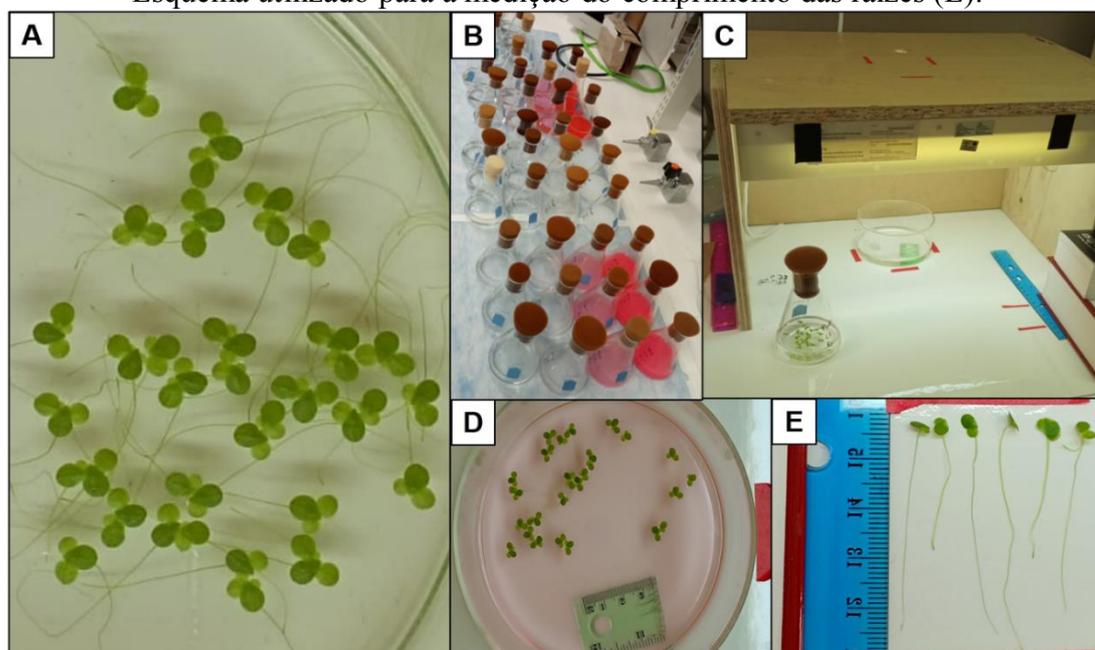
3.7.3.1 Cultivo de *L. minor*

As macrófitas *L. minor* foram cultivadas em condições axênicas, em frascos Erlenmeyer de 250 ml contendo aproximadamente 100 mL de Bold Basal Medium (BBM, pH 6;8; BISCHOFF E BOLD, 1963). A cultura foi mantida no Laboratório de Ecotoxicologia de Microrganismos Aquáticos, na UQAM, sobre condições controladas de temperatura (24 ± 2 °C) e luminosidade (fotoperíodo de 12h, $85 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). O meio de cultura foi renovado uma vez por semana.

3.7.3.2 Testes de inibição de crescimento com *L. minor*

Os testes de toxicidade (inibição do crescimento) com *L. minor* foram realizados seguindo as diretrizes da OECD 221 (OECD, 2002), em ambiente com condições controladas de temperatura (24 ± 2 °C) e luminosidade (fotoperíodo de 12h, $85 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Dez frondes de lemna (obtidas de uma cultura saudável, de cor verde homogênea) foram adicionadas em cada unidade experimental. Foram testadas cinco concentrações de NPPS, CLO, ou da mistura, todas diluídas em meio de cultivo (Tabela 3.7.1). Um tratamento controle contendo apenas BBM também foi preparado. Quatro réplicas foram preparadas por tratamento. Após sete dias de exposição, o número de frondes em cada réplica foi quantificado, e o comprimento das raízes de cinco plantas aleatoriamente selecionadas de cada réplica foi medido. A Figura 3.7.3 apresenta algumas etapas do teste de inibição do crescimento com *L. minor*.

Figura 3.7.3 - Cultura de macrófitas aquáticas *Lemna minor* em meio de criação (A). Unidades experimentais dos ensaios contendo as soluções contaminadas (B). Estrutura utilizada para a avaliação final do teste de crescimento com lemnas, contendo o suporte para a câmera fotográfica e o recipiente para inserção das lemnas (C). Foto do conteúdo de uma réplica de um ângulo superior, para posterior contagem das frondes geradas durante o ensaio (D). Esquema utilizado para a medição do comprimento das raízes (E).



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

3.7.4 Testes com microalgas *Chlamydomonas reinhardtii*

3.7.4.1 Cultivo de *C. reinhardtii*

Microalgas *C. reinhardtii* foram mantidas em culturas estoque axênicas, em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de BBM (pH 6.8; BISCHOFF E BOLD, 1963). A cultura foi mantida no Laboratório de Ecotoxicologia de Microrganismos Aquáticos, na UQAM, sobre condições controladas de temperatura (24 ± 2 °C) e luminosidade (fotoperíodo de 12 h, $85 \mu\text{mol f\^otons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Culturas na fase exponencial de crescimento foram utilizadas nos experimentos. O meio de cultura foi renovado duas vezes por semana.

3.7.4.2 Testes de inibição de crescimento com *C. reinhardtii*

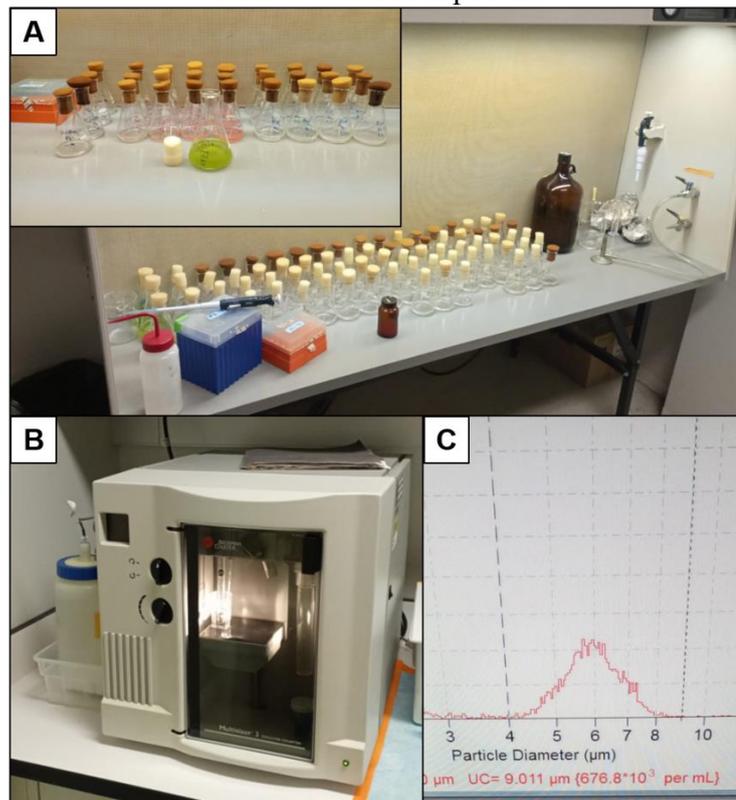
Testes de toxicidade com algas *C. reinhardtii* (Figura 3.7.4) foram realizados seguindo as orientações da OECD 201 (OECD, 2011), em ambiente com condições controladas de

temperatura ($24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) e luminosidade (fotoperíodo de 12 h, $85 \text{ } \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Amostras de alga contendo aproximadamente $2 \times 10^5 \text{ c\u00e9lulas ml}^{-1}$ foram expostas a cinco concentra\u00e7\u00f5es crescentes de NPPS, CLO e da mistura (Tabela 3.7.1) durante 72 h, sob as mesmas condi\u00e7\u00f5es de temperatura e luminosidade do cultivo. Quatro r\u00e9plicas foram preparadas por tratamento. Um tratamento controle contendo apenas BBM tamb\u00e9m foi preparado. A cada 24 h, as unidades experimentais foram agitadas por cerca de 1 min. Ap\u00f3s 72 h de exposi\u00e7\u00e3o, a densidade de c\u00e9lulas de cada r\u00e9plica foi determinada usando um contador de c\u00e9lulas Multisizer 3 (Beckman Coulter), e a taxa de crescimento (μ) foi calculada seguindo a Equa\u00e7\u00e3o 1.

$$\text{Taxa de crescimento } (\mu) \text{ (dia}^{-1}\text{)} = (\ln N_t - \ln N_0)/t_n \quad (1)$$

onde N_t \u00e9 a densidade final de c\u00e9lulas ap\u00f3s 72 h, N_0 \u00e9 a densidade inicial de c\u00e9lulas, e t_n \u00e9 o per\u00edodo de exposi\u00e7\u00e3o em dias.

Figura 3.7.4 - Preparo das unidades experimentais dos testes com microalgas e cianobact\u00e9rias dentro do fluxo de ar est\u00e9ril, com as solu\u00e7\u00f5es contaminadas (A). Vista frontal do equipamento Multisizer 3, utilizado para a contagem de c\u00e9lulas nas solu\u00e7\u00f5es (B). Gr\u00e1fico com o pico de concentra\u00e7\u00e3o de microalgas/cianobact\u00e9rias na amostra (C), atrav\u00e9s do qual se quantificou a concentra\u00e7\u00e3o de algas ou cianobact\u00e9rias em cada r\u00e9plica, e posteriormente a taxa de crescimento das esp\u00e9cies.



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

3.7.5 Testes com cianobactérias *Microcystis aeruginosa*

3.7.5.1 Cultivo de *M. aeruginosa*

O cultivo de *M. aeruginosa* foi mantido nas mesmas condições e procedimentos adotados para as microalgas *C. reinhardtii* (fotoperíodo de 12 h, 85 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, temperatura de 24 ± 2 °C), utilizando BBM estéril.

3.7.5.2 Testes de inibição de crescimento com *M. aeruginosa*

Os testes de toxicidade com *M. aeruginosa* (Figura 3.7.4) seguiram as recomendações da OECD 201 (OECD, 2011), e foram realizados em ambiente com condições controladas de temperatura (24 ± 2 °C) e luminosidade (fotoperíodo de 12 h, 85 $\mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Os ensaios iniciaram com amostras de cianobactéria de 5×10^5 células ml^{-1} que foram expostas a cinco concentrações crescentes de NPPS, CLO e mistura (Tabela 3.7.1), sob as mesmas condições de temperatura e luminosidade do cultivo. Um tratamento controle contendo apenas meio BBM foi preparado. Após 72 h de exposição, a densidade de células foi determinada utilizando um contador de células, e a taxa de crescimento foi calculada seguindo o mesmo procedimento descrito para *C. reinhardtii*.

3.8 ANÁLISE DOS DADOS

3.8.1 Experimento I

3.8.1.1 Determinação das concentrações de efeito da exposição individual aos compostos

Todos os conjuntos de dados de cada um dos testes ecotoxicológicos foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para testar se os dados seguem uma distribuição normal. Além disso, o teste de Bartlett foi usado para verificar a homogeneidade de variância dos dados.

Os resultados de cada um dos testes ecotoxicológicos terrestres de toxicidade crônica foram individualmente analisados no Statistica versão 13.5.0.17. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e quando diferenças significativas ($p < 0,05$) foram detectadas,

as médias dos tratamentos foram comparadas com o controle através do teste de post-hoc de Dunnet, para a determinação da concentração de efeito não observado (CENO) e da concentração de efeito observado (CEO). Além disso, nos testes de toxicidade crônica, as concentrações que reduzem a reprodução em 10% e 50% em relação ao controle (CE₁₀ e CE₅₀) foram estimadas utilizando modelos de regressão não lineares (Exponencial, Gompertz, Hormesis ou Logístico) recomendados por Environmental Canada (2007).

3.8.1.2 *Curva de distribuição de sensibilidade das espécies (DSE)*

Uma curva de DSE foi gerada utilizando os dados de toxicidade gerados nos testes ecotoxicológicos do experimento I. Os valores de CE₁₀ obtidos nos ensaios foram utilizados para a construção da DSE. A DSE e as concentrações de perigo para 5% e 50% das espécies (CP₅ e CP₅₀, respectivamente) foram estimadas através da aplicação de um ajuste de uma distribuição log-normal ao conjunto de dados, utilizando o programa *USEPA Species Sensitivity Distribution generator* (USEPA, 2005).

3.8.1.3 *Estimativa da concentração ambiental estimada (CAE) e do risco ecológico*

A concentração ambiental estimada (CAE) da CLO 28 dias após o plantio das sementes tratadas foi calculada através do software ESCAPE®, seguindo as recomendações da EPPO (2003). Uma densidade de plantio de 30 kg de sementes de milho por hectare foi adotada para os cálculos, bem como uma dose de aplicação recomendada pelo fabricante de 4 mL da formulação comercial INSIDE FS por kg de sementes, resultando em 72 g de i.a. ha⁻¹ incorporados nos 5 cm superiores do perfil do solo. Adotou-se também uma densidade do solo de 1,0 g cm⁻³, que foi usada para calcular a massa de solo em contato com o inseticida. Além disso, a interceptação do inseticida pelas plantas (1,5%, considerando a absorção pelas plântulas após sua emergência, de acordo com Alford e Krupke, 2017) e a dissipação do agrotóxico ao longo do tempo seguindo uma cinética de decaimento de primeira ordem (DT₅₀ = 155 dias; De Lima e Silva et al., 2019) foram consideradas nos cálculos. A CAE foi estimada em 0,133 mg kg⁻¹.

O risco ecológico da CLO para invertebrados não-alvo do solo foi calculado com base na diretriz para avaliação de risco de substâncias novas e existentes da Comissão Europeia (EC, 2003). A concentração prevista de efeito não observado (CPENO) foi definida como a

concentração que protege 95% das espécies (CPENO = CP₅). O risco ecológico foi calculado através do Quociente de Perigo (QP = CAE/CPENO; EC, 2003), e foi considerado significativo quando QP > 1.

3.8.2 Experimento II

Nos testes de fuga, a porcentagem de fuga foi calculada seguindo a equação da ISO 17512-2 (ISO, 2011):

$$A = [(C-T)/N].100 \quad (2)$$

Onde C é o número de colêmbolos encontrados do lado controle, T é o número de colêmbolos encontrados no lado contaminado, e N é o número total de colêmbolos recuperados (C + T). Valores positivos de A indicam fuga significativa do solo contaminado, enquanto que valores negativos de A indicam atração/preferência para o lado contaminado (ISO, 2011). Os dados foram analisados utilizando o teste de Fisher ($p < 0,05$) com o teste de uma calda para os tratamentos contaminados e o teste de duas caldas para o duplo controle (Natal-da-Luz et al., 2008), para a determinação da CEO e CENO.

Em relação ao teste de locomoção, os efeitos das concentrações na distância média percorrida pelos colêmbolos foram testadas via ANOVA, seguido pelo teste de post-hoc de Dunnet ($p < 0,05$) para comparar o comportamento de locomoção entre os grupos contaminados e o grupo controle.

3.8.3 Experimento III

3.8.3.1 *Determinação das concentrações de efeito dos compostos isolados*

A CEO, CENO e CE₅₀ dos compostos isolados (NPPS e CLO) para cada uma das espécies utilizadas no solo, foram determinadas de acordo com os procedimentos descritos na seção 3.8.1.1.

3.8.3.2 *Análise de interação das misturas*

O efeito interativo entre as substâncias foi avaliado através do modelo de Abbott (ABBOTT, 1925). Este método foi escolhido para a análise de misturas por se tratar de uma equação simplificada, que segue o princípio da adição de concentração recomendada por diretrizes internacionais de interpretação do efeito de misturas (USEPA, EFSA) e pelo seu emprego usual na avaliação de misturas de nanomateriais e agrotóxicos (DA SILVA et al, 2021; NOGUEIRA et al., 2022). O método de Abbott consiste na comparação da toxicidade observada (T_{obs} , proveniente do resultado dos testes com misturas) com a toxicidade esperada (T_{esp} , proveniente da estimativa feita por modelos de predição de toxicidade). A T_{esp} da mistura foi calculada a partir dos efeitos dos compostos individuais, através da equação: $T_{exp} = A + B - (AB/100)$, onde A e B representam, respectivamente, a inibição induzida por CLO e NPPS individualmente. Em seguida, a razão de inibição (RI) foi calculada para comparar a toxicidade observada com a esperada, através da equação: $RI = T_{obs}/T_{esp}$, onde T_{obs} representa a inibição causada pela mistura. Para cada concentração testada, os valores de T_{obs} foram estatisticamente comparados com os valores de T_{esp} através do teste de Duncan ($p < 0,05$). Assim, sinergismo significativo foi constatado quando houve diferença significativa entre os valores de T_{obs} e T_{esp} e valores de $RI > 1$ (efeitos observados maiores do que os esperados); da mesma forma, diferenças significativas entre os valores de T_{obs} e T_{esp} pelo teste de Duncan e valores de $RI < 1$ indicam que houve antagonismo significativo (efeitos observados menores do que os esperados). Efeitos aditivos foram constatados quando os valores de T_{obs} e T_{esp} não diferiram estatisticamente.

3.8.4 Experimento IV

3.8.4.1 *Determinação das concentrações de efeito dos compostos isolados*

Os resultados dos testes ecotoxicológicos aquáticos com cada uma das espécies testadas foram analisados admitindo diferenças significativas entre os tratamentos para $p < 0,05$ no software Statistica versão 13.5.0.17. Para os testes agudos com *D. magna*, bem como para os testes de inibição de crescimento com *L. minor*, *C. reinhardtii* e *M. aeruginosa*, o valor de CE_{50} e seu intervalo de confiança (95%) foram estimados através de um modelo logístico de regressão não-linear. Já para os testes crônicos e multigeneracionais, o CEO e o CENO

(considerando longevidade, comprimento corporal e número de filhotes por ninhada) foram determinados através do teste de Dunnet (comparação entre os tratamentos e o respectivo controle). Em relação aos testes de natação, os efeitos das concentrações na distância média percorrida pelas daphnias foram testadas via ANOVA, seguido pelo teste de post-hoc de Dunnet ($p < 0,05$) para identificar se existiram diferenças significativas entre as distâncias percorridas pelos organismos dos grupos contaminados e o grupo controle.

3.8.4.2 *Análise de interação das misturas*

O efeito interativo entre as substâncias foi avaliado através do modelo de Abbott (ABBOTT, 1925), conforme descrito na seção 3.8.3.2.

4 RESULTADOS DA TESE

4.1 RESULTADOS E DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO I: Efeitos crônicos e risco ecológico da clotianidina sobre invertebrados não-alvo do solo

Os resultados dos testes de toxicidade crônica com a CLO sobre as cinco espécies de invertebrados não-alvo do solo foram publicados em um artigo científico (Apêndice A), intitulado “*Chronic effects of clothianidin to non-target soil invertebrates: Ecological risk assessment using the species sensitivity distribution (SSD) approach*” (BANDEIRA et al., 2021). A publicação foi no periódico “*Journal of Hazardous Materials*” (<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126491>), fator de impacto (2022): 13,6 e classificação Qualis CAPES (Quadrênio 2017-2020): A1 (área de avaliação: Engenharias I).

4.1.1 Testes de ecotoxicidade crônica

Os resultados dos testes de toxicidade crônica com a CLO em SAT, para cada uma das cinco espécies testadas, estão apresentados na Tabela 4.1.1 e na Figura 4.1.1. Todos os testes crônicos com as espécies padrão atenderam os respectivos critérios de validação propostos nas normas utilizadas (ISO, 2012; 2014). As espécies alternativas de colêmbolos (*Sinella curviseta* e *Proisotoma minuta*) também tiveram desempenho adequado para os ensaios, com taxa de sobrevivência de adultos > 80% e número médio de juvenis ≥ 100 nos controles.

O crescimento das minhocas *E. andrei* (medido através da mudança de peso corporal ao longo dos experimentos) foi inibido a partir de 6,1 mg de CLO kg^{-1} . A reprodução das minhocas foi ainda mais afetada pela CLO (CEO = 1,5 mg kg^{-1}). Já os enquitreideos *E. crypticus* foram os organismos menos sensíveis (CENO = 20 mg kg^{-1} ; Tabela 4.1.1). Dependendo do parâmetro ecotoxicológico considerado, os enquitreideos foram 7 a 26 vezes menos sensíveis do que as minhocas (Tabela 4.1.1). Uma maior sensibilidade das minhocas, comparado aos enquitreideos, também foi observada por De Lima e Silva et al. (2017) para os neonicotinoides imidacloprido e tiacloprido. Os autores atribuíram esta diferença de sensibilidade aos distintos metabolismos das espécies e à afinidade dos neonicotinoides aos sítios de ligação nos organismos. Além disso, Renaud et al. (2018) sugeriram que os enquitreideos podem ter uma maior capacidade de evitar a exposição aos contaminantes devido ao seu menor tamanho

corporal, o que é mais difícil para as minhocas devido ao seu maior tamanho e maior área para penetração dérmica do inseticida.

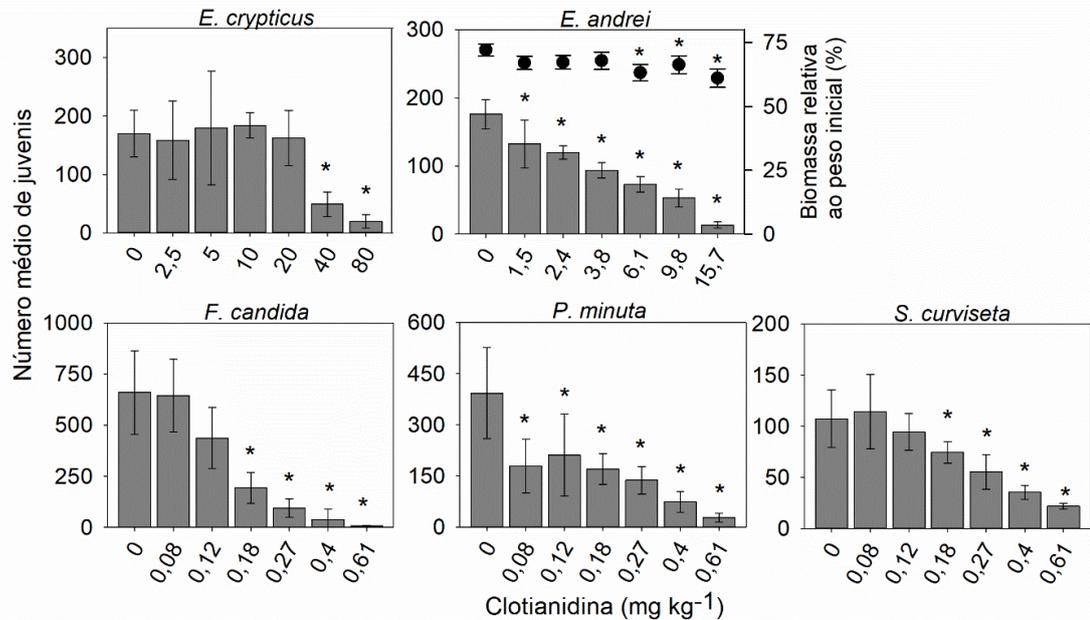
As espécies de colêmbolos demonstraram maior sensibilidade à CLO (Tabela 4.1.1), comparado aos outros grupos de invertebrados avaliados. A reprodução de *F. candida* e *S. curviseta* foi significativamente inibida a partir de 0,18 mg kg⁻¹, enquanto que *P. minuta* foi afetada a partir de 0,08 mg kg⁻¹ (Figura 4.1.1). Baseado nos valores de CE₅₀ (e seus intervalos de confiança de 95%), a toxicidade foi maior para *F. candida* e *P. minuta* do que para *S. curviseta* (Tabela 4.1.1). A inibição da reprodução dos colêmbolos foi observada em concentrações ambientalmente relevantes, tendo em vista que níveis superiores aos CEOs para as espécies de colêmbolos já foram encontrados em solos agrícolas (0,25 – 0,44 mg kg⁻¹; CHOWDHURY et al., 2012; RAMASUBRAMANIAN, 2013). Uma alta sensibilidade dos colêmbolos aos neonicotinoides também já foi reportada em outros estudos (ALVES et al., 2014; DE LIMA E SILVA et al., 2017; 2018; 2019; HENNIG et al., 2020; BANDEIRA et al., 2020a, b), o que provavelmente se deve à alta seletividade dos neonicotinoides pelos receptores nicotínicos de acetilcolina dos artrópodes, tendo em vista que estes são organismos filogeneticamente próximos dos insetos, alvo principal dos inseticidas neonicotinoides (AKEJU, 2014).

Tabela 4.1.1 - Parâmetros ecotoxicológicos (CEO, CENO, CE₁₀ e CE₅₀) obtidos para a clotianidina através dos testes de toxicidade crônica com cinco espécies de invertebrados não-alvo do solo realizados em solo artificial tropical (SAT). Os intervalos de confiança de 95% estão apresentados entre parênteses.

Grupo	Espécie	Endpoint medido	CENO	CEO	CE ₁₀		CE ₅₀
					mg kg ⁻¹		
Minhocas	<i>E. andrei</i>	Rep. 56d	< 1,5	1,5	0,81 (0,39 – 1,24)		4,35 (3,43 – 5,28)
Enquitreídeos	<i>E. crypticus</i>	Rep. 21d	20	40	21,3 (3,40 – 39,2)		33,5 (22,4 – 44,6)
Colêmbolos	<i>F. candida</i>	Rep. 28d	0,12	0,18	0,08 (0,05 – 0,12)		0,15 (0,12 – 0,18)
	<i>P. minuta</i>	Rep. 28d	< 0,08	0,08	0,04 (0,01 – 0,07)		0,11 (0,04 – 0,18)
	<i>S. curviseta</i>	Rep. 28d	0,12	0,18	0,12 (0,08 – 0,16)		0,28 (0,22 – 0,34)

Rep. – reprodução.

Figura 4.1.1 – Número médio de juvenis de *Enchytraeus crypticus*, *Eisenia andrei*, *Folsomia candida*, *Proisotoma minuta* e *Sinella curviseta* (\pm desvio padrão; barras baseadas no eixo Y da esquerda) e biomassa de *E. andrei* (\pm desvio padrão; barras baseadas no eixo Y da direita) encontrados após a exposição a concentrações crescentes de clotianidina em um solo tropical artificial (SAT). Asterisco (*) indica diferença significativa comparado ao respectivo tratamento controle (teste de Dunnett, $p \leq 0,05$).

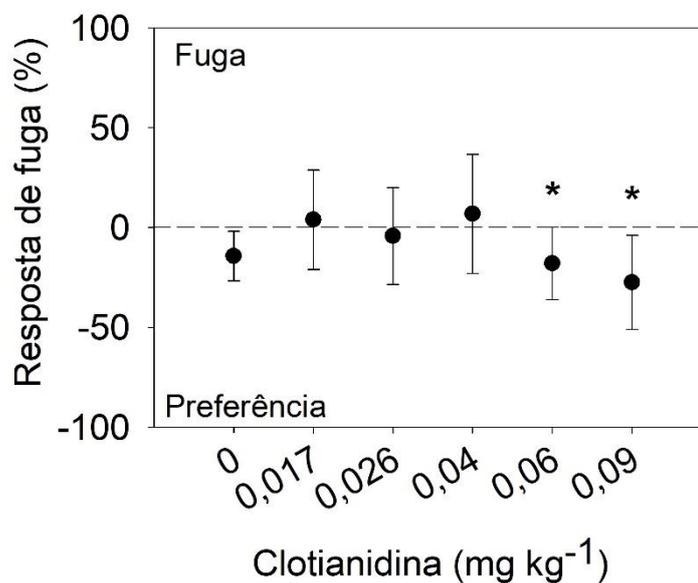


Fonte: elaborado pelo autor (2022).

4.1.2 Teste de fuga com colêmbolos

O resultado do teste de fuga preliminar com colêmbolos está apresentado na Figura 4.1.2. A clotianidina não causou fuga significativa dos colêmbolos. Na realidade, preferência significativa pelo solo contaminado ($p < 0.05$) foi observada nas duas maiores concentrações de CLO testadas. Neste sentido, uma vez que a resposta de fuga não foi um parâmetro sensível para a CLO (não foi possível estimar uma concentração de efeito em virtude da ausência da fuga), os dados de fuga não foram incluídos na análise de risco. Além disso, o efeito da CLO sobre o comportamento de preferência dos colêmbolos foi explorado mais profundamente no Experimento II, o qual objetivou esclarecer quais as razões para a preferência pelo lado contaminado, e as potenciais limitações dos testes de fuga utilizando inseticidas neurotóxicos.

Figura 4.1.2 - Resposta de fuga de colêmbolos *F. candida* após 48 h de exposição a solos contaminados com clotianidina. Asterisco (*) indica preferência significativa pelo solo contaminado.

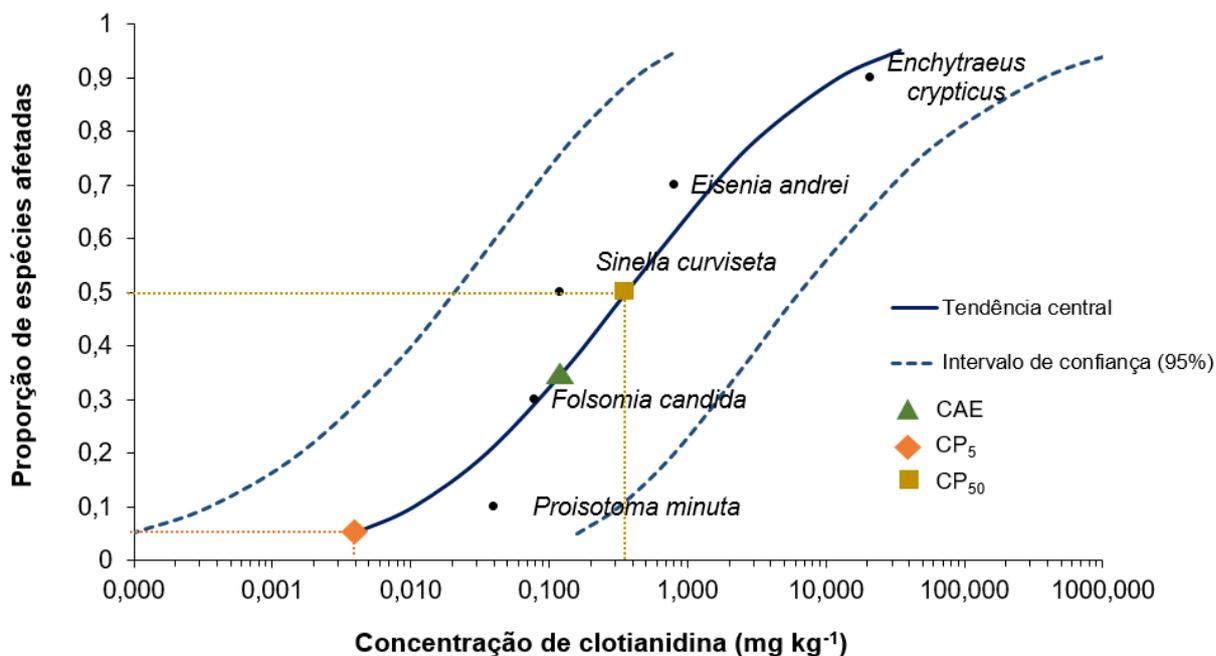


Fonte: elaborado pelo autor (2024).

4.1.3 Curva DSE e cálculo do quociente de perigo (QP)

A curva da DSE foi construída com dados de toxicidade de cinco espécies pertencentes a três diferentes grupos taxonômicos (minhocas, enquitreideos e colêmbolos; Figura 4.1.3). Por meio dessa análise, os colêmbolos também foram identificados como o grupo mais sensível à CLO; minhocas *E. andrei* apresentaram sensibilidade intermediária, enquanto que os enquitreideos *E. crypticus* foram os organismos menos afetados pelo inseticida. Os valores de CP₅ e CP₅₀ foram estimados em 0,004 (0,0001 – 0,159) e 0,367 (0,021 – 6,465) mg kg⁻¹. A comparação da CAE (0,133 mg kg⁻¹) com a curva DSE permite inferir que cerca de 36% das espécies do solo sofrerão algum tipo de efeito crônico pelos níveis esperados de CLO no solo após 28 dias do plantio de sementes tratadas. Além disso, o grupo inteiro de colêmbolos estará sujeito a uma redução da reprodução de 10% das suas populações sob concentrações de CLO abaixo da CAE. O valor de QP foi estimado em 33, indicando um risco significativo da exposição dos invertebrados edáficos aos níveis esperados de CLO no solo.

Figura 4.1.3 - Curva de distribuição de sensibilidade das espécies (DSE) baseada em valores de CE_{10} obtidos de testes de toxicidade crônica com clotianidina, com cinco espécies de invertebrados do solo. CAE: concentração ambiental esperada. CP_5 e CP_{50} : concentrações de perigo para 5 e 50% das espécies, respectivamente.



Fonte: elaborado pelo autor (2022).

O conjunto de dados usado para construir a DSE diz respeito aos experimentos de toxicidade crônica de cinco espécies de três grupos taxonômicos (minhocas, enquitreídeos e colêmbolos), atendendo, assim, aos requerimentos mínimos estabelecidos nas diretrizes de avaliação de risco de agrotóxicos da Austrália e da Nova Zelândia para a aplicação de metodologias de construção de DSE (NEPC, 2011). Na Europa, uma metodologia padrão para a construção de DSEs para organismos do solo ainda está sendo consolidada (EFSA, 2017). No Brasil, ainda não existe uma orientação técnica que estabeleça como as DSEs devem ser construídas, e metodologias de avaliação de risco ambiental (ARA) ainda estão em desenvolvimento. Desta forma, apesar do número limitado de espécies e grupos taxonômicos utilizados na elaboração desta DSE, pode-se considerar que esta é uma primeira tentativa de aplicação desta metodologia para o melhoramento da avaliação de risco da CLO no Brasil, fornecendo um ponto de partida para pesquisas futuras.

A Figura 4.1.3 demonstra que todas as espécies avaliadas dentro do grupo taxonômico dos colêmbolos deverão ser afetadas pela concentração ambiental de CLO no ambiente, pois os valores de CE_{10} de todas as espécies de colêmbolos são inferiores à CAE. O impacto sobre a comunidade de colêmbolos pode representar uma ameaça para o ecossistema, pois estes

organismos estão envolvidos com a regulação e dispersão de comunidades fúngicas e bacterianas, a decomposição de folhas e raízes, além de servirem como presas para aranhas e besouros (POTAPOV et al., 2020).

Apesar da espécie padrão de colêmbolos (*F. candida*) ter sido o segundo organismo mais sensível à CLO (Figura 4.1.1), há de se considerar que espécies de reprodução partenogenética (tal como é a de *F. candida*) provavelmente possuem uma capacidade maior de recuperação do tamanho da sua população após cessado o estresse, em comparação a espécies de reprodução sexuada (tal como *S. curviseta* e *P. minuta*), pois de acordo com Chahartaghi et al. (2009), espécies partenogenéticas colonizam habitats mais rapidamente do que colêmbolos de reprodução sexuada, pois estas dependem das fêmeas encontrarem e coletarem espermatóforos liberados pelos machos (GLIME, 2017; DE LIMA E SILVA et al., 2021).

Embora *F. candida* seja, inquestionavelmente, a espécie de colêmbolos mais estudada e utilizada em estudos ecotoxicológicos do solo, deve-se destacar que os colêmbolos de reprodução sexuada são mais representativos da comunidade de microartrópodes. Buch et al. (2016) encontraram organismos da espécie *P. minuta* em 68% das amostras de solo coletadas em florestas do Rio de Janeiro, enquanto que *F. candida* foi encontrado em apenas 2% das amostras. Neste mesmo sentido, Xu et al. (2009) reportaram que a espécie *S. curviseta* é abundantemente encontrada no sul da China, enquanto que *F. candida* é raramente encontrada no campo. Além da boa representatividade ecológica, *P. minuta* apresentou alta sensibilidade à CLO, uma vez que os valores de CE_{10} e CE_{50} (e seus limites de confiança de 95%) foram similares aos encontrados para *F. candida* (Tabela 4.1.1), o que reforça a importância de incluir espécies com distintas estratégias reprodutivas na avaliação de risco de agrotóxicos, pois isso pode contribuir para a obtenção de valores mais precisos de concentração proteção ambiental.

A análise de risco ecológico através do cálculo do QP demonstrou que a CAE é mais de 35 vezes maior do que a concentração protetiva para 95% das espécies, revelando que há risco significativo da exposição dos invertebrados do solo aos níveis esperados de CLO (EC, 2003). Estes resultados são preocupantes pois, apesar de nós considerarmos uma única aplicação da CLO no solo, aplicações sucessivas deste inseticida podem ocorrer em áreas agrícolas, e os níveis deste i.a. podem ser ainda maiores em virtude da sua persistência e acúmulo no solo (GE et al., 2018).

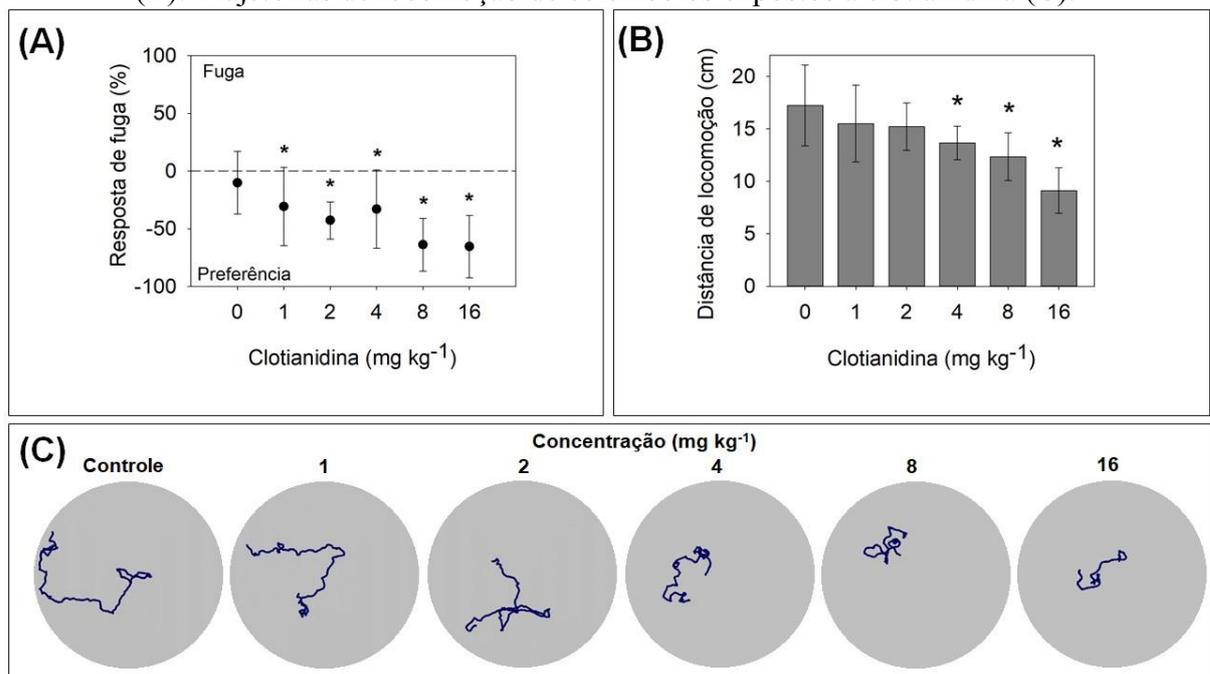
Por fim, conclui-se que a clotianidina causa risco ecológico significativo às espécies do solo e que os níveis esperados deste agrotóxico no solo irão afetar as espécies de colêmbolos.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO II: Efeitos da clotianidina sobre a fuga e locomoção de colêmbolos

Os resultados do experimento de fuga e de locomoção com colêmbolos *Folsomia candida* foram publicados em um artigo científico (Apêndice B) intitulado “Locomotion behavior testing as a complementary tool in collembola avoidance assays with neurotoxic insecticides” (BANDEIRA et al., 2023). O artigo científico foi publicado no periódico *Environmental Science and Pollution Research* (<https://doi.org/10.1007/s11356-023-30750-y>), fator de impacto (2022): 5,8 e classificação Qualis CAPES (Quadriênio 2017-2020): A2 (área de avaliação: Engenharias I).

Os resultados referentes ao experimento II (teste de fuga e locomoção com colêmbolos, com CLO, em Neossolo) estão apresentados na Figura 4.2.1. O teste de fuga atendeu aos critérios de validação estabelecidos pela ISO 17512-2 (ISO, 2011). Além disso, o teste de locomoção apresentou baixa variabilidade ($CV < 30\%$) e os efeitos seguiram uma dose-resposta.

Figura 4.2.1 - Resposta de fuga de colêmbolos *Folsomia candida* submetidos às concentrações crescentes de clotianidina (A). Distância de locomoção de colêmbolos expostos à clotianidina (B). Trajetórias de locomoção de colêmbolos expostos à clotianidina (C).



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

A clotianidina não causou fuga dos colêmbolos em nenhuma das concentrações testadas. Na verdade, uma preferência pelo lado contaminado foi observada em todas as concentrações testadas (Figura 4.2.1A). Resultados semelhantes (de não-fuga ou atração pelo lado contaminado) já foram reportados em outros estudos. Por exemplo, colêmbolos *F. candida* não evitaram solos contaminados com ivermectina (GUIMARÃES et al., 2019b) e os inseticidas teflubenzuron (GUIMARÃES et al., 2019A) e imidacloprido (BORI et al., 2015; DE LIMA E SILVA et al., 2017). Estes autores sugerem que este tipo de resposta está associado à incapacidade de os sensores gustatórios e olfatórios dos organismos detectarem os contaminantes (GAINER; OWOJORI; MABOETA, 2022), seja pela natureza do contaminante ou pelas baixas concentrações do agrotóxico no solo, resultando em uma incapacidade de evitar solos contaminados. Isto provavelmente não é aplicável aos nossos resultados, pois foi encontrada uma tendência de aumento do número de indivíduos no lado contaminado com o aumento da concentração testada.

Por outro lado, outros autores mencionam que a “preferência” pelo lado contaminado pode ser uma incapacidade dos organismos de escapar do solo contaminado devido a possíveis efeitos neurotóxicos induzidos pelos agrotóxicos (PEREIRA et al., 2013; GAINER; OWOJORI; MABOETA, 2022). Este argumento é particularmente válido para inseticidas que atuam no sistema nervoso dos organismos, tal como a clotianidina, que atua nos receptores nicotínicos da acetilcolina (nAChRs) (CAMPBELL et al., 2022). A inibição dos neurotransmissores pode resultar em hiperexcitação dos neurônios e paralisia neuromuscular, o que pode provocar movimentos descoordenados e desorientados (VAN GESTEL et al., 2017; ENGENHEIRO et al., 2005). Isto provavelmente explica redução da atividade locomotora observada no nosso estudo (Figura 4.2.1B), e também em outros estudos com agrotóxicos neurotóxicos (SØRENSEN; BAYLEY; BAATRUP, 1995; JENSEN; GARSDAL; BAATRUP, 1997; SZABÓ; SERES; BAKONYI, 2018).

Uma redução significativa no comportamento de locomoção dos colêmbolos foi observada a partir de 4 mg CLO kg⁻¹ (Figura 4.2.1B). Os colêmbolos expostos à CLO caminharam distâncias 10-47% inferiores aos não expostos. Além disso, as trajetórias de locomoção dos colêmbolos expostos são restritas a menores áreas, com uma tendência de movimentos circulares nas maiores concentrações (Figura 4.2.1C), o que pode ser um sinal de desorientação. Estes resultados confirmam que a preferência pelo lado contaminado pode ser explicada pela incapacidade dos colêmbolos de escaparem devido à inibição da locomoção,

conforme anteriormente sugerido por outros autores como uma explicação para os resultados falso-negativos em testes de fuga (PEREIRA et al., 2013; BICHO et al., 2015; SON et al., 2022).

Neste contexto, destaca-se que a capacidade de se movimentar é crucial para os colêmbolos realizarem a grande maioria de suas atividades no solo, tal como a busca por alimento e a decomposição de folhas, bem como a incorporação de material orgânico nas camadas de solo (ENGENHEIRO et al., 2005); é também essencial para a reprodução e sobrevivência das espécies, uma vez que eles precisam estar aptos a se locomoverem para migrarem na busca de melhores nichos, bem como para fugirem de predadores (SØRENSEN; BAYLEY; BAATRUP, 1995). Assim, impactar a locomoção dos colêmbolos pode trazer implicações importantes para o balanço ecológico do solo, o funcionamento do ecossistema e os serviços associados a estas atividades.

O nosso teste de locomoção foi focado no efeito subletal incapacitante (paralisia) induzido pela clotianidina, conhecido como a fase de *knockdown* resultante da exposição crônica a este inseticida neurotóxico. Entretanto, sabe-se que os neonicotinoides promovem uma fase de hiperatividade no início da exposição, tal como já reportado para abelhas *Apis mellifera* e *Tetragonisca angustula* (TOSI; BURGIO; NIEH, 2017; DE JACOB et al., 2019). Nestes estudos, as abelhas apresentaram um aumento na velocidade e distância de voo 1 h após a exposição ao inseticida, mas ao longo do tempo (exposição crônica) apresentaram redução significativa na duração, distância e velocidade de voo. Neste sentido, a ausência da fase de hiperatividade nos nossos resultados provavelmente é devido à exposição relativamente mais longa dos colêmbolos à CLO antes da medição da locomoção (48 h). Além disso, as concentrações relativamente altas utilizadas no nosso experimento provavelmente favoreceu uma transição mais rápida da fase de hiperexcitação para a fase de *knockdown*, devido à rápida saturação dos neuroreceptores pelas moléculas de CLO.

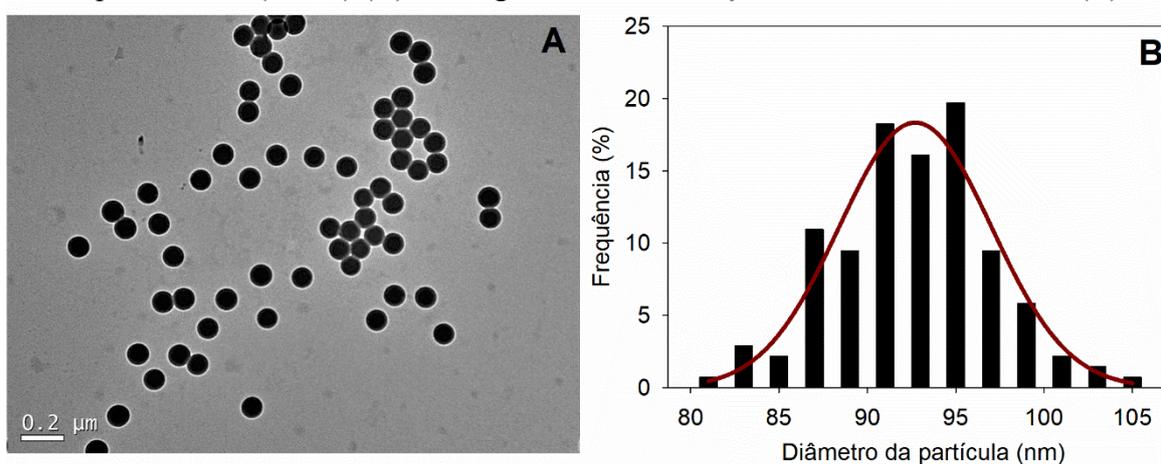
Finalmente, nossos resultados demonstram que os testes de fuga não se mostraram uma ferramenta eficaz para avaliar os impactos comportamentais de inseticidas potencialmente inibidores da locomoção, uma vez que podem conduzir a falsos-negativos. Além disso, os resultados deste experimento permitiram confirmar a hipótese 1 desta tese, uma vez que o teste de locomoção demonstrou ser um método complementar promissor para a avaliação dos impactos de agrotóxicos sobre o comportamento dos colêmbolos.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO III: Efeitos individuais e em mistura da clotianidina e do nanoplástico de poliestireno sobre invertebrados do solo

4.3.1 Caracterização das NPPS

A imagem de MET das NPPS demonstra que as nanopartículas sintetizadas em laboratório possuem morfologia esférica (Figura 4.3.1A). Além disso, na imagem de MET, destaca-se a ausência de nanopartículas de Al_2O_3 livres, sugerindo que o poliestireno revestiu todo o Al_2O_3 usado como núcleo metálico e provavelmente permanece estavelmente encapsulado no meio (VICENTINI et al., 2019). A distribuição do diâmetro das partículas está apresentada na Figura 4.3.1B, a qual foi obtida com base na medição aleatória de cerca de 140 nanopartículas. Observa-se que a grande maioria das nanopartículas contém tamanhos situados entre 87 e 97 nm, com apenas algumas NPPS com diâmetro ocupando as extremidades do histograma. O diâmetro médio (\pm desvio padrão) das NPPS foi calculado em $92,6 \pm 4,4$ nm. Os resultados de morfologia e diâmetro das partículas são compatíveis com trabalhos anteriores, que obtiveram NPPS de morfologia esférica e com tamanhos médios de $85,1 \pm 11,1$ nm (VAZ et al., 2021) e $90,1 \pm 4,9$ nm (VICENTINI et al., 2019) após procedimento semelhante de síntese por polimerização em emulsão convencional.

Figura 4.3.1 – Imagem da microscopia eletrônica de transmissão (MET) das nanopartículas de poliestireno (NPPS) (A). Histograma de distribuição do diâmetro das NPPS (B).



Fonte: elaborado pelo autor (2021).

4.3.2 Testes de ecotoxicidade crônica

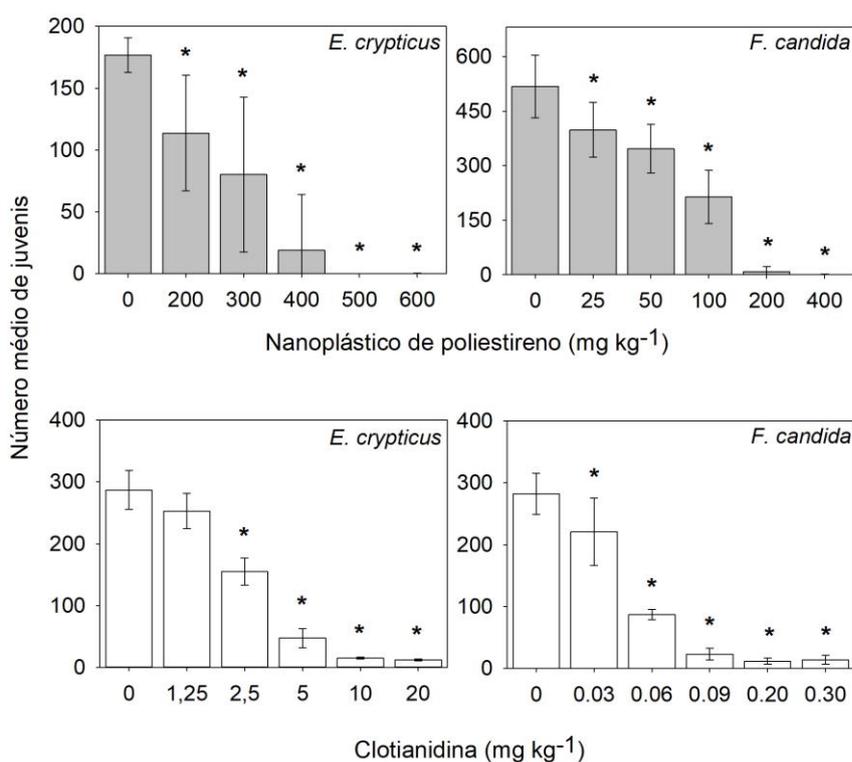
Os resultados indicaram que o NPPS pode inibir a reprodução de colêmbolos *F. candida* a partir de 25 mg kg⁻¹ (Figura 4.3.2). Por outro lado, os enquitreideos apresentaram uma sensibilidade ao NPPS relativamente menor, pois só foram afetados na concentração de 200 mg kg⁻¹ (Figura 4.3.2). Os valores de CE₅₀ (Tabela 4.3.1) também revelam uma diferença de toxicidade do NPPS entre as diferentes espécies.

Tabela 4.3.1 - Valores de CE₅₀ (mg kg⁻¹) obtidos para *Enchytraeus crypticus* e *Folsomia candida* com base nos testes de toxicidade crônica com os compostos isolados (clotianidina e nanoplástico de poliestireno) em Neossolo, e utilizados para a definição das unidades tóxicas (UTs) para os testes de misturas.

Espécie	EC ₅₀ (mg kg ⁻¹)	
	Nanoplástico de poliestireno	Clotianidina
<i>E. crypticus</i>	256 (209 - 303)	2,67 (2,37 – 2,97)
<i>F. candida</i>	75 (59 – 90)	0,045 (0,040 - 0,051)

Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Figura 4.3.2 - Número médio de juvenis de enquitreideos *Enchytraeus crypticus* (esquerda) e colêmbolos *Folsomia candida* (direita) (± desvio padrão) encontrados após a exposição a concentrações crescentes de nanoplástico de poliestireno (NPPS) (cinza) e clotianidina (branco) em Neossolo. Asterisco (*) indica diferença significativa comparado ao respectivo tratamento controle (teste de Dunnett, p ≤ 0,05).



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Embora a grande maioria dos estudos sobre os efeitos tóxicos de resíduos plásticos em invertebrados do solo tenha sido realizada utilizando plásticos em escala micrométrica (SANCHEZ-HERNANDEZ; CAPOWIEZ; RO, 2020), já existem evidências de que os nanoplásticos podem induzir efeitos deletérios em organismos-chave do solo, tal como enquitreídeos (ZHU et al, 2018a) e nematoides (KIM et al., 2020). Os mecanismos responsáveis pelos efeitos deletérios das nanopartículas plásticas sobre organismos do solo ainda precisam ser mais bem elucidados, mas geralmente estão associados a danos físicos e químicos, tal como abrasão de tecidos e bloqueios de canais intestinais (ZHU et al., 2018a), além da indução de estresse oxidativo (KIM et al., 2019).

Embora já existam evidências da presença de NPPS no solo (WAHL et al., 2021), estudos com o objetivo de quantificação dos NPs nos solos são bem mais limitados, o que dificulta o entendimento acerca dos níveis reais aos quais os organismos estarão submetidos no ambiente e, conseqüentemente, a interpretação do nível de risco associado a esta exposição. Até mesmo para MPs, as informações são escassas, principalmente porque as metodologias utilizadas para detectar e quantificar estes materiais encontram-se em constante desenvolvimento e ainda não há uma metodologia padronizada para a quantificação de NPs em matrizes complexas, tal como o solo (CORRADINI et al., 2019). Apesar disso, concentrações de microplásticos de 55,5 mg kg⁻¹ e de 8 – 540 mg kg⁻¹ já foram encontradas, respectivamente, em solos de várzea (SCHEURER; BIGALKE, 2018) e em solos agrícolas (LIU et al., 2018), e em áreas industriais onde a contaminação tende a ser ainda maior, concentrações na faixa de 300 – 67500 mg kg⁻¹ já foram reportadas (FULLER; GAUTAM, 2016). Isto sugere que, em alguns cenários de contaminação elevada, a possível presença de partículas nanoplásticas no solo poderá induzir efeitos tóxicos crônicos nos colêmbolos, embora a probabilidade de risco em áreas agrícolas seja baixa. Para enquitreídeos, entretanto, o risco tende a ser menor, pois esta espécie só foi afetada em concentrações superiores àquelas que induziram efeitos tóxicos nos colêmbolos.

Nos primeiros testes realizados, verificou-se que a CLO causou diminuição da reprodução de ambos os organismos nos testes realizados em solo natural (Figura 4.3.2). Observou-se que os colêmbolos foram substancialmente mais sensíveis à CLO se comparado aos enquitreídeos, pois concentrações de 0,03 mg kg⁻¹ já foram suficientes para causar redução significativa na reprodução destes organismos, enquanto que para os enquitreídeos, este efeito só foi observado a partir de 2,5 mg kg⁻¹. Os valores de CE₅₀ (Tabela 4.3.1) revelam que os

colêmbolos apresentam uma sensibilidade quase 60 vezes maior do que os enquitreideos à CLO.

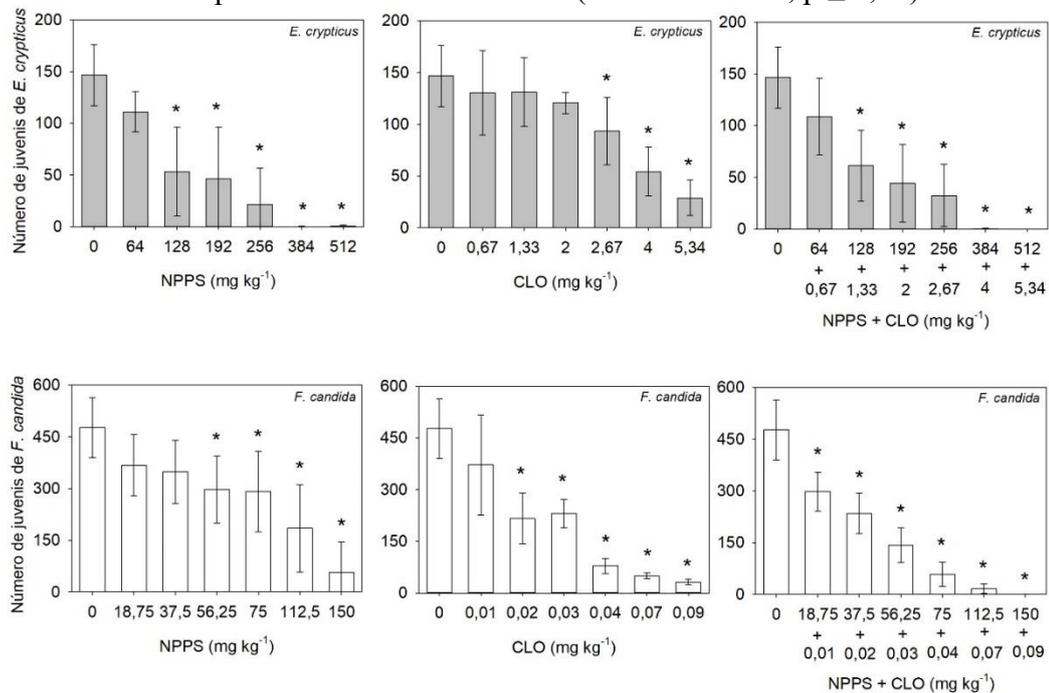
Uma série de mecanismos de ação tóxica podem ser induzidos pela CLO após sua absorção pelos organismos do solo. Este inseticida atua no sistema nervoso, através da ligação irreversível aos receptores nicotínicos da acetilcolina, causando desregulação do fluxo de íons, hiperexcitação neural e, em última instância, a paralisia e morte dos indivíduos expostos (HILTON et al., 2018). Além disso, há evidências de que a CLO pode causar danos ao DNA e alterações na atividade de enzimas antioxidantes e de desintoxicação, além de induzir a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em oligoquetas (LIU et al., 2017). Alguns autores também sugerem que, quando expostos a agrotóxicos, os organismos edáficos tendem a alocar uma maior quantidade de recursos energéticos em processos de desintoxicação, de maneira a garantir sua sobrevivência e, conseqüentemente, o crescimento e a reprodução podem ser prejudicados nestas ocasiões (PELOSI et al., 2014), o que também pode ser uma explicação para os resultados obtidos neste estudo.

Os efeitos crônicos da CLO sobre os organismos do solo natural do Brasil, em especial para os colêmbolos, são preocupantes, pois inibições significativas na reprodução de *F. candida* foram observadas em uma faixa de concentrações que já foram encontradas no ambiente. Concentrações variando entre 0,25 - 0,45 e 0,44 - 0,88 mg kg⁻¹ foram encontrados por Chowdhury et al. (2012) e Ramasubramanian (2013), respectivamente, em solos agrícolas. Estes níveis provavelmente causariam impactos substanciais sobre a reprodução dos colêmbolos. Além disso, Zhang et al. (2016) encontrou uma concentração de CLO de 2,06 mg kg⁻¹, a qual, além de ser altamente prejudicial para os colêmbolos, poderia também causar alguma redução da reprodução de enquitreideos se a exposição ocorresse em Neossolo. No caso dos colêmbolos, até mesmo concentrações residuais de CLO, tal como os níveis encontrados por Botías et al. (2015) (0,029 mg kg⁻¹) 300 dias após o plantio de sementes tratadas, têm potencial para induzir efeitos tóxicos nos colêmbolos. Desta forma, apesar dos estudos de quantificação da clotianidina no solo não terem sido realizados nos solos utilizados neste estudo, os valores podem ser úteis para estimar os níveis aos quais os organismos provavelmente estarão expostos em cenários agrícolas reais.

Os resultados dos testes de mistura realizados a partir da definição das unidades tóxicas (UTs) para os compostos individuais estão apresentados na Figura 4.3.3 e Tabela 4.3.2. Observa-se que o NPPS apresentou uma baixa variação nos valores de toxicidade em relação aos testes anteriores, uma vez que reduziu significativamente a reprodução de *E. crypticus* a

partir de 128 mg kg⁻¹ (comparado a 200 mg kg⁻¹ no teste preliminar), e, para os colêmbolos, impactos significativos foram observados a partir de 56,25 mg kg⁻¹ (comparado a 25 mg kg⁻¹ no teste preliminar). Para a CLO, as diferenças de toxicidade entre os testes foram menores. Reduções significativas na reprodução dos enquitreideos foram observadas a partir de 2,67 mg kg⁻¹ (comparado a 2,5 mg kg⁻¹ no teste preliminar), enquanto que os colêmbolos tiveram seu número de juvenis significativamente reduzidos a partir de 0,02 mg kg⁻¹, comparativamente a 0,03 mg kg⁻¹ no teste anterior. As diferenças de efeito tóxico observadas para o NPPS nos diferentes testes são esperadas, uma vez que se trata de um material produzido em laboratório e com certa heterogeneidade nas partículas formadas, além de se tratar de um material com alta reatividade no solo, o que também pode ajudar a explicar a maior variabilidade de efeito tóxico observado em algumas concentrações testadas (tal como em 128 – 256 mg kg⁻¹ para enquitreideos e > 75 mg kg⁻¹ para colêmbolos).

Figura 4.3.3 - Número médio de juvenis de enquitreideos *Enchytraeus crypticus* (cinza) e colêmbolos *Folsomia candida* (branco) (\pm desvio padrão) encontrados após a exposição a concentrações crescentes de nanoplastico de poliestireno (NPPS), clotianidina (CLO) e suas misturas (NPPS + CLO) em Neossolo. Asterisco (*) indica diferença significativa comparado ao respectivo tratamento controle (teste de *Dunnet*, $p \leq 0,05$).



Fonte: elaborado pelo autor (2024).

Tabela 4.3.2 - Porcentagem de efeito inibitório induzido pelo nanoplastico de poliestireno (NPPS), clotianidina (CLO) e suas misturas (NPPS + CLO) na reprodução de *Enchytraeus crypticus* e *Folsomia candida*. Interação toxicológica estimada com base no modelo de Abbott.

Espécie	NPPS (mg kg ⁻¹) [UT ^a]	A ^b	CLO (mg kg ⁻¹) [UT ^a]	B ^c	Inibição esperada (C _{exp}) (%) ^d	NPPS + CLO (mg kg ⁻¹) [UT ^a]	Inibição observada (C _{obs}) (%)	RI ^e	Natureza da interação	p valor
<i>E. crypticus</i>	64 [0,25]	24,2 ± 13,3	0,67 [0,25]	10,9 ± 27,9	31,8 ± 19,9	64 + 0,67 [0,50]	25,7 ± 25,2	0,81	Efeito aditivo	0,604 ^f
	128 [0,50]	63,7 ± 29,2	1,34 [0,50]	10,5 ± 22,7	68,9 ± 24,4	128 + 1,34 [1,00]	58,1 ± 23,3	0,84	Efeito aditivo	0,382 ^f
	192 [0,75]	68,3 ± 33,9	2,00 [0,75]	17,7 ± 7,1	73,9 ± 28,2	192 + 2,00 [1,50]	69,8 ± 25,8	0,94	Efeito aditivo	0,770 ^f
	256 [1,00]	85,4 ± 23,9	2,67 [1,00]	36,3 ± 22,2	92,0 ± 12,6	256 + 2,67 [2,00]	77,8 ± 20,5	0,86	Efeito aditivo	0,118 ^f
	384 [1,50]	99,8 ± 0,3	4,01 [1,50]	63,0 ± 16,1	99,9 ± 0,2	384 + 4,01 [3,00]	99,7 ± 0,5	1,00	Efeito aditivo	0,391 ^f
	512 [2,00]	99,6 ± 0,7	5,34 [2,00]	80,2 ± 11,6	99,9 ± 0,1	512 + 5,34 [4,00]	100 ± 0,0	1,00	Efeito aditivo	0,079 ^f
<i>F. candida</i>	18,7 [0,25]	22,9 ± 18,7	0,01 [0,25]	22,1 ± 30,5	41,3 ± 24,6	18,7 + 0,01 [0,50]	37,5 ± 11,7	0,91	Efeito aditivo	0,743 ^f
	37,5 [0,50]	26,9 ± 19,2	0,02 [0,50]	54,6 ± 15,3	67,9 ± 10,9	37,5 + 0,02 [1,00]	53,8 ± 10,0	0,79	Efeito aditivo	0,061 ^f
	56,2 [0,75]	37,6 ± 20,4	0,03 [0,75]	51,8 ± 8,6	69,4 ± 13,6	56,2 + 0,03 [1,50]	70,1 ± 10,5	1,01	Efeito aditivo	0,919 ^f
	75,0 [1,00]	38,7 ± 24,5	0,04 [1,00]	83,5 ± 4,7	89,5 ± 5,4	75,0 + 0,04 [2,00]	87,8 ± 7,3	0,98	Efeito aditivo	0,652 ^f
	112,5 [1,50]	61,2 ± 26,5	0,07 [1,50]	89,5 ± 1,9	95,9 ± 2,7	112,5 + 0,07 [3,00]	96,6 ± 3,0	1,01	Efeito aditivo	0,668 ^f
	150,0 [2,00]	88,1 ± 18,7	0,09 [2,00]	93,3 ± 1,8	99,1 ± 1,4	150,0 + 0,09 [4,00]	99,9 ± 0,2	1,01	Efeito aditivo	0,230 ^f

^a UT: unidade tóxica. 1 UT = EC₅₀.

^b A: Efeito de inibição induzido pelo NPPS;

^c B: Efeito de inibição induzido pela CLO;

^d C_{exp}: Inibição esperada calculada pela fórmula de Abbott: Inibição esperada (%) = A + B - (AB/100);

^e RI: razão de inibição. RI = inibição observada/inibição esperada

^f p > 0,05 (Teste de Duncan), indicando efeito aditivo.

Os resultados dos testes de mistura (Tabela 4.3.2) indicam que os efeitos tóxicos da mistura entre NPPS e CLO correspondem à soma dos efeitos individuais observados para cada molécula, uma vez que as interações foram predominantemente aditivas em todas as concentrações testadas. Para *E. crypticus*, a mistura só causou efeito tóxico em concentrações que já haviam causado redução significativa individualmente (isto é, CEO = 128 mg de NPPS kg⁻¹). Contudo, para *F. candida*, a combinação de concentrações individuais sem efeito tóxico (18,75 mg de NPPS kg⁻¹ + 0,01 mg de CLO kg⁻¹) provocou efeito tóxico significativo, indicando que a coexistência destes contaminantes, mesmo quando em níveis individuais teoricamente seguros, pode representar um problema ecotoxicológico para os microartrópodes do solo.

Até o momento, a grande maioria dos estudos avaliando o efeito de misturas de partículas plásticas e pesticidas têm empregado minhocas como organismos teste, e fragmentos plásticos com dimensões micrométricas (MPs; PEÑA; RODRÍGUEZ-LIÉBANA; DELGADO-MORENO, 2023), e, portanto, a utilização de outras oligoquetas e artrópodes em estudos ecotoxicológicos de misturas ainda é incipiente, bem como o emprego de nanoplásticos. Apesar disso, alguns estudos indicam que a presença de microplásticos no solo pode intensificar os efeitos tóxicos induzidos pelos agrotóxicos, principalmente em virtude da facilitação da internalização de moléculas de pesticida pelos organismos expostos, por conta da adsorção destas moléculas na superfície das partículas plásticas (CHENG et al., 2020; SUN et al., 2021). Por exemplo, Li et al. (2020) verificaram que microplásticos agravaram o dano oxidativo do agente antiviral vegetal dufulin sobre minhocas *E. fetida*, provavelmente por conta da adsorção do composto na superfície dos MPs e transporte para diferentes partes do corpo das minhocas. Outros estudos também reportaram que a presença de MPs aumentou a toxicidade de atrazina (CHENG et al., 2020) e clorpirifós (JU et al., 2023), embora não tenham elucidado se este acréscimo corresponde a um sinergismo significativo. Por outro lado, os MPs também podem induzir uma diminuição da biodisponibilidade do agrotóxico e conseqüente redução dos efeitos tóxicos, tal como foi verificado por Dolar et al. (2021) e Selonon et al. (2023) com o inseticida clorpirifós para isópodes *Porcellio scaber*, e *F. candida*.

No nosso estudo, os efeitos combinados do NPPS e da CLO não diferiram significativamente da soma dos efeitos dos compostos individuais, o que indica que o efeito da mistura é de aditividade. Neste sentido, uma possível explicação para estes resultados está relacionada com os diferentes mecanismos de ação e sítios de adsorção do NPPS e da CLO. Enquanto os nanoplásticos atuam principalmente na interrupção do sistema digestivo e

consequente perdas de assimilação de energia (LIU et al., 2021) e na geração de espécies reativas de oxigênio devido à internalização em diferentes células (NOGUEIRA et al., 2022), a CLO atua especificamente nos receptores nicotínicos da acetilcolina, causando interrupção na transmissão de impulsos nervosos (YIN et al., 2023). Desta forma, é possível que o modo de ação de um composto não tenha causado interferência significativa na ação do outro, o que provavelmente explica a soma dos efeitos tóxicos.

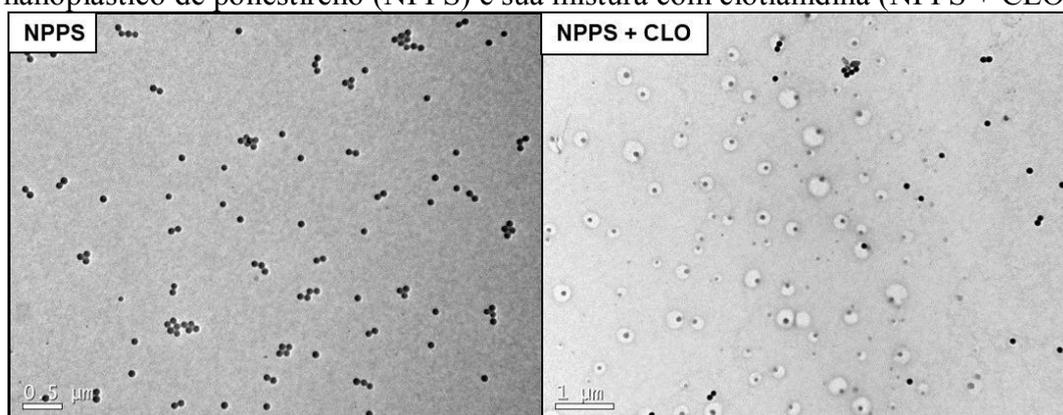
Embora nossos resultados tenham demonstrado que o NPPS causa efeitos tóxicos apenas em concentrações acima de 25 mg kg^{-1} e que seus efeitos combinados com a CLO podem ser previstos por modelos de aditividade, há de se ter em mente que concentrações ambientalmente relevantes de MP/NPs podem modificar o efeito tóxico de outros contaminantes, apesar de individualmente não causarem grande risco às espécies do solo. Por exemplo, a presença de MPs de diferentes naturezas aumentou a acumulação dos pesticidas fenantreno (XU et al., 2021), atrazina (SONG et al., 2023) e 2, 4-D (BOUGHATTAS et al., 2024) em minhocas *Eisenia andrei/fetida*. Neste contexto, verificou-se que a CLO isoladamente só induziu efeitos tóxicos significativos em concentrações a partir de $0,02 \text{ mg kg}^{-1}$, mas quando esteve em combinação com os NPPS, passou a ter efeitos significativos a partir da concentração de $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$. Isso indica que em cenários de contaminação pura, temos um nível de risco que já é ambientalmente relevante, mas em cenários de contaminação combinada (que é a maior parte da realidade dos solos), o risco de toxicidade pode dobrar. Ainda neste viés, embora não tenha sido investigado nesta tese, recomenda-se avaliar a influência de concentrações ambientalmente relevantes do nanoplástico sobre a bioacumulação e toxicidade de neonicotinoídeos para invertebrados do solo, uma vez que concentrações muito inferiores às testadas neste estudo podem interferir no nível tóxico dos neonicotinoídeos.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO DO EXPERIMENTO IV: Efeitos individuais e em mistura da clotianidina e do nanoplastico de poliestireno sobre quatro espécies de organismos aquáticos

4.4.1 Caracterização das NPPS isoladas e em mistura com CLO

A imagem de microscopia eletrônica de transmissão (MET; Figura 4.4.1) demonstrou que a síntese resultou em partículas esféricas, com diâmetro de $92,6 \pm 4,4$ nm. O potencial Zeta (PZ) das NPPS em água ultrapura e meios de cultivo foi inferior a -40 mV (Tabela 4.4.1), indicando que as NPPS são negativamente carregadas e possuem alta estabilidade em suspensão. O diâmetro efetivo (DE) médio das NPPS foi $156,44$ em água ultrapura apresentou uma tendência de aumento nos meios de cultivo. Os valores do índice de polidispersão (IPD) inferiores a $0,30$ revelam que as NPPS estão monodispersas em todos os meios testados (Tabela 4.4.1). A adição da CLO promoveu uma tendência de aumento no DE das NPPS, bem como um decréscimo nos valores de ZP, especialmente em meio ISO e M4. Além disso, as imagens de MET revelaram nanopartículas cercadas por algum material (Figura 4.4.1), o que pode ser devido à presença da CLO.

Figura 4.4.1 - Comparativo das imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) do nanoplastico de poliestireno (NPPS) e sua mistura com clotianidina (NPPS + CLO).



Fonte: elaborado pelo autor (2023).

Tabela 4.4.1 - Potencial Zeta (PZ), Diâmetro Efetivo (DE) e Índice de Polidispersão (IPD) obtidos para o nanoplástico de poliestireno isolado (NPPS) e na presença da clotianidina (CLO), nos diferentes meios utilizados nos ensaios.

Composto	Meio	PZ (mV) ^a	DE (nm) ^b	IPD ^c
NPPS (200 mg L ⁻¹)	H ₂ O	-68,67 ± 2,55	156,44 ± 5,40	0,25 ± 0,01
	ISO	-48,38 ± 0,34	161,92 ± 2,15	0,28 ± 0,01
	M4	-47,70 ± 0,97	167,32 ± 7,17	0,26 ± 0,07
	BBM	-66,57 ± 2,05	158,80 ± 2,72	0,28 ± 0,01
NPPS (200 mg L ⁻¹) +	H ₂ O	-59,54 ± 1,60	163,89 ± 4,45	0,26 ± 0,01
	ISO	-23,25 ± 0,57*	166,26 ± 2,36	0,27 ± 0,01
CLO (200 mg L ⁻¹)	M4	-23,20 ± 2,03*	169,68 ± 3,52	0,25 ± 0,01
	BBM	-57,39 ± 2,24*	163,17 ± 0,79	0,27 ± 0,01

^a PZ: potencial zeta – medida de estabilidade da partícula no meio.

^b DE: diâmetro efetivo – medida da área de influência da partícula no meio, considerando seu tamanho real mais a camada elétrica formada em sua superfície.

^c IPD: índice de polidispersão – valores inferiores a 0,30 indicam que as partículas estão monodispersas.

* diferença significativa em relação ao NPPS isolado ($p < 0,05$, teste de Tukey).

4.4.2 Testes de toxicidade com *D. magna*

4.4.2.1 Testes de toxicidade aguda com *D. magna*

Os resultados dos testes de toxicidade aguda com *D. magna* estão apresentados na Tabela 4.4.2. Após 48h de exposição, efeitos de imobilização foram observados em organismos expostos a concentrações de 75 mg NPPS L⁻¹ e 67 mg CLO L⁻¹. As maiores concentrações testadas para os compostos individuais causaram 100% (NPPS) e 90% (CLO) de imobilização. Antagonismo significativo ($p < 0.05$) foi observado em todas as combinações de misturas de NPPS e CLO testadas (Tabela 4.4.2).

Tabela 4.4.2 - Porcentagem de efeito inibitório induzido pelo nanoplástico de poliestireno (NPPS), clotianidina (CLO) e suas misturas (NPPS + CLO) na imobilização e natação de *D. magna* (48 h de exposição), crescimento de *Lemna minor* (7 dias de exposição) e crescimento de *Chlamydomonas reinhardtii* e *Microcystis aeruginosa* (72 h de exposição).

Espécie	Endpoint	NPPS	A ^b	CLO	B ^c	Inibição esperada	NPPS + CLO	Inibição observada	RI ^e	Natureza da interação	p valor	
		(mg L ⁻¹) [UT ^a]		(mg L ⁻¹) [UT ^a]		(C _{exp}) (%) ^d	(mg L ⁻¹) [UT ^a]	(C _{obs}) (%)				
<i>D. magna</i>	Imobilidade	25 [0,125]	0	22 [0,125]	0	0	22 + 25 [0,25]	0	-	-	-	
		50 [0,25]	0	45 [0,25]	0	0	50 + 45 [0,5]	0	-	-	-	
		75 [0,375]	15,6 ± 5,9	67 [0,375]	8,3 ± 2,9	22,5 ± 7,5	75 + 67 [0,75]	3,3 ± 2,9	0,13	Antagonismo ^f	0,015*	
		99 [0,50]	17,5 ± 6,5	89 [0,50]	7,5 ± 2,9	23,7 ± 6,5	99 + 89 [1]	8,7 ± 4,8	0,36	Antagonismo ^f	0,011*	
		149 [0,75]	41,3 ± 15,5	134 [0,75]	21,3 ± 4,8	53,9 ± 11,0	149 + 134 [1,5]	8,7 ± 6,3	0,17	Antagonismo ^f	< 0,001*	
		199 [1]	65,0 ± 18,7	178 [1]	49,4 ± 13,6	81,9 ± 10,4	199 + 178 [2]	20,0 ± 14,1	0,26	Antagonismo ^f	< 0,001*	
		298 [1,5]	95,0 ± 5,0	267 [1,5]	60,0 ± 13,2	98,3 ± 1,4	298 + 267 [3]	28,3 ± 17,6	0,29	Antagonismo ^f	0,002*	
		398 [2]	100,0 ± 0,0	357 [2]	90,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	398 + 357 [4]	40,0 ± 18,0	0,40	Antagonismo ^f	0,005*	
	Natação (teste agudo)	50 [0,25]	48,3 ± 12,9	45 [0,25]	4,8 ± 24,8	49,5 ± 17,0	50 + 45 [0,50]	8,9 ± 22,9	0,18	Antagonismo ^f	< 0,001*	
		99 [0,50]	70,7 ± 15,0	89 [0,50]	82,8 ± 9,3	94,7 ± 3,9	99 + 89 [1]	75,3 ± 18,6	0,88	Antagonismo ^f	0,032*	
		149 [0,75]	83,3 ± 13,7	134 [0,75]	77,2 ± 19,7	97,1 ± 2,2	149 + 134 [1,5]	78,6 ± 15,1	0,83	Antagonismo ^f	0,002*	
		199 [1]	83,0 ± 9,9	178 [1]	76,0 ± 13,3	95,3 ± 4,1	199 + 178 [2]	82,6 ± 15,3	0,86	Antagonismo ^f	0,021*	
	<i>L. minor</i>	Número de frondes	1	0	1	0	0	1 + 1	0	-	-	-
			10	0	10	0	0	10 + 10	0	-	-	-
100			2,8 ± 3,3	100	10,7 ± 9,0	13,2 ± 8,8	100 + 100	1,5 ± 5,2	0,11	Antagonismo ^f	0,016*	
500			12,1 ± 1,4	500	18,8 ± 4,1	28,7 ± 3,6	500 + 500	24,6 ± 4,3	0,86	Aditivo	0,202	
Comprimento de raiz		1000	21,7 ± 5,0	1000	21,1 ± 8,3	38,0 ± 8,2	1000 + 1000	27,3 ± 12,7	0,72	Aditivo	0,140	
		1	0	1	0	0	1 + 1	0	-	-	-	
		10	0	10	0	0	10 + 10	0	-	-	-	
		100	0	100	15,1 ± 12,5	11,6 ± 31,7	100 + 100	16,8 ± 23,0	1,45	Aditivo	0,724	
		500	4,8 ± 3,9	500	32,0 ± 11,2	35,6 ± 10,3	500 + 500	15,7 ± 9,9	0,44	Antagonismo ^f	0,005*	
		1000	8,6 ± 12,7	1000	67,7 ± 4,9	70,2 ± 7,6	1000 + 1000	49,1 ± 5,5	0,70	Antagonismo ^f	0,002*	
<i>C. reinhardtii</i>	Taxa de crescimento	35,2	0	35,2	0	0	35,2 + 35,2	0	-	-	-	
		70,5	0	70,5	0	0	70,5 + 70,5	0	-	-	-	
		105,7	27,4 ± 5,0	105,7	16,7 ± 3,3	39,4 ± 6,6	105,7 + 105,7	10,3 ± 3,2	0,26	Antagonismo ^f	< 0,001*	
		140,9	55,0 ± 27,2	140,9	11,1 ± 5,8	60,6 ± 24,4	140,9 + 140,9	5,3 ± 7,8	0,09	Antagonismo ^f	0,005*	
		211,4	79,3 ± 15,4	211,4	0	78,2 ± 16,6	211,4 + 211,4	2,4 ± 8,0	0,03	Antagonismo ^f	< 0,001*	
<i>M. aeruginosa</i>	Taxa de crescimento	1,9 [0,25]	0	46,9 [0,25]	0	0	46,9 + 1,9 [0,50]	0	-	-	-	
		3,8 [0,50]	0	93,8 [0,50]	15,1 ± 3,9	15,1 ± 3,9	93,8 + 3,8 [1,00]	7,9 ± 4,5	0,53	Antagonismo ^f	0,012*	
		5,7 [0,75]	15,5 ± 31,0	140,6 [0,75]	19,8 ± 4,0	32,8 ± 24,0	140,6 + 5,7 [1,5]	22,9 ± 5,7	0,70	Aditivo	0,456	
		7,6 [1,00]	26,1 ± 24,5	187,5 [1,00]	47,2 ± 14,3	63,3 ± 4,1	187,5 + 7,6 [2]	61,6 ± 11,7	0,97	Aditivo	0,825	
		11,4 [1,5]	100,0 ± 0,0	281,3 [1,50]	100,0 ± 0,0	100,00 ± 0,0	281,3 + 11,4 [3]	100,0 ± 0,0	1,00	Aditivo	-	

^a UT: unidade tóxica. 1 UT = EC₅₀.

^b Efeito de inibição induzido pelo NPPS;

^c Efeito de inibição induzido pela CLO;

^d Inibição esperada calculada pela fórmula de Abbott: Inibição esperada (%) = A + B - (AB/100);

^e RI: razão de inibição. RI = inibição observada/inibição esperada

^f* p < 0,05 (Teste de Duncan), indicando antagonismo significativo para valores de RI menores do que 1.

4.4.2.2 Testes de toxicidade crônica e multigeracionais com *D. magna*

Os resultados dos testes crônicos com *D. magna* estão apresentados nas Tabelas 4.4.3, 4.4.4 e 4.4.5. Na geração exposta (F0), as NPPS reduziram significativamente o crescimento das mães e o número de filhotes por ninhada, bem como causaram um atraso na idade da primeira ninhada a partir de 4,97 mg L⁻¹ (Tabela 4.4.3). A exposição à maior concentração testada de CLO (17,83 mg L⁻¹) reduziu significativamente o crescimento das mães. Por outro lado, nenhum efeito tóxico da CLO foi observado nos demais parâmetros estudados (Tabela 4.4.4). No teste de mistura, efeitos negativos significativos na reprodução e crescimento da geração exposta (F0) foram observados apenas na maior concentração da mistura (19,88 mg L⁻¹ NPPS + 17,83 mg L⁻¹ CLO; Tabela 4.4.5).

Nos testes multigeracionais de recuperação com *D. magna*, as gerações F1 e F2 obtidas a partir de mães expostas à CLO não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros reprodutivos e de crescimento quando comparados com aqueles obtidos a partir de mães não expostas (apenas M4) (Tabela 4.4.4). Por outro lado, filhotes obtidos a partir da geração parental exposta a 19,88 mg L⁻¹ NPPS (geração F1) apresentaram um atraso na primeira ninhada, mas este efeito desapareceu na geração F2 (Tabela 4.4.3). Uma primeira ninhada com atraso também foi encontrada na geração F1 obtida a partir da geração parental exposta a 4,97 mg L⁻¹ NPPS + 4,46 mg L⁻¹ CLO e concentrações da mistura acima destas. Da mesma forma, este efeito de atraso não se repetiu na geração F2 (Tabela 4.4.5).

Tabela 4.4.3 - Resultados do teste de toxicidade crônica com nanoplastico de poliestireno (NPPS) em termos de longevidade, crescimento e reprodução (média ± desvio padrão; n = 10). CENO: concentração de efeito não observado. CEO: concentração de efeito observado. Asterisco (*) indica diferença significativa entre o tratamento e o respectivo controle (teste de post-hoc de *Dunnet*; $p < 0,05$).

Ensaio	Concentração (mg L ⁻¹)	Longevidade: sobrevivência (%)	Crescimento: comprimento (mm)	Reprodução: filhotes/ninhada	Idade da primeira ninhada
NPPS – Exposição (F0)	Controle	100	3,27 ± 0,13	8,68 ± 0,70	12,00 ± 1,33
	2,49	100	3,32 ± 0,18	9,84 ± 1,44	11,50 ± 0,97
	4,97	80	2,98 ± 0,21*	5,16 ± 2,89*	17,00 ± 4,07*
	9,94	60	2,88 ± 0,19*	5,40 ± 2,71*	17,00 ± 3,67*
	19,88	30 *	2,55 ± 0,07*	3,33 ± 3,51*	20,00 ± 1,41*
	CENO	9,94	2,49	2,49	2,49
	CEO	19,88	4,97	4,97	4,97
NPPS – Recuperação (F1)	Controle	100	3,52 ± 0,08	9,85 ± 1,97	9,70 ± 0,95
	2,49	100	3,53 ± 0,08	10,05 ± 1,96	9,70 ± 0,48
	4,97	100	3,41 ± 0,14	9,74 ± 2,24	9,10 ± 0,32
	9,94	100	3,50 ± 0,13	9,83 ± 1,69	9,10 ± 0,32
	19,88	33 *	3,45 ± 0,07	7,66 ± 0,00	15,00 ± 0,00 *
	CENO	9,94	19,88	19,88	9,94
	CEO	19,88	> 19,88	> 19,88	19,88
NPPS – Recuperação (F2)	Controle	100	3,39 ± 0,14	10,29 ± 1,53	10,60 ± 1,07
	2,49	100	3,36 ± 0,08	10,38 ± 1,94	10,60 ± 0,84
	4,97	100	3,41 ± 0,09	10,77 ± 1,16	9,67 ± 1,22
	9,94	100	3,43 ± 0,12	10,21 ± 1,11	10,10 ± 0,88
	19,88	100	3,32 ± 0,13	9,53 ± 0,85	10,20 ± 0,92
	CENO	19,88	19,88	19,88	19,88
	CEO	> 19,88	> 19,88	> 19,88	> 19,88

Tabela 4.4.4 - Resultados do teste de toxicidade crônica com clotianidina (CLO) em termos de longevidade, crescimento e reprodução (média \pm desvio padrão; n = 10). CENO: concentração de efeito não observado. CEO: concentração de efeito observado. Asterisco (*) indica diferença significativa entre o tratamento e o respectivo controle (teste de post-hoc de *Dunnet*; $p < 0,05$).

Ensaio	Concentração (mg L ⁻¹)	Longevidade: sobrevivência (%)	Crescimento: comprimento (mm)	Reprodução: filhotes/ninhada	Idade da primeira ninhada
CLO – Exposição (F0)	Controle	100	3,36 \pm 0,13	9,29 \pm 0,97	11,33 \pm 1,00
	2,23	100	3,39 \pm 0,20	9,81 \pm 0,98	11,11 \pm 1,05
	4,46	100	3,31 \pm 0,10	9,46 \pm 0,90	10,88 \pm 0,83
	8,92	100	3,37 \pm 0,11	9,91 \pm 0,97	11,22 \pm 0,67
	17,83	100	3,06 \pm 0,15*	10,25 \pm 1,34	11,56 \pm 0,73
	CENO	17,83	8,92	17,83	17,83
	CEO	>17,83	17,83	>17,83	>17,83
CLO – Recuperação (F1)	Controle	100	3,37 \pm 0,13	8,38 \pm 0,66	10,00 \pm 0,00
	2,23	100	3,32 \pm 0,09	7,67 \pm 0,98	10,67 \pm 1,32
	4,46	100	3,35 \pm 0,08	8,32 \pm 0,91	10,00 \pm 0,00
	8,92	100	3,44 \pm 0,07	7,69 \pm 1,47	10,00 \pm 0,00
	17,83	100	3,46 \pm 0,11	8,84 \pm 1,42	10,10 \pm 0,32
	CENO	17,83	17,83	17,83	17,83
	CEO	>17,83	>17,83	>17,83	>17,83
CLO – Recuperação (F2)	Controle	100	3,38 \pm 0,10	10,08 \pm 1,21	10,22 \pm 0,83
	2,23	100	3,43 \pm 0,12	9,93 \pm 0,90	10,20 \pm 0,63
	4,46	100	3,34 \pm 0,13	8,73 \pm 1,36	10,70 \pm 1,16
	8,92	100	3,46 \pm 0,11	11,03 \pm 1,46	10,00 \pm 1,15
	17,83	100	3,36 \pm 0,16	9,38 \pm 2,06	10,70 \pm 1,42
	CENO	17,83	17,83	17,83	17,83
	CEO	>17,83	>17,83	>17,83	>17,83

Tabela 4.4.5 - Resultados do teste de toxicidade crônica com a mistura (NPPS + CLO) em termos de longevidade, crescimento e reprodução (média \pm desvio padrão; n = 10). Asterisco (*) indica diferença significativa entre o tratamento e o respectivo controle (teste de post-hoc de *Dunnet*; $p < 0,05$).

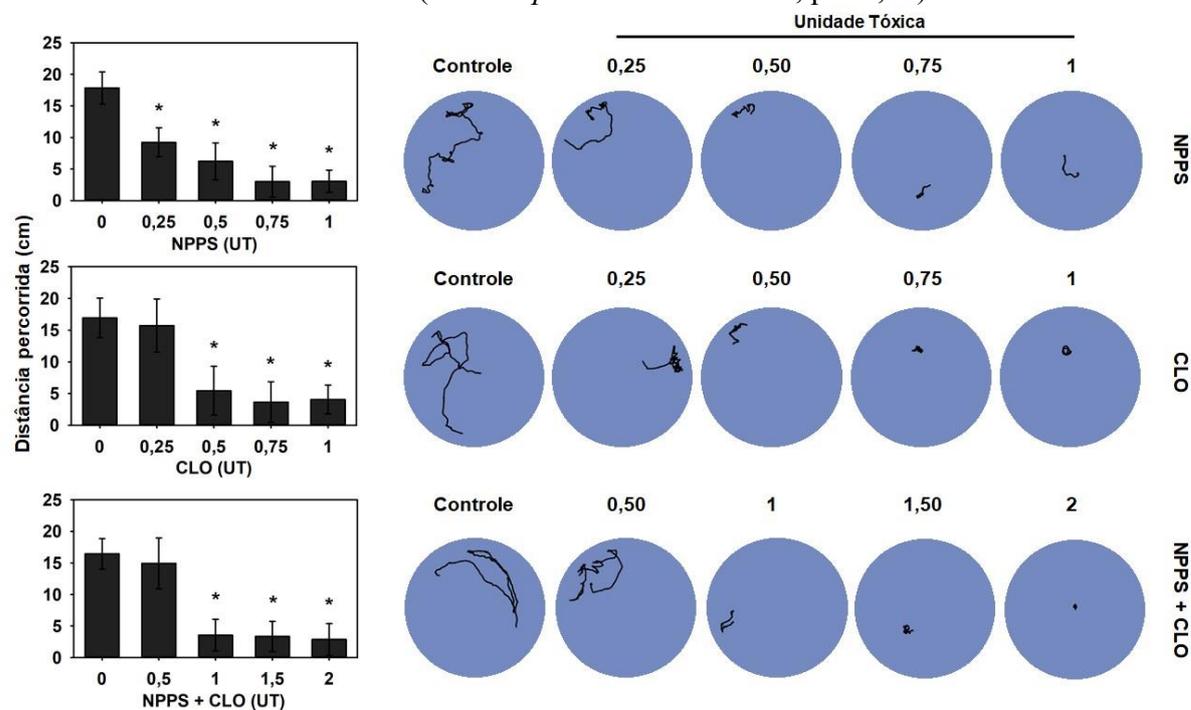
Ensaio	Concentração (mg L ⁻¹)	Longevidade: sobrevivência (%)	Crescimento: comprimento (mm)	Reprodução: filhotes/ninhada	Idade da primeira ninhada
Mistura (NPPS + CLO) Exposição (F0)	Controle	100	3,44 \pm 0,11	10,59 \pm 1,01	10,63 \pm 1,69
	2,49 (PSNP) + 2,23 (CLO)	100	3,41 \pm 0,14	11,74 \pm 1,30	11,00 \pm 1,41
	4,97 (PSNP) + 4,46 (CLO)	100	3,41 \pm 0,12	11,83 \pm 0,99	11,00 \pm 0,94
	9,94 (PSNP) + 8,92 (CLO)	100	3,32 \pm 0,16	10,89 \pm 0,73	11,22 \pm 1,09
	19,88 (PSNP) + 17,83 (CLO)	100	2,99 \pm 0,15*	9,56 \pm 0,95*	12,56 \pm 0,88*
Mistura (NPPS + CLO) Recuperação (F1)	Controle	100	3,32 \pm 0,08	7,85 \pm 0,58	9,50 \pm 0,53
	2,49 (PSNP) + 2,23 (CLO)	100	3,29 \pm 0,08	7,24 \pm 1,57	10,56 \pm 1,33
	4,97 (PSNP) + 4,46 (CLO)	100	3,28 \pm 0,08	7,62 \pm 1,05	11,70 \pm 1,83*
	9,94 (PSNP) + 8,92 (CLO)	100	3,29 \pm 0,08	7,35 \pm 0,99	11,75 \pm 1,91*
	19,88 (PSNP) + 17,83 (CLO)	100	3,29 \pm 0,08	7,42 \pm 0,77	11,67 \pm 1,87*
Mistura (NPPS + CLO) Recuperação (F2)	Controle	100	3,35 \pm 0,14	7,06 \pm 1,48	9,30 \pm 0,48
	2,49 (PSNP) + 2,23 (CLO)	100	3,33 \pm 0,14	7,69 \pm 0,61	9,56 \pm 1,13
	4,97 (PSNP) + 4,46 (CLO)	100	3,31 \pm 0,09	8,24 \pm 1,21	9,90 \pm 1,52
	9,94 (PSNP) + 8,92 (CLO)	100	3,28 \pm 0,17	7,46 \pm 0,89	10,50 \pm 1,73
	19,88 (PSNP) + 17,83 (CLO)	100	3,34 \pm 0,13	7,97 \pm 1,03	9,63 \pm 0,52

4.4.2.3 Testes de natação com *D. magna*

Os resultados dos testes de comportamento de natação, após a exposição aguda, estão apresentados na Figura 4.4.2. Uma redução significativa na distância percorrida foi observada em todas as concentrações de NPPS testadas, e a partir de 0,5 UT (89 mg L⁻¹) da CLO (Tabela 4.4.2 e Figura 4.4.2). Antagonismo significativo ($p < 0,05$) foi detectado para todas as combinações de misturas testadas, mas especialmente na menor concentração da mistura, nas quais o efeito observado foi inferior a 20% do esperado (RI = 0,18; Tabela 4.4.2). Organismos expostos a concentrações a partir de 0,5 UT nos ensaios com os compostos individuais, e a partir de 1 UT nos ensaios com as misturas, apresentaram sinais de desorientação, com trajetórias de natação menores e mais restritas a pequenas áreas (Figura 4.4.2).

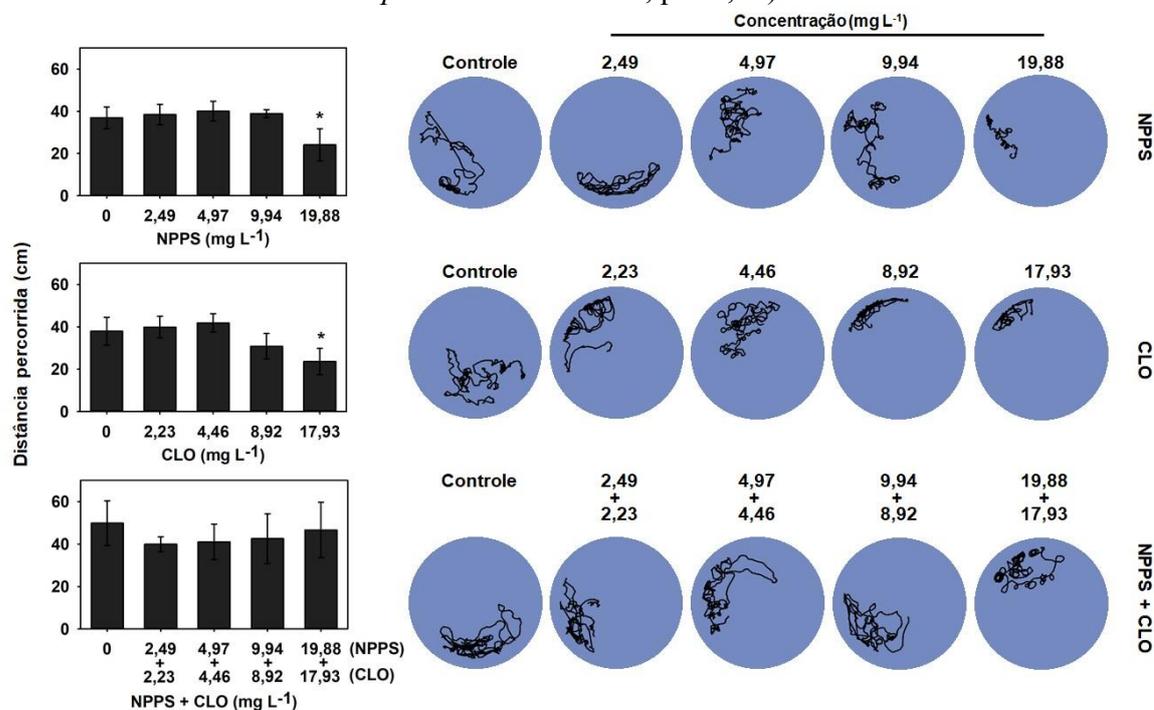
Os resultados dos testes de comportamento de natação após a exposição crônica estão apresentados na Figura 4.4.3. Apenas os indivíduos expostos às maiores concentrações de NPPS (19,88 mg L⁻¹) e da CLO (17,93 mg L⁻¹) nos testes com os compostos individuais apresentaram uma redução significativa na distância percorrida. Por outro lado, nenhuma redução na distância percorrida foi observada quando estas concentrações foram combinadas (19,88 mg NPPS L⁻¹ + 17,93 mg CLO L⁻¹), revelando uma interação de antagonismo (efeitos menores do que os esperados) entre o NPPS e a CLO.

Figura 4.4.2 - Distâncias e trajetórias de natação dos neonatos de *D. magna* (média \pm desvio padrão; $n = 10$) após 48h de exposição a concentrações crescentes (expressas em unidades tóxicas – UT) de nanoplastico de poliestireno (NPPS), clotianidina (CLO) e suas misturas (NPPS + CLO). Asterisco (*) indica diferença significativa entre o controle e o respectivo tratamento (teste de *post-hoc* de Dunnett, $p < 0,05$).



Fonte: elaborado pelo autor (2023).

Figura 4.4.3 - Distâncias e trajetórias de natação das *D. magna* adultas (média \pm desvio padrão; n = 10) após 21 dias de exposição (teste crônico) a concentrações crescentes de nanoplástico de poliestireno (NPPS), clotianidina (CLO) e suas misturas (NPPS + CLO). Asterisco (*) indica diferença significativa entre o controle e o respectivo tratamento (teste de *post-hoc* de Dunnett, $p < 0,05$).



Fonte: elaborado pelo autor (2023).

Os resultados demonstraram que o NPPS induziu tanto efeitos agudos quanto crônicos no microcrustáceo *D. magna*. Uma pequena diferença entre os valores de EC_{50} (imobilização aguda) do nosso estudo (199 [181 – 216] mg L⁻¹) e estudos anteriores com NPPS (VICENTINI et al. (2019): 266 [240 – 294] mg L⁻¹; NOGUEIRA et al. (2022): 244 [232 – 255] mg L⁻¹) pode ser observada. Além disso, nos nossos testes crônicos, efeitos de inibição significativos nos parâmetros de reprodução iniciaram em uma menor concentração (4,97 mg L⁻¹) se comparado a Vicentini et al. (2019) (26,6 mg L⁻¹) e Nogueira et al. (2022) (13,24 mg L⁻¹). Estas diferenças revelam que os nanoplásticos possuem efeitos tóxicos muito particulares, e que mesmo NPs com tamanhos e formas semelhantes (tal como o deste trabalho e dos estudos citados) podem provocar efeitos toxicológicos distintos.

Até o momento, a toxicidade do NPPS vem sendo atribuída a diferentes mecanismos, tal como estresse oxidativo e disfunção mitocondrial (NOGUEIRA et al., 2022), desregulação da atividade de enzimas antioxidantes e desintoxicantes (DE FELICE et al., 2022) e de genes relacionados à resposta ao estresse (FADARE et al., 2019), bem como a indução de processos

inflamatórios e deficiências na assimilação de energia devido à acumulação dos nanoplásticos no sistema digestivo (LIU et al., 2021). Além do mais, a aderência de partículas nanoplásticas nas antenas e na carapaça dos microcrustáceos (VICENTINI et al., 2019; ZOCCHI E SOMARUGA, 2019) pode ter contribuído para a redução da distância nadada pelos organismos expostos ao NPPS (Figuras 4.4.2 e 4.4.3), o que também já foi reportado em outros estudos (PIKUDA et al., 2019; VAZ et al., 2021; NOGUEIRA et al., 2022).

A exposição de *D. magna* à CLO induziu efeitos tóxicos relativamente baixos nos testes agudos (Tabela 4.4.2), com efeitos de inibição sendo observados apenas a partir de 67 mg L⁻¹. Os resultados obtidos são consistentes com a literatura, a qual também aponta baixa toxicidade da CLO para *D. magna*, com EC_{50s} (imobilização aguda) variando de 11,43 a > 500 mg L⁻¹ (TAKÁCS et al., 2017; HAYASAKA et al., 2013). Baixa toxicidade também foi observada nos testes crônicos; o comprimento das *D. magna* adultas foi o único parâmetro afetado, e apenas na maior concentração de CLO testada (Tabela 4.4.4). Por outro lado, o comportamento de natação dos organismos aparenta ser um parâmetro mais sensível, uma vez que reduções significativas nas distâncias nadadas foram observadas em concentrações inferiores àquelas que causam imobilização no teste agudo (Figura 4.4.3 e Tabela 4.4.2). Os efeitos tóxicos da CLO provavelmente estão relacionados à inativação dos receptores nicotínicos da acetilcolina e da consequente desordem causada no sistema nervoso central, a qual muito provavelmente compromete a capacidade locomotora dos organismos expostos (Raby et al., 2018), levando à desorientação e paralisia. Até onde foi pesquisado pelos envolvidos neste estudo, esta tese de doutorado representa o primeiro estudo avaliando os impactos da CLO sobre o comportamento de natação de *D. magna*, entretanto, Bownik, Pawłocik e Sokołowska (2017) constataram que o neonicotinoide acetamiprido reduziu a velocidade de natação de *D. magna* em concentrações entre 25 – 100 mg L⁻¹, o que é consistente com os nossos resultados.

Os resultados dos testes crônicos multigeracionais de recuperação revelaram que, de maneira geral, os efeitos tóxicos induzidos pelos compostos individuais na geração exposta (F0) não foram transferidos para as próximas gerações (F1 e F2; Tabelas 4.4.3 e 4.4.4), com exceção da maior concentração de NPPS testada, a qual impactou a longevidade e atrasou a idade da primeira ninhada da geração subsequente (F1). Por outro lado, os filhotes obtidos a partir da geração parental exposta a todas as concentrações de misturas (NPPS + CLO) apresentaram um atraso na idade da primeira ninhada (Tabela 4.4.5), o que pode ter relação também com o

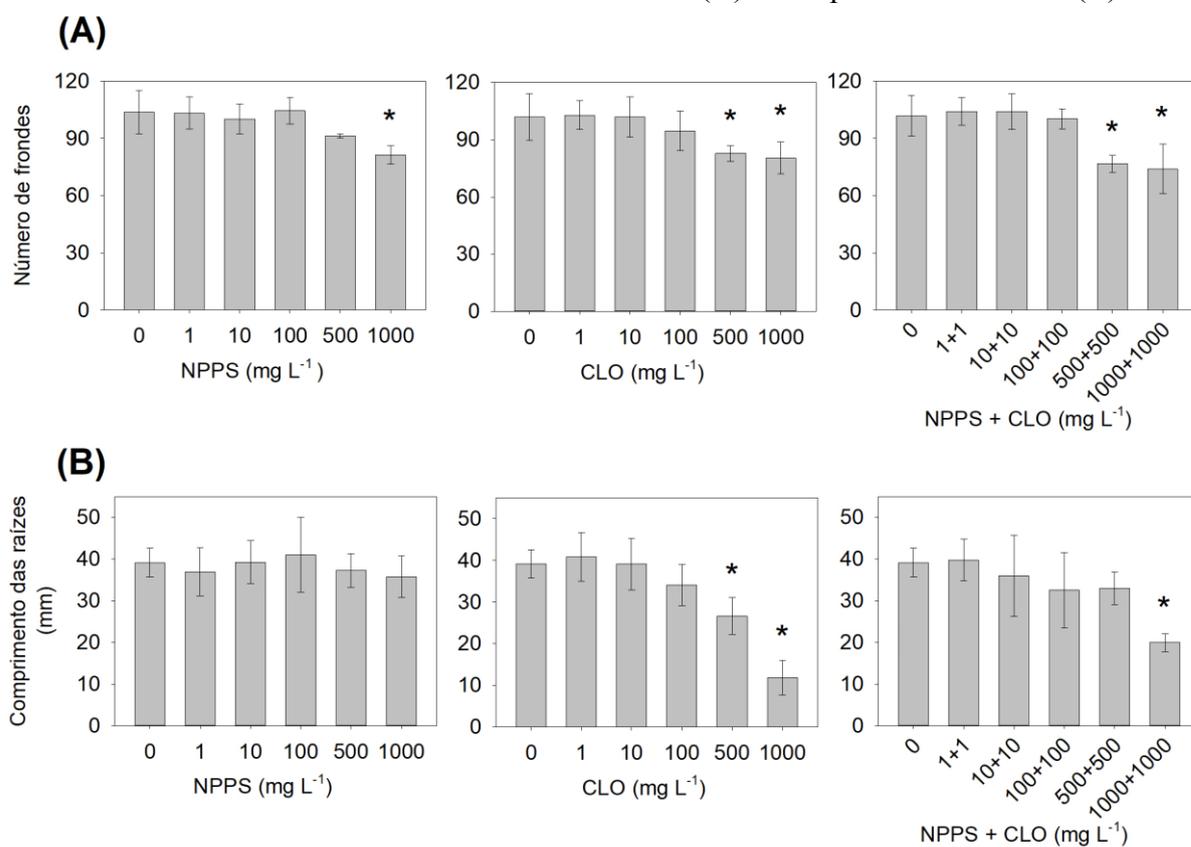
crescimento reduzido das mães. Atrasos na reprodução de *D. magna* também foram observados na geração F1 nos ensaios de recuperação realizados com a geração parental (F0) exposta a misturas de glifosato e NPPS (NOGUEIRA et al., 2022) e glifosato e nanopartículas de prata (DA SILVA et al., 2021). O atraso na produção de filhotes pode ter implicações ecológicas negativas para o crescimento da população de *D. magna* e seu estabelecimento em ambientes naturais (SANCHO; VILLARROEL; FERRANDO, 2016), bem como para comunidades do fitoplâncton que são usadas como fonte de alimento pelos microcrustáceos (CHRISTENSEN et al., 2005).

Por outro lado, foi observado uma recuperação completa da geração F2 para todos os tratamentos estudados (tanto para os compostos individuais quanto para as misturas), o que indica que as *D. magna* provavelmente estarão aptas a se recuperarem a longo prazo se a contaminação for interrompida. Ressalta-se, contudo, que os ensaios de recuperação deste estudo são limitas a apenas duas gerações filiais (F1 e F2), e, portanto, o aparecimento de efeitos deletérios em gerações futuras não pode ser descartado. Estudos adicionais com exposição multigeracional prolongada a misturas ainda são necessários para esclarecer os potenciais riscos.

4.4.3 Testes de inibição de crescimento com *L. minor*

Os resultados dos testes de inibição de crescimento com macrófitas *L. minor* estão apresentados na Figura 4.4.4. Efeitos de inibição significativos do NPPS sobre o número de frondes foram observados apenas na maior concentração testada (CEO = 1000 mg L⁻¹). O comprimento das raízes não foi afetado pelo NPPS até 1000 mg L⁻¹ (Figura 4.4.5). Por outro lado, a CLO diminuiu significativamente o número de frondes geradas e o comprimento de raízes a partir de 500 mg L⁻¹ (Figuras 4.4.4 e 4.4.5). Baixa toxicidade também foi observada para as misturas, com interações toxicológicas variando de antagonismo a efeito aditivo (Tabela 4.4.2).

Figura 4.4.4 - Resultados dos testes de inibição de crescimento com *Lemna minor* expostas (7 dias) a concentrações crescentes de nanoplástico de poliestireno (NPPS), clotianidina (CLO) e suas misturas em termos de número de frondes (A) e comprimento de raízes (B).



Fonte: elaborado pelo autor (2023).

Figura 4.4.5 - Fotografia das raízes de *Lemna minor*, 7 dias após a exposição a concentrações crescentes de nanoplástico de poliestireno (NPPS), clotianidina (CLO) e suas misturas.



Fonte: elaborado pelo autor (2023).

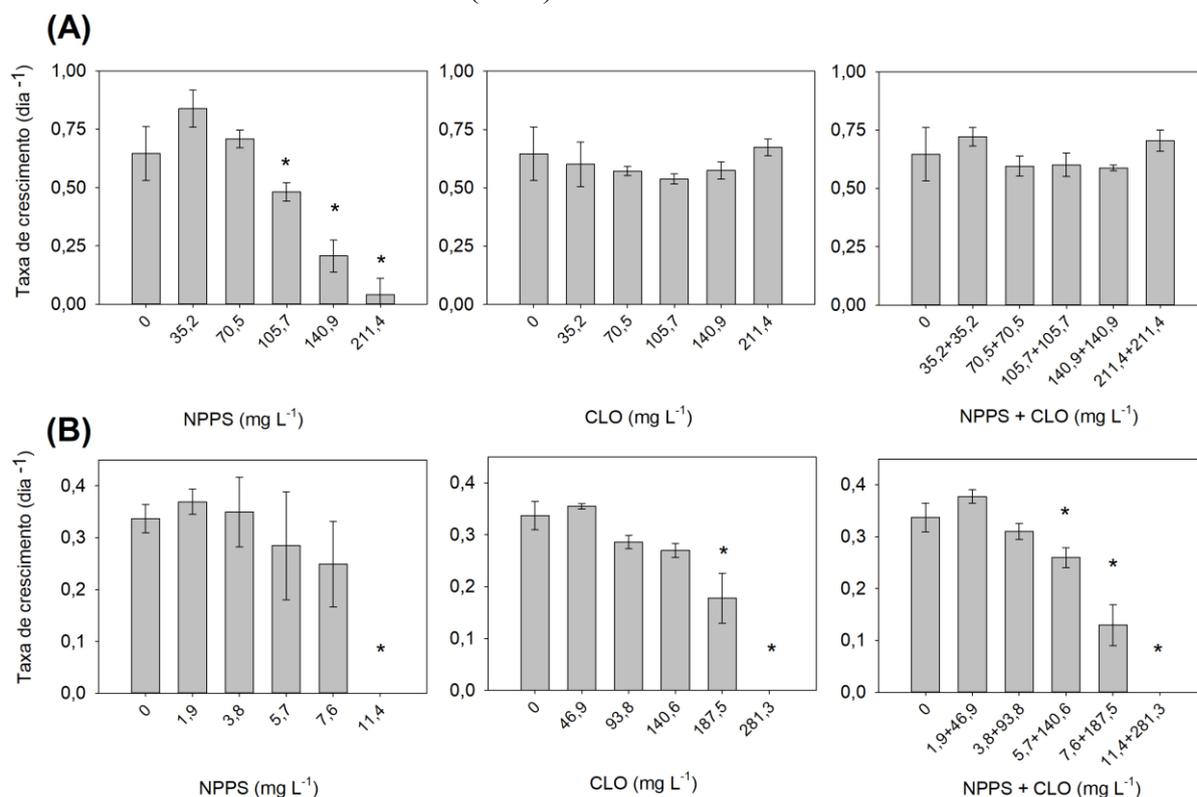
Outros estudos também observaram baixa toxicidade de nanoplásticos de poliestireno sobre o crescimento de *L. minor*. Por exemplo, nenhuma inibição de crescimento foi observada por Arikan et al. (2022) em experimentos com *L. minor* expostas a 100 mg NPPS L⁻¹, embora tenha sido observado um aumento na atividade de enzimas antioxidantes e a produção de espécies reativas de oxigênio. De maneira semelhante, não há evidências de toxicidade da CLO sobre *L. minor* na literatura, o que provavelmente está relacionado com o mecanismo de ação dos neonicotinoides, os quais são projetados principalmente para atingir os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) no sistema nervoso de insetos (YIN et al., 2023), e com isso, provavelmente são menos compatíveis com os nAChRs das plantas. Desta forma, presume-se que em cenários de altas concentrações de NPPS, CLO e suas misturas, os contaminantes podem se acumular nos poros das *L. minor* e prejudicar a absorção de água e nutrientes essenciais para as plantas (ATUGODA et al., 2023), o que poderia explicar parcialmente os efeitos tóxicos observados em concentrações acima de 500 mg L⁻¹ (Figura 4.4.4 e 4.4.5).

4.4.4 Testes de inibição do crescimento com *C. reinhardtii* e *M. aeruginosa*

Os resultados dos testes de inibição do crescimento com microalgas *C. reinhardtii* e cianobactérias *M. aeruginosa* estão apresentados na Figura 4.4.6. As NPPS reduziram significativamente a taxa de crescimento de *C. reinhardtii* a partir de 105,7 mg L⁻¹. Por outro lado, a CLO individualmente e suas misturas com o NPPS não causaram efeitos significativos sobre o crescimento das microalgas (Figura 4.4.6A), indicando a existência de interações antagonísticas entre os compostos (Tabela 4.4.2).

As cianobactérias *M. aeruginosa* tiveram sua taxa de crescimento completamente inibida quando expostas a 11,4 mg NPPS L⁻¹ (Figura 4.4.6B). Por outro lado, sua sensibilidade à CLO foi relativamente baixa, com efeitos de inibição iniciando apenas a partir de 187,5 mg L⁻¹. No teste de misturas, reduções significativas na taxa de crescimento foram observadas a partir de 5,7 mg L⁻¹ NPPS + 140,6 mg L⁻¹ CLO (Figura 4.4.6B). Antagonismo significativo foi observado na mistura de 3,8 mg L⁻¹ NPPS + 93,8 mg L⁻¹ CLO, enquanto que nas outras concentrações de mistura, efeitos aditivos foram observados (Tabela 4.4.2).

Figura 4.4.6 - Resultados dos testes de inibição de crescimento com microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* (A) e cianobactérias *Microcystis aeruginosa* (B) após 72 h de exposição a concentrações crescentes de nanoplástico de poliestireno (NPPS), clotianidina (CLO) e suas misturas.



Fonte: elaborado pelo autor (2023).

Yan et al. (2021) reportaram efeitos inibitórios de nanoesferas de poliestireno (diâmetro médio de 102,1 nm) em *C. reinhardtii* iniciando em 50 mg L⁻¹, após 72h de exposição. Os resultados desses autores estão na mesma ordem de magnitude dos nossos (Figura 4.4.6A), embora nós tenhamos observado um decréscimo mais acentuado na taxa de crescimento de *C. reinhardtii* com o aumento da concentração de NPPS, o que pode ser atribuído às diferenças de tamanho e estabilidade entre os NPPS utilizados, uma vez que o nanoplástico do estudo de Yan et al. (2021) possui um maior tamanho e uma menor estabilidade se comparado ao deste estudo. Por outro lado, microplásticos de PVC (50 – 100 µm) causaram uma toxicidade mais intensa em *C. reinhardtii* (WANG et al., 2020), indicando que a toxicidade dos plásticos é também dependente do tipo e tamanho do polímero.

Os NPPS induziram um efeito de inibição mais intenso nas cianobactérias comparativamente às microalgas em nossos experimentos, uma vez que a taxa de crescimento de *M. aeruginosa* foi completamente inibida a partir de 11,4 mg L⁻¹ (Figura 4.4.6B). Zheng et

al. (2023) também reportaram decréscimos significativos no crescimento de *M. aeruginosa* expostas a NPPS (50 – 100 nm), em concentrações variando de 1 a 100 mg L⁻¹. As NPPS são conhecidas por provocarem mudanças na atividade de enzimas fotossintéticas e antioxidantes, além de induzirem peroxidação lipídica nas membranas celulares (ZHENG et al., 2023), o que pode ajudar a explicar o decréscimo na taxa de crescimento observado em nossos experimentos.

Nossos resultados demonstraram baixa toxicidade da CLO para as algas, com efeitos de inibição sobre a taxa de crescimento de *C. reinhardtii* sendo observados apenas a partir de 100 mg L⁻¹ (Figura 4.4.6A). Até o momento, não foram encontrados estudos avaliando a toxicidade da CLO para *C. reinhardtii* na literatura. Entretanto, outro inseticida neonicotinoide (imidacloprido) também induziu baixa toxicidade para a espécie de microalga *Desmodesmus subspicatus*, com efeitos de toxicidade iniciando apenas a partir de 127,8 mg L⁻¹ (MALEV et al., 2012). Além disso, a cianobactéria *M. aeruginosa* apresentou baixa sensibilidade para a CLO até 211,4 mg L⁻¹ (Figura 4.4.6B). Em linha com estudos anteriores, já foi reportado que a exposição crônica a concentrações ambientalmente relevantes do imidacloprido (3 µg L⁻¹) podem, na realidade, induzir a proliferação de cianobactérias em comunidades de água doce (DIMITRI et al., 2021), revelando uma tendência de baixa toxicidade dos neonicotinoides para estas espécies.

Avaliando os efeitos do NPPS e da CLO em mistura, nós observamos diferentes interações para cada uma das espécies testadas (Tabela 4.4.2). Mais especificamente, para *L. minor* e *M. aeruginosa*, as interações toxicológicas variaram entre efeito aditivo e antagonismo. Por outro lado, para *D. magna* e *C. reinhardtii*, as interações foram predominantemente de antagonismo (Tabela 4.4.2). Além disso, foi observado que a presença de CLO no meio de exposição causou uma diminuição no potencial Zeta (PZ) das NPPS. Este decréscimo no PZ foi mais evidente nos meios ISO e M4, mas também ocorreu no meio BBM (Tabela 4.4.1), e pode estar associado à presença da CLO em torno das NPPS (Figura 4.4.1). Desta forma, o decréscimo no PZ pode ter contribuído para uma diminuição da estabilidade das NPPS em suspensão, e com isso, diminuindo sua presença na coluna d'água e sua biodisponibilidade, o que muito provavelmente reduziu seus efeitos tóxicos para as espécies em questão e pode contribuir para explicar os efeitos antagônicos observados.

Outros estudos também reportaram interações antagonísticas entre micro/nanoplásticos e pesticidas (ZHANG et al., 2018; GARRIDO et al., 2019). Garrido et al. (2019) constataram que a presença de microplásticos de polietileno (2 – 6 µm) reduziram a

toxicidade do pesticida organofosforado clorpirifós para a microalga *Isochrysis galbana*. Semelhantemente, Zhang et al. (2018) observaram antagonismo entre nanopartículas de poliestireno amino-modificadas catiônicas (200 nm) e o glifosato para *M. aeruginosa*. Os autores atribuíram o antagonismo à adsorção dos pesticidas na superfície dos micro/nanoplásticos, o que provavelmente contribuiu para diminuir a biodisponibilidade dos pesticidas por removê-los do meio de exposição, resultando, em última instância, em uma toxicidade reduzida. Este fenômeno também foi mencionado por Wang et al. (2023a) para explicar o antagonismo entre NPPS (500 nm) e o antibiótico sulfametoxazol sobre *C. reinhardtii*, bem como por Verdú et al. (2022) para justificar as interações antagonísticas entre NPPS (30 nm) e 44 micropoluentes de um efluente tratado para as macrófitas *Spirodela polyrhiza* e os microcrustáceos *D. magna*.

Até o momento, um número limitado de estudos tem avaliado a toxicidade combinada de nanoplásticos e inseticidas neonicotinoides para organismos aquáticos. Nugnes et al. (2022) observaram que misturas de microplásticos de poliestireno esféricos (1 μm) e o neonicotinoide imidacloprido causaram efeitos aditivos no microcrustáceo *Ceriodaphnia dubia*. Scherer et al. (2020) verificaram que microplásticos de cloreto de polivinila (< 50 nm) aumentaram a toxicidade do imidacloprido para mosquitos *Chironomus riparius*, e Luo et al. (2021) observaram que a exposição combinada de microplásticos de poliestireno (5 μm) e imidacloprido causaram hepatotoxicidade aumentada em peixes-zebra *Dario rerio*. Desta forma, pode-se perceber que não há uma regra geral para a interação entre plásticos e neonicotinoides. As diferenças entre as interações relatadas e os nossos resultados podem ser devido a vários fatores, tal como as diferentes estruturas e comportamentos das moléculas usadas, bem como das diferentes vias de exposição das espécies testadas.

Embora no nosso estudo o NPPS e a CLO causaram efeitos deletérios sobre as espécies estudadas, é necessário reconhecer que as concentrações nas quais foram observados efeitos tóxicos são muito superiores àquelas usualmente encontradas nos ambientes aquáticos. Até então, inseticidas neonicotinoides vêm sendo detectados em águas superficiais em concentrações na ordem de ng a $\mu\text{g L}^{-1}$ (SAMSON-ROBERT et al., 2014; DE PERRE; MURPHY; LYDY, 2015; WANG et al., 2023b), e micro e nanoplásticos dificilmente ultrapassam 1 mg L^{-1} (MATERIĆ et al. 2022; XU et al., 2022a). Além disso, a co-exposição ao NPPS e à CLO resultou, predominantemente, em interações antagonísticas, indicando que o risco para os organismos aquáticos, em uma primeira análise, provavelmente é baixo.

Entretanto, ressalta-se a importância de estudos futuros com exposição prolongada, a qual permita a avaliação dos efeitos tóxicos em condições de degradação tardia e/ou liberação/biodisponibilização posterior, o que poderá acarretar em efeitos tóxicos diferentes daqueles observados neste estudo.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desta tese demonstraram que nanoplásticos de poliestireno e o inseticida neonicotinoide clotianidina possuem potencial para causar toxicidade para espécies bioindicadoras do solo e da água, tanto individualmente como em mistura. No solo, os níveis esperados da clotianidina causarão efeito tóxico sobre pelo menos três espécies de invertebrados, indicando um risco ambiental inaceitável para esta substância. Além disso, os efeitos tóxicos dos compostos em combinação seguiram o padrão de aditividade, confirmando a hipótese 1 desta tese.

No ambiente aquático, observou-se uma baixa toxicidade de ambos os compostos para as espécies testadas, e uma predominância de interações antagonísticas entre os compostos. Desta forma, a hipótese 2 desta tese foi parcialmente rejeitada, uma vez que os efeitos sinérgicos esperados para as misturas não se confirmaram. Por outro lado, os efeitos negativos causados na geração parental não causam prejuízos para as gerações subsequentes, confirmando uma parte da hipótese 2 desta tese.

Embora os resultados desta tese auxiliem no estabelecimento de limites máximos destes contaminantes no ambiente, com vistas a auxiliar gestores ambientais, técnicos agrícolas e agricultores familiares, ressalta-se que esta tese representa apenas uma primeira etapa de análise dos efeitos ecotoxicológicos das misturas de nanoplásticos e neonicotinoides. Mesmo nos cenários em que foram detectadas baixa toxicidade/risco, há de se considerar as transformações/liberações posteriores que as partículas plásticas poderão sofrer a longo prazo, o que poderá modificar os efeitos tóxicos conhecidos até então.

Por fim, esta tese contribui para o desenvolvimento sustentável no Brasil, uma vez que trás novas informações a respeito dos efeitos de contaminantes ambientalmente relevantes em importantes compartimentos ambientais (solo e água), reforçando os princípios de agricultura sustentável e da manutenção da vida na água e no solo.

5.1 CONCLUSÕES

Especificamente, conclui-se que:

1. A clotianidina (CLO) induz efeitos tóxicos crônicos (inibição da reprodução) em espécies de invertebrados não-alvo do solo, mas a magnitude dos efeitos varia de acordo com a espécie. A maior toxicidade foi detectada para o grupo de colêmbolos, os quais provavelmente seriam afetados pela concentração ambiental estimada (CAE) em um cenário de exposição real. Por outro lado, as oligoquetas (em especial os enquitreideos) possuem menor sensibilidade a este inseticida. Além disso, a concentração de proteção para 95% das espécies (CP5) é inferior à CAE, indicando que há risco significativo da exposição das espécies edáficas aos níveis esperados de clotianidina no solo;
2. Os colêmbolos não evitam o solo contaminado com clotianidina. Entretanto, a locomoção destes organismos é significativamente afetada em concentrações que não causam repelência, indicando que os testes de fuga resultam em falsos-negativos para inseticidas neurotóxicos, e que os testes de locomoção podem ser uma ferramenta interessante na avaliação dos efeitos destas substâncias sobre as espécies do solo;
3. No solo, a CLO é substancialmente mais tóxica aos colêmbolos e enquitreideos do que o NPPS, indicando que existe um risco maior para esta substância se comparado aos nanoplásticos;
4. Os colêmbolos apresentaram maior sensibilidade aos contaminantes se comparado aos enquitreideos, o que indica que estes artrópodes devem representar um grupo de proteção prioritária em cenários de contaminação por CLO, NPPS e/ou suas misturas;
5. Os testes de mistura no solo indicam que a interação toxicológica é predominantemente aditiva, uma vez que os efeitos das misturas causaram efeitos semelhantes à soma dos efeitos dos compostos individuais, com base no modelo de Abbott;
6. Os testes aquáticos revelaram que tanto o NPPS quanto a CLO podem causar toxicidade para *D. magna* (em termos de imobilização, redução da reprodução e crescimento e inibição da natação) e *L. minor*, *M. aeruginosa* e *C. reinhardtii*

(em termos de inibição do crescimento), mas que o risco ambiental é relativamente baixo, uma vez que efeitos tóxicos só foram observados em concentrações muito superiores às aquelas que frequentemente ocorrem no ambiente;

7. Em relação ao NPPS, os microcrustáceos *D. magna* e as cianobactérias *M. aeruginosa* apresentaram maior sensibilidade ao nanoplástico, uma vez que tiveram sua reprodução e crescimento afetados em concentrações 10 a 20 vezes menores do que aquelas que causaram efeitos nas microalgas *C. reinhardtii*, e de aproximadamente 100 a 200 vezes menores do que aquelas que causaram efeitos tóxicos para as macrófitas aquáticas *L. minor*;
8. Em relação à CLO, a toxicidade foi relativamente baixa para as macrófitas, microalgas e cianobactérias. Apenas nos testes crônicos e de natação com *D. magna* é que foram observados efeitos tóxicos em concentrações inferiores a 20 mg L^{-1} ;
9. Os testes de misturas apontaram que a interação toxicológica entre NPPS e CLO é predominantemente antagonística para *D. magna* e *C. reinhardtii*, enquanto que para *M. aeruginosa* e *L. minor*, as interações podem variar entre efeito aditivo e antagonismo. Desta forma, pode-se concluir que o risco ecológico para a mistura, no ambiente aquático, é baixo, uma vez que os efeitos das substâncias tendem a diminuir quando em mistura, e também por que mesmo nos cenários de interação aditiva, os efeitos tóxicos só foram observados em concentrações consideravelmente maiores às aquelas que tendem a serem encontradas no ambiente aquático;
10. Os testes multigeracionais de recuperação com *D. magna* indicam que a exposição da geração parental não causa prejuízos significativos sobre os filhotes, os quais estão aptos a se recuperarem se a contaminação for interrompida;
11. Uma visão geral sobre os resultados desta tese permite inferir que os efeitos tóxicos e que as interações toxicológicas entre as substâncias testadas variam com o compartimento ambiental, e que especialmente para a CLO e misturas, o risco tende a ser maior no solo do que na água, haja vista os efeitos tóxicos observados em menores concentrações no solo.

5.2 LIMITAÇÕES DO TRABALHO

Embora o presente trabalho tenha atingido aos objetivos propostos e contribuído para o avanço científico na área da toxicologia de misturas de poluentes emergentes, existem algumas limitações importantes que devem ser consideradas.

A primeira limitação deste trabalho diz respeito às concentrações utilizadas nos testes de toxicidade, que são, com exceção dos testes com clotianidina no solo, na ordem de ppm (mg kg^{-1} ou mg L^{-1}). Estas concentrações são, em geral, superiores àquelas encontradas no ambiente e, portanto, possuem baixa relevância ambiental. Ressalta-se, contudo, que este foi um estudo exploratório, uma vez que os estudos envolvendo misturas de nanoplásticos e neonicotinoides ainda são muito incipientes. Desta forma, as concentrações utilizadas neste estudo buscaram atingir uma faixa capaz de causar efeitos sobre os parâmetros analisados, de forma a permitir observar interações entre os compostos.

Outro fator limitante do trabalho é que os parâmetros biológicos utilizados foram restritos à sobrevivência, reprodução, crescimento e comportamento. Desta forma, os resultados obtidos nesta tese não permitem conhecer os efeitos dos contaminantes em níveis moleculares ou bioquímicos, o que permitiria um entendimento maior a respeito do mecanismo de ação tóxico das substâncias e do risco individual e combinado dos contaminantes sobre as espécies em questão.

Além disso, neste trabalho, utilizou-se um nanoplástico de poliestireno sintetizado em laboratório, que possui características semelhantes a um NP primário. Contudo, sabe-se que no ambiente, boa parte dos micropásticos são de origem secundária (originados a partir da fragmentação e decomposição de plásticos maiores). Estes plásticos envelhecidos podem apresentar um comportamento diferente no compartimento aquático e terrestre e, também, induzir efeitos tóxicos diferentes daqueles observados para os NP primários, como já reportado em outros estudos.

Outra limitação é referente aos solos utilizados nos testes terrestres. Embora os solos utilizados possuam relevância científica e ambiental, sabe-se que o comportamento destes contaminantes é altamente variável com o tipo de solo. Sendo assim, embora o Neossolo muito provavelmente represente uma situação de pior cenário possível (*worst-case scenario*), situação em que não é possível extrapolar os resultados obtidos para solos com textura mais argilosa e maiores teores de matéria orgânica.

Por fim, neste estudo não foi feita a quantificação química das substâncias artificialmente aplicadas nos meios de exposição. Embora isto não seja um fator limitante para o entendimento da toxicidade, a quantificação seria útil para validar e ter maior confiança nos resultados obtidos.

5.3 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nas limitações destacadas acima, recomenda-se:

1. A utilização de concentrações ambientalmente relevantes (por exemplo, na ordem de ppb - $\mu\text{g kg}^{-1}$ / $\mu\text{g L}^{-1}$) em ensaios futuros, visando compreender de forma mais efetiva as interações entre os compostos em níveis de ocorrência ambiental;
2. A avaliação toxicológica das misturas sobre parâmetros moleculares e bioquímicos, os quais permitirão antecipar efeitos tóxicos que podem não ter sido observados nos parâmetros de reprodução e crescimento utilizados neste estudo;
3. A utilização de nanoplásticos secundários (envelhecidos) em ensaios toxicológicos posteriores envolvendo misturas, os quais podem apresentar maiores capacidades de internalização pelos organismos expostos;
4. A avaliação da influência de concentrações não tóxicas de nanoplásticos sobre a internalização, bioacumulação e toxicidade de agrotóxicos;
5. O emprego de uma maior diversidade de solos naturais nos testes de toxicidade, especialmente aqueles de textura argilosa e com maior teor de matéria orgânica;
6. A quantificação das concentrações utilizadas nos ensaios, de maneira a validar os efeitos observados e conferir maior confiança às concentrações de proteção derivadas dos testes.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, W.S. A method of computing the effectiveness of an insecticide. **Journal of Economic Entomology**, v. 18, p. 265–267, 1925. <https://doi.org/10.1093/jee/18.2.265a>.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 12.713: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp.* (Cladocera, Crustacea)**. Rio de Janeiro, 2016.

AKEJU, T.O. Assessment of the Effects of the Neonicotinoids Thiacloprid and Acetamiprid on Soil Fauna. **Tese de mestrado, Universidade de Coimbra**, 2014.

ALFORD, A.; KRUPKE, C.H. Translocation of the neonicotinoid seed treatment clothianidin in maize. **PLOS One**, v. 12 (3), p. 0173836, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173836>.

ALIMI, O. S. et al. Microplastics and Nanoplastics in Aquatic Environments: Aggregation, Deposition, and Enhanced Contaminant Transport. **Environmental Science and Technology**, v. 52(4), p. 1704–1724, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b05559>.

ALVES, P. R. L. et al. Earthworm ecotoxicological assessments of pesticides used to treat seeds under tropical conditions. **Chemosphere**, v. 90, p. 2674-2682, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.11.046>.

ALVES, P. R. L. et al. Seed dressing pesticides on springtails in two ecotoxicological laboratory tests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 105, p. 65-71, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.04.010>.

ANDRADY, A. L. Microplastics in the marine environment. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62(8), p. 1596–1605, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.05.030>.

ARIKAN, B. ET AL. The impacts of nanoplastic toxicity on the accumulation, hormonal regulation and tolerance mechanisms in a potential hyperaccumulator – *Lemna minor* L. **Journal of Hazardous Materials**, v. 440, p. 129692, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.129692>.

ASEPERI, A. K. et al. Behaviour of neonicotinoids in contrasting soils. **Journal of Environmental Management**, v. 276, p. 111329, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111329>.

ATUGODA, T. et al. Nanoplastic occurrence, transformation and toxicity: a review. **Environmental Chemistry Letter**, v. 21, p. 363–381, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10311-022-01479-w>.

BANAEE, M. et al. Evaluation of single and combined effects of cadmium and micro-plastic particles on biochemical and immunological parameters of common carp (*Cyprinus carpio*). **Chemosphere**, v. 236, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.07.066>>.

BANDEIRA, F. O. et al. Toxicity of imidacloprid to the earthworm *Eisenia andrei* and collembolan *Folsomia candida* in three contrasting tropical soils. **Journal of Soils and Sediments**, v. 20, p. 1997-2007, 2020a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11368-019-02538-6>>.

BANDEIRA, F.O. et al. Effect of temperature on the toxicity of imidacloprid to *Eisenia andrei* and *Folsomia candida* in tropical soils. **Environmental Pollution**, v. 267, p. 115565, 2020b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115565>>.

BANDEIRA, F.O. et al. Locomotion behavior testing as a complementary tool in Collembola avoidance assays with neurotoxic insecticides. **Environmental Science and Pollution Research**, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-023-30750-y>>.

BARNES, D. K. A. et al. Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 364, p. 1985–1998, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0205>>.

BASLEY, K.; GOULSON, D. Effects of chronic exposure to clothianidin on the earthworm *Lumbricus terrestris*. **PeerJ**, v. 5, p. e3177, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.7717/peerj.3177>>.

BELLINGERI, A. et al. Combined effects of nanoplastics and copper on the freshwater alga *Raphidocelis subcapitata*. **Aquatic Toxicology**, v. 210, p. 179–187, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.02.022>>.

BESSELING, E. et al. Nanoplastic affects growth of *S. obliquus* and reproduction of *D. magna*. **Environmental Science and Technology**, v. 48(20), p. 12336–12343, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/es503001d>>.

BICHO, R. C. et al. Nonavoidance behaviour in enchytraeids to boric acid is related to the GABAergic mechanism. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 6898–6903, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3921-5>.

BISCHOFF, H. E BOLD, H. Phycological studies. In: University of Texas Publication 6924. University of Texas, Austin, p. 96, 1963.

BLÄSING, M.; AMELUNG, W. Plastics in soil: Analytical methods and possible sources. **Science of the Total Environment**, v. 612, p. 422–435, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.08.086>>.

BONMATIN, J.-M. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 35-67, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-014-3332-7>>.

BORI, J. et al. Environmental impacts of an imidacloprid-containing formulation: from soils to waters. **AFINIDAD LXXII**, v. 571, p. 169–176, 2015.

BOSKER, T. et al. Microplastics accumulate on pores in seed capsule and delay germination and root growth of the terrestrial vascular plant *Lepidium sativum*. **Chemosphere**, v. 226, p. 774–781, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.163>>.

BOTÍAS, C. et al. Neonicotinoid residues in wildflowers, a potential route of chronic exposure for bees. **Environmental Science & Technology**, v. 49, 12731–12740, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03459>>.

BOUGHATTAS, I. et al. Interactive effects of environmental microplastics and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on the earthworm *Eisenia andrei*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 424, p. 127578, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127578>>.

BOUGHATTAS, I. et al. Co-exposure to environmental microplastic and the pesticide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) induce distinctive alterations in the metabolome and microbial community structure in the gut of the earthworm *Eisenia andrei*. **Environmental Pollution**, v. 344, p. 123213, 2024. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.123213>>.

BOWNIK, A., PAWŁOCIK, M., SOKOŁOWSKA, N. Effects of neonicotinoid insecticide acetamiprid on swimming velocity, heart rate and thoracic limb movement of *Daphnia Magna*. **Polish Journal of Natural Sciences**, v. 32, p. 481–493, 2017.

BRAGA, A. R. C. et al. Global health risks from pesticide use in Brazil. **Nature Food**, v. 1, p. 312–314, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s43016-020-0100-3>>.

BRASIL. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. 2009. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas/wp-content/uploads/sites/17/2017/09/resolucao-conama-420-2009-gerenciamento-de-acs.pdf>>.

BRASIL. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (CONAMA). Resolução nº 357, de 15 de junho de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre>>.

BUCH, A.C. et al. Ecotoxicity of mercury to *Folsomia candida* and *Proisotoma minuta* (Collembola: Isotomidae) in tropical soils: baseline for ecological risk assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 127, p. 22–29, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.01.009>>.

CAMPBELL, K. S. et al. Detection of imidacloprid and metabolites in Northern Leopard frog (*Rana pipiens*) brains. **Science of the Total Environment**, v. 813, p. 152424, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.152424>>.

CANUEL, E. et al. Interaction Effect of EDTA, Salinity, and Oxide Nanoparticles on Alga *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlamydomonas euryale*. **Plants**, v. 10, p. 2118, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/plants10102118>>.

CAO, D. et al. Effects of polystyrene microplastics on the fitness of earthworms in an agricultural soil. **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science**, v. 61(1), p. 3–7, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1088/1755-1315/61/1/012148>>.

CHAHARTAGHI, M. et al. Resource depletion and colonization: a comparison between parthenogenetic and sexual Collembola species. **Pedobiologia**, v. 52, p. 181–189, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2008.08.003>>.

CHARMANT, J. et al. **Kinovea (Version 0.9.5) [Computer software]**. 2021. Disponível em: <https://www.kinovea.org>. Acessado em 06 de dezembro de 2022.

CHEN, C. et al. Comparative and combined acute toxicity of butachlor, imidacloprid and chlorpyrifos on earthworm, *Eisenia fetida*. **Chemosphere**, v. 100, p. 111–115, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.12.023>>.

CHEN, C. et al. The synergistic toxicity of the multi chemical mixtures: Implications for risk assessment in the terrestrial environment. **Environment International**, v. 77, p. 95–105, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.01.014>>.

CHENG, Y. et al. Combined effects of mulch film-derived microplastics and atrazine on oxidative stress and gene expression in earthworm (*Eisenia fetida*). **Science of the Total Environment**, v. 746, p. 141280, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141280>>.

CHEVILLOT, F. et al. Selective bioaccumulation of neonicotinoids and sub-lethal effects in the earthworm *Eisenia andrei* exposed to environmental concentrations in an artificial soil. **Chemosphere**, v. 186, p. 839–847, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.08.046>>.

CHOWDHURY, S.; MUKHOPADHYAY, S.; BHATTACHARYYA, A. Degradation dynamics of the insecticide: Clothianidin (Dantop 50 % WDG) in a tea field ecosystem. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 89(2), p. 340–343, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00128-012-0671-2>>.

CHRISTENSEN, B.T. et al. A comparison of feeding efficiency and swimming ability of *Daphnia magna* exposed to cypermethrin. **Aquatic Toxicology**, v. 73, p. 210–220, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.03.011>>.

COLE, M. et al. Microplastics as contaminants in the marine environment: A review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62(12), p. 2588–2597, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.09.025>>.

COLE, M. et al. The impact of polystyrene microplastics on feeding, function and fecundity in the marine copepod *Calanus helgolandicus*. **Environmental Science and Technology**, v. 49, p. 1130–1137, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/es504525u>>.

CORRADINI, F. et al. Predicting soil microplastic concentration using vis-NIR spectroscopy. **Science of the Total Environment**, v. 650, p. 922–932, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.101>>.

COSTA, C. H. et al. Effect of chromium oxide (III) nanoparticles on the production of reactive oxygen species and photosystem II activity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Science of the Total Environment**, v. 565, p. 951–960, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.028>>.

CUI, R.; KIM, S. W.; AN, Y. J. Polystyrene nanoplastics inhibit reproduction and induce abnormal embryonic development in the freshwater crustacean *Daphnia galeata*. **Scientific Reports**, v. 7(1), p. 1–10, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-017-12299-2>>.

DA SILVA, M. L. N. et al. Multigenerational Toxic Effects on *Daphnia magna* Induced by Silver Nanoparticles and Glyphosate Mixture. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 40, p. 1123–1131, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/etc.4952>>

DE FELICE, B. et al. Molecular, biochemical and behavioral responses of *Daphnia magna* under long-term exposure to polystyrene nanoplastics. **Environmental International**, v. 164, p. 107264, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107264>.

DE JACOB, C. R. O. et al. The impact of four widely used neonicotinoid insecticides on *Tetragonisca angustula* (Latreille) (Hymenoptera: Apidae). **Chemosphere**, v. 224, p. 65–70, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.105>.

DE LIMA E SILVA, C. et al. Assessing the toxicity of thiamethoxam, in natural LUFA 2.2 soil, through three generations of *Folsomia candida*. **Ecotoxicology**, v. 27, p. 764–771, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10646-018-1922-8>>.

DE LIMA E SILVA, C. et al. Bringing ecology into toxicology: Life-cycle toxicity of two neonicotinoids to four different species of springtails in LUFA 2.2 natural soil. **Chemosphere**, v. 263, p. 128245, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128245>>.

DE LIMA E SILVA, C. et al. Comparative toxicity of imidacloprid and thiacloprid to different species of soil invertebrates. **Ecotoxicology**, v. 26, p. 555–564, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10646-017-1790-7>>.

DE LIMA E SILVA, C. et al. Toxicity in Neonicotinoids to *Folsomia candida* and *Eisenia andrei*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 39, p. 548-555, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/etc.4634>>.

DE PERRE, C.; MURPHY, T. M.; LYDY, M. J. Fate and effects of clothianidin in fields using conservation practices. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 34(2), p. 258–265, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/etc.2800>>.

DE SÁ, L. C. et al. Studies of the effects of microplastics on aquatic organisms: What do we know and where should we focus our efforts in the future? **Science of the Total Environment**, v. 645, p. 1029–1039, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.207>>.

DE SANTO, F. B. et al. Laboratory and field tests for risk assessment of metsulfuron-methyl-based herbicides for soil fauna. **Chemosphere**, v. 222, p. 645–655, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.01.145>>.

DE SANTO, F. B. et al. Screening effects of metsulfuron-methyl to collembolans and earthworms: the role of adjuvant addition on ecotoxicity. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25(24), p. 24143–24149, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-018-2481-5>>.

DIMITRI, V.P. et al. Imidacloprid treatments induces cyanobacteria blooms in freshwater communities under sub-tropical conditions. **Aquatic Toxicology**, v. 240, p. 105992, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2021.105992>>.

DOLAR, A. et al. Microplastics, chlorpyrifos and their mixtures modulate immune processes in the terrestrial crustacean *Porcellio scaber*. **Science of the Total Environment**, v. 772, p. 144900, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144900>>.

DONNARUMMA, L. et al. Preliminary study on persistence in soil and residues in maize of imidacloprid. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 46:6, p. 469-472, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/03601234.2011.583848>>.

EC – European Commission. **Technical guidance document on risk assessment**. In: Support of Commission Directive 93/67/EEC. Commission Regulation (EC) No 1488/94 and Directive 98/8/ EC. European Commission Joint Research Center, 2003.

EFSA – European Food Safety Authority. Evaluation of the data on clothianidin, imidacloprid and thiamethoxam for the updated risk assessment to bees for seed treatments and granules in the EU. **EFSA Supporting Publication**, v. 15, p. 1–31, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2018.en-1378>>.

EFSA – European Food Safety Authority. Panel on Contaminants in the Food Chain. Presence of microplastics and nanoplastics in food, with particular focus on seafood. **EFSA Journal**, v. 14, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2016.4501>>.

EFSA - European Food Safety Authority. Panel on plant protection products and their residues (PPR). Scientific opinion addressing the state of the science on risk assessment of plant protection products for in-soil organisms. **EFSA Journal**, v. 15, p. 4690, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.4690>>.

ELTEMSAH, Y. S.; BOHN, T. Acute and chronic effects of polystyrene microplastics on juvenile and adult *Daphnia magna*. **Environmental Pollution**, v. 254, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.07.087>>.

ENGENHEIRO, E. L. et al. Influence of dimethoate on acetylcholinesterase activity and locomotor function in terrestrial isopods. **Environ Toxicol Chem**, v. 24, p. 603–609, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1897/04-131R.1>>.

ENVIRONMENTAL CANADA. **Guidance Document on Statistical Methods for Environmental Toxicity Test**. Environmental Protection Series, EPS 1/RM/46, 2005 with 2007 updates. Environmental Canada, Ottawa, 2007.

EPPO. Environmental risk assessment scheme for plant protection products (Chapter 4): Soil. **OEPP/EPPO Bull.**, v. 33, p. 151–162, 2003.

ERTIBAN, S. M. Soil fauna as webmasters, engineers and bioindicators in ecosystems: implications for conservation ecology and sustainable agriculture. **American Journal of Life Sciences**, v. 7, p. 17–26, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.11648/j.ajls.20190701.14>>.

FADARE, O. O. et al. Humic acid alleviates the toxicity of polystyrene nanoplastic particles to: *Daphnia magna*. **Environmental Science: Nano**, v. 6(5), p. 1466–1477, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/C8EN01457D>>.

FULLER, S.; GAUTAM, A. A Procedure for Measuring Microplastics using Pressurized Fluid Extraction. **Environmental Science & Technology**, v. 50, p. 5774–5780, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00816>>.

GAINER, A.; OWOJORI, O. J. & MABOETA, M. Use of soil invertebrate avoidance tests as an emerging tool in soil ecotoxicology. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 260, p. 2, 2022. <https://doi.org/10.1007/s44169-021-00004-4>.

GARCIA, M. V. B. Effects of pesticides on soil fauna: development of ecotoxicological test methods for tropical regions. **Ecol. Dev. Ser.** 19 (University of Bonn, Germany.), 2004.

GARRIDO, S. et al. Effect of microplastics on the toxicity of chlorpyrifos to the microalgae *Isochrysis galbana*, clone t-ISO. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 173, p. 103–109, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.020>>.

GE, J. et al. Sub-lethal effects of six neonicotinoids on avoidance behavior and reproduction of earthworms (*Eisenia fetida*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 162, p. 423-429, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.064>>.

GEYER, R.; JAMBECK, J. R.; LAW, K. L. Production, use, and fate of all plastics ever made. **Science Advances**, v. 3(7), p. 25–29, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1126/sciadv.1700782>>.

GIGAULT, T. et al. Current opinion: What is a nanoplastic? **Environmental Pollution**, v. 235, p. 1030–1034, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.024>>.

GLIME, J.M. Terrestrial insects: hemimetabola – collembola (Chapter 12-2). In: **Glime, J.M. (Ed.), Bryophyte Ecology**. Volume 2: Bryological Interaction, 2, 2017.

GOULSON, D. REVIEW: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. **Journal of Applied Ecology**, v. 50, p. 977-987, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/1365-2664.12111>>.

GUIMARÃES, B. et al. Exposure of *Folsomia candida* (Willem 1902) to teflubenzuron over three generations –increase of toxicity in the third generation. **Applied Soil Ecology**, v. 134, p. 8–14, 2019a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.10.003>>

GUIMARÃES, B. et al. Multigenerational exposure of *Folsomia candida* to ivermectin – using avoidance, survival, reproduction, size and cellular markers as endpoints. **Geoderma**, v. 337, p. 273–279, 2019b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2018.09.030>>.

GUO, B. et al. Quantification of pesticide residues on plastic mulching films in typical farmlands of the North China. **Frontiers of Environmental Science and Engineering**, v. 14(1), p. 1–10, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11783-019-1181-9>>.

GUO, Y. et al. Bio-based clothianidin-loaded solid dispersion using composite carriers to improve efficacy and reduce environmental toxicity. **Pest Management Science**, v. 77, p. 5246–5254, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ps.6567>>.

GUPTA, S.; GAJBHIYE, V. T.; GUPTA, R. K. Soil Dissipation and Leaching Behavior of a Neonicotinoid Insecticide Thiamethoxam. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 80, p. 431–437, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00128-008-9420-y>>.

HACKENBERGER, D. K. et al. Effects of single and combined exposure to nano and bulk zinc-oxide and propiconazole on *Enchytraeus albidus*. **Chemosphere**, v. 224, p. 572–579, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.02.189>>.

HAEGERBAEUMER, A. et al. Impacts of micro- and nano-sized plastic particles on benthic invertebrates: A literature review and gap analysis. **Frontiers in Environmental Science**, v. 7, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00017>>.

HARRIS, K. D. M.; BARTLETT, N. J.; LLOYD, V. K. Daphnia as an Emerging Epigenetic Model Organism. **Genetics Research International**, p. 1–8, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2012/147892>>.

HAYASAKA, D. et al. Comparison of acute toxicity of two neonicotinoid insecticides, imidacloprid and clothianidin, to five cladoceran species. **Journal of Pesticide Science**, v. 38, p. 44–47, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1584/jpestics.D12-061>>.

HENNIG, T. B. et al. Can the increase in atmospheric temperature enhance the toxicity and risk of fipronil for collembolans in tropical soils? **Environmental Science and Pollution Research**, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-021-18349-7>>.

HENNIG, T. B. et al. Toxicity of imidacloprid to collembolans in two tropical soils under different soil moisture. **Journal of Environmental Quality**, v. 49, p. 1491–1501, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jeq2.20143>>.

HILTON, M.J. et al. The route and rate of thiamethoxam soil degradation in laboratory and outdoor incubated tests, and field studies following seed treatments or spray application. **Pest Management Science**, v. 75, p. 63–78, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ps.5168>>.

HIRAI, H. et al. Organic micropollutants in marine plastics debris from the open ocean and remote and urban beaches. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62(8), p. 1683–1692, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.06.004>>.

HLADIK, M. L.; KOLPIN, D. W.; KUIVILA, K. M. Widespread occurrence of neonicotinoid insecticides in streams in a high corn and soybean producing region, USA. **Environmental Pollution**, v. 193, p. 189–196, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2014.06.033>>.

HODNETT, M. G.; TOMASELLA, J. Marked differences between van Genuchten soil water-retention parameters for temperate and tropical soils: a new water-retention pedo-transfer functions developed for tropical soils. **Geoderma**, v. 108, p. 155–180, 2002.

HORTON, A. A. et al. Acute toxicity of organic pesticides to *Daphnia magna* is unchanged by co-exposure to polystyrene microplastics. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 166(2018), p. 26–34, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.052>>.

HORTON, A. A. et al. Microplastics in freshwater and terrestrial environments: Evaluating the current understanding to identify the knowledge gaps and future research priorities. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 127–141, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.01.190>>.

HUERTA LWANGA, E. et al. Microplastics in the Terrestrial Ecosystem: Implications for *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta, Lumbricidae). **Environmental Science and Technology**, v. 50(5), p. 2685–2691, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.5b05478>>.

HÜFFER, T. et al. Polyethylene microplastics influence the transport of organic contaminants in soil. **Science of the Total Environment**, v. 657, p. 242–247, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.12.047>>.

HUNGRIA, M. et al. Seed pre-inoculation with *Bradyrhizobium* as time-optimizing option for large-scale soybean cropping systems. **Agronomy Journal**, v. 112(6), p. 5222–5236, 2020. Disponível em: <<http://doi.org/10.1002/agj2.20392>>.

IHARA, M. et al. Super agonist actions of clothianidin and related compounds on the SAD β 2 nicotinic acetylcholine receptor expressed in *Xenopus laevis* oocytes. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 68(3), p. 761–763, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1271/bbb.68.761>>.

IHARA, M.; MATSUDA, K. Neonicotinoids: molecular mechanisms of action, insights into resistance and impact on pollinators. **Current Opinion in Insect Science**, v. 30, p. 1-7, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.09.009>>.

ISO 10706-2000. **Water Quality - Determination of Long Term Toxicity of Substances to *Daphnia Magna* Straus (Cladocera, Crustacea), first ed. (USA)**. ISO-International Standardization Organization, 2000.

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

ISO 11268-2:2012a. **Soil quality - Effects of pollutants on earthworms – Part 2: Determination of effects on reproduction of *Eisenia fetida*/*Eisenia andrei***. ISO-International Standardization Organization, 2012. 21 p.

ISO 16387 – 2004. **Soil Quality: Effects of Pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.) -Determination of Effects on Reproduction and Survival**. ISO - International Standardization Organization, 2004. Genève, Switzerland.

ISO 17512-2 – 2011. **Soil Quality: Avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals – Part 2: Test with collembolans (*Folsomia candida*)**. ISO - International Standardization Organization. Genève, Switzerland.

ISO 6341-11: 2012b. **Water quality — determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) — acute toxicity test.** ISO – International Standardization Organization, 2012.

IVAR DO SUL, J. A.; COSTA, M. F. The present and future of microplastic pollution in the marine environment. **Environmental Pollution**, v. 185, p. 352–364, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.036>>.

JENSEN, C. S.; GARSDAL, L.; BAATRUP, E. Acetylcholinesterase inhibition and altered locomotor behavior in the carabid beetle *Pterostichus cupreus*. A linkage between biomarkers at two levels of biological complexity. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 16, p. 1727–1732, 1997. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/etc.5620160822>.

JESCHKE, P. et al. Overview of the Status and Global Strategy for Neonicotinoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 2897-2908, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/jf101303g>>.

JU, H. et al. Effects of microplastics and chlorpyrifos on earthworms (*Lumbricus terrestris*) and their biogenic transport in sandy soil. **Environmental Pollution**, v. 316, n. 120483, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120483>>.

JU, H.; ZHU, D.; QIAO, M. Effects of polyethylene microplastics on the gut microbial community, reproduction and avoidance behaviors of the soil springtail, *Folsomia candida*. **Environmental Pollution**, v. 247, p. 890–897, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.097>>.

KACZMAREK, D. K. et al. Choline-based ionic liquids as adjuvants in pesticide formulation. **Journal of Molecular Liquids**, v. 327, p. 114792, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2020.114792>>.

KIM, D.; CHAE, Y.; AN, Y.-J. Mixture toxicity of nickel and microplastics with different functional groups on *Daphnia magna*. **Environmental Science and Technology**, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.est.7b03732>>.

KIM, H.M. et al. Uptake of nanopolystyrene particles induces distinct metabolic profiles and toxic effects in *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Pollution**, v. 246, p. 578–586, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.043>>.

KIM, S. W. et al. Size-dependent effects of polystyrene plastic particles on the nematode *Caenorhabditis elegans* as related to soil physicochemical. **Environmental Pollution**, v. 258, p. 113740, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113740>>.

KRUPKE, C. H. et al. Multiple routes of pesticide exposure for honey bees living near agricultural fields. **PLoS ONE**, v. 7 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029268>>.

LALAU, C. M. et al. Toxicological effects of AgNPs on duckweed (*Landoltia punctata*). **Science of the Total Environment**, v. 710, p. 136318, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136318>>.

LEE, K.-W. et al. Size-Dependent Effects of Micro Polystyrene Particles in the Marine Copepod *Tigriopus japonicus*. **Environmental Science and Technology**, v. 47(19), p. 11278–11283, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/es401932b>>.

LEE, W. S. et al. Bioaccumulation of polystyrene nanoplastics and their effect on the toxicity of Au ions in zebrafish embryos. **Nanoscale**, v. 11(7), p. 3200–3207, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/C8NR09321K>>.

LI, X. et al. Joint toxic effects of polystyrene nanoparticles and organochlorine pesticides (chlordane and hexachlorocyclohexane) on *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Science Nano**, v. 7, p. 3062–3073, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/d0en00654h>>.

LIU, G. et al. Sorption behavior and mechanism of hydrophilic organic chemicals to virgin and aged microplastics in freshwater and seawater. **Environmental Pollution**, v. 246, p. 26–33, 2019c. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.100>>.

LIU, L. et al. Functionalized polystyrene nanoplastic-induced energy homeostasis imbalance and the immunomodulation dysfunction of marine clams (*Meretrix meretrix*) at environmentally relevant concentrations. **Environmental Science: Nano**, v. 8, p. 2030-2048, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1039/d1en00212k>>.

LIU, M. et al. Microplastic and mesoplastic pollution in farmland soils in suburbs of Shanghai, China. **Environmental Pollution**, v. 242, p. 855–862, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.051>>.

LIU, T. et al. Oxidative stress and gene expression of earthworm (*Eisenia fetida*) to clothianidin. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 142, p. 489-496, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.012>>.

LIU, Z. et al. Effects of nanoplastics at predicted environmental concentration on *Daphnia pulex* after exposure through multiple generations. **Environmental Pollution**, v. 256, p. 113506, 2019a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113506>>.

LIU, Z. et al. Polystyrene nanoplastic exposure induces immobilization, reproduction, and stress defense in the freshwater cladoceran *Daphnia pulex*. **Chemosphere**, v. 215, p. 74–81, 2019b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.176>>.

LU, K. et al. Influence of microplastics on the accumulation and chronic toxic effects of cadmium in zebrafish (*Dario rerio*). **Chemosphere**, v. 202, p. 514-520, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.145>>.

LU, S.; QU, R; FORCADA, J. Preparation of magnetic polymeric composite nanoparticles by seeded emulsion polymerization. **Materials Letters**, v. 63, p. 770–772, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.matlet.2008.12.045>>.

LUO, T. et al. Combined hepatotoxicity of imidacloprid and microplastics in adult zebrafish: Endpoints at gene transcription. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 246, p. 109043, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2021.109043>>.

LV, X. et al. Mechanisms underlying the acute toxicity of fullerene to *Daphnia magna*: Energy acquisition restriction and oxidative stress. **Water Research**, v. 123, p. 696–703, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.07.023>>.

MAAß, S. et al. Transport of microplastics by two collembolan species. **Environmental Pollution**, v. 225, p. 456–459, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.03.009>>.

MAGARA, G. et al. Effects of combined exposures of fluoranthene and polyethylene or polyhydroxybutyrate microplastics on oxidative stress biomarkers in the blue mussel (*Mytilus edulis*). **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 82(10), p. 616–625, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/15287394.2019.1633451>>.

MALEV, O. et al. Comparative toxicity of imidacloprid and its transformation product 6-chloronicotinic acid to non-target aquatic organisms: Microalgae *Desmodesmus subspicatus* and amphipod *Gammarus fossarum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 104, p. 178–186, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.07.008>>.

MALONEY, E. M. et al. Can chronic exposure to imidacloprid, clothianidin, and thiamethoxam mixtures exert greater than additive toxicity in *Chironomus dilutus*? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 156, p. 354–365, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.003>>.

MATERIĆ, D. et al. Presence of nanoplastics in rural and remote surface waters. **Environmental Research Letters**, v. 17, p. 054036, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1088/1748-9326/ac68f7>>.

MOHAPATRA, D. P. et al. Application of Wastewater and Biosolids in Soil: Occurrence and Fate of Emerging Contaminants. **Water, Air, Soil Pollut.**, v. 227, p. 77, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11270-016-2768-4>>.

MONKUL, M. M.; ÖZHAN, H. O. Microplastic Contamination in Soils: A Review from Geotechnical Engineering View. **Polymers**, v. 13, n. 23, p. 4129, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.3390/polym13234129>>.

MORRISSEY, C. A. et al. Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. **Environment International**, v. 74, p. 291–303, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2014.10.024>>.

MÖRTL, M. et al. Study on Soil Mobility of Two Neonicotinoid Insecticides. **Journal of Chemistry**, v. 2016, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1155/2016/4546584>>.

NEPC - National Environment Protection Council. **Assessment of Site Contamination-Schedule B5a: Guideline on Ecological Risk Assessment**, 2011.

NG, E. L. et al. An overview of microplastic and nanoplastic pollution in agroecosystems. **Science of the Total Environment**, v. 627, p. 1377–1388, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.341>>.

NIZZETTO, L.; FUTTER, M.; LANGAAS, S. Are Agricultural Soils Dumps for Microplastics of Urban Origin? **Environmental Science and Technology**, v. 50(20), p. 10777–10779, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04140>>.

NOGUEIRA, D. J. et al. Crystalline phase-dependent toxicity of aluminum oxide nanoparticles toward *Daphnia magna* and ecological risk assessment. **Environmental Research**, v. 182, p. 108987, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108987>>.

NOGUEIRA, D.J. et al. Individual and combined multigenerational effects induced by polystyrene nanoplastic and glyphosate in *Daphnia magna* (Strauss, 1820). **Science of the Total Environment**, v. 151360, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151360>>.

NUGNES, R. et al. Polystyrene microplastic particles in combination with pesticides and antiviral drugs: Toxicity and genotoxicity in *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Pollution**, v. 313, p. 120088, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120088>>.

OECD 201:2011. **Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals**. Paris, France.

OECD 202:2004. *Daphnia* Sp. **Acute Immobilisation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD - Organisation for Economic Co-Operation and Development**, Paris, 2004.

OECD 221:2002. *Lemna* sp. **Growth Inhibition Test. OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidelines for the Testing of Chemicals**. Paris, France.

OGUNGBEMI, A. O.; VAN GESTEL, C. A. M. Extrapolation of imidacloprid toxicity between soils by exposing *Folsomia candida* in soil pore water. **Ecotoxicology**, v. 27, p. 1107-1115, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10646-018-1965-x>>.

PARISI, J. J. D.; MEDINA, P. F. **Tratamento de sementes**. Campinas: Instituto Agronômico - IAC, 2013.

PELOSI, C. et al. Pesticides and earthworms. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 34, p. 199–228, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s13593-013-0151-z>>.

PEÑA, A.; RODRÍGUEZ-LIÉBANA, J. A.; DELGADO-MORENO, L. Interactions of Microplastics with Pesticides in Soils and Their Ecotoxicological Implications. **Agronomy**, v. 13, n. 3, p. 1–33, 2023. <https://doi.org/10.3390/agronomy13030701>.

PEREIRA, C. M. S. et al. Dimethoate affects cholinesterases in *Folsomia candida* and their locomotion - false negative results of an avoidance behaviour test. **Science of the Total Environment**, v. 443, p. 821–827, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.11.044>>.

PERREAULT, F. et al. Core-shell copper oxyde nanoparticles toxicity in algae: role of the algal cell wall. In: **The Third Annual Montreal Plant Meeting**, Montreal: Concordia University, v. 1, p. 1, 2010.

PIKUDA, O. et al. Toxicity Assessments of Micro- and Nanoplastics Can Be Confounded by Preservatives in Commercial Formulations. **Environmental Science & Technology Letters**, v. 6, p. 21–25, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.estlett.8b00614>>.

PISA, L. W. et al. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 68-102, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-014-3471-x>>.

POSTHUMA, L. et al. Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology. **CRC**, Boca Raton, Florida, USA, 2002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1201/9781420032314>>.

POTAPOV, A. et al. Towards a global synthesis of Collembola knowledge: challenges and potential solutions. **Soil Organisms**, v. 92, p. 161–188, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.25674/so92iss3pp161>>.

QIN, L. T. et al. QSAR prediction of additive and non-additive mixture toxicities of antibiotics and pesticide. **Chemosphere**, v. 198, p. 122–129, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.142>>.

RABY, M. et al. Relative chronic sensitivity of neonicotinoid insecticides to *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia magna*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 163, p. 238–244, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.07.086>>.

RADOLINSKI, J. et al. Transport of a neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, from artificial seed coatings. **Science of the Total Environment**, v. 618, p. 561–568, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.031>>.

RAMASUBRAMANIAN, T. Persistence and dissipation kinetics of clothianidin in the soil of tropical sugarcane ecosystem. **Water, Air & Soil Pollution**, v. 224 (3), p. 1468, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11270-013-1468-6>>.

RENAUD, M. et al. Effects of the neonicotinoids acetamiprid and thiacloprid in their commercial formulations on soil fauna. **Chemosphere**, v. 194, p. 85-93, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.11.102>>.

RILLIG, M.C. Microplastic in terrestrial ecosystems and the soil? **Environmental Science and Technology**, v. 46, p. 6453–6454, 2012. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.1021/es302011r>>.

RIST, S.; BAUN, A.; HARTMANN, N. B. Ingestion of micro- and nanoplastics in *Daphnia magna* – Quantification of body burdens and assessment of feeding rates and reproduction. **Environmental Pollution**, v. 228, p. 398–407, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.048>>.

RITCHIE, E. E. et al. Lethal and Sublethal Toxicity of Thiamethoxam and Clothianidin Commercial Formulations to Soil Invertebrates in a Natural Soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38(10), p. 2111–2120, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/etc.4521>>.

ROCH, S.; BRINKER, A. Rapid and Efficient Method for the Detection of Microplastic in the Gastrointestinal Tract of Fishes. **Environmental Science and Technology**, v. 51(8), p. 4522–4530, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.7b00364>>.

RODRIGUEZ-SEIJO, A. et al. Histopathological and molecular effects of microplastics in *Eisenia andrei* Bouché. **Environmental Pollution**, v. 220, p. 495–503, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.09.092>>.

ROSSETTO, A. L. O. F. et al. Comparative evaluation of acute and chronic toxicities of CuO nanoparticles and bulk using *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. **Science of the Total Environment**, v. 490, p. 807-814, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.056>>.

ROUT, P. R. et al. Treatment technologies for emerging contaminants in wastewater treatment plants: A review. **Science of the Total Environment**, v. 753, p. 141990, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141990>>.

SAMSON-ROBERT, O. et al. Neonicotinoid-contaminated puddles of water represent a risk of intoxication for honey bees. **PLoS ONE**, v. 9(12), p. 1–17, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0108443>>.

SANCHEZ-BAYO, F.; HYNE, R. V. Comparison of environmental risks of pesticides between tropical and non-tropical regions. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 7 (4), p. 577-586, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ieam.189>>.

SANCHEZ-HERNANDEZ, J. C., CAPOWIEZ, Y., RO, K. S. Potential Use of Earthworms to Enhance Decaying of Biodegradable Plastics. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 8, p. 4292-4316, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b05450>>.

SANCHO, E., VILLARROEL, M.J., FERRANDO, M.D. Assessment of chronic effects of tebuconazole on survival, reproduction and growth of *Daphnia magna* after different exposure times. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 124, p. 10-17, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.034>>.

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

SCHAAFSMA, A. et al. Neonicotinoid Insecticide Residues in Surface Water and Soil Associated with Commercial Maize (Corn) Fields in Southwestern Ontario. **PLOS ONE**, v. 10(2), e0118139, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0118139>>.

SCHERER, C. et al. Toxicity of microplastics and natural particles in the freshwater dipteran *Chironomus riparius*: Same same but different? **Science of the Total Environment**, v. 711, p. 134604. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134604>>.

SCHEURER, M.; BIGALKE, M. Microplastics in Swiss Floodplain Soils. **Environmental Science & Technology**, v. 52, p. 3591-3598, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06003>>.

SCHREINER, V. C. et al. Pesticide mixtures in streams of several European countries and the USA. **Science of the Total Environment**, v. 573, p. 680-689, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.163>>.

SELIM, H. M.; JEONG, C. Y.; ELBANA, T. A. Transport of imidacloprid in soils: miscible displacement experiments. **Soil Science**, v. 175, p. 375-381, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1097/SS.0b013e3181ebc9a2>>.

SELONEN, S. et al. Modulation of chlorpyrifos toxicity to soil arthropods by simultaneous exposure to polyester microfibers or tire particle microplastics. **Applied Soil Ecology**, v. 181, n. 104657, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2022.104657>>.

SHAHID, N.; LIESS, M.; KNILLMANN, S. Environmental Stress Increases Synergistic Effects of Pesticide Mixtures on *Daphnia magna*. **Environmental Science and**

Technology, v. 53(21), p. 12586–12593, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1021/acs.est.9b04293>>.

SIDDIQUI, S. A. et al. Polystyrene microplastic particles in the food chain: Characteristics and toxicity - A review. **Science of The Total Environment**, v. 892, p. 164531, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.164531>>.

SIMON-DELISO, N. et al. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 5-34, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11356-014-3470-y>>.

SON, J. et al. Soil compression influences the avoidance behavior of *Allonychiurus kimi* (Collembola) to cadmium and copper. **Pedosphere**, v. 32, p. 487–494, 2022. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(21\)60088-7](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(21)60088-7).

SONG, W. et al. Polyethylene mulch film-derived microplastics enhance the bioaccumulation of atrazine in two earthworm species (*Eisenia fetida* and *Metaphire guillelmi*) via carrier effects. **Journal of Hazardous Materials**, v. 455, p. 131603, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.131603>>.

SØRENSEN, F. F.; BAYLEY, M.; BAATRUP, E. The effects of sublethal dimethoate exposure on the locomotor behavior of the collembolan *Folsomia candida* (Isotomidae). **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 14, p. 1587–1590, 1995. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/etc.5620140919>.

SUMITOMO CHEMICAL CO. LTD. **INSIDE FS** (600 g/L clotianidina). Suspensão Concentrada para Tratamento de Sementes (FS). Registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA sob nº 12812. Av. Paulista, São Paulo/SP, Brasil, 2016.

SUN, W. et al. Joint effects of microplastic and dufulin on bioaccumulation, oxidative stress and metabolic profile of the earthworm (*Eisenia fetida*). **Chemosphere**, v. 263, p. 128171, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128171>>.

ŠUNTA, U. et al. Adsorption of acetamiprid, chlorantraniliprole and flubendiamide on different type of microplastics present in alluvial soil. **Chemosphere**, v. 261, p. 127762, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127762>>.

SUR, R.; STORK, A. Uptake, translocation and metabolism of imidacloprid in plants. **Bulletin of Insectology**, v. 56, p. 35–40, 2003.

SUSSARELLU, R. et al. Oyster reproduction is affected by exposure to polystyrene microplastics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, p. 2430–2435, 2016. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1519019113>.

SZABÓ, B.; SERES, A.; BAKONYI, G. *Folsomia Candida* (Collembola) locomotor activity pattern is changed by a neurotoxicant pesticide. **Acta Zoologica Academiae**

Scientiarum Hungaricae, v. 64, p. 355–368, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.17109/AZH.64.4.355.2018>.

TAHERAN, M. et al. Emerging contaminants: Here today, there tomorrow! **Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management**, v. 10, p. 122–126, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.enmm.2018.05.010>>.

TAKÁCS, E. et al. Effects of neonicotinoid insecticide formulations and their components on *Daphnia magna*—the role of active ingredients and co-formulants. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 97(9), p. 885–900, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/03067319.2017.1363196>>.

TEDESCO, M. J. et al. Análise de solo, plantas e outros materiais, 2nd edn. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, p 147 (Boletim Técnico, 5), 1995.

TEUTEN, E. L. et al. Potential for plastics to transport hydrophobic contaminants. **Environmental Science and Technology**, v. 41(22), p. 7759–7764, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/es071737s>>.

TOSI, S.; BURGIO, G.; NIEH, J. C. A common neonicotinoid pesticide, thiamethoxam, impairs honey bee flight ability. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1201, 2017. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01361-8>.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. **Species Sensitivity Distribution Generator (version 1.0)**. 2005. Disponível em: <https://www.epa.gov/caddis-vol4/caddis-volume-4-data-analysis-download-software>.

UWIZEYIMANA, H. et al. The eco-toxic effects of pesticide and heavy metal mixtures towards earthworms in soil. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 55, p. 20–29, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2017.08.001>>.

VAN DER SLUIJS, J. P. et al. Conclusions of the worldwide integrated assessment on the risks of neonicotinoids and fipronil to biodiversity and ecosystem functioning. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22(1), p. 148–154, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s11356-014-3229-5>>.

VAN GESTEL, C. A. M. et al. Multigeneration toxicity of imidacloprid and thiacloprid to *Folsomia candida*. **Ecotoxicology**, v. 26, p. 320–328, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10646-017-1765-8>>.

VAZ, V. P. et al. Can the sonication of polystyrene nanoparticles alter the acute toxicity and swimming behavior results for *Daphnia magna*? **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 14192–14198, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-021-12455-2>>.

VERDÚ, I. et al. Polystyrene nanoplastics and wastewater displayed antagonistic toxic effects due to the sorption of wastewater micropollutants. **Science of the Total Environment**, v. 819, p. 153063, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153063>>.

VICENTINI, D. S. et al. Toxicological Evaluation and Quantification of Ingested Metal-Core Nanoplastic by *Daphnia magna* Through Fluorescence and Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometric Methods. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38(10), p. 2101–2110, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/etc.4528>>.

WAHL, A. et al. Nanoplastic occurrence in a soil amended with plastic debris. **Chemosphere**, v. 262, p. 127784, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127784>>.

WANG, C. et al. Toxicity interaction of polystyrene nanoplastics with sulfamethoxazole on the microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*: A closer look at effect of light availability. **Journal of Environmental Management**, v. 340, p. 117969, 2023a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117969>>.

WANG, H. T. et al. Exposure to microplastics lowers arsenic accumulation and alters gut bacterial communities of earthworm *Metaphire californica*. **Environmental Pollution**, v. 251, p. 110–116, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2019.04.054>>.

WANG, J. et al. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in the earthworm *Eisenia fetida*. **Chemosphere**, v. 144, p. 510-517, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.09.004>>.

WANG, J. et al. Meta-analysis of neonicotinoid insecticides in global surface waters. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, p. 1039–1047, 2023b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-022-22270-y>>.

WANG, K. et al. Biological response of earthworm, *Eisenia fetida*, to five neonicotinoid insecticides. **Chemosphere**, v. 132, p. 120–126, 2015a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.03.002>>.

WANG, K. et al. Evaluation of the Toxicity, AChE Activity and DNA Damage Caused by Imidacloprid on Earthworms, *Eisenia fetida*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 95, p. 475–480, 2015b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00128-015-1629-y>>.

WANG, Q. et al. The toxicity of virgin and UV-aged PVC microplastics on the growth of freshwater algae *Chlamydomonas reinhardtii*. **Science of the Total Environment**, v. 749, p. 141603, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141603>>.

WANG, Y. et al. Comparative acute toxicity of twenty-four insecticides to earthworm, *Eisenia fetida*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 79, p. 122–128, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.12.016>>.

WANG, Y. et al. Ternary toxicological interactions of insecticides, herbicides, and a heavy metal on the earthworm *Eisenia fetida*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 284, p. 233–240, 2015c. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.11.017>>.

WEN, X., ZHEN, L., JIANG, Q. & XIAO, Y. A global review of the development and application of soil erosion control techniques. **Environmental Research Letters**, v. 18, p. 033003, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1088/1748-9326/acbaac>>.

WOOD, T. J.; GOULSON, D. The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, p. 17285-17325, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-017-9240-x>>.

WRIGHT, S. L.; THOMPSON, R. C.; GALLOWAY, T. S. The physical impacts of microplastics on marine organisms: a review. **Environmental Pollution**, v. 178, p. 483–492, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.02.031>>.

XU, B. et al. Microplastics in the soil environment: Occurrence, risks, interactions and fate – A review. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 50, p. 2175-2222, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1694822>>.

XU, G. et al. Size effects of microplastics on accumulation and elimination of phenanthrene in earthworms. **Journal of Hazardous Materials**, v. 403, p. 123966, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.123966>>.

XU, J. et al. Evaluation of growth and reproduction as indicators of soil metal toxicity to the Collembolan, *Sinella curviseta*. **Insect Science**, v. 16, p. 57–63, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1744-7917.2009.00254.x>>.

XU, Y. et al. Identification and Quantification of Nanoplastics in Surface Water and Groundwater by Pyrolysis Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Environmental Science and Technology**, v. 56, p. 4988–4997, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.est.1c07377>>.

YAN, N.; TANG, B. Z. & WANG, W.-X. Cell cycle control of nanoplastics internalization in phytoplankton. **ACS Nano**, v. 15, p. 12237-12248, 2021.

YAN, Z. et al. Comparative toxic effects of microplastics and nanoplastics on *Chlamydomonas reinhardtii*: Growth inhibition, oxidative stress, and cell morphology. **Journal of Water Process Engineering**, v. 43, p. 102291, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2021.102291>>.

YANG, W. et al. Mechanisms of the inhibition and detoxification effects of the interaction between nanoplastics and microalgae *Chlorella pyrenoidosa*. **Science of the Total Environment**, v. 783, p. 146919, 2021.

YANG, X. et al. Biogenic transport of glyphosate in the presence of LDPE microplastics: A mesocosm experiment. **Environmental Pollution**, v. 245, p. 829–835, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.044>>.

YIN, C. et al. Knockdown of the Nicotinic Acetylcholine Receptor β 1 Subunit Decreases the Susceptibility to Five Neonicotinoid Insecticides in Whitefly (*Bemisia tabaci*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 71, p. 7221–7229, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c00782>>.

YU, Y. et al. Joint toxic effects of cadmium and four pesticides on the earthworm (*Eisenia fetida*). **Chemosphere**, v. 227, p. 489–495, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.04.064>>.

ZHANG, P. et al. Residue and dissipation of clothianidin in tomatoes and soil. **Chinese Journal of Pesticide Science**, v. 18 (4), p. 490–496, 2016.

ZHANG, P. et al. Single and combined effects of microplastics and roxithromycin on *Daphnia magna*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26(17), p. 17010–17020, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-019-05031-2>>.

ZHANG, Q. et al. The combined toxicity effect of nanoplastics and glyphosate on *Microcystis aeruginosa* growth. **Environmental Pollution**, v. 243, p. 1106–1112, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.09.073>>.

ZHENG, X. et al. Acute effects of three surface-modified nanoplastics against *Microcystis aeruginosa*: Growth, microcystin production, and mechanisms. **Science of the Total Environment**, v. 855, p. 158906, 2023. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.158906>>.

ZHU, B. K. et al. Exposure to nanoplastics disturbs the gut microbiome in the soil oligochaete *Enchytraeus crypticus*. **Environmental Pollution**, v. 239, p. 408–415, 2018a. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.017>>.

ZHU, D. et al. Exposure of soil collembolans to microplastics perturbs their gut microbiota and alters their isotopic composition. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 116, p. 302–310, 2018b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.10.027>>.

ZOCCHI, M.; SOMMARUGA, R. Microplastics modify the toxicity of glyphosate on *Daphnia magna*. **Science of the Total Environment**, v. 697, p. 1–7, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134194>>.

ZORTÉA, T. et al. Ecotoxicological effects of fipronil, neem cake and neem extract in edaphic organisms from tropical soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 166, p. 207–214, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.061>>.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Artigo publicado referente à tese (artigo 1)

Journal of Hazardous Materials

Fator de impacto (2022): 13,6

Classificação Qualis Periódicos Capes (Engenharias I, 2017-2020): A1

BANDEIRA, F. O.; ALVES, P. R. L.; HENNIG, T. B.; BRANCALIONE, J.; NOGUEIRA, D. J.; MATIAS, W.G. Chronic effects of clothianidin to non-target soil invertebrates: Ecological risk assessment using the species sensitivity distribution (SSD) approach.

Journal of Hazardous Materials, v. 419, p. 126491, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.126491>.

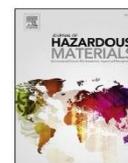
Journal of Hazardous Materials 419 (2021) 126491



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

Journal of Hazardous Materials

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jhazmat



Research Paper

Chronic effects of clothianidin to non-target soil invertebrates: Ecological risk assessment using the species sensitivity distribution (SSD) approach

Felipe Ogliari Bandeira^a, Paulo Roger Lopes Alves^b, Thuanne Braúlio Hennig^c,
Juliane Brancalione^b, Diego José Nogueira^a, William Gerson Matias^{a,*}

^a Laboratory of Environmental Toxicology, Department of Sanitary and Environmental Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-970, Brazil

^b Federal University of Fronteira Sul, Av. Fernando Machado 108 E, 89802112 Chapecó, SC, Brazil

^c Department of Soil Science, Santa Catarina State University, Av. Luis de Camões, 2090, 88520-000 Lages, SC, Brazil



ARTICLE INFO

Editor: Dr. R. Maria Sonia

Keywords:

Collembolans
Earthworms
Enchytraeids
Neonicotinoids
Clothianidin

ABSTRACT

This study aimed to assess the chronic toxicity and risk of clothianidin in a seed dressing formulation to non-target soil invertebrates. The toxicity assays were performed with two oligochaetes (earthworms *Eisenia andrei* and enchytraeids *Enchytraeus crypticus*) and three collembolans (*Folsomia candida*, *Proisotoma minuta* and *Sinella curviseta*) species following ISO protocols. Risk assessment (via Hazard Quotient approach – HQ) was based on the hazardous concentrations for 95% of the species (HC₅), derived from chronic Species Sensitivity Distributions (SSD) for clothianidin, and on its predicted environmental concentrations (PEC). Four SSD scenarios were generated with literature and/or this study data, following different data selection criteria (i.e., general, only data from tests using similar formulations, similar soils, or identical soil/formulation). In our experiments, a higher clothianidin toxicity (EC₅₀-based) was found for collembolans (varying from 0.11 to 0.28 mg kg⁻¹ between species) followed by the earthworms (4.35 mg kg⁻¹), while the enchytraeids were the least sensitive (33.5 mg kg⁻¹). HQ indicated a significant risk of clothianidin to soil invertebrates because the estimated PEC were at least 16.6 times higher than HC₅ and are expected to affect the whole group of collembolans. Despite the criteria for data inclusion have influenced the HC₅ values, no substantial changes were observed for the risk outcomes. To our knowledge, this is the first study assessing the chronic ecological risk of clothianidin to beneficial soil fauna based on a probabilistic SSD approach. Data from this study can help to derive more reliable protection thresholds for clothianidin in soils.

1. Introduction

The treatment of seeds with pesticides is a technique applied worldwide in commercial crops, such as soybean, corn and wheat (Labrie et al., 2020). Neonicotinoids are the most widely used insecticide class for seed treatment and are registered in more than 120 countries (Borsuah et al., 2020). Clothianidin is an N-nitroguanidine neonicotinoid insecticide used through foliar spraying, soil treatment and especially for seed dressing (Grout et al., 2020). This molecule acts competing with acetylcholine by the nicotinic receptors, thus promoting the paralysis and/or nervous hyperstimulation of exposed organisms (Hilton et al., 2018; Ihara and Matsuda, 2018). In this way, clothianidin protects the crop by providing a systemic, broad-spectrum control of

soil-inhabiting insect pests (Atwood et al., 2018).

Although its use has been restricted and/or prohibited in some European Union since 2013, mainly due to its adverse effects on honey bee colonies (EFSA (European Food Safety Authority), 2018c), some EU member states are still using clothianidin through emergency authorizations to prevent severe pest damage to crops (Carrasco-Navarro and Skaldina, 2019; EFSA (European Food Safety Authority), 2018a, 2018b). Also, clothianidin sales outside Europe have continued to grow in the last years, and this active ingredient (a.i.) remains intensively used in agricultural areas of the American and Asian continents (Chevillat et al., 2017; Bass and Field, 2018; Grout et al., 2020; Ramasubramanian, 2021). In 2012, clothianidin was among the three most used neonicotinoids and accounted for 14.7% of the total neonicotinoid sales (Bass

APÊNDICE B – Artigo publicado referente à tese (artigo 2)

Environmental Science and Pollution Research

Fator de impacto (2022): 5.8

Classificação Qualis Periódicos Capes (Engenharias I, 2017-2020): A2

BANDEIRA, F. O.; TINA, J. K.; ALVES, P. R. L.; VAZ, V. P.; PUERARI, R. C.; JUNEAU, P.; DEWEZ, D.; MATIAS, W. J. Locomotion behavior testing as a complementary tool in *Collembola* avoidance assays with neurotoxic insecticides. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, p. 124374–124381, 2023.
<https://doi.org/10.1007/s11356-023-30750-y>.

Environmental Science and Pollution Research (2023) 30:124374–124381
<https://doi.org/10.1007/s11356-023-30750-y>

SHORT RESEARCH AND DISCUSSION ARTICLE



Locomotion behavior testing as a complementary tool in *Collembola* avoidance assays with neurotoxic insecticides

Felipe Ogliari Bandeira¹ · Jéssica Karolayne Tina² · Paulo Roger Lopes Alves² · Vitor Pereira Vaz^{1,3} · Rodrigo Costa Puerari¹ · Philippe Juneau³ · David Dewez⁴ · William Gerson Matias¹

Received: 26 June 2023 / Accepted: 25 October 2023 / Published online: 10 November 2023
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2023

Abstract

This study aimed (1) to assess the ability of collembolans *Folsomia candida* to avoid soils contaminated with three seed dressing insecticides imidacloprid, clothianidin, and fipronil; (2) to assess the effects of the insecticides on collembolans' locomotion behavior; (3) to check if changes in the locomotion behavior would explain the avoidance/preference responses; and (4) to evaluate the possibility to use locomotion behavior as toxicity biomarker of the tested insecticides. Avoidance and locomotion behavior assays with collembolans *F. candida* were performed with commercial seed dressing formulations of three insecticides (imidacloprid, clothianidin, and fipronil). Results showed no avoidance behavior at any concentration, while a “preference” was observed with increasing concentrations of the three tested insecticides. Significant reductions in the locomotion of exposed collembolans were observed at $\geq 1 \text{ mg kg}^{-1}$ for imidacloprid (18–38%) and fipronil (29–58%) and $\geq 4 \text{ mg kg}^{-1}$ for clothianidin (10–47%). At the higher insecticide concentrations, the collembolans had their trajectories restricted to smaller areas, with a tendency for circular movements. Our results confirm that the “preference” for contaminated soils with neurotoxic substances is likely due to locomotion inhibition impairing the ability of organisms to escape. This effect highlights that only avoidance assays may be not sufficient to assure the safety of some substances and confirm the potential of locomotion behavior as a sensitive toxicity biomarker for neurotoxic insecticides.

Keywords Imidacloprid · Fipronil · Clothianidin · Non-avoidance · Locomotion impairment

Introduction

Seed-dressing insecticides are widely used in conventional agricultural practices to ensure plant protection and food production (Bonmatin et al. 2015). In 2018, neonicotinoids had a market value of approximately US\$ 4752 million, with imidacloprid and clothianidin being among the three top-used neonicotinoids in the seed treatment market (Sparks et al. 2020; Rohlman et al. 2022), while the phenylpyrazole fipronil accounts for almost one-third of the global insecticide market (Trinh et al. 2022). Although

Responsible Editor: Chris Lowe

✉ Paulo Roger Lopes Alves
paulo.alves@uffs.edu.br

¹ Laboratory of Environmental Toxicology, Department of Sanitary and Environmental Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-970, Brazil