



LEONARDO MENDES DA SILVA

**ECO(GENO)TOXICIDADE DA FORMULAÇÃO ACARICIDA
COLOSSO FC30 EM DIFERENTES MODELOS VEGETAIS E
Artemia salina L.**

**LAVRAS-MG
2024**

LEONARDO MENDES DA SILVA

**ECO(GENO)TOXICIDADE DA FORMULAÇÃO ACARICIDA COLOSSO FC30 EM
DIFERENTES MODELOS VEGETAIS E *Artemia salina* L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Mestre.

Prof (a). Dr (a). Larissa Fonseca Andrade Vieira

Orientadora

LAVRAS-MG

2024

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Silva, Leonardo Mendes da.

Eco(geno)toxicidade da formulação acaricida COLOSSO FC30 em diferentes modelos vegetais e *Artemia salina* L. / Leonardo Mendes da Silva. - 2024.

155 p.

Orientador(a): Larissa Fonseca Andrade Vieira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Ecotoxicologia. 2. Fito(geno)toxicidade. 3. Mistura de agrotóxicos. I. Andrade Vieira, Larissa Fonseca. II. Título.

LEONARDO MENDES DA SILVA

**ECO(GENO)TOXICIDADE DA FORMULAÇÃO ACARICIDA COLOSSO FC30 EM
DIFERENTES MODELOS VEGETAIS E *Artemia salina* L.**

**ECO(GENO)TOXICITY OF THE ACARICIDAL FORMULATION COLOSSO FC30
IN DIFFERENT PLANT MODELS AND *Artemia salina* L.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 19 de fevereiro de 2024.

Dr. Marinês Ferreira Pires Lira UFLA

Dr. Matheus Mantuanelli Roberto FHO

Prof (a). Dr (a). Larissa Fonseca Andrade Vieira

Orientadora

LAVRAS-MG

2024

À minha família e aos meus amigos.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela oportunidade acadêmica concedida.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada pelos valiosos ensinamentos. Em especial, quero reconhecer o apoio e compreensão da minha orientadora, Larissa Fonseca Andrade Vieira, que soube lidar com minhas dificuldades e dedicou-se a orientar, auxiliar e ensinar.

Ao meu pai, Amaurinho Mendes da Silva, pela base sólida que me proporcionou, pelo carinho constante e pelo apoio incondicional.

Aos colegas de curso, pelo convívio enriquecedor, pela partilha de confidências, sorrisos e conhecimentos, tanto no ambiente acadêmico quanto fora dele.

Aos meus colegas do Laboratório de Eco-geno-toxicologia e citogenética, pelo auxílio fundamental durante o desenvolvimento da pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

Na perspectiva brasileira e global, a pecuária bovina desempenha um papel crucial ao fornecer alimentos como carne, leite e derivados para o mercado interno. Entretanto, o processo de criação de bovinos expõe os animais a ectoparasitas, especialmente carrapatos. O controle desse ectoparasita é feito com acaricidas, como a formulação comercial COLOSSO FC30, que contém clorpirifós, cipermetrina e fenthion. Este produto é pulverizado no corpo dos animais, no entanto, após a aplicação, eles podem circular livremente pelas propriedades rurais, carregando moléculas tóxicas em seus pelos, o que pode, eventualmente, resultar na contaminação de solos, lagos e rios. Diante dessa problemática, o presente estudo propôs-se a avaliar a eco(genoto)xicidade da formulação comercial COLOSSO FC30 em diferentes organismos. O teste de fitotoxicidade foi realizado utilizando quatro modelos vegetais (*Lactuca sativa*, *Pennisetum glaucum*, *Raphanus sativus* e *Triticum aestivum*). As sementes foram expostas a diferentes concentrações do produto (0,12 a 23,61 mL/L da formulação comercial) por 72 horas, sendo avaliados parâmetros de porcentagem de germinação (%G), índice de velocidade de germinação (IVG), massa fresca, comprimento da raiz e da parte aérea. No teste de citogenotoxicidade com *Allium cepa*, sementes germinadas foram expostas a diferentes concentrações (0,195 a 1,25 mL/L da formulação comercial) por 48 horas. Após esse período, foram realizadas avaliações tanto na zona meristemática quanto na região F1 da raiz, considerando parâmetros como o número de células em divisão, aberrações cromossômicas e micronúcleos. O teste de toxicidade aguda com o microcrustáceo *Artemia salina* L. foi conduzido conforme as diretrizes da NBR 16530, com concentrações variando de 0,000976 a 0,1024 mL/L da formulação comercial. Nos testes com modelos vegetais, a %G mostrou-se como o parâmetro menos sensível, necessitando de concentrações elevadas para inibição de 50%. Diferentemente da %G, o IVG dos modelos vegetais demonstrou maior sensibilidade à formulação, com EC₅₀ de 0,8151, 2,080, 2,990 e 6,352 mL/L, para *L. sativa*, *R. sativus*, *P. glaucum* e *T. aestivum*, respectivamente. Os parâmetros que revelaram maior sensibilidade ao COLOSSO FC30 foram o comprimento da raiz e da parte aérea. Para o comprimento da raiz, as EC₅₀ foram de 0,3464, 0,6758, 0,3558 e 0,6870 mL/L para *L. sativa*, *R. sativus*, *P. glaucum* e *T. aestivum*, respectivamente. No que diz respeito ao comprimento da parte aérea, as EC₅₀ foram de 0,6174, 3,313, 0,1901 e 0,2173 mL/L para *L. sativa*, *R. sativus*, *P. glaucum* e *T. aestivum*, respectivamente. Em relação aos efeitos sobre o ciclo celular, tanto na região meristemática quanto na F1 das raízes de *A. cepa*, concentrações acima de 0,351 mL/L reduziram a atividade mitótica. Na região meristemática, todas as concentrações induziram aberrações cromossômicas, sendo a aderência cromossômica a mais comum. Micronúcleos foram constatados em ambas as regiões avaliadas em todas as concentrações. No bioensaio de toxicidade aguda com náuplios de *A. salina*, a concentração inibitória média (IC₅₀) após 24 horas de exposição foi de 0,01207 mL/L da formulação comercial. Diante dos riscos ambientais identificados, é fundamental buscar métodos sustentáveis para controlar ectoparasitas e assim reduzir impactos nos ecossistemas aquáticos e terrestres.

Palavras-chave: Acaricidas; bioensaios vegetais; clorpirifós; cipermetrina; fenthion; testes ecotoxicológicos.

ABSTRACT

In the Brazilian and global perspective, cattle farming plays a crucial role in providing food such as meat, milk, and derivatives for the domestic market. However, the process of raising cattle exposes the animals to ectoparasites, especially ticks. The control of this ectoparasite is carried out with acaricides, such as the commercial formulation COLOSSO FC30, which contains chlorpyrifos, cypermethrin, and fenthion. This product is sprayed on the animals' bodies; however, after application, they may freely roam around rural properties, carrying toxic molecules on their fur, which can eventually result in soil, lake, and river contamination. Faced with this issue, the present study aimed to evaluate the eco(geno)toxicity of the commercial formulation COLOSSO FC30 on different organisms. The phytotoxicity test was performed using four plant models (*Lactuca sativa*, *Pennisetum glaucum*, *Raphanus sativus*, and *Triticum aestivum*). Seeds were exposed to different concentrations of the product (0.12 to 23.61 mL/L of the commercial formulation) for 72 hours, evaluating parameters such as percentage of germination (%G), germination speed index (GSI), fresh mass, root length, and shoot length. In the cytogenotoxicity test with *Allium cepa*, germinated seeds were exposed to different concentrations (0.195 to 1.25 mL/L of the commercial formulation) for 48 hours. After this period, evaluations were conducted in both the meristematic zone and the F1 region of the root, considering parameters such as the number of cells in division, chromosomal aberrations, and micronuclei. The acute toxicity test with the microcrustacean *Artemia salina* L. was conducted following the guidelines of NBR 16530, with concentrations ranging from 0.000976 to 0.1024 mL/L of the commercial formulation. In the tests with plant models, %G was the least sensitive parameter, requiring high concentrations for 50% inhibition. Unlike %G, the GSI of the plant models demonstrated higher sensitivity to the formulation, with EC₅₀ of 0.8151, 2.080, 2.990, and 6.352 mL/L for *L. sativa*, *R. sativus*, *P. glaucum*, and *T. aestivum*, respectively. The parameters that showed higher sensitivity to COLOSSO FC30 were root length and shoot length. For root length, the EC₅₀ values were 0.3464, 0.6758, 0.3558, and 0.6870 mL/L for *L. sativa*, *R. sativus*, *P. glaucum*, and *T. aestivum*, respectively. Regarding shoot length, the EC₅₀ values were 0.6174, 3.313, 0.1901, and 0.2173 mL/L for *L. sativa*, *R. sativus*, *P. glaucum*, and *T. aestivum*, respectively. Regarding the effects on the cell cycle, both in the meristematic region and in the F1 of the roots of *A. cepa*, concentrations above 0.351 mL/L reduced mitotic activity. In the meristematic region, all concentrations induced chromosomal aberrations, with chromosomal adhesion being the most common. Micronuclei were found in both evaluated regions at all concentrations. In the acute toxicity bioassay with *A. salina* nauplii, the median inhibitory concentration (IC₅₀) after 24 hours of exposure was 0.01207 mL/L of the commercial formulation. In view of the identified environmental risks, it is essential to seek sustainable methods to control ectoparasites and thus reduce impacts on aquatic and terrestrial ecosystems.

Keywords: Acaricides; plant bioassays; chlorpyrifos; cypermethrin; fenthion. ecotoxicological tests.

INDICADORES DE IMPACTO

Os resultados das análises ecotoxicológicas conduzidas utilizando a formulação comercial COLOSSO FC30 evidenciaram impactos substanciais tanto para organismos terrestres quanto aquáticos, apontando para implicações sérias no âmbito ambiental. Essas descobertas ressaltam a premente necessidade de implementação de políticas regulatórias mais robustas para o comércio e uso da formulação COLOSSO FC30, especialmente devido à sua classificação como agrotóxico e à possibilidade de comercialização sem receituário agrônomo, aspectos cruciais para a realização do Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 12 - Consumo e Produção Responsáveis. Além disso, a atividade citotóxica e genotóxica identificada para a formulação comercial neste estudo possui implicações diretas na saúde humana, enfatizando a importância de contemplar os impactos à saúde ao empregar agentes químicos na agricultura e pecuária, em consonância com o ODS 3 - Saúde e Bem-Estar. Sob a ótica dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), os resultados deste estudo possuem relevância não apenas para os ODS 12 e 3, mas também para os ODS 14 - Vida na Água e 15 - Vida Terrestre. No âmbito do ODS 14, a identificação dos efeitos adversos da formulação comercial sobre os organismos aquáticos sublinha a urgência em preservar e proteger os ecossistemas marinhos. Estes ecossistemas desempenham um papel fundamental na promoção e manutenção da biodiversidade aquática, bem como na sustentação dos habitats marinhos e na conservação das cadeias alimentares. Similarmente, no contexto do ODS 15, a análise dos impactos do COLOSSO sobre as plantas modelos enfatiza a importância crítica de conservar a biodiversidade terrestre. Esta biodiversidade é essencial para a manutenção da estabilidade ecológica dos ecossistemas terrestres, incluindo a fertilidade do solo, a polinização de plantas e a regulação do clima. Portanto, tais observações destacam a necessidade imperativa de medidas de conservação que garantam a integridade ecológica dos ecossistemas aquáticos e terrestres, conforme preconizado pelos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. Além disso, os resultados deste estudo carregam implicações tecnológicas significativas, indicando a urgência de desenvolvimento de novas moléculas mais ecologicamente corretas e menos nocivas aos seres vivos. Tal direção pode conduzir à formulação de alternativas mais sustentáveis para a agricultura e pecuária, contribuindo, assim, para a mitigação dos impactos adversos no meio ambiente e na saúde pública, alinhando-se com diversos outros ODS, como a erradicação da pobreza, a promoção da segurança alimentar e a melhoria da saúde e bem-estar, entre outros.

IMPACT INDICATORS

The results of ecotoxicological analyses conducted using the commercial formulation COLOSSO FC30 have demonstrated substantial impacts on both terrestrial and aquatic organisms, indicating serious environmental implications. These findings underscore the urgent need for the implementation of more robust regulatory policies for the trade and use of the COLOSSO FC30 formulation, especially due to its classification as a pesticide and the possibility of commercialization without agronomic prescription, crucial aspects for achieving Sustainable Development Goal (SDG) 12 - Responsible Consumption and Production. Additionally, the cytotoxic and genotoxic activity identified for the commercial formulation in this study has direct implications for human health, emphasizing the importance of considering health impacts when employing chemical agents in agriculture and livestock, in line with SDG 3 - Good Health and Well-being. From the perspective of the Sustainable Development Goals (SDGs), the results of this study are relevant not only for SDGs 12 and 3 but also for SDGs 14 - Life Below Water and 15 - Life on Land. Within the scope of SDG 14, the identification of adverse effects of the commercial formulation on aquatic organisms highlights the urgency to preserve and protect marine ecosystems. These ecosystems play a fundamental role in promoting and maintaining aquatic biodiversity, as well as sustaining marine habitats and conserving food chains. Similarly, in the context of SDG 15, the analysis of COLOSSO impacts on model plants emphasizes the critical importance of conserving terrestrial biodiversity. This biodiversity is essential for maintaining the ecological stability of terrestrial ecosystems, including soil fertility, plant pollination, and climate regulation. Therefore, such observations underscore the imperative need for conservation measures to ensure the ecological integrity of both aquatic and terrestrial ecosystems, as advocated by the Sustainable Development Goals. Furthermore, the results of this study carry significant technological implications, indicating the urgency of developing new molecules that are more environmentally friendly and less harmful to living organisms. Such a direction could lead to the formulation of more sustainable alternatives for agriculture and livestock, thereby contributing to the mitigation of adverse impacts on the environment and public health, aligning with various other SDGs such as poverty eradication, promotion of food security, and improvement of health and well-being, among others.

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 Agrotóxicos e seus impactos no ecossistema e na saúde humana.....	15
2.2 Desafios e perspectivas no controle de carrapatos: uma análise profunda dos impactos ambientais gerados pela formulação COLOSSO FC30 e seus ingredientes ativos.....	13
2.2.1 Dados de ecotoxicidade relativos aos ingredientes ativos presentes na formulação do COLOSSO FC30 em interação com organismos vegetais.....	17
2.2.2 Dados de ecotoxicidade relativos aos ingredientes ativos presentes na formulação do COLOSSO FC30 em interação com organismos animais.....	40
2.3 Bioensaios ecotoxicológicos com plantas terrestres: uma visão holística das diretrizes e regulamentações.....	65
2.3.1 Test No. 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test.....	70
2.3.2 Test No. 227: Terrestrial Plant Test: Vegetative Vigour Test.....	71
2.3.3 ISO 11269-1:2012 Soil quality: Determination of the effects of pollutants on soil flora. Part 1: Method for the measurement of inhibition of root growth.....	71
2.3.4 ISO 11269-2:2012 Soil quality: Determination of the effects of pollutants on soil flora. Part 2: Effects of contaminated soil on the emergence and early growth of higher plants.....	72
2.3.5 ISO 18763:2016 Soil quality: Determination of the toxic effects of pollutants on germination and early growth of higher plants.....	73
2.3.6 EPA 600/3-88/029 Protocols For Short Term Toxicity Screening Of Hazardous Waste Sites. A 8.6 Lettuce Seed Germination (<i>Lactuca sativa</i>).....	74
2.3.7 EPA 600/3-88/029 Protocols For Short Term Toxicity Screening Of Hazardous Waste Sites. A.8.7 Lettuce root elongation (<i>Lactuca sativa</i>).....	75
2.3.8 OPPTS 850.4200 Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test.....	75
2.3.9 OCSPP 850.4100: Seedling Emergence and Seedling Growth.....	76
2.3.10 OCSPP 850.4230: Early Seedling Growth Toxicity Test.....	76
2.3.11 OCSPP 850.4800: Plant Uptake and Translocation Test.....	77
2.3.12 ASTM E1963-22 Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests.....	78
2.3.13 ISO 29200:2013(en) Soil quality - Assessment of genotoxic effects on higher plants - <i>Vicia faba</i> micronucleus test.....	79
ISO 29200:2013(en) Soil quality - Assessment of genotoxic effects on higher plants - <i>Vicia faba</i> micronucleus test.....	92
2.4 Citogenética vegetal aplicada a estudos ecotoxicológicos.....	93
2.4.1 Índice Mitótico.....	94

2.4.2 Aberrações cromossômicas.....	95
2.4.3 Alterações nucleares.....	96
2.4.4 Micronúcleos.....	96
2.5 Fisiologia da germinação.....	97
2.6 Utilização do microcrustáceo <i>Artemia salina</i> em estudos ecotoxicológicos.....	99
3 CONCLUSÃO.....	101
REFERÊNCIAS.....	102
SEGUNDA PARTE.....	118
ARTIGO 1 – ECO(GENO)TOXICITY OF AN ACARICIDAL FORMULATION CONTAINING CHLORPYRIPHOS, CYPERMETHRIN AND FENTHION ON DIFFERENT PLANT MODELS AND <i>Artemia salina</i> L.....	118

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o Brasil emergiu como um dos principais consumidores globais de agrotóxicos (Paumgarten, 2020). Estas substâncias desempenham um papel eficaz no controle de organismos específicos, como pragas agrícolas, plantas invasoras e patologias que frequentemente afligem as lavouras e o setor agropecuário, resultando em ganhos de produtividade e viabilidade econômica (Mendes *et al.*, 2019). Dentre as categorias de agrotóxicos, destacam-se os acaricidas, bactericidas, inseticidas e herbicidas, cada qual com sua função particular, referente aos organismos alvo.

No entanto, o uso inadequado ou excessivo desses agroquímicos pode resultar em efeitos adversos nos organismos não alvos, incluindo seres humanos, seja por exposição direta ou indireta. Atualmente, torna-se quase impossível evitar a exposição a esses produtos prejudiciais. Existem três principais formas de exposição aos agroquímicos: contaminação ocupacional, resultante da exposição de agricultores e trabalhadores rurais que lidam diretamente com esses produtos; contaminação alimentar, quando há ingestão de alimentos contaminados; e contaminação ambiental, decorrente de acidentes na produção ou aplicação inadequada (Damala; Eleftherohorinos, 2011).

No âmbito da pecuária, os acaricidas, são utilizados para controlar doenças provocadas por ectoparasitas em animais como bovinos, caprinos e suínos. No contexto brasileiro, o carrapato (*Rhipicephalus microplus* Canestrini, 1888) destaca-se como um dos principais ectoparasitas, ocasionando perdas significativas na pecuária bovina. Entretanto, nos últimos anos, esse organismo tem desenvolvido resistência aos acaricidas, levando as indústrias a formularem produtos com diferentes princípios ativos para contornar essa resistência.

A formulação comercial preponderante empregada para o controle do ectoparasita em questão é denominada COLOSSO FC30, composta por agentes pertencentes ao grupo dos organofosforados, notadamente clorpirifós e fenthion, juntamente com piretroides, como a cipermetrina. A aplicação do produto pode ser realizada por pulverização utilizando bombas específicas ou na forma de banho de imersão, onde são utilizadas banheiras contendo água e o produto, e os animais são submersos por determinado período de tempo. No entanto, a segunda forma de aplicação gera maior quantidade de resíduos tóxicos, além de ser mais trabalhosa, sendo assim, a maioria dos produtores opta pela pulverização.

Após a aplicação do produto por pulverização, os animais não permanecem confinados e podem mover-se livremente pelas áreas das propriedades rurais. Este aspecto levanta preocupações quanto à potencial contaminação do solo e dos corpos d'água devido à presença residual do produto nos pelos dos animais tratados. Além disso, observa-se que uma parcela significativa de produtores desconhece ou negligencia as orientações fornecidas pelo fabricante, especialmente no que diz respeito ao período de carência recomendado antes do abate ou consumo de leite e carne dos animais submetidos ao tratamento.

É imperativo ressaltar que dois dos princípios ativos presentes no acaricida COLOSSO FC30, a cipermetrina e o clorpirifós, têm sido identificados no ambiente e em amostras alimentares. A presença de cipermetrina foi documentada em diversas fontes, abrangendo águas superficiais, poços artesianos, águas pluviais (Moreira *et al.*, 2012) e sedimentos de rios (Triassi *et al.*, 2019). Em um estudo focalizado na qualidade do leite produzido em Chapada dos Guimarães, Mato Grosso, Brasil, a presença de cipermetrina foi constatada em amostras de leite, alcançando uma concentração de 0,012 µg/g (Hernandes *et al.*, 2009). De maneira análoga, o clorpirifós foi identificado em águas superficiais e pluviais (Jaensson *et al.*, 2007), assim como em amostras de leite, tanto convencional quanto orgânico, ultrapassando os níveis estabelecidos como referência (10 µg/L) (Granella *et al.*, 2013). Além disso, resíduos deste pesticida foram detectados em peixes selvagens (Mehta *et al.*, 2008).

A escassez de estudos ecotoxicológicos referentes à formulação do acaricida COLOSSO FC30 é evidente, uma vez que não foram encontradas investigações específicas sobre este produto na literatura. Geralmente, as pesquisas de toxicidade se concentram individualmente em cada princípio ativo, como a cipermetrina, clorpirifós e fenthion, sem, até o momento, considerar as interações entre esses três princípios ativos em conjunto. Esta lacuna de conhecimento torna-se crucial para compreender os efeitos desses compostos nos organismos, alertando sobre o possível impacto dessas substâncias nos ecossistemas.

No âmbito desse cenário, a ecotoxicologia se revela como uma aliada imprescindível, fornecendo a fundamentação para o desenvolvimento de estudos de significância substancial. Através da implementação de testes ecotoxicológicos meticulosamente elaborados em ambiente laboratorial, é possível obter uma compreensão abrangente acerca da toxicidade da substância em foco. Nestes experimentos, uma variedade de organismos modelos pode ser empregada, representando distintos ecossistemas. Dentre os representantes dos ambientes terrestres, destacam-se os organismos da fauna edáfica, bem como as plantas com sementes. Por sua vez, os microcrustáceos, algas e plantas aquáticas emergem como representantes notáveis dos ambientes aquáticos.

As plantas com sementes têm desempenhado um papel significativo na detecção de efeitos tóxicos, genotóxicos e mutagênicos de diversas substâncias. Elas constituem ferramentas valiosas na avaliação dos impactos de substâncias simples ou complexas presentes no ambiente. Os bioensaios com plantas são economicamente viáveis e apresentam uma sólida correlação com outros sistemas de testes, como organismos animais, tornando-se opções confiáveis para programas de monitoramento genotoxicológico (Andrade-Vieira; Silveira, 2018; Iqbal *et al.*, 2019).

Nos bioensaios com plantas para avaliar o potencial tóxico de substâncias, podem ser observados efeitos tanto em nível macroscópico, como germinação, biomassa e comprimento das plântulas, quanto em nível microscópico, através da análise do índice mitótico, aberrações cromossômicas e presença de micronúcleos (Aguiar; Andrade-Vieira; de Oliveira, 2016). Sendo que, os parâmetros microscópicos podem ser avaliados tanto na região meristemática quanto na região F1 da raiz de plantas modelo após exposição à substância química (Palmieri *et al.*, 2016).

Como representante dos organismos aquáticos, o microcrustáceo conhecido como *Artemia salina* (Linnaeus, 1758) merece particular destaque, sendo inicialmente utilizado para avaliar o potencial tóxico de extratos derivados de plantas medicinais (Meyer *et al.*, 1982). No entanto, esse ensaio tornou-se amplamente difundido, aplicando-se na avaliação de substâncias como metais, agrotóxicos, águas residuais e marinhas, lodo de esgoto, entre outros. O procedimento com esse organismo é relativamente simples: os náuplios permanecem em contato com a substância a ser analisada por 24 ou 48 horas, após as quais é determinado o número de organismos imóveis e a concentração inibitória média (IC₅₀). As vantagens do teste incluem a obtenção rápida de resultados, disponibilidade comercial ao longo do ano na forma de cistos, e ausência da necessidade de cultivo específico (Libralato *et al.*, 2016; Ntungwen *et al.*, 2020).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Agrotóxicos e seus impactos no ecossistema e na saúde humana

Os desafios decorrentes da interação da sociedade com a natureza têm levado ao esgotamento dos recursos naturais e das bases de subsistência, resultando em desequilíbrio na dinâmica ambiental e em disparidades sociais (Carneiro, 2015). No âmbito agrícola, a ascensão da modernização conservadora teve início em 1965, influenciada pelos princípios do capitalismo e pela chamada Revolução Verde. Esta última, segundo seus defensores, seria

fundamental para mitigar a fome que assolava grande parte da população mundial (Londres, 2011).

O termo "Revolução Verde" foi adotado para descrever um processo de modernização agrícola caracterizado pela utilização de sementes modificadas, fertilizantes, maquinários e uma crescente dependência de agrotóxicos, com o propósito de minimizar as perdas de colheitas e maximizar a produtividade (Carneiro, 2015).

Os agrotóxicos, sob um prisma conceitual, configuram-se como quaisquer substâncias ou combinações destas empregadas com o intuito de prevenir, reduzir ou eliminar doenças no âmbito agropecuário, abarcando tanto as plantações quanto os rebanhos. Consideram-se como pragas e doenças as espécies indesejáveis de plantas, animais e vetores de enfermidades vegetais e animais, responsáveis por causar danos durante a produção, processamento, armazenamento, transporte ou distribuição de alimentos, produtos agrícolas, madeira e seus derivados (Peres; Moreira, 2003).

No âmbito brasileiro, observa-se uma dependência de fertilizantes químicos e agrotóxicos no processo de produção agrícola. Consoante às disposições estabelecidas pela Lei de Agrotóxicos (Brasil, 1989), essas substâncias são:

os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) desempenha um papel crucial na classificação dos agrotóxicos, categorizando-os em cinco distintas classes quanto à toxicidade: Classe I - Extremamente Tóxico, Classe II - Altamente Tóxico, Classe III - Moderadamente Tóxico e Classe IV - Pouco Tóxico, Classe V – Produto improvável de causar dano agudo. Neste contexto, mais de 1900 produtos são regulamentados no Brasil, dos quais cerca de 258 estão agrupados nas categorias de maior toxicidade (I, II e III), delineando uma preocupante realidade toxicológica (Anvisa, 2022).

Em consonância, Laws Jr (2013) destaca a possibilidade de classificar os agrotóxicos conforme o organismo alvo, abrangendo categorias como inseticidas, fungicidas, acaricidas, microbicidas, nematocidas, raticidas, herbicidas, desfolhantes, e considerando o método de aplicação, modo de ação e sua toxicidade. No entanto, apesar das diversas classificações toxicológicas, os agrotóxicos impõem impactos adversos e expressivos ao meio ambiente.

A aplicação inadequada destas substâncias em espaços agrícolas desencadeia lixiviação, potencialmente afetando águas subterrâneas, superficiais e o solo. Este fenômeno compromete a biota circundante, resultando em prejuízos tanto para organismos-alvo quanto para não alvo, abrangendo organismos aquáticos, terrestres e até mesmo seres humanos. Os danos gerados por estas substâncias podem manifestar-se rapidamente, causando mortalidade ou afetando a fisiologia e comportamento dos organismos presentes nos ecossistemas (Konwick *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2021; Tudi *et al.*, 2021).

Adicionalmente, o uso indiscriminado de agrotóxicos culmina na contaminação atmosférica. Estas substâncias podem dispersar-se através do vento e água da chuva, alcançando regiões distantes das áreas de aplicação. Mesmo em locais remotos, como as regiões polares, destituídos de atividades agrícolas, não estão isentos de serem impactados por este processo (Grisolia, 2005; Galon *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022).

A disseminação generalizada de substâncias tóxicas no ambiente contribui significativamente para sua degradação. Este cenário evidencia a complexidade em prever com precisão os efeitos a longo prazo nos ecossistemas, pois, uma vez liberadas, essas substâncias podem causar danos severos às cadeias alimentares. A introdução de agrotóxicos no ambiente pode afetar a população de uma ou mais espécies de organismos, mesmo que não sejam o alvo direto da aplicação (Barbosa, 2004; Baudrot *et al.*, 2020).

No ambiente terrestre, os agrotóxicos exercem influência significativa sobre os organismos não alvo, destacando-se os insetos, que desempenham papel crucial como principais agentes polinizadores. A exposição a agrotóxicos pode comprometer a sobrevivência e a reprodução desses organismos, sendo a última afetada indiretamente pela redução de plantas hospedeiras (Sharma; Jha; Reddy, 2018). Inseticidas, como o clorpirifós, demonstram capacidade de induzir neurotoxicidade nesses organismos (Dorneles; de Souza Rosa; Blochtein, 2017).

Comportamentos fundamentais, como voo, locomoção e alimentação, também são passíveis de alterações sob a influência dos agrotóxicos (Lunardi; Zaluski; Orsi, 2017). Agrotóxicos com odor intenso podem provocar repelência e irritação em tais indivíduos (Stejskalová; Konradová; Kazda, 2021), impactando negativamente a comunicação de insetos que utilizam feromônios. Além disso, esses produtos podem interferir na homeostase do sistema digestório, resultando em estresse oxidativo (Farder-Gomes *et al.*, 2021), o que, por conseguinte, acarreta redução na digestão e absorção de nutrientes.

Os impactos dos agrotóxicos no ambiente terrestre são extensos e complexos. Uma vez liberados, esses produtos podem afetar também as plantas não alvo, interferindo em diversos

processos essenciais para o desenvolvimento celular e fisiológico. A absorção dessas substâncias pelas plantas, por exemplo, pode comprometer o transporte de elétrons no fotossistema II, levando a diminuições na produção de ATP e prejudicando a condutância estomática (Henry; Johnson; Wise, 2011). Adicionalmente, fungicidas apresentam a capacidade de interromper a carboxilação da rubisco, resultando na redução da assimilação de gás carbônico (Nason; Farrar; Bartlett, 2007; Petit *et al.*, 2008).

Essas alterações não se limitam apenas aos processos bioquímicos, mas também têm repercussões significativas nas eficiências morfológicas e fisiológicas das plantas. Estudos demonstram que os agrotóxicos podem causar uma diminuição na taxa de germinação, desaceleração do crescimento de órgãos vegetativos e reprodutivos, impactando variados aspectos do ciclo de vida vegetal (Rio *et al.*, 2012; Coskun *et al.*, 2015; Shakir *et al.*, 2016). Além disso, observa-se reduções no crescimento das plântulas, dimensão estomática, densidade estomática e nos pigmentos essenciais, como clorofila a, clorofila b, carotenoides e clorofila total (Duran; Kilic; Coskun, 2015).

No solo, a aplicação de agrotóxicos pode resultar na redução do pH, tornando-o mais ácido. Como consequência, a comunidade microbiana do solo é impactada, podendo levar à morte de alguns microorganismos imediatamente após a aplicação desses produtos. Os microorganismos edáficos desempenham um papel crucial na manutenção da estrutura do solo, na transformação e mineralização da matéria orgânica. Eles são extremamente importantes para diversas espécies vegetais, especialmente as leguminosas, que dependem deles para converter o nitrogênio presente na atmosfera em nitrato assimilável. Além disso, existem grupos de microorganismos capazes de degradar moléculas potencialmente tóxicas, incluindo os agrotóxicos (Baweja; Kumar; Kumar, 2020).

Adicionalmente, os efeitos dos agrotóxicos não se limitam à comunidade microbiana do solo, estendendo-se aos organismos macroscópicos presentes, como minhocas, formigas, colêmbolos, entre outros. A exposição a agrotóxicos pode resultar em impactos adversos, desde danos ao material genético até alterações enzimáticas, reduzindo significativamente as taxas de crescimento e reprodução dos invertebrados que compõem a fauna do solo (Pelosi *et al.*, 2014; Gunstone *et al.*, 2021).

Quando ocorre a lixiviação de agrotóxicos do solo ou de plantas expostas, esses compostos adentram os ecossistemas aquáticos. No ambiente aquático, as plantas, algas e invertebrados aquáticos, como os microcrustáceos, ocupam posições fundamentais na cadeia trófica. Em relação às plantas aquáticas, os efeitos mais frequentemente observados consistem na redução da fitomassa e da estrutura foliar (Ribeiro *et al.*, 2019). Para as algas, a exposição

aguda resulta na inibição do crescimento e alterações nas vias metabólicas e bioquímicas (Fernández-Naveira *et al.*, 2016; Flood; Burkholder; Cope, 2018). No que tange aos microcrustáceos, os efeitos associados incluem mortalidade, impacto no crescimento e na reprodução, redução da taxa alimentar, alterações comportamentais e locomotoras, entre outros (Moura; Souza-Santos, 2020). Adicionalmente, ressalta-se que moléculas de agrotóxicos têm a capacidade de se bioacumular nos tecidos de invertebrados aquáticos. Predadores, como peixes, ao se alimentarem desses organismos, tornam-se contaminados, desencadeando um processo de biomagnificação (Tongo *et al.*, 2022).

A exposição prolongada a agrotóxicos pode comprometer diversos aspectos da biologia dos peixes, abrangendo desde o crescimento e a produção normal de ovos até o abandono de ninhos, a redução da imunidade, a diminuição do peso corporal, a promoção de alterações hormonais e a influência na capacidade de evitar predadores. A exposição a concentrações subletais está associada a uma variedade de efeitos adversos, incluindo a diminuição da taxa de sobrevivência de adultos e a redução na abundância da população (Kamel; Hoppin, 2004; Kumar *et al.*, 2023).

Para além dos impactos ambientais, diversos estudos científicos documentam casos de intoxicação e ameaças à saúde humana. Os efeitos da intoxicação por agrotóxicos podem ser categorizados em agudos e crônicos (Peres; Moreira; Dubois, 2003). Efeitos agudos manifestam-se em até 24 horas após exposição, com sintomas que variam de irritações cutâneas e oculares a óbito. Já os efeitos crônicos, resultantes da exposição prolongada, afetam a população devido à presença residual em alimentos e no ambiente, podendo se manifestar semanas, meses, anos ou até gerações após a exposição. Estes efeitos incluem infertilidade, malformações, neurotoxicidade e câncer (Peres; Moreira; Dubois, 2003).

No corpo humano, diferentes vias de exposição aos agrotóxicos podem ocorrer, sendo as vias inalatórias e dérmicas as mais comuns para aqueles que trabalham com essas substâncias (Tudi *et al.*, 2022). Outra via relevante é a oral, relacionada ao consumo de alimentos ou água contaminados. Além disso, embriões e fetos em desenvolvimento podem ser expostos aos agrotóxicos através da placenta, se a mãe foi exposta durante ou antes da gravidez (Felisbino *et al.*, 2023).

2.2 Desafios e perspectivas no controle de carrapatos: uma análise dos impactos ambientais gerados pela formulação COLOSSO FC30 e seus ingredientes ativos

Os carrapatos, artrópodes ectoparasitas hematofágicos obrigatórios, encontram-se distribuídos globalmente, apresentando a capacidade de desencadear doenças tanto em seres humanos, como exemplificado pela febre maculosa, quanto em animais, a exemplo da babesiose (Kasaija *et al.*, 2021). Nos últimos anos, esses organismos têm manifestado resistência aos acaricidas, resultando em considerável retrocesso nos setores agrícola e pecuário em diversas regiões do planeta. Os prejuízos ocasionados por este ectoparasita em nível mundial possuem amplas implicações na saúde pública, veterinária e no contexto econômico. Estima-se que as perdas econômicas anuais derivadas de doenças transmitidas por carrapatos alcancem a expressiva cifra entre 22 a 30 milhões de dólares globalmente (Agwunobi; Yu; Liu, 2021).

A resistência manifestada por esse artrópode aos acaricidas está intimamente relacionada a dois fatores primordiais: o uso indiscriminado de agrotóxicos e a elevada taxa reprodutiva desses organismos (Agwunobi; Yu; Liu, 2021; Dzemo; Thekiso; Vudriko, 2022). Com o intuito de contornar tal resistência aos agrotóxicos e mitigar os prejuízos acarretados por este ectoparasita, têm sido adotadas misturas complexas de agrotóxicos para o seu controle. Destaca-se a formulação comercial COLOSSO FC30.

O acaricida COLOSSO FC30, uma formulação de destaque, é especificamente recomendado para o controle de carrapatos (*Rhipicephalus micropulus*), bernes (larvas de *Dermatobia hominis* L.) e mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans* L.) que afetam bovinos. Na elaboração deste produto (Tabela 1), nota-se a presença de compostos pertencentes ao grupo dos organofosforados, incluindo clorpirifós e fenthion, além de piretróides, como a cipermetrina. A aplicação desse composto pode ser executada por meio de duas modalidades distintas: pulverização ou banho de imersão (Ouro Fino Saúde Animal, 2023).

Tabela 1 – Ingredientes ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30

Fórmula:	
Ingredientes ativos	Quantidade a cada 100 mL (g)
Clorpirifós	30
Cipermetrina	15
Fenthion	15

Fonte: Ouro Fino Saúde Animal (2023)

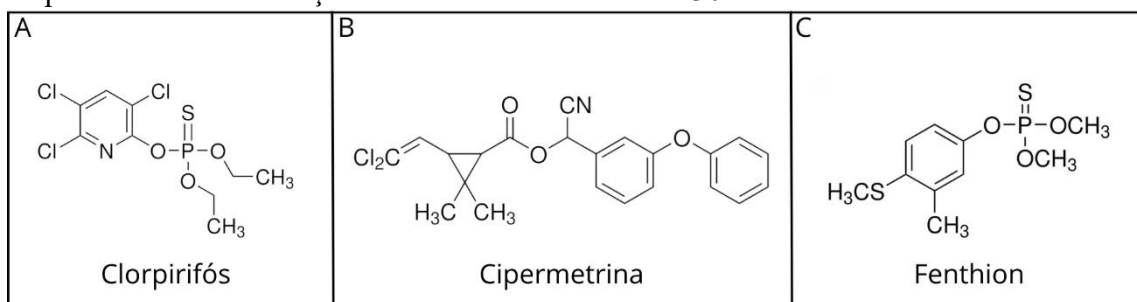
O clorpirifós (Figura 1A) é um inseticida organofosforado amplamente utilizado na produção agrícola mundial. Pode ser encontrado na forma sólida como um cristal claro ou

incolor. Quando metabolizado, torna-se um composto ainda mais tóxico e potente denominado de clorpirifós-oxon. O principal mecanismo de ação dos organofosforados nos insetos é a inibição da acetilcolinesterase, como consequência ocorre um aumento do neurotransmissor acetilcolina nos processos sinápticos, nos nervos e músculos do sistema nervoso central (Sánchez-Santed; Colomina; Hernández, 2015; Yadav *et al.*, 2016).

O composto ativo conhecido como cipermetrina (Figura 1B) é categorizado dentro da classe dos piretróides, sendo uma variação modificada da piretrina, uma substância extraída da planta *Chrysanthemum cinerariifolium* (Trevis.) Vis. (Soderlund *et al.*, 2002; Ahmad *et al.*, 2009). Este agrotóxico é amplamente utilizado na agricultura, em ambientes de jardinagem, no setor da silvicultura e na pecuária bovina com o propósito de controlar ectoparasitas.

O fenthion, também conhecido como O,O-Dimetil O-[3-metil-4-(metilsulfanil)fenil] fosforotioato ou MPP (Figura 1C), é um agrotóxico pertencente à classe dos organofosforados. Seu principal mecanismo de ação está intimamente relacionado à inibição da atividade da enzima colinesterase, a qual desempenha um papel crucial no sistema nervoso dos artrópodes (Nishio *et al.*, 2023). Esse composto é extensivamente empregado na agricultura e na área da saúde para o controle de insetos hematófagos, responsáveis por causar doenças, incluindo o carrapato (Somdare *et al.*, 2015; Nwani *et al.*, 2016). Os cinco principais produtos resultantes da degradação do Fenthion - MPP-sulfóxido, MPP-sulfona, MPP-oxon, MPP-oxon sulfóxido e MPP-oxon sulfona - são metabólitos que surgem a partir da ação de microrganismos presentes no ambiente vegetal, animal e do solo circundante (Nishio *et al.*, 2023).

Figura 1 – Estrutura molecular dos ingredientes ativos clorpirifós, cipermetrina e fenthion que estão presentes na formulação comercial COLOSSO FC30

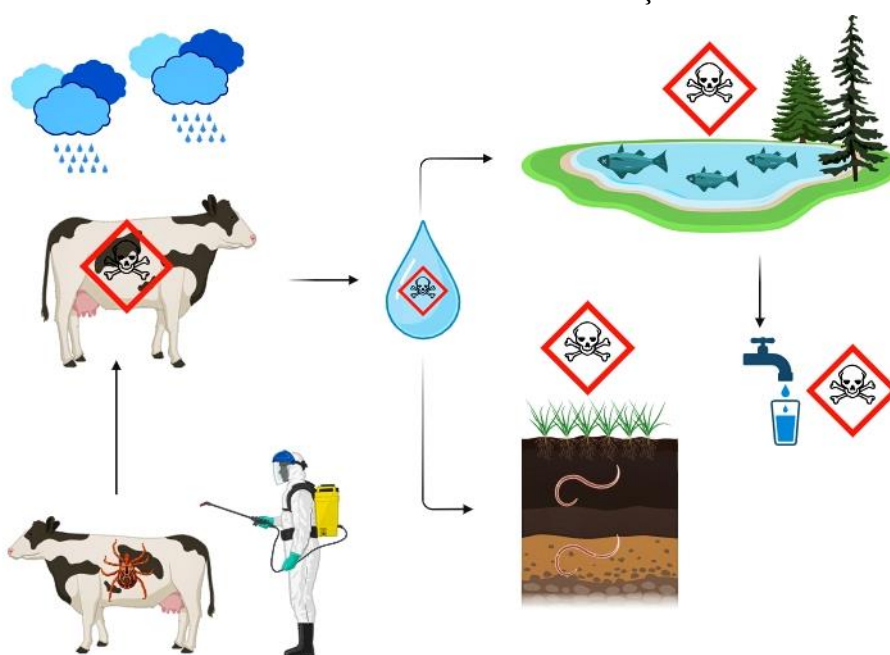


Fonte: Sigma-aldrich (2024)

Apesar da formulação comercial COLOSSO FC30, contendo os três ingredientes ativos, ser importante para o controle de ectoparasitas na pecuária, é fundamental ressaltar que seu uso suscita preocupações ambientais que ainda carecem de uma investigação abrangente. A principal preocupação está relacionada à aplicação do produto nos animais. Este é pulverizado

sobre todo o rebanho de gado para eliminar os parasitas (Ouro Fino Saúde Animal, 2023). No entanto, após a aplicação, os animais não permanecem confinados, podendo se deslocar livremente pelas propriedades rurais. Isso os transforma em vetores ou carreadores de moléculas potencialmente tóxicas, contaminando solos e lagos devido à presença do produto ainda em seu pelo. Adicionalmente, os animais ficam expostos a eventos climáticos inesperados, como tempestades, que podem remover o produto do pelo. Conseqüentemente, a água com resíduos do produto pode atingir lençóis freáticos ou ser escoada para lagos e rios, causando contaminação ou mesmo a morte de organismos da biota local (Figura 2).

Figura 2 – Problemática ambiental envolvida no uso da formulação comercial COLOSSO FC30



Fonte: Autor (2024)

No que concerne à toxicidade da formulação COLOSSO FC30 para seres humanos, episódios de ingestão ou intoxicação frequentemente resultam em reações adversas abrangentes. Estas incluem tremores, convulsões, vômitos, salivagem excessiva, sudorese intensa, cólicas abdominais, broncoconstrição, diarreia, fraqueza muscular, bradicardia, incontinência urinária e dificuldade respiratória. Dada a inexistência de antídotos específicos para incidentes de intoxicação por este composto, a recomendação é a aplicação de um tratamento sintomático e de suporte (FISPQ, 2017).

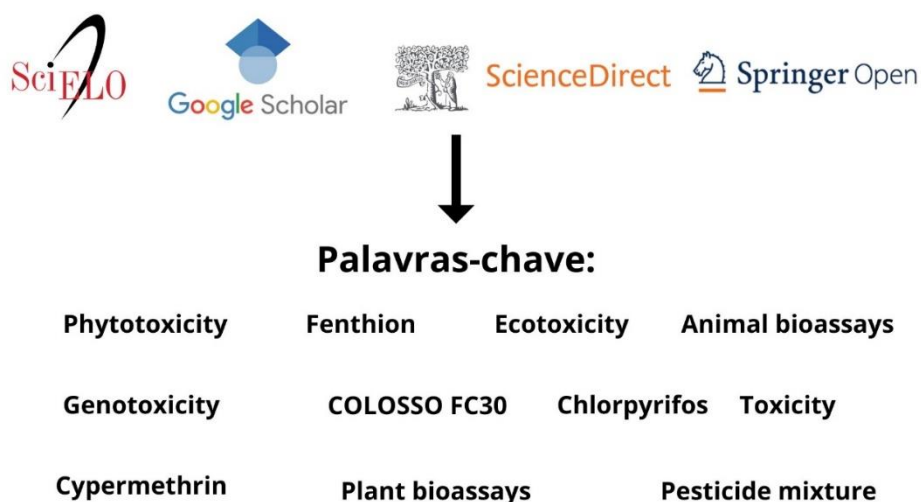
Em relação aos impactos ambientais, informações acerca da ecotoxicidade da formulação COLOSSO FC30, que engloba os três ingredientes ativos anteriormente mencionados, destacam sua elevada toxicidade para organismos aquáticos, sendo categorizado

como extremamente tóxico (Classe 1) tanto em exposições agudas quanto crônicas (FISPQ, 2017). Além disso, no contexto ambiental, o produto manifesta uma reduzida capacidade de degradação, persistindo por períodos substanciais. É pertinente salientar que os dados de ecotoxicidade atualmente disponíveis na Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) são restritos e incompletos, uma vez que se concentram na avaliação de cada princípio ativo de forma isolada, negligenciando a abordagem da interação resultante da combinação dos três ingredientes ativos presentes na formulação (FISPQ, 2017).

Diante do exposto, esta seção da revisão de literatura empenhar-se-á na investigação dos efeitos ecotoxicológicos decorrentes das misturas de ingredientes ativos ou dos princípios ativos isolados presentes na formulação COLOSSO FC30 em organismos modelos. O escopo desta análise visa aprofundar o conhecimento acerca dos impactos e dos mecanismos associados a essas substâncias sobre organismos vivos, proporcionando uma compreensão mais abrangente dos potenciais riscos ambientais envolvidos.

Um corpus constituído por 53 artigos da área de ecotoxicologia foi criteriosamente selecionado, abrangendo pesquisas que empregaram uma variedade de organismos modelos para a avaliação do potencial ecotoxicológico da combinação dos ingredientes ativos (cipermetrina, clorpirifós e fenthion), bem como de cada um desses compostos de forma isolada. As palavras chaves e bases de dados consultadas para seleção dos artigos estão dispostas na figura 3.

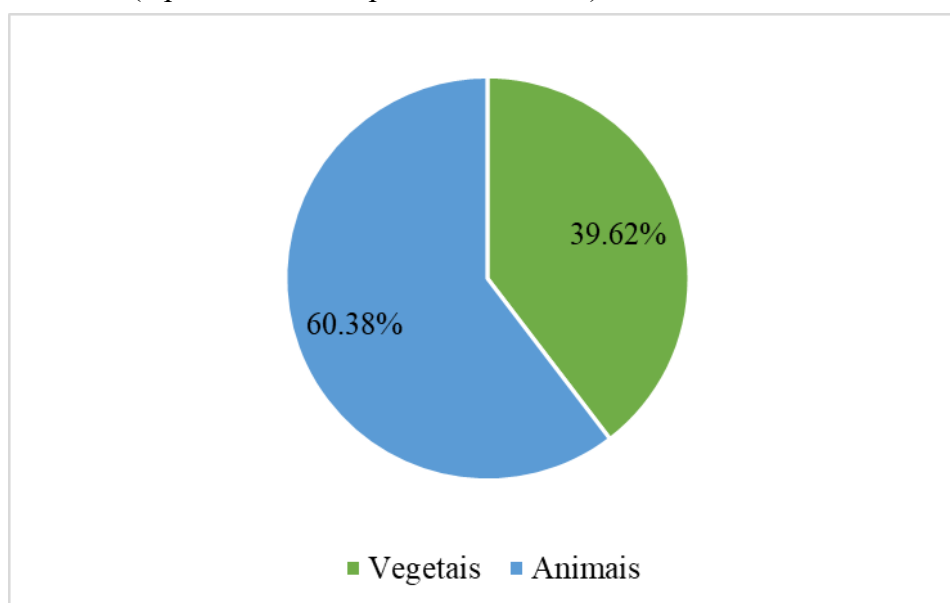
Figura 3 - Bases de dados consultadas e palavras-chave empregadas na seleção dos artigos que investigaram a ecotoxicidade da formulação comercial COLOSSO FC30 ou de seus ingredientes ativos.



Fonte: Autor (2024)

As análises dos artigos selecionados revelam, de maneira abrangente, que a maioria dos estudos ecotoxicológicos (60,38%) optou por empregar organismos animais como modelos nos bioensaios realizados (Figura 4).

Figura 4 - Percentual de trabalhos que empregaram organismos animais ou vegetais na avaliação do potencial ecotoxicológico da formulação comercial COLOSSO FC30 ou de seus ingredientes ativos (cipermetrina, clorpirifós e fenthion)

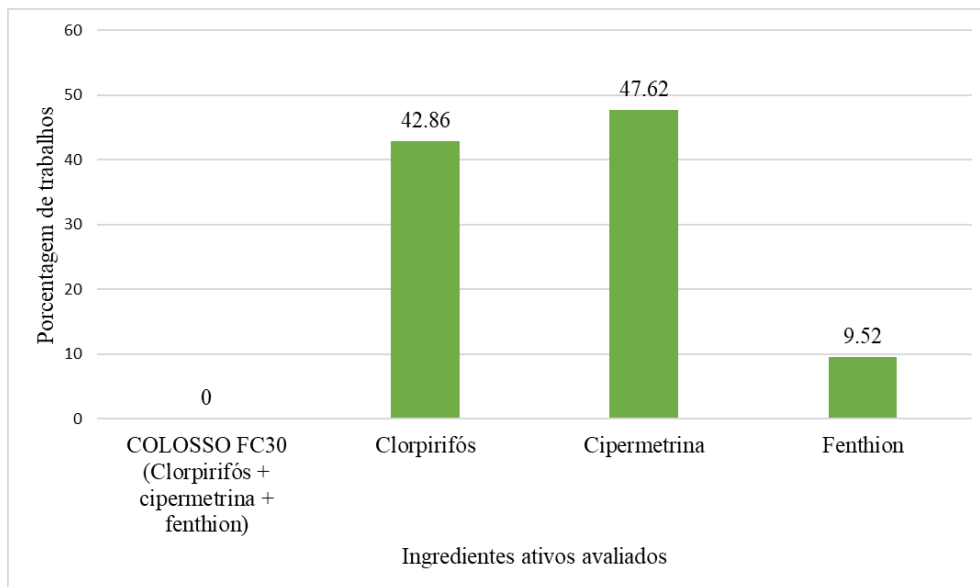


Fonte: Autor (2024)

2.2.1 Dados de ecotoxicidade relativos aos ingredientes ativos presentes na formulação do COLOSSO FC30 em interação com organismos vegetais

A revisão bibliográfica não revelou estudos específicos que abordassem o potencial tóxico da formulação comercial COLOSSO FC30 ou da combinação de seus ingredientes sobre organismos vegetais. As análises disponíveis se restringem à investigação do princípio ativo de forma isolada. Destaca-se que, dentre os estudos que empregaram organismos vegetais como modelo, a cipermetrina se evidencia como o principal ingrediente ativo investigado, representando aproximadamente 47,62% das pesquisas identificadas, conforme apresentado na Figura 5.

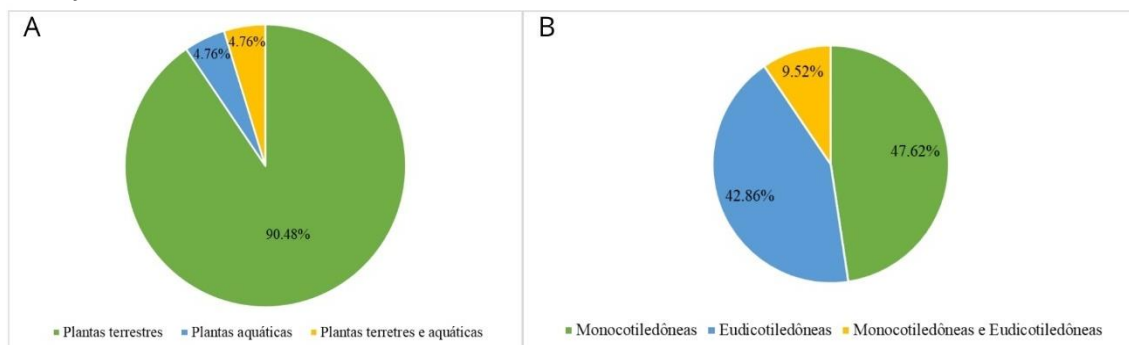
Figura 5 – Percentual de estudos identificados abordando a avaliação do potencial ecotoxicológico da formulação comercial COLOSSO FC30, bem como de seus ingredientes ativos (cipermetrina, clorpirifós e fenthion), de maneira isolada, utilizando modelos vegetais.



Fonte: Autor (2024)

Nas investigações ecotoxicológicas conduzidas com organismos vegetais, foi constatado que 90,48% dos ensaios empregaram plantas terrestres como organismos-modelo (Figura 6A). Além disso, observou-se que a maioria das espécies utilizadas pertence ao grupo das monocotiledôneas, representando 47,62% do total (Figura 6B).

Figura 6 - Perfil das espécies vegetais empregadas em ensaios ecotoxicológicos para a avaliação dos efeitos dos ingredientes ativos (clorpirifós, cipermetrina e fenthion) presentes na formulação comercial COLOSSO FC30.

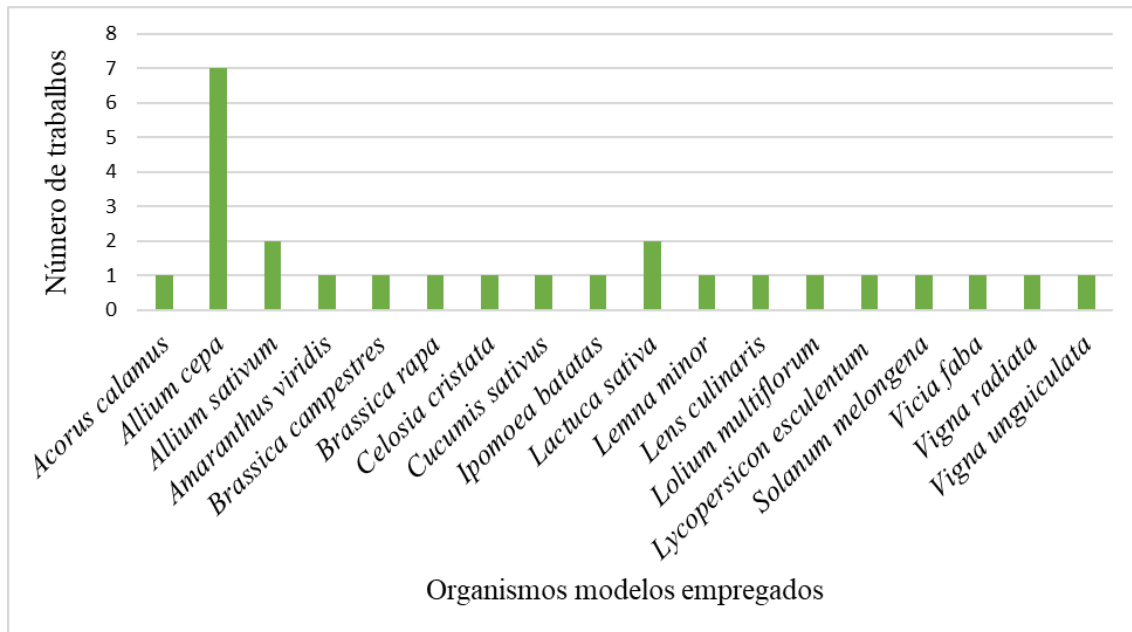


Fonte: Autor (2024)

Na análise detalhada das pesquisas em questão, observou-se que sete delas elegeram a espécie *Allium cepa* L. como organismo modelo. Adicionalmente, notou-se que o *Allium sativum* L. e a *Lactuca sativa* L. foram os segundos modelos vegetais mais frequentemente

empregados, com dois estudos registrados envolvendo esses organismos, conforme evidenciado na Figura 7.

Figura 7 – Número de estudos e variedade de modelos vegetais utilizados em pesquisas ecotoxicológicas envolvendo os princípios ativos (cipermetrina, clorpirifós e fenthion) presentes na formulação comercial COLOSSO FC30.



Fonte: Autor (2024)

No Quadro 1, são apresentados de forma detalhada os estudos avaliados que empregaram organismos vegetais, destacando o ingrediente ativo investigado, as concentrações utilizadas, os parâmetros analisados e os principais resultados obtidos.

Quadro 1 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos vegetais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto avaliado	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Clorpirifós (CPF)	<i>Allium cepa</i>	5; 10; 15; 20; 25 e 30 ppm	Porcentagem de germinação da semente (G%), porcentagem de sobrevivência (S%), comprimento da raiz, comprimento da parte aérea, razão do comprimento da parte aérea para a raiz, índice de vigor da plântula (SVI), porcentagem de fitotoxicidade (P%), índice de tolerância (IT) e atividades de enzimas antioxidantes como catalase (CAT), peroxidase (POD) e superóxido dismutase (SOD).	A LC ₅₀ para %G foi de 9 ppm. O índice de sobrevivência de plantas <i>A. cepa</i> também foi afetado, com 48,33% a 5 ppm e 13,33% a 30 ppm. O comprimento da raiz e da parte aérea diminuiu com a dose do agrotóxico, e a fitotoxicidade aumentou de 62,01% a 5 ppm para 93,02% a 30 ppm. Plântulas de <i>A. cepa</i> expostas ao CPF mostraram aumento na atividade de enzimas antioxidantes (CAT, POD, SOD), indicando impactos abrangentes do CPF na germinação, crescimento e respostas antioxidantes das plantas.	Fatma <i>et al.</i> , (2018)

Quadro 1 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos vegetais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto avaliado	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Clorpirifós	<i>Celosia cristata</i> L.	1, 2 e 2.5 %	Porcentagem de germinação, comprimento da raiz e parte aérea, peso fresco e seco e determinação do teor de pigmentos fotossintéticos (clorofila a e b).	O clorpirifós teve efeitos notáveis na germinação de sementes e no desenvolvimento de plantas. A maior redução na germinação (46%) ocorreu com a concentração mais elevada do agrotóxico (2,5%). O comprimento da parte aérea aumentou a 0,5%, mas foi negativamente afetado em concentrações superiores. A maior diminuição no comprimento da raiz foi observada a 2,5%. Peso fresco e peso seco diminuíram com o aumento da dosagem de clorpirifós. A maior concentração (2,5%) resultou em diminuição nos teores de clorofila a e b.	Baskaran <i>et al.</i> (2016)
Clorpirifós	<i>Lolium multiflorum</i> Lam.	10; 25; 50; 75 e 100 mg/kg	Porcentagem de germinação	Em concentrações até 50 mg/kg, o clorpirifós não foi tóxico para o azevém. No entanto, em níveis mais altos (75 e 100 mg/kg), a germinação das sementes foi significativamente reduzida para 58% e 44%.	Korade; Fulekar, (2009)

Quadro 1 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos vegetais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto avaliado	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Clorpirifós	<i>Vigna radiata</i> (L.) R.Wilczek	5; 25; 50; 75 e 100 ppm.	Porcentagem de germinação, comprimento da raiz e da parte aérea das plântulas	Sementes expostas às soluções de clorpirifós com concentrações de 5, 25, 50, 75 e 100 ppm, foi observada diminuição significativa na taxa de germinação. Além disso, constatou-se que o clorpirifós teve o efeito de inibir o comprimento da raiz e da parte aérea em todas as concentrações analisadas.	Santhoshkumar <i>et al.</i> (2015)
Clorpirifós	<i>Allium cepa</i>	170; 340 e 680 ppm	Ensaio de citogenotoxicidade	Na menor concentração testada, observou-se elevada citotoxicidade do clorpirifós. Adicionalmente, este composto demonstrou a capacidade de induzir diversas aberrações cromossômicas, tais como aderências cromossômicas, anáfases e telófases multipolares, pontes cromossômicas e cromossomos retardados.	Asita; Makhalemele (2008)

Quadro 1 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos vegetais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto avaliado	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Clorpirifós	<i>Lens culinaris</i> Medik.	1; 3; 5; 7; 8; 10 e 15 mg/L	Comprimento radicular e citogenotoxicidade	A exposição a concentrações de 8 e 10 mg/L resultou em significativa diminuição no comprimento das raízes. Houve inibição da mitose em todas as concentrações testadas, especialmente em 8, 10 e 15 mg/L, com taxa de inibição superior a 50%. Foram identificadas diversas anormalidades cromossômicas, como cromossomos aderentes durante a anáfase, disrupção cromossômica, anáfase irregular, ausência de núcleo, lesões nucleares, pontes anáfasicas e cromossomos aderentes na metáfase, evidenciadas em todas as concentrações. Micronúcleos foram observados nas concentrações de 8, 10 e 15 mg/L.	Mercado; Bayona (2019)

Quadro 1 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos vegetais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto avaliado	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Clorpirifós	<i>Acorus calamus</i> L.	1, 2, 4, 8 e 16 mg/L	Medições de fluorescência da clorofila, incluindo a eficiência quântica máxima (Fv/Fm), a eficiência quântica do PSII (Φ PSII) e o coeficiente de extinção fotoquímica (qP).	Os parâmetros fotossintéticos Φ PSII e qP foram impactados pelo estresse provocado pelo clorpirifós, evidenciando alterações dependentes da concentração aplicada. Observou-se uma significativa redução em Φ PSII nos níveis de tratamento de 8 e 16 mg/L, ao passo que qP apresentou uma diminuição estatisticamente significativa nos tratamentos de 4, 8 e 16 mg/L. Concomitantemente à diminuição na eficiência quântica máxima do PSII (Fv/Fm), verificou-se um aumento significativo na fluorescência inicial da clorofila (Fo) em plantas expostas ao clorpirifós.	Wang <i>et al.</i> (2016)
Clorpirifós	<i>Lactuca sativa</i>	200; 20; 2; 0,2, e 0,02 μ g/L	Índice de germinação e o comprimento médio da raiz	O clorpirifós não exerceu impacto significativo sobre os processos de germinação nem sobre o comprimento das raízes.	Utzig <i>et al.</i> (2019)

Quadro 1 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos vegetais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto avaliado	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Clorpirifós	<i>Lactuca sativa</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> L. e <i>Lemna minor</i> L.	15; 150 e 1500 µg/L	Porcentagem de germinação, comprimento da raiz e formação de novas folhas	Para <i>L. sativa</i> , a concentração de 1050 µg/L foi necessária para inibir a germinação em 50%. Já para <i>L. minor</i> , os resultados mostraram que a CE ₅₀ para clorpirifós em relação à formação de novas folhas foi de 10,41 µg/L em 48 horas. No caso de <i>L. esculentum</i> , os resultados indicaram que a concentração de clorpirifós necessária para inibir o crescimento da raiz em 50%, em 96 horas, foi de 960 µg/L.	Iannacone <i>et al.</i> (2000)
Cipermetrina	<i>Cucumis sativus</i> L.	50; 125; 200; 350 e 500 µg/kg	Porcentagem de germinação, comprimento da raiz, parte aérea e das folhas, e quantificação de Clorofila-a (Ch a), Clorofila-b (Ch b) e carotenoides.	A germinação não foi afetada pela cipermetrina, mas sua presença estimulou o crescimento radicular e inibiu o desenvolvimento da parte aérea e o tamanho das folhas. O tratamento das folhas com cipermetrina aumentou significativamente os níveis de clorofila (Ch a) e carotenoides totais.	Bragança <i>et al.</i> (2018)

Quadro 1 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos vegetais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto avaliado	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Cipermetrina	<i>Vigna unguiculata</i> (L.) Walp.	0,25; 0,50, 0,75 e 1,0%	Porcentagem de germinação, atividade da enzima amilase, comprimento da raiz e da parte aérea, número de folhas e ramos, quantidade de sementes produzidas e massa seca total.	A cipermetrina influenciou positivamente o crescimento da radícula, mas teve efeitos fitotóxicos em concentrações mais elevadas, reduzindo tanto o comprimento da radícula quanto o número de ramos. O grupo controle não tratado apresentou o maior número médio de folhas e ramos, enquanto a concentração de 1,0% resultou no menor número médio. A cipermetrina reduziu o número de sementes em todas as concentrações e a matéria seca total apenas em concentrações de 0,75% e 1%. Em concentrações baixas, estimulou a produção de amilase, mas em concentrações elevadas, diminuiu a atividade dessa enzima.	Obidola <i>et al.</i> (2019)
Cipermetrina	<i>Allium sativum</i>	1; 2; 4; 8 e 16 ppm	Índice mitótico (IM) e aberrações cromossômicas	O índice mitótico foi afetado a partir de 2 ppm, e aberrações cromossômicas ocorreram em todas as concentrações testadas. A maior porcentagem de aberrações (40,76%) foi observada na concentração mais alta (16 ppm).	Saxena; Chauhan; Gupta (2005)

Quadro 1 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos vegetais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto avaliado	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Cipermetrina	<i>Solanum melongena</i> Wall.	0,01; 0,15; 0,25 e 1,00%	Porcentagem de germinação, comprimento das plântulas (aérea e raiz), número de folhas, flores e ramificações, área foliar e massa seca.	A cipermetrina demonstrou impacto significativo em diversos parâmetros morfológicos de plantas, incluindo comprimento da raiz, parte aérea, altura, número de ramificações, número de folhas e área foliar. Em concentrações mais baixas (0,01%), observou-se um estímulo positivo em todos esses parâmetros de crescimento, ao passo que concentrações mais elevadas resultaram na inibição de todos esses aspectos.	Sharma (2016)
Cipermetrina	<i>Allium cepa</i>	5; 10 e 20 mg/L	Comprimento da raiz, índice mitótico e aberrações cromossômicas	A concentração inibitória de 50% para o comprimento da raiz foi 10 mg/L. Todas as concentrações testadas apresentaram efeitos mitodepressivos. A cipermetrina induziu quebras cromossômicas centroméricas e diversas aberrações, como cromossomos aderidos, c-metáfases, anáfases multipolares, cromossomos retardados, células binucleadas e micronúcleos.	Chauhan; Saxena; Gupta (1999)

Quadro 1 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos vegetais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto avaliado	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Cipermetrina	<i>Allium cepa</i>	1,5; 3,0 e 6,0 ppm	Determinação dos pigmentos fotossintéticos (clorofila e clorofila b), atividade da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), quantificação de malonaldeído (MDA), ensaio de micronúcleo, índice mitótico e avaliação de aberrações cromossômicas.	A cipermetrina resultou em diminuição nos níveis de pigmentos carotenoides, clorofila a e b em todos os tratamentos. Paralelamente, a atividade da enzima SOD aumentou proporcionalmente à concentração e duração da exposição, atingindo o pico no décimo quinto dia com 6,0 ppm de cipermetrina. Em contraste, a atividade da enzima CAT aumentou com a concentração de cipermetrina, mas teve uma leve diminuição após 15 dias de tratamento com 1,5 ppm e 3,0 ppm. Nas raízes expostas a 1,5, 3,0 e 6,0 ppm, os níveis de malonaldeído foram aumentados em comparação ao controle. Além disso, a cipermetrina causou redução do índice mitótico. Em todas as concentrações testadas, foram observadas anormalidades cromossômicas e micronúcleos, sendo a ponte cromossômica a anormalidade mais prevalente.	Çavuşoğlu <i>et al.</i> (2011)

Quadro 1 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos vegetais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto avaliado	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Cipermetrina	<i>Allium cepa</i>	0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 1,5 e 2%	Comprimento da raiz, índice mitótico e aberrações cromossômicas	O valor da concentração efetiva média (EC ₅₀) para o crescimento radicular foi determinado na concentração de 0,50%. Todas as concentrações dos inseticidas testadas afetaram o índice mitótico. Além disso, foram observadas aberrações cromossômicas em todas as concentrações testadas. Os tipos mais prevalentes de aberrações cromossômicas foram viscosidade, c-metáfase, pontes cromossômicas na anáfase e cromossomos atrasados.	Sheikh; Patowary; Laskar (2020)
Cipermetrina	<i>Allium cepa</i>	1,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0 ppm	Comprimento da raiz e índice mitótico	A concentração de cipermetrina que causou 50% de redução da raiz foi de 21,5 ppm. Todas as concentrações testadas resultaram em uma diminuição do índice mitótico. Além disso, aberrações cromossômicas, como cromossomos pegajosos, pontes e fragmentos cromossômicos, e cromossomos retardados foram observadas.	Yekeen; Adeboye (2013)

Quadro 1 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos vegetais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto avaliado	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Cipermetrina	<i>Brassica rapa</i> L.	0, 5,6; 8,4; 11 e 17 mg/L	Porcentagem de germinação, comprimento da raiz e da parte aérea	Na concentração de 17 mg/L, registrou-se uma taxa de germinação de 10%. No ensaio da solução, notou-se uma diminuição significativa no comprimento da raiz à medida que a concentração de cipermetrina aumentou. No entanto, em condições de solo, constatou-se que o crescimento da raiz foi minimamente impactado.	Liu <i>et al.</i> (2009)
Cipermetrina	<i>Allium sativum</i>	0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 mg/mL	Comprimento da raiz, índice mitótico e aberrações cromossômicas	Todas as concentrações avaliadas impactaram o comprimento radicular e o índice mitótico. Nas células expostas à cipermetrina, observou-se uma variedade de aberrações cromossômicas. Essas anomalias incluíram quebras cromossômicas, c-metáfases, cromossomos retardados, anáfases quádruplas erráticas, anáfases tripolares e formação de pontes cromossômicas.	Onuminya; Eze (2019)

Quadro 1 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos vegetais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Conclusão)

Composto avaliado	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Fenthion	<i>Amaranthus viridis</i> L., <i>Brassica campestris</i> L., <i>Ipomoea batatas</i>	500 µg/mL	Microextração em fase sólida <i>in vivo</i> (SPME)	Os pesquisadores identificaram que a exposição ao agrotóxico fenthion implica potenciais riscos relacionados ao metabolismo da fase I.	Qiu <i>et al.</i> (2020)
Fenthion	<i>Allium cepa</i> (L.) Lam. e <i>Vicia faba</i> L.	0,075, 0,75 e 7.5 M	Dano ao DNA (ensaio cometa e análise de morte celular programada)	Todas as concentrações testadas causaram danos no DNA das espécies vegetais, especialmente nas raízes de <i>A. cepa</i> , que demonstraram maior sensibilidade aos contaminantes. O tratamento com fenthion resultou em um aumento de enzimas ativas semelhantes à caspase-3 nas células radiculares. A análise de imunolocalização de Cyt C mostrou liberação no citoplasma, com sinal mais fraco e difuso nas células tratadas em comparação com as células não tratadas. Esses efeitos foram mais evidentes nas concentrações mais altas do inseticida fenthion em <i>A. cepa</i> , e a exposição ao fenthion também levou a uma redução nas quantidades de proteínas fosfo-ERK.	Cortés-Eslava <i>et al.</i> (2018)

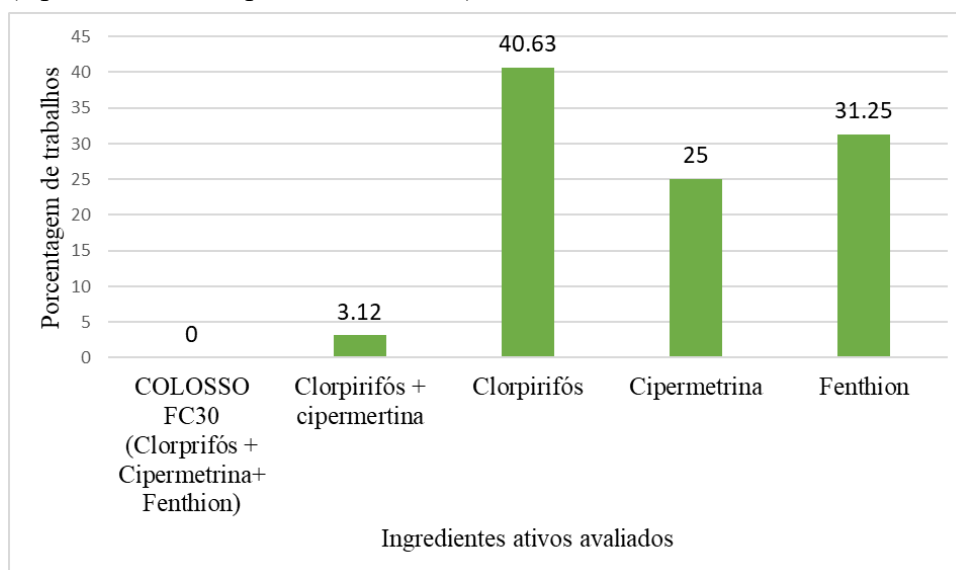
Fonte: Autor (2024)

2.2.2 Dados de ecotoxicidade relativos aos ingredientes ativos presentes na formulação do COLOSSO FC30 em interação com organismos animais

Conforme mencionado anteriormente, a maioria dos estudos (60,38%) empregou organismos animais na avaliação dos efeitos decorrentes da mistura ou dos ingredientes ativos isolados presentes na formulação comercial COLOSSO FC30, que consistem em cipermetrina, clorpirifós e fenthion. Não foram identificados estudos que investigassem a associação dos três princípios ativos em conjunto. Contudo, destaca-se um estudo (3,12%) que analisou os efeitos da combinação de clorpirifós e cipermetrina em carpas (*Cyprinus sp.*) e no zebrafish (*Danio rerio*) (Figura 8).

No escopo dos estudos envolvendo animais, o princípio ativo mais amplamente investigado foi o clorpirifós de forma isolada, abrangendo 40,63% das pesquisas, seguido pelo fenthion, presente em 31,25% dos estudos (Figura 8).

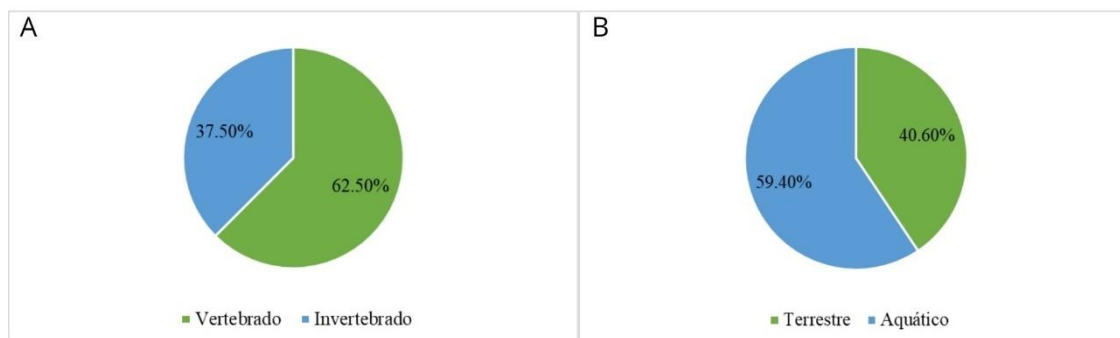
Figura 8 - Percentual de estudos identificados abordando a avaliação do potencial ecotoxicológico da formulação comercial COLOSSO FC30, bem como de seus ingredientes ativos (cipermetrina, clorpirifós e fenthion), de maneira isolada, utilizando modelos animais



Fonte: Autor (2024)

Com base nos estudos que utilizaram organismos animais, evidenciou-se que 62,50% deles optaram por organismos vertebrados, enquanto 37,5% empregaram organismos invertebrados (Figura 9A). Adicionalmente, destaca-se que 59,40% dos estudos aplicaram organismos aquáticos nos testes de toxicidade, contrastando com os 40,60% que empregaram organismos terrestres, conforme ilustrado na Figura 9B.

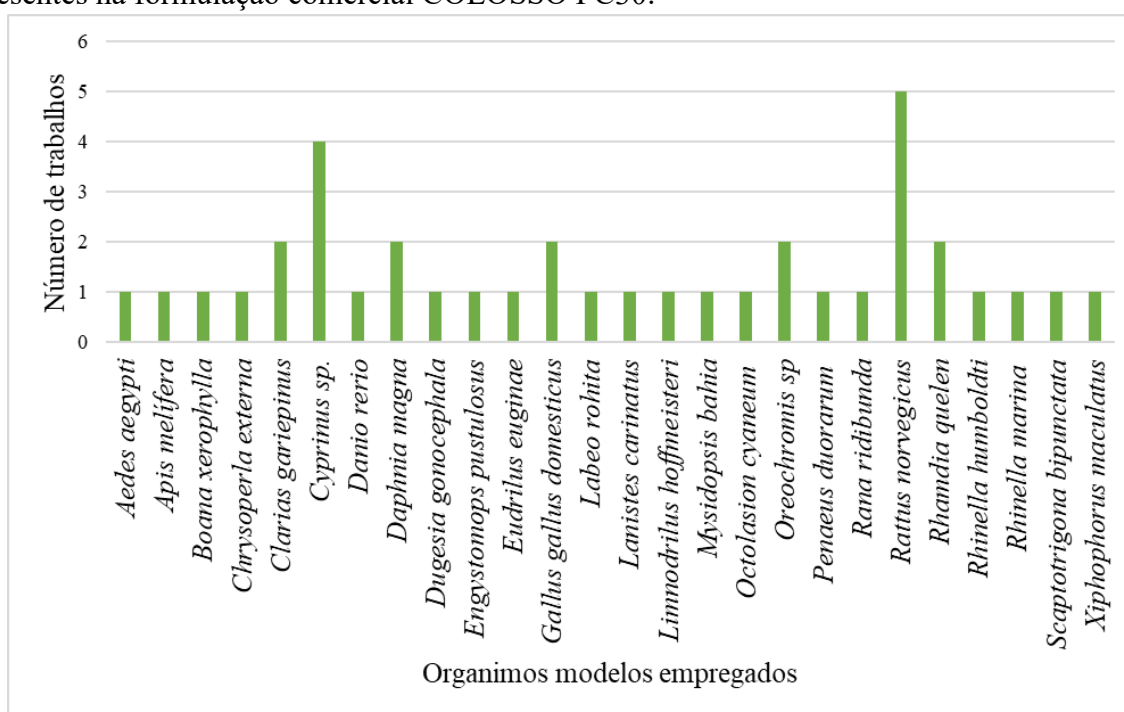
Figura 9 - Perfil dos organismos animais empregados em ensaios ecotoxicológicos para a avaliação dos efeitos dos ingredientes ativos (clorpirifós, cipermetrina e fenthion) presentes na formulação comercial COLOSSO FC30



Fonte: Autor (2024)

No que concerne aos organismos modelo animais utilizados, evidenciou-se que a maioria dos estudos empregou a espécie *Rattus norvegicus* (cinco trabalhos) e a espécie *Cyprinus* sp. (quatro trabalhos). Subsequentemente, foram identificados estudos envolvendo as seguintes espécies: *Daphnia magna*, *Gallus gallus domesticus*, *Rhamdia quelen*, *Oreochromis* sp. e *Clarias gariepinus* (com dois trabalhos para cada espécie), conforme representado na Figura 10.

Figura 10 - Número de estudos e variedade de modelos animais utilizados em pesquisas ecotoxicológicas envolvendo os princípios ativos (cipermetrina, clorpirifós e fenthion) presentes na formulação comercial COLOSSO FC30.



Fonte: Autor (2024)

No Quadro 2, encontram-se dispostas as pesquisas avaliadas que empregaram organismos animais, juntamente com o ingrediente ativo objeto de investigação, as concentrações utilizadas e os parâmetros analisados. Adicionalmente, são apresentados os principais resultados obtidos a partir dessas investigações.

Quadro 2 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos animais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Cipermetrina + Clorpirifós	<i>Danio rerio</i> (Hamilton, 1822) e <i>Cyprinus sp.</i>	0,3; 0,6 e 1 µg/L	Determinação da peroxidação lipídica (LPO), tióis não proteicos (NPSH) e níveis de ácido ascórbico (ASA), atividade da glutathione S-transferase (GST) e atividade da catalase (CAT)	Durante a exposição, tanto a carpa (<i>Cyprinus sp.</i>) quanto o peixe-zebra (<i>D. rerio</i>) mostraram sinais de estresse oxidativo, evidenciado pelo aumento na peroxidação lipídica (LPO) e na atividade da enzima glutathione-S-transferase (GST). No entanto, as respostas a outros indicadores oxidativos foram diferentes entre as espécies. As carpas apresentaram aumento nos níveis de ácido ascórbico (ASA) e diminuição na atividade da enzima catalase (CAT) e nos níveis de tióis não protéicos (NPSH). Já o peixe-zebra teve uma redução significativa nos níveis de ASA, mas aumento na atividade da CAT e nos níveis de NPSH.	Nunes <i>et al.</i> (2018)

Quadro 2 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos animais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Clorpirifós	<i>Rattus norvegicus</i> (Berkenhout, 1769)	2,7; 5,4 e 12,8 mg/kg	Mortalidade, pesos corporais e testiculares, contagem de esperma, motilidade e taxa de malformação, níveis hormonais (Hormônio luteinizante (LH), Hormônio folículo-estimulante (FSH), estradiol (E ₂) e testosterona (T)), avaliação histopatológica e a detecção da lactato desidrogenase (LDH)	O clorpirifós não ocasionou mortalidade nem impactou o peso corporal ou dos testículos dos animais estudados. No entanto, foi responsável por reduzir a contagem e a mobilidade dos espermatozoides, aumentar a taxa de malformações espermáticas e gerar alterações degenerativas nos túbulos seminíferos em diferentes níveis de dosagem. Em doses de 5,4 e 12,8 mg/kg, houve uma tendência de diminuição nos níveis de testosterona e um aumento nos níveis de FSH, mas sem efeitos claros nos níveis de LH e E ₂ . Além disso, a exposição ao clorpirifós resultou em um aumento significativo nas atividades das enzimas LDH e LDH-x em doses de 5,4 e 12,8 mg/kg, mas não foram observadas diferenças notáveis nos níveis de expressão dos genes relacionados.	Sai <i>et al.</i> (2013)

Quadro 2 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos animais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Clorpirifós	<i>Daphnia magna</i> Straus, 1820	3,9; 7,8; 31,3 e 250 µg/L	Imobilidade	A concentração de clorpirifós que demonstrou efeitos estatisticamente significativos na mobilidade de <i>D. magna</i> ficou entre 0,98 e 31,3 µg/L. O valor do IC ₅₀ obtido foi de 1,2 µg/L.	Echeverri-Jaramillo <i>et al.</i> (2020)
Clorpirifós	<i>Gallus gallus domesticus</i> L.	3,5 mg/kg	Contagem de glóbulos brancos e vermelhos, conteúdo de hemoglobina, volume celular médio, hemoglobina corpuscular média e teor de proteína total	A exposição ao clorpirifós resultou em redução nas contagens de leucócitos, neutrófilos e linfócitos, enquanto promoveu um aumento significativo nos parâmetros hematológicos de volume corpuscular médio (PCV), hemoglobina (Hb) e contagem de glóbulos vermelhos (RBC). Além disso, observou-se uma diminuição significativa nos níveis de fosfatase alcalina (ALP), alanina aminotransferase (ALT), proteínas totais (TP) e albumina (ALB), porém não houve efeito significativo nos níveis de bilirrubina (BIL).	Ojezele (2009)

Quadro 2 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos animais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Clorpirifós	<i>Eudrilus eugeniae</i> (Kinberg, 1866)	1 a 4 mg/mL; 100; 250; 500; 750 e 1.000 mg/kg	Mortalidade, alterações histopatológicas, análise de fragmentação de DNA.	O valor da LC ₅₀ para os testes de contato com papel de filtro e a toxicidade aguda foi determinado como 3,8 mg/mL e 180 mg/kg, respectivamente. Resultados indicam que a exposição prolongada ao agrotóxico levou à mortalidade de minhocas, acompanhada pela ausência de formação de casulo. Mais especificamente, a exposição ao clorpirifós na concentração de 100 mg/kg demonstrou causar degeneração do epitélio intestinal, fusão das vilosidades e hiperplasia epidérmica. Além disso, a detecção de três bandas distintas no DNA sugere a ocorrência de efeitos genotóxicos do agrotóxico em nível molecular.	Krishnaswamy <i>et al.</i> (2021)
Clorpirifós	<i>Daphnia magna</i> Straus, 1820	0,1; 1; 5; 10 e 15 µg/L	Mortalidade	A concentração letal 50 (CL ₅₀) determinada após um período de 48 horas de exposição foi registrada como sendo de 0,057 µg/L.	Burga; Visitación; Chire (2009)

Quadro 2 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos animais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Clorpirifós	<i>Rattus norvegicus</i> (Berkenhout, 1769)	0,01; 1,00 e 1,35 mg/kg	Peso corporal e proporção de peso dos órgãos, ensaios de enzimas antioxidantes (SOD e GST), estimação da peroxidação lipídica (Malondialdeído), marcadores hepáticos e renais e estudos histopatológicos.	O estudo revelou que a exposição materna a duas doses elevadas de clorpirifós (1,00 e 1,35 mg/kg) resultou em reduções no peso corporal e aumento nos pesos relativos do fígado e dos rins. Observou-se danos significativos ao fígado, evidenciados pelo aumento dose-dependente nos níveis plasmáticos de AST, ALT, LDH e g-GT. Além disso, a atividade da colinesterase diminuiu consideravelmente em lactantes expostas a essas duas doses elevadas de CPF. A análise também demonstrou um aumento significativo na peroxidação lipídica, enquanto os níveis de GST e SOD apresentaram reduções significativas em comparação com o grupo controle. Notavelmente, na dose mais elevada de clorpirifós (1,35 mg/kg), houve um aumento significativo nos níveis de proteína total e ácido úrico.	Mansour; Mossa (2011)

Quadro 2 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos animais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Clorpirifós	<i>Rattus norvegicus</i> (Berkenhout, 1769)	3; 6 e 9 mg/kg/d	Mortalidade, peso corporal, parâmetros bioquímicos (proteínas totais, colesterol, glicose, triglicerídeos e fosfolipídios), ensaio de acetilcolinesterase, estudos hematológicos (glóbulos brancos (WBC), glóbulos vermelhos (RBC), hemoglobina (Hb), hematócrito (HCT) e contagem diferencial de leucócitos (DLC), análise de esperma e análise histopatológica.	A exposição de animais a doses elevadas (9 mg/kg/d) resultou em toxicidade, evidenciada por sintomas como piloereção, diarreia, hemorragia ocular, perda de massa corporal e morte. Houve alterações significativas na massa das glândulas adrenais e dos testículos, inibição da acetilcolinesterase no sangue e no cérebro, além de distúrbios histopatológicos em órgãos como cérebro, fígado, testículos, epidídimo e glândulas adrenais. Enzimas testiculares aumentaram sua atividade, enquanto os triglicerídeos sanguíneos elevaram-se, e a contagem de células vermelhas, hemoglobina e hematócrito diminuíram. A contagem de espermatozoides reduziu-se em doses elevadas, sem afetar motilidade ou morfologia.	Akhtar <i>et al.</i> (2009)

Quadro 2 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos animais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Clorpirifós	<i>Lanistes carinatus</i> (Olivier, 1804)	0,1; 0,5; 1,0; 5,0 e 10,0 µg/L	Biomarcadores de estresse oxidativo (atividades de GST - Glutaciona S-transferase, CAT - Catalase e GPx - Glutaciona peroxidase e conteúdo de MDA - Malondialdeído e GSH - Glutaciona) e a inibição da AChE (Acetilcolinesterase) como biomarcador neurotóxico, além do teor de proteína total.	Durante a exposição aos níveis de 0,09 e 0,29 µg/L de clorpirifós, observou-se a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) e a redução dos níveis de glutaciona (GSH) em comparação com o grupo controle. Simultaneamente, houve um aumento progressivo e proporcional à dose no conteúdo de malondialdeído (MDA). No decorrer do experimento, as atividades das enzimas catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona S-transferase (GST) apresentaram um aumento significativo durante o primeiro período de exposição (7-21 dias), seguido por uma diminuição em relação ao grupo controle durante o segundo período de exposição (21-28 dias).	Khalil (2015)
Clorpirifós	<i>Apis mellifera</i> L.	0,015; 0,030; 0,060; 0,130; 0,250 µg/abelha	Mortalidade	Os valores da dose letal média (LD ₅₀) situaram-se entre 0,023-0,024 µg/abelha, com uma média de 0,024 µg/abelha.	Carrasco-Letelier <i>et al.</i> (2012)

Quadro 2 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos animais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Clorpirifós	<i>Octolasion cyaneum</i> (Savigny in Cuvier, 1826)	120; 240; 480; 960 e 1440 g ia/ha	Mortalidade, alterações morfológicas, peso corporal, número de casulos e indivíduos jovens.	O clorpirifós não afetou diretamente a sobrevivência de <i>O. cyaneum</i> , mas causou mudanças significativas em sua morfologia, bem como redução na biomassa e nos parâmetros reprodutivos. Cerca de 35% dos indivíduos expostos mostraram modificações morfológicas, sendo que os danos aumentaram com concentrações mais altas, especialmente nas doses de 240g e 1440g de ingrediente ativo. A concentração recomendada para uso (480 g ia/ha) resultou em apenas 2,5% de danos. A menor concentração de clorpirifós (240 g ia/ha) levou a uma diminuição significativa no número de casulos e indivíduos juvenis.	Salvio <i>et al.</i> (2015)
Clorpirifós	<i>Aedes aegypti</i> L.	0,2; 0,5; 0,8; 1,0 e 2,0 µg/L	Mortalidade	O valor da dose letal média (LD ₅₀) para o composto puro foi de 0,84 µg/L.	Utzig <i>et al.</i> (2019)

Quadro 2 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos animais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Clorpirifós	<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i> Claparède, 1862	50; 100; 500; 1250 e 2500 µg/L	Mortalidade	Os testes conduzidos visando avaliar o efeito letal do clorpirifós em diferentes intervalos de tempo (24, 48 e 96 horas) revelaram valores de toxicidade aguda distintos. Para o período de 24 horas, foi registrada uma concentração letal de 379,13 mg/L ¹ . Ao expandir a exposição para 48 horas, essa concentração letal reduziu significativamente para 154 mg/L. Por fim, após 96 horas de exposição, a concentração letal diminuiu ainda mais, atingindo o valor de 66,01 mg/L.	Iannacone <i>et al.</i> (2000)
Clorpirifós	<i>Chrysoperla externa</i> (Hagen, 1861)	1,2 g i.a./L	Mortalidade reprodução	e O clorpirifós demonstrou um efeito nocivo classificado como classe 4 sobre a mortalidade geral e a reprodução de adultos provenientes de larvas de primeiro ínstar tratadas, resultando em uma taxa de mortalidade de 100%. Além disso, o produto causou uma mortalidade de 100% nas larvas de segundo e terceiro ínstars.	Silva <i>et al.</i> (2005)

Quadro 2 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos animais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Cipermetrina	<i>Apis mellifera</i> L.	0,015; 0,030; 0,060; 0,130; 0,250 µg/abelha	Mortalidade	Os valores da dose letal média (LD ₅₀) para a cipermetrina variou entre 0,097-0,169 µg/abelha, com uma média de 0,124 µg/abelha.	Carrasco-Letelier <i>et al.</i> (2012)
Cipermetrina	<i>Rhamdia quelen</i> (Quoy & Gaimard, 1824)	1,5 e 2,5mg/L	Alterações morfológicas e comportamentais, eritrócitos totais, diferenciação leucocitária e total; número total de trombócitos; hematócrito; hemoglobina; proteína plasmática; albumina; alanina; transaminase (ALT); aspartato aminotransferase (AST); gama glutamiltransferase (GGT) e fosfatase alcalina (ALP)	Animais expostos a concentrações de 1,5 e 2,5 mg/L apresentaram efeitos adversos, como perda de pigmentação, lesões ulceradas e hemorragias. Peixes expostos manifestaram comportamento anômalo, incluindo desequilíbrio, dispneia e movimentos anormais. Nos parâmetros hematológicos, a concentração de 2,5 mg/L resultou em aumento significativo nos índices de hematócrito, hemoglobina, contagem de eritrócitos e leucócitos. A enzima ALT teve redução significativa nas concentrações de 1,5 e 2,5 mg/L, enquanto a AST aumentou significativamente em 2,5 mg/L. A análise da ALP mostrou diminuição significativa nas concentrações de 1,5 e 2,5 mg/L.	Montanha <i>et al.</i> (2014)

Quadro 2 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos animais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Cipermetrina	<i>Boana xerophylla</i> (Duméril & Bibron, 1841), <i>Engystomops pustulosus</i> (Cope, 1864), <i>Rhinella marina</i> L. e <i>Rhinella humboldti</i> (Gallardo, 1965)	Laboratório: 2,4; 4,8; 9,6; 19,2 e 38,4 mg/L Microcosmo: 9,37; 18,75; 37,5; 75 e 150 mg/há	Mortalidade	Os experimentos com embriões demonstraram que a espécie <i>R. humboldti</i> revelou a maior sensibilidade a cipermetrina em ambiente laboratorial, exibindo uma concentração letal para 50% (CL ₅₀) de 6,27 mg/L, enquanto a espécie <i>B. xerophylla</i> mostrou-se a mais sensível no microcosmo, com uma CL ₅₀ de 88,32 mg/ha. Por outro lado, <i>E. pustulosus</i> foi identificada como a menos sensível em ambas as condições experimentais, apresentando uma CL ₅₀ de 11,80 mg/L em laboratório e 112,37 mg/ha no microcosmo. A CL ₅₀ para <i>R. marina</i> em laboratório foi de 8,14 mg/L. No que se refere aos girinos, todas as quatro espécies analisadas demonstraram uma mortalidade total (100%) em diferentes concentrações de cipermetrina.	Triana Velásquez <i>et al.</i> (2017)

Quadro 2 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos animais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Cipermetrina	<i>Rhamdia quelen</i> (Quoy & Gaimard, 1824)	0,001; 0,01; 0,1; 1,0 e 10,0 mg/L	Mortalidade de adultos e dos embriões	Durante a exposição à cipermetrina, os peixes apresentaram sintomas como perda de equilíbrio, alterações no comportamento de natação, dificuldades respiratórias e movimentos em espiral. Concentrações acima de 3,0 mg/L resultaram em óbito, enquanto concentrações entre 1 e 2,5 mg/L foram subletais, causando cerca de 50% de mortalidade em 96 horas. A concentração letal de cipermetrina em 96 horas foi calculada em 1,71 mg/L. Após a morte, observaram-se alterações como perda de pigmentação, lesões ulceradas, hemorragias e degeneração nas caudas. Os ovos expostos a concentrações mais baixas mostraram redução na fertilidade e tendência à diminuição na taxa de eclosão, com variações significativas em concentrações de 0,001, 0,01 e 0,1 mg/L.	Montanha <i>et al.</i> (2012)

Quadro 2 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos animais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Cipermetrina	<i>Xiphophorus maculatus</i> (Günther, 1866)	1,0 e 2,5 mg/L	Mortalidade, comportamento alterações morfológicas	e A cipermetrina é letal para <i>X. maculatus</i> mesmo em concentrações tão baixas quanto 1 mg/L. Os sinais de exposição incluem anormalidades na natação, movimentação irregular, dificuldade de locomoção, problemas respiratórios e movimentos em espiral, podendo levar à morte. Após o óbito, ocorrem degenerações nos tecidos, lesões hiperêmicas, hemorragias e alterações na pigmentação corporal.	Vergara-Chen <i>et al.</i> (2019)
Cipermetrina	<i>Oreochromis</i> sp.	0,04; 0,40 e 2,0 g/L	Mortalidade genotoxicidade	e A concentração letal para 50% dos organismos expostos (CL ₅₀) de cipermetrina, ao longo de 96 horas, foi registrada em 6,0 µg/L. Os espécimes de tilápia submetidos à cipermetrina exibiram efeitos genotóxicos nos eritrócitos já a partir do primeiro dia de exposição.	Henao; Palacio; Camargo (2005)

Quadro 2 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos animais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Cipermetrina	<i>Dugesia gonocephala</i> (Duges, 1830)	1,455; 0,1455; 0,01455; 0,001455; 0,0001455 e 0,00001455 mg/mL	Mudanças no perímetro dos túbulos seminíferos e quantificação de células-tronco positivas para CD133+	A cipermetrina exibiu um impacto substancial na morfologia dos túbulos seminíferos, resultando no aumento da área e do perímetro dessas estruturas. Além disso, provocou alterações celulares, sendo observado um aumento significativo de células-tronco identificadas pelo marcador CD133+.	Navarro <i>et al.</i> (2016)
Cipermetrina	<i>Scaptotrigona bipunctata</i> (Lepeletier, 1836)	Pulverização: 0,25; 0,5; 1; 2 e 4 µg/mL Contato: 0,0625; 0,125; 0,25, 0,5 e 1 mg/mL	Mortalidade e esterases (EST)	Toxicidade por Ingestão: Após 72 horas de exposição, a LC ₅₀ estimada para o ingrediente ativo foi de 27,224 µg/mL. Houve uma leve inibição nas esterases EST-1 e EST-3 a 4 µg/mL após 24 horas, seguida por uma redução global na atividade da esterase a 0,25 µg/mL após 72 horas. Toxicidade por Contato: A LC ₅₀ estimada após 72 horas de exposição por contato foi de 3,663 mg/mL. A atividade da EST-3 aumentou em animais expostos a concentrações de 0,125 e 0,25 mg/mL após 24 horas, porém diminuiu nas concentrações de 0,5 e 1 mg/mL.	Pereira <i>et al.</i> (2021)

Quadro 2 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos animais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Cipermetrina	<i>Labeo rohita</i> (Hamilton, 1822)	0,10; 0,12; 0,14; 0,16; 0,18 e 0,20 ppm	Níveis de DNA e RNA, conteúdo de proteína, fosfatase ácida (ACP) e fosfatase alcalina (ALP), acetilcolinesterase (AChE), lactato desidrogenase (LDH), succinato desidrogenase (SDH) e ATPase.	Durante o período de observação de 96 horas, a concentração letal (LC ₅₀) da cipermetrina foi determinada como 0,139 ppm. A exposição a este pesticida induziu uma redução nos níveis de RNA e um incremento nos níveis de DNA. A atividade da acetilcolinesterase cerebral manifestou uma diminuição significativa durante um período de 45 dias sob ambas as concentrações testadas de cipermetrina. Em paralelo, a atividade da enzima lactato desidrogenase mostrou-se elevada no cérebro e no fígado, contudo, foi inibida nos rins. Observou-se uma redução nos níveis de proteína sérica e um aumento nos níveis de glicose no sangue e na contagem total de leucócitos. A porcentagem de hemoglobina e o número total de eritrócitos apresentaram diminuição sob ambas as concentrações subletais testadas.	Das; Mukherjee (2003)

Quadro 2 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos animais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Fenthion	<i>Rattus norvegicus</i> (Berkenhout, 1769)	25; 50; 75 e 100 mg/kg	Análise sanguínea, Aspartato aminotransferase sérica (AST), alanina aminotransferase (ALT) e gama-glutamiltranspeptidase (GGT), nefrotoxicidade, medição da butirilcolinesterase sérica (BChE); análise histopatológica do fígado e rim.	Após a administração de 100 mg/kg de fenthion, foi observada uma taxa de mortalidade de 30%. Uma correlação significativa foi identificada entre a dosagem de fenthion e o aumento dos níveis sanguíneos de enzimas hepáticas, creatinina e nitrogênio ureico no sangue (BUN). Adicionalmente, os níveis plasmáticos da enzima BChE foram significativamente reduzidos em ratos que receberam 75 e 100 mg/kg de fenthion em comparação com os ratos que foram administrados com 25-50 mg/kg de fenthion, durante um período de 24 horas. O exame histopatológico do fígado e rim indicou lesões significativas exclusivamente nos ratos que foram submetidos à dosagem de 100 mg/kg de fenthion.	Kerem <i>et al.</i> (2007)

Quadro 2 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos animais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Fenthion	<i>Cyprinus</i> sp.	0,5 e 400 mg/kg	Determinação de Glutaciona reduzida (GSH) e Glutaciona oxidada (GSSG), atividade da Superóxido Dismutase (SOD), atividade da Catalase (CAT), atividade da Glutaciona Redutase, Glutaciona S-Transferase, Glutaciona Total (tGSH), atividade da Acetilcolinesterase (AChE), medição de Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) e teores de proteína.	A exposição ao fenthion resultou no aumento significativo do teor intracelular de glutaciona reduzida (GSH), resultando em um aumento proporcional na razão entre GSH (glutaciona reduzida) e GSSG (glutaciona oxidada), além de provocar um aumento na atividade da enzima Glutaciona-S-Transferase (GST). Paralelamente, houve uma diminuição notável no teor de GSSG, bem como na concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e na quantidade de proteínas. É importante destacar que, apesar dessas alterações, não foram observados efeitos sobre as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), nem sobre a enzima acetilcolinesterase (AChE).	Üner <i>et al.</i> (2009)

Quadro 2 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos animais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Fenthion	<i>Gallus gallus domesticus</i>	1 e 4 mg/kg	Mortalidade, comportamento, atividade da acetilcolinesterase, atividade muscular, peso corporal e produção de ovos	As aves que foram expostas a doses elevadas demonstraram manifestações transitórias de perda de propriocepção, habilidade de empoleiramento e reflexo de endireitamento, além de exibir uma redução na capacidade ou motivação para saltar. Observou-se uma inibição mais pronunciada das atividades da colinesterase sérica e da acetilcolinesterase cerebral nas aves submetidas a doses elevadas. Adicionalmente, foram identificadas anormalidades nas fibras musculares, juntamente com um quadro leve de neuropatia nas aves expostas à dose alta. Esta dose elevada também acarretou uma redução de 10% na produção de ovos e uma diminuição de 8% no peso corporal das aves. Em contraste, a exposição a doses baixas estimulou a produção de ovos em 8%.	Tuler; Bowen (1999)

Quadro 2 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos animais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Fenthion	<i>Danio rerio</i> (Hamilton, 1822)	5, 10, 20 e 40 µM	Expressão de genes, genotoxicidade e embriotoxicidade	Foi observado que a expressão de vários genes relacionados aos complexos mecanismos de reparo do DNA permaneceu constante a uma concentração de 40 µM, exceto para os genes Rad51 e Rad18. Ao prolongar o período de exposição ao fenthion, ocorreu uma inibição significativa na expressão desses genes, assim como nos genes Xrcc2 e Xrcc6/Ku70 em embriões tratados com fenthion. A exposição ao fenthion não afetou a atividade da proteína γH2AX nos embriões de peixe-zebra, e a sobrevivência não foi significativamente afetada após 24, 48 e 72 horas de exposição a 40 µM de fenthion. No entanto, houve uma notável diminuição na taxa de eclosão dos ovos após 72 horas de exposição à substância.	Wahyuni <i>et al.</i> (2021)

Quadro 2 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos animais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Fenthion	<i>Clarias gariepinus</i> (Burchell, 1822)	2, 24, 36, 48, 60 e 72 mg/L e 1/20, 1/10 e 1/5 da CL ₅₀	Mortalidade e alterações histopatológicas	Os resultados indicaram que a CL ₅₀ para peixes expostos ao fenthion foi de 39,97 mg/L após 96 horas. Os peixes apresentaram sintomas como comportamento de natação desorientada, tentativas de salto, aumento na respiração e liberação excessiva de muco, culminando em óbito. Durante 21 dias, os peixes foram expostos a concentrações de fenthion (1/20, 1/10, e 1/5 da CL ₅₀) por 96 horas, seguidas por 7 dias de recuperação. Todas as concentrações causaram desordens significativas nas brânquias, destacando-se mudanças mais severas na concentração mais alta, incluindo edema, descolamento do epitélio e fusão das lamelas branquiais.	Somdare <i>et al.</i> (2015)

Quadro 2 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos animais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Fenthion	<i>Cyprinus sp.</i>	0,096; 0,38 e 0,193 mg/L	Teor de glicogênio, proteína, lipídios totais, teores de umidade e índice hepatossomático (LSI)	Observou-se redução significativa nos níveis de glicogênio e proteína nos tecidos musculares e hepáticos expostos ao fenthion. O índice hepatossomático (LSI) diminuiu com o aumento da concentração de fenthion nos tecidos hepáticos. Simultaneamente, houve aumento nos teores de lipídios e umidade nos tecidos analisados, proporcional à concentração e período de exposição ao fenthion.	Muralidharan (2014)
Fenthion	<i>Oreochromis mossambicus</i> (Peters, 1852)	0,02; 0,1; 0,2 mg/L	Mortalidade, crescimento, reprodução e atividade da acetilcolinesterase	LC ₅₀ após 96 horas de exposição ao fenthion foi de 0,83 mg/L para alevinos e 2,07 mg/L para juvenis. Exposição prolongada a concentrações subletais (0,1 e 0,2 mg/L por 10 semanas) resultou em impactos negativos significativos na sobrevivência e crescimento dos peixes em comparação com o controle. A exposição crônica também causou notável inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) no tecido cerebral, com inibições de 26% a 29% nos juvenis e 38% a 40% nos alevinos.	Pathiratne (1999)

Quadro 2 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos animais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Continua)

Composto	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Fenthion	<i>Rana ridibunda</i> Pallas, 1771	10 e 20 ppm	Malonaldeído (MDA) e sistema de defesa antioxidante (ADS), nível de glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GSH-Px), atividades de glutathione-S-transferase (GST) e superóxido dismutase (SOD)	Os resultados evidenciaram um aumento nos níveis de malondialdeído (MDA) nos tecidos analisados após a exposição a ambas as concentrações de fenthion. Adicionalmente, as atividades das enzimas superóxido dismutase (SOD), peroxidase de glutathione (GSH-Px), glutathione S-transferase (GST) e a atividade da enzima antioxidante dismutase de superóxido (ADS), bem como os níveis de glutathione (GSH), apresentaram variações notáveis em diferentes intervalos de tempo (24, 48, 72 e 96 horas).	Kanter; Celik (2012)
Fenthion	<i>Rattus norvegicus</i> (Berkenhout, 1769)	40 mg/kg	Genotoxicidade	Com base na análise do ensaio cometa, foi constatado que os roedores submetidos ao tratamento com fenthion apresentaram um índice de danos significativamente maior ($19,29 \pm 3,59$ vs. $7,80 \pm 2,25$) e uma frequência de danos mais elevada ($17,00 \pm 3,46$ vs. $7,5 \pm 2,46$) em comparação com o grupo controle.	Goldoni <i>et al.</i> (2017)

Quadro 2 - Síntese detalhada dos estudos ecotoxicológicos com organismos animais envolvendo os princípios ativos presentes na formulação comercial COLOSSO FC30. (Conclusão)

Composto	Organismo	Concentração avaliada	Endpoints avaliados	Resultados	Referência
Fenthion	<i>Clarias gariepinus</i> (Burchell, 1822)	2,0; 4,0 e 8,0 mg/L	Teste de micronúcleo, determinação da peroxidação lipídica, atividade da catalase, superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GR), glutathione oxidada (GSSG) e glutathione peroxidase (GPx).	A exposição ao inseticida fenthion teve um impacto significativo na indução de micronúcleos (MN) nos eritrócitos de <i>C. gariepinus</i> . Tanto a concentração quanto a duração da exposição influenciaram a frequência de MN. A menor concentração de fenthion (2,0 mg/L) causou 2,8% de MN no primeiro dia, aumentando para 4,60% no dia 21. A maior frequência (7,35%) ocorreu no grupo exposto a 8,0 mg/L no dia 14. Estresse oxidativo foi evidenciado pela peroxidação lipídica (LPO), atingindo valores máximos (62,47% e 71,17%) nos tecidos branquiais e hepáticos, respectivamente, em <i>C. gariepinus</i> expostos a 8,0 mg/L de fenthion. Houve alterações nos níveis de GSH, GR, GPx, SOD e CAT ao longo dos períodos, refletindo a resposta do organismo ao fenthion.	Nwani <i>et al.</i> (2017)

Fonte: Autor (2024)

Diante das informações apresentadas, a presente revisão discorre sobre a relevância da formulação comercial acaricida COLOSSO FC30 na atividade pecuária, conferindo ênfase à sua importância no controle de ectoparasitas, especialmente carrapatos, bernes e a mosca-dos-chifres, em bovinos. A composição do referido acaricida, constituída por clorpirifós, fenthion e cipermetrina, manifesta mecanismos de ação singulares, colaborando para a eficácia no enfrentamento destes organismos.

Contudo, a utilização indiscriminada do COLOSSO FC30 suscita preocupações, tanto do ponto de vista ambiental como de saúde pública. A eventual contaminação de solos e corpos d'água por animais expostos ao produto demanda uma abordagem cautelosa. A toxicidade para os seres humanos, manifestada por sintomas adversos em casos de ingestão, e a lacuna de informações acerca dos impactos ambientais do produto reforçam a imperatividade de medidas preventivas e de um manejo responsável do acaricida.

Adicionalmente, a revisão identifica lacunas significativas na pesquisa ecotoxicológica, ressaltando a ausência de estudos abrangentes que avaliem a formulação comercial em sua integralidade, bem como das interações dos ingredientes ativos presentes na mesma. A predominância de pesquisas voltadas a organismos animais sugere a necessidade de uma abordagem mais equilibrada, incorporando investigações direcionadas a organismos vegetais, bem como outras formas de vida, como fungos e bactérias. Tal abordagem visa a compreensão holística dos impactos cumulativos desses compostos no ambiente, considerando a interação complexa entre diferentes componentes biológicos e seu papel na dinâmica ecossistêmica.

Em termos de gestão e práticas agrícolas, a implementação de estratégias sustentáveis e o desenvolvimento de formulações mais seguras podem ser objetos de exploração. Considerações éticas e regulamentações rigorosas são cruciais para assegurar a segurança tanto dos animais expostos quanto do meio ambiente, fomentando práticas agrícolas responsáveis e sustentáveis.

2.3 Bioensaios ecotoxicológicos com plantas terrestres: uma visão holística das diretrizes e regulamentações

Ao longo das últimas décadas, o planeta Terra tem sido alvo de crescente e diversificada exposição a múltiplas fontes de poluição. Entre essas fontes, destacam-se os agrotóxicos, cuja aplicação tornou-se essencial devido aos avanços na produção agrícola e ao crescimento populacional global. Estima-se que anualmente sejam utilizadas aproximadamente 2 milhões de toneladas desses produtos (Foong *et al.*, 2020). Os agrotóxicos englobam distintas

categorias, agrupadas conforme a espécie-alvo, como herbicidas, fungicidas, acaricidas, inseticidas, entre outros (Sharma et al., 2019). Notavelmente, as categorias mais amplamente utilizadas são os herbicidas e inseticidas, representando em conjunto 47,5% do consumo (De et al., 2014). Países como Brasil, China, Índia, Argentina, Estados Unidos, Canadá, Japão, França e Itália são os principais consumidores desses agrotóxicos (Sharma et al., 2019).

A produtividade agrícola teve um notável aumento desde a Revolução Verde que ocorreu na década de 1960, mas nessa época os efeitos e impactos dos agrotóxicos nos ecossistemas e na saúde humana ainda eram desconhecidos (Karunarathne et al., 2020). Atualmente, compreende-se que o uso excessivo de agrotóxicos a curto prazo pode levar à contaminação de lagos, solos e rios, resultando na mortalidade de organismos presentes nesses ambientes. A longo prazo, seus metabólitos podem acumular-se na cadeia alimentar, afetando até mesmo os seres humanos e desencadeando várias disfunções orgânicas, favorecendo o surgimento de cânceres e tumores (Gallegos et al., 2018; Kalyabina et al., 2021; Yang; Lim; Song, 2021; Sánchez-Bayo, 2021).

Diante dessas problemáticas, a Ecotoxicologia, proposta por Jean-Michel Jouany em 1971, emerge como aliada crucial (Vasseur; Masfaraud; Blaise, 2021). Por meio de bioensaios ecotoxicológicos, é possível avaliar o potencial risco dessas substâncias a curto e longo prazo (Ghosh; Thakur; Kaushik, 2017; Schuijt et al., 2021). Para isso, utilizam-se bioensaios com diversos organismos, tanto vertebrados (coelhos, gatos, peixes e ratos) quanto invertebrados (anelídeos, microcrustáceos e nematóides). No entanto, os bioensaios com mamíferos demandam equipamentos sofisticados, já que esses organismos são maiores, têm ciclos de vida prolongados e necessitam de manutenção diária. Além disso, o uso de mamíferos nesses testes envolve princípios éticos que requerem tempo considerável do pesquisador; é importante destacar que, após a condução do teste, os animais utilizados geralmente são sacrificados (Disner, 2019; Khabib et al., 2022). Por essa razão, têm-se buscado novos modelos alternativos para avaliar o potencial risco dessas substâncias químicas.

Os bioensaios empregando plantas com sementes surgem como uma alternativa aos ensaios com animais. O primeiro bioensaio vegetal foi conduzido em 1938 por Levan, no qual o pesquisador buscou avaliar os efeitos do fármaco colchicina sobre o ciclo celular de *Allium*. O autor relatou que o fármaco induziu alterações, como telófase multipolar e c-metáfase, embora as alterações macroscópicas não tenham sido mensuradas. No entanto, o autor observou que a exposição ao fármaco causou engrossamento nas pontas das raízes, associando tal fenômeno a tumores (Levan, 1938).

Entretanto, apenas em 1980, por intermédio do programa de Toxicologia Genética (GENE-TOX), as plantas foram reconhecidas como sistemas biológicos confiáveis e sensíveis para detecção de substâncias mutagênicas, clastogênicas e carcinogênicas. Nessa ocasião, foram realizados nove diferentes bioensaios utilizando os principais organismos vegetais: *Allium cepa* (bioensaio de aberração cromossômica), *Arabidopsis thaliana* (bioensaio de mutação), *Glycine max* (bioensaio do mosaicismismo em folhas de soja), *Hordeum vulgare* (ensaio de aberração cromossômica e ensaio de mutante deficiente em clorofila), *Vicia faba* (testes citogenéticos), *Tradescantia paludosa* (ensaio para mutágenos gasosos e testes citogenéticos) e *Zea mays* (ensaios de mutação em *locus* específico) (Grant; Zinov'eva-Stahevitch; Zura, 1981; Ennever; Andreano; Rosenkranz, 1988; Grant, 1999; Ma, 1999).

Durante o GENE-TOX, foi discutida a sensibilidade dos modelos vegetais, destacando que esses organismos são extremamente sensíveis a substâncias genotóxicas e podem ser fundamentais para prever e evitar desastres ambientais, como o acidente nuclear de Chernobyl na Ucrânia (1986), o desastre que ocorreu em uma fábrica de agrotóxicos em Bhopal (1984), na Índia, e o acidente nuclear de Three Mile Island (1979) nos EUA. Inicialmente, houve discussões sobre a impossibilidade de extrapolar os resultados dos bioensaios vegetais para a saúde humana (Ma, 1999). No entanto, estudos posteriores demonstraram uma boa correlação entre os resultados obtidos com plantas, especialmente o teste de micronúcleo, e os resultados obtidos com células animais (Grant; Salamone, 1994; Rodrigues *et al.*, 2010; Mauro *et al.*, 2014; Palmieri *et al.*, 2016; Dos Reis *et al.*, 2017; Marcussi *et al.*, 2023).

Posteriormente, em 1985, durante a conferência de Ottawa, foram validados e padronizados quatro bioensaios empregando organismos vegetais, recebendo os seguintes nomes: Mutação nos pelos estaminais de *Tradescantia* (Trad-SHM), Teste de Micronúcleo com *Tradescantia* (Trad-MCN), Teste de aberração cromossômica utilizando raiz de *Allium/Vicia* (AVR-CA) e o teste de aberração embrionária com *Arabidopsis* (Arab-EM). Durante essa conferência, quatro produtos químicos foram testados, e todos os bioensaios foram considerados eficazes e confiáveis para monitorar *in situ* (Ma; Grant; de Serres, 1997; Ma, 1999).

Em 1993, surgiu o Programa Internacional de Bioensaios Vegetais (IPPB) sob a égide do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente. Seu principal propósito consistiu em fomentar a aplicação de bioensaios vegetais como ferramentas viáveis, ágeis e economicamente acessíveis para o rastreamento e a identificação de substâncias mutagênicas presentes no meio ambiente. A segunda missão do IPPB concentrou-se na constituição de uma rede global dedicada à condução dessas avaliações de monitoramento e identificação em múltiplas regiões

ao redor do planeta. Nesse contexto de atuação, o programa almejou a criação de um repositório de dados destinado à identificação de condições perigosas em diferentes áreas globais. Por fim, o último objetivo desse programa foi disseminar o uso de bioensaios vegetais para o público em geral, especialmente em ambientes educacionais, considerando que os materiais necessários para a realização dos testes são simples e de custo reduzido (Grant, 1999; Ma, 1999)

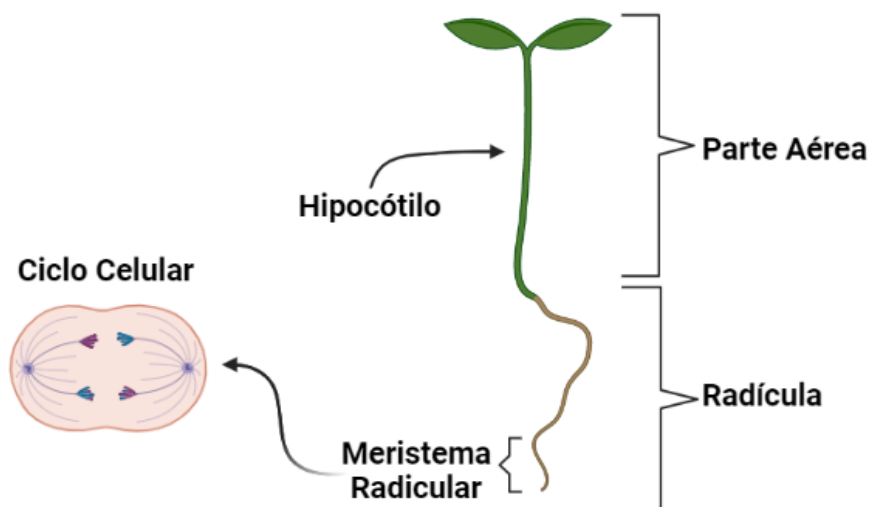
Atualmente, embora o programa tenha sido descontinuado, ele representa um marco significativo na história dos bioensaios vegetais. Esses bioensaios continuam sendo recomendados por instituições de renome internacional, como a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) (Andrade-Vieira; Silveira, 2018), e o Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente (PNUMA) (Iqbal, 2016), seja para a liberação de novos produtos químicos, ou para avaliar a qualidade de solos contaminados ou de águas residuais.

Conforme abordado anteriormente, os primeiros bioensaios com plantas estavam primariamente focados nos efeitos microscópicos, direcionados à avaliação da citogenotoxicidade e mutagenicidade de substâncias químicas. No entanto, negligenciavam parâmetros de relevância, como germinação e desenvolvimento vegetal. Estes parâmetros foram inicialmente utilizados para avaliar o potencial alelopático de extratos vegetais (Gressel; Holm, 1964; McNaughton, 1968).

Posteriormente, esses parâmetros foram incorporados à pesquisa científica em ecotoxicologia, visando quantificar a presença e o potencial tóxico de herbicidas em solos de diversas localidades. No contexto delineado, sementes pré-germinadas de *Avena sativa* e *Zea mays* eram amplamente preconizadas. Após um período específico de exposição, procedia-se à mensuração do comprimento das raízes, identificando a concentração que causava uma redução de 50% nesse parâmetro (Behrens, 1970; Horowitz, 1976; Hurle, 1977; Hsiao; Smith, 1983).

Diversos parâmetros podem ser submetidos à avaliação por meio de bioensaios vegetais, visando determinar os efeitos tóxicos de compostos ou substâncias em análise. Através da implementação desses bioensaios, é possível avaliar meticulosamente parâmetros como a taxa de germinação e o índice de velocidade de germinação (Silveira *et al.*, 2014; Moraes *et al.*, 2015; Da Silva; Da Silva, 2023). Ademais, outros critérios passíveis de avaliação englobam a biomassa fresca (Appah *et al.*, 2020) e biomassa seca (Li *et al.*, 2022), o comprimento das raízes e da parte aérea (Menzyanova *et al.*, 2022; Da Silva; Da Silva, 2023) o índice mitótico, anormalidades cromossômicas e frequência de micronúcleos (Anacleto; Roberto; Marin-Morales, 2017; Andrade-Vieira *et al.*, 2018; Aragão *et al.*, 2022, Silva *et al.*, 2023) (Figura 9).

Figura 9 – Alguns dos parâmetros avaliados em bioensaios vegetais



Fonte: Autor (2024)

Atualmente, compreendemos a existência de uma correlação entre parâmetros microscópicos e macroscópicos avaliados nos bioensaios vegetais. Diversos estudos têm demonstrado que geralmente, as alterações microscópicas precedem as alterações macroscópicas (Aragão *et al.*, 2021; Da Silva *et al.*, 2023a; Miranda *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2023). Isso se deve ao fato de que o desenvolvimento das plântulas pode estar relacionado tanto ao crescimento e expansão das células vegetais quanto ao aumento do número de células (Taiz *et al.*, 2017). Substâncias que apresentam características citotóxicas podem retardar tais fenômenos, consequentemente reduzindo o crescimento das plântulas expostas (Amaç; Liman, 2021; Kumar *et al.*, 2022; Aslantürk, 2024).

Diante do histórico exposto, constata-se que os bioensaios vegetais são ferramentas valiosas para a ecotoxicologia, auxiliando na tomada de decisões e na análise de risco ambiental de substâncias químicas. Houve tentativas de padronizar os testes com plantas por meio do programa GENE-TOX e pela conferência de Ottawa; contudo, os protocolos produzidos na época já se tornaram antigos. Atualmente, existem organizações que padronizam os bioensaios com plantas, as normativas produzidas são atualizadas periodicamente com as novas descobertas científicas. Entretanto, a maioria dos pesquisadores desconhece a existência dessas normativas específicas.

Assim, o objetivo desta revisão é compilar as principais normativas que padronizam os bioensaios com plantas com sementes, destacando sua relevância na ecotoxicologia e seu papel na análise de risco ambiental de substâncias químicas. Além disso, buscará extrair dessas

normativas informações detalhadas sobre como realizar esses testes, oferecendo diretrizes e orientações práticas para os pesquisadores interessados nessa área.

2.3.1 Test No. 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test

O protocolo OECD-208, elaborado e publicado pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) em 2006, representa um recurso disponível à comunidade científica de forma gratuita. Seu propósito fundamental é oferecer diretrizes para a avaliação dos impactos sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de plantas com sementes após a exposição a substâncias específicas, seja no solo ou em matrizes de solo apropriadas. Ressalte-se que esse protocolo exclui a consideração de efeitos crônicos ou reprodutivos, tais como a formação de sementes, flores e maturação de frutos. Embora sua recomendação não abarque a avaliação de substâncias químicas presentes no ar, esse método tem demonstrado eficácia na análise dos efeitos tóxicos de produtos químicos em geral, particularmente no caso de agrotóxicos usados no controle de pragas (OECD, 2006a).

A aplicação da substância teste pode variar entre o solo e a superfície, dependendo da via de exposição prevista, refletindo a possível rota de exposição ao composto químico no meio ambiente. A incorporação ao solo é realizada por meio de tratamento em massa, seguido pela transferência desse solo para recipientes onde sementes da espécie vegetal em estudo são plantadas. As unidades de teste são mantidas em condições apropriadas para promover a germinação e o crescimento das plantas (OECD, 2006a).

O protocolo inclui uma lista com 32 espécies vegetais consideradas modelos. Recomenda-se a utilização de diferentes espécies vegetais para obter resultados diversificados nos bioensaios, considerando fatores como diversidade taxonômica, distribuição geográfica, abundância e outros aspectos do ciclo de vida e habitat natural das espécies. A seleção das espécies vegetais deve ser criteriosa, considerando características como germinação rápida e uniforme, bem como a sensibilidade da planta a substâncias químicas. É preferível que a espécie selecionada tenha sido previamente utilizada em testes de toxicidade de metais, agrotóxicos ou compostos alelopáticos (OECD, 2006a).

As principais informações e os procedimentos experimentais estabelecidos no protocolo OECD-208 estão disponíveis no Quadro 3.

2.3.2 Test No. 227: Terrestrial Plant Test: Vegetative Vigour Test

O Protocolo OECD-227, uma diretriz estabelecida pela OECD no ano de 2006, representa um marco fundamental na avaliação dos impactos exercidos por substâncias sobre organismos vegetais. Esse documento, disponibilizado gratuitamente, compreende um conjunto de procedimentos metodológicos detalhados que visam investigar os efeitos fisiológicos e morfológicos decorrentes da exposição de substâncias químicas sobre as estruturas foliares de plantas terrestres (OECD, 2006b).

O procedimento tem início com o cultivo das plantas a partir de sementes, geralmente alcançando um estágio de desenvolvimento entre 2 a 4 folhas verdadeiras. A substância em estudo é então pulverizada sobre as superfícies foliares, seguindo doses específicas, e as plantas são mantidas em condições controladas por um período determinado. Posteriormente, o vigor e o crescimento das plantas tratadas são comparados com as plantas controle, que não foram expostas à substância (OECD, 2006b).

Similar ao protocolo OECD-208, o protocolo OECD-227 apresenta uma lista de 32 espécies recomendadas e ressalta a necessidade de que essas espécies atendam a critérios rigorosos, incluindo ampla diversidade taxonômica, disponibilidade de sementes uniformes, adaptação a ambientes laboratoriais, sensibilidade ambiental compatível, histórico de utilização em testes de toxicidade, conformidade com as condições de crescimento do método de teste e aderência aos critérios de validação do experimento (OECD, 2006b).

A análise minuciosa das informações essenciais e dos procedimentos experimentais consagrados no protocolo OECD-227 está detalhadamente descrita no Quadro 3.

2.3.3 ISO 11269-1:2012 Soil quality: Determination of the effects of pollutants on soil flora. Part 1: Method for the measurement of inhibition of root growth

A normativa ISO 11269-1:2012, elaborada pela International Organization for Standardization (ISO) e disponibilizada em 2012, estabelece um procedimento para avaliar os efeitos das substâncias presentes em amostras de solo ou contaminadas sobre o crescimento das raízes das plantas. A obtenção desse documento normativo requer o pagamento de uma taxa específica pelos pesquisadores interessados. Essa normativa apresenta uma ampla aplicabilidade, abrangendo a análise de diversas substâncias, como solos, materiais do solo, compostos, lodo de esgoto, resíduos industriais e produtos químicos. Destaca-se a sua relevância na comparação da qualidade de solos provenientes de fontes conhecidas e

desconhecidas, bem como na determinação dos impactos causados por materiais ou produtos químicos intencionalmente introduzidos no solo (International Organization for Standardization, 2012a).

O protocolo prescrito nesta normativa implica na exposição de sementes previamente germinadas, com 48 horas de germinação, ao material de teste, sob condições estritamente controladas. Posteriormente ao período de crescimento, o comprimento das raízes das plantas em teste é comparado com o das plantas do grupo controle. A identificação de diferenças estatisticamente significantes no comprimento das raízes das plântulas cultivadas em qualquer meio de teste, em comparação com os controles, indica a presença de um efeito. Além disso, a mensuração da altura da parte aérea das plantas constitui um parâmetro complementar valioso, o qual pode ser avaliado em conjunto com o comprimento das raízes, fornecendo dados suplementares e confirmatórios (International Organization for Standardization, 2012a).

Os principais dados e procedimentos experimentais estipulados na norma ISO 11269-1:2012 estão sumarizados e disponibilizados no Quadro 3.

2.3.4 ISO 11269-2:2012 Soil quality: Determination of the effects of pollutants on soil flora. Part 2: Effects of contaminated soil on the emergence and early growth of higher plants

A normativa ISO 11269-2:2012, publicada pela ISO e posteriormente traduzida pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) em 2014, requer pagamento para acesso integral por parte dos pesquisadores. Esta normativa estabelece diretrizes destinadas à avaliação da qualidade de solos provenientes de diversas fontes, os quais apresentam contaminações desconhecidas ou são coletados em áreas industriais, locais de degradação ambiental, resíduos de estações de tratamento de esgoto, materiais derivados de compostagem, assim como detritos animais (International Organization for Standardization, 2012b).

A norma direciona um estudo comparativo entre duas espécies vegetais representativas, uma monocotiledônea e uma eudicotiledônea. Sementes específicas dessas espécies são semeadas em recipientes designados para o teste, contendo amostras de solo teste ou suas misturas, enquanto recipientes de controle empregam solos artificiais ou de referência. Esses recipientes são mantidos sob condições ideais de crescimento para as plantas em análise (International Organization for Standardization, 2012b).

Após a emergência de 50% das plântulas nos recipientes de controle, registram-se as proporções de emergência nos tratamentos, e as plantas são coletadas seguindo critérios

específicos. Posteriormente, após um intervalo temporal de cerca de duas a três semanas, as plantas remanescentes são colhidas para determinação de suas massas biológicas. A partir desses dados, calcula-se a inibição relativa do crescimento no solo teste não diluído, fornecendo uma avaliação da capacidade desse solo em promover o crescimento das espécies vegetais selecionadas (International Organization for Standardization, 2012b).

Os detalhes específicos e procedimentos experimentais delineados na normativa ISO 11269-2:2012 são minuciosamente resumidos e apresentados no Quadro 3, visando uma compreensão mais acessível e aplicação prática.

2.3.5 ISO 18763:2016 Soil quality: Determination of the toxic effects of pollutants on germination and early growth of higher plants

A avaliação ecotoxicológica de solos e a análise dos efeitos de resíduos, como o lodo de esgoto, em ambientes agrícolas, ou ainda o monitoramento da qualidade do solo após a reabilitação de áreas industriais, representam aspectos cruciais na avaliação do risco ambiental associado à contaminação do solo. Para atender a essa demanda, um método de avaliação foi desenvolvido, baseado na germinação de sementes e no subsequente crescimento de plântulas em condições controladas, proporcionando uma abordagem rápida e prática (International Organization for Standardization, 2016).

Nesse contexto, a ISO desenvolveu e publicou a normativa ISO 18763:2016, cujo acesso integral requer pagamento de uma taxa. Esta normativa apresenta um procedimento específico para avaliar os efeitos do solo e de substâncias químicas adicionadas no solo sobre a germinação de sementes e o crescimento inicial de plântulas. Tais parâmetros são indicativos valiosos para a avaliação da capacidade do solo como habitat para organismos (International Organization for Standardization, 2016).

Essa metodologia é aplicável a todos os solos com atividade biológica e pode ser empregada para avaliar dois aspectos principais:

1. Efeitos sobre a fisiologia e desenvolvimento das plantas decorrentes da exposição a produtos químicos, sejam sólidos ou líquidos, introduzidos no solo, incluindo compostos diversos, resíduos, lamas e substâncias químicas inseridas diretamente no substrato terrestre (International Organization for Standardization, 2016).

2. Modificações na interação solo-planta resultantes da aplicação de estratégias de restauração ambiental (International Organization for Standardization, 2016).

A execução dos testes dispensa a necessidade de tratamento prévio das sementes e de equipamentos sofisticados. Eles são conduzidos por meio de placas de teste transparentes, posicionadas verticalmente para permitir a observação direta do desenvolvimento das sementes expostas ao material em avaliação. Após um período de exposição de 72 horas, imagens das plântulas expostas são capturadas e processadas por meio de software de imagem, viabilizando a avaliação de diversos parâmetros ecotoxicológicos (International Organization for Standardization, 2016).

Os detalhes específicos e os procedimentos experimentais delineados na norma ISO 18763:2016 são minuciosamente resumidos e apresentados no Quadro 3, visando facilitar a compreensão e a aplicação prática.

2.3.6 EPA 600/3-88/029 Protocols For Short Term Toxicity Screening Of Hazardous Waste Sites. A 8.6 Lettuce Seed Germination (*Lactuca sativa*)

O Protocolo EPA 600/3-88/029 seção 8.6, emitido pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) no ano de 1988, encontra-se acessível de forma gratuita a pesquisadores interessados. A metodologia delineada neste protocolo ostenta aplicabilidade na avaliação da toxicidade aguda de resíduos sólidos perigosos, empregando a alface (*Lactuca sativa*) como organismo modelo. Esta abordagem é uma adaptação derivada da metodologia inicialmente concebida por Thomas e Cline (1985), com o propósito de determinar os efeitos adversos que podem emergir sinergicamente, antagonicamente ou aditivamente pela interação dos componentes químicos, físicos e biológicos presentes nos resíduos sob investigação. Esta interação pode resultar em impactos diretos sobre as funções fisiológicas e bioquímicas das plantas (Greene *et al.*, 1988).

O procedimento proposto neste protocolo utiliza o solo como matriz de exposição, fundamentado na semelhança das condições ambientais naturais. Adicionalmente, permite a avaliação de amostras aquosas por meio da aplicação de um substrato completamente artificial, o qual é saturado pela substância química e suas diluições em água destilada. Isso viabiliza a análise do potencial impacto dessas substâncias sobre as plantas sujeitas ao solo (Greene *et al.*, 1988).

Os detalhes específicos e os procedimentos experimentais delineados no protocolo EPA 600/3-88/029 seção A.8.6 são minuciosamente resumidos e apresentados no Quadro 3 para uma compreensão mais acessível e aplicação prática.

2.3.7 EPA 600/3-88/029 Protocols For Short Term Toxicity Screening Of Hazardous Waste Sites. A.8.7 Lettuce root elongation (*Lactuca sativa*)

O protocolo EPA 600/3-88/029, seção A.8.7, foi publicado em 1988 pela EPA e está disponível gratuitamente. Este protocolo, derivado das obras de Porcella (1983) e Ratsch (1983), detalha um procedimento para avaliação da toxicidade aguda e dos efeitos de substâncias químicas aquosas e elutriados em plântulas de alface (*Lactuca sativa*) (Greene *et al.*, 1988).

O experimento compreende a exposição de sementes de alface (*L. sativa*) a diferentes concentrações de soluções provenientes de resíduos perigosos, as quais são dispostas sobre papel de filtro umedecido, por um período de 120 horas. Os resultados obtidos a partir destes testes baseiam-se na medição da inibição percentual do crescimento radicular da alface, comparativamente aos grupos de controle (Greene *et al.*, 1988).

Os detalhes específicos e procedimentos experimentais delineados no protocolo EPA 600/3-88/029, seção A.8.7, são minuciosamente sumarizados e apresentados no Quadro 3, buscando proporcionar uma compreensão mais acessível e viabilizar a aplicação prática do referido protocolo.

2.3.8 OPPTS 850.4200 Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test

O protocolo OPPTS 850.4200, desenvolvido pela EPA, teve sua publicação no ano de 1996. Este documento está acessível gratuitamente aos pesquisadores interessados. Em sua formulação, o referido protocolo foi concebido com a finalidade de realizar testes de toxicidade específicos para a germinação de sementes e crescimento radicular de plantas modelos. Sua estrutura foi elaborada para atender às exigências regulatórias estabelecidas tanto pelo Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act (FIFRA) (Lei Federal de Inseticidas, Fungicidas e Raticidas) quanto pelo Toxic Substances Control Act (TSCA) (Lei de Controle de Substâncias Tóxicas) (Environmental Protection Agency, 1996).

O propósito primordial deste protocolo é oferecer diretrizes detalhadas para a obtenção de informações pertinentes à toxicidade aguda de substâncias químicas e suas misturas, sujeitas a liberação no meio ambiente. Destina-se a realçar os efeitos e impactos ambientais por meio desses testes específicos. Seu objetivo central reside na padronização de métodos e condições de avaliação que empreguem sementes de plantas terrestres com relevância comercial. O intuito é adquirir dados precisos referentes à fitotoxicidade de produtos químicos, contribuindo assim

para a avaliação e mitigação dos possíveis danos ao meio ambiente decorrentes da exposição a essas substâncias (Environmental Protection Agency, 1996).

Os detalhes específicos e procedimentos experimentais delineados no protocolo OPPTS 850.4200 são minuciosamente resumidos e apresentados no Quadro 3, para uma compreensão mais acessível e aplicação prática.

2.3.9 OCSPP 850.4100: Seedling Emergence and Seedling Growth

O guia referido, datado de 2012, foi criado pela EPA e representa um recurso de acesso gratuito destinado aos pesquisadores envolvidos na área da ecotoxicologia. Ele assume um papel crucial na estruturação dos dados a serem submetidos à EPA, em conformidade com as disposições estabelecidas pelo Ato de Controle de Substâncias Tóxicas (TSCA), o Ato Federal de Inseticidas, Fungicidas e Rodenticidas (FIFRA) e o Ato Federal de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos (FFDCA) (Environmental Protection Agency, 2012a).

O propósito fundamental deste documento é oferecer uma estrutura metodológica específica e orientações detalhadas para a execução de testes voltados à avaliação da emergência e crescimento inicial de plântulas. Esses testes visam permitir a avaliação dos efeitos das substâncias em avaliação sobre as plantas durante estágios críticos iniciais de seu desenvolvimento. Os procedimentos meticulosamente delineados neste guia não se limitam apenas aos testes de exposição única, conhecidos como Nível I para agrotóxicos, mas também abrangem os procedimentos destinados aos testes que envolvem múltiplas concentrações de exposição, identificados como Nível II para agrotóxicos (Environmental Protection Agency, 2012a).

Os detalhes específicos e procedimentos experimentais delineados no protocolo OCSPP 850.4100 são minuciosamente resumidos e apresentados no Quadro 3, para uma compreensão mais acessível e aplicação prática.

2.3.10 OCSPP 850.4230: Early Seedling Growth Toxicity Test

O guia OCSPP 850.4230, concebido pelo Escritório de Segurança Química e Prevenção da Poluição da EPA em 2012, figura como um recurso crucial para os pesquisadores no campo da ecotoxicologia, disponível gratuitamente para acesso. Este guia foi elaborado com o propósito específico de coletar dados relativos à toxicidade de compostos químicos e suas combinações, sujeitos a regulamentações ambientais segundo o Ato de Controle de Substâncias

Tóxicas (TSCA), o Ato Federal de Inseticidas, Fungicidas e Rodenticidas (FIFRA), e a seção 408 do Ato Federal de Alimentos, Medicamentos e Cosméticos (FFDCA) (Environmental Protection Agency, 2012b).

Seu principal objetivo reside na delimitação de protocolos de testes voltados para plantas terrestres de relevância econômica, ou seja, espécies cultivadas, visando elucidar a toxicidade das substâncias em análise. Tais testes são conduzidos em diferentes contextos de exposição, seja por meio de aplicação foliar ou radicular (Environmental Protection Agency, 2012b).

Quando se presume que a substância avaliada entrará em contato com o solo ou a água presente na zona radicular e, caso o mecanismo de interesse esteja associado à absorção pelas raízes, a administração da substância é realizada por meio de uma solução nutritiva no substrato radicular. Por outro lado, se a substância em análise inicialmente interage com as plantas por meio de deposição na superfície, seja por transporte atmosférico ou pela água de irrigação, o método de teste apropriado é a aplicação foliar. Esse procedimento permite a subsequente movimentação da substância para a zona radicular através da irrigação (Environmental Protection Agency, 2012b).

Os detalhes específicos e procedimentos experimentais delineados no protocolo OCSPP 850.4230 são minuciosamente sumarizados e apresentados no Quadro 3, proporcionando uma compreensão facilitada e a aplicação prática dessas diretrizes.

2.3.11 OCSPP 850.4800: Plant Uptake and Translocation Test

O protocolo OCSPP 850.4800 foi concebido pelo Escritório de Segurança Química e Prevenção de Poluição da EPA dos Estados Unidos no ano de 2012. Este protocolo, disponível de forma gratuita, tem por escopo prover uma metodologia estruturada e uniforme aos pesquisadores interessados na investigação da absorção e translocação de diversas substâncias químicas por plantas terrestres, tais como agrotóxicos, metais pesados, princípios farmacêuticos e outras entidades similares (Environmental Protection Agency, 2012c).

É notório que uma diversidade de compostos químicos pode ser disseminada para distintos ambientes através de variadas formas, incluindo seu estado gasoso, partículas dispersas de poeira, solubilização em preparações ou água de irrigação, e mesmo por sua presença no solo. As plantas, por sua vez, demonstram uma notável capacidade de absorver, translocar, acumular e metabolizar substâncias não essenciais para seu crescimento e desenvolvimento. Este processo de absorção e assimilação frequentemente desencadeia a

transferência dessas substâncias para as cadeias alimentares terrestres (Environmental Protection Agency, 2012c).

Neste contexto, o mencionado protocolo estabelece procedimentos específicos para avaliar o comportamento destas substâncias em plantas de relevância comercial. Seu principal intento é fornecer dados precisos e padronizados sobre a quantidade de substâncias incorporadas nos tecidos vegetais, assim como o potencial de transferência desses compostos para as cadeias alimentares. Tal transferência ocasiona uma exposição indireta, tanto para seres humanos quanto para a vida selvagem (Environmental Protection Agency, 2012c)

Os detalhes específicos e os procedimentos experimentais delineados no protocolo OCSPP 850.4800 são meticulosamente sumarizados e apresentados no Quadro 3, promovendo a facilitação da compreensão e a aplicação prática deste guia.

2.3.12 ASTM E1963-22 Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests

O Protocolo ASTM E1963-22, elaborado pela American Society for Testing and Materials (ASTM) foi disponibilizado no ano de 2022. Para ter acesso integral ao documento é necessário o pagamento de uma taxa determinada pela referida organização. Segundo a American Society for Testing and Materials (2022), este guia apresenta uma abordagem multifacetada, visando:

- (a) Estabelecer a fitotoxicidade de substâncias, independentemente de sua natureza orgânica ou inorgânica;
- (b) Determinar a fitotoxicidade de amostras ambientais;
- (c) Avaliar a fitotoxicidade de lodos e resíduos perigosos;
- (d) Analisar o impacto decorrente da liberação de substâncias tóxicas no solo; e
- (e) Verificar a eficácia de medidas de remediação.

Com o propósito de tornar mais acessível a compreensão e a aplicação prática deste guia, os detalhes específicos e os procedimentos experimentais são minuciosamente resumidos e apresentados no Quadro 3.

2.3.13 ISO 29200:2013(en) Soil quality - Assessment of genotoxic effects on higher plants - *Vicia faba* micronucleus test

A normativa internacional ISO 29200:2013, promulgada pela ISO em 2013, versa sobre os protocolos para a avaliação dos efeitos genotóxicos induzidos por compostos presentes no solo. A obtenção deste documento requer o pagamento de uma taxa determinada pela entidade reguladora correspondente.

Seu escopo abarca a definição de um procedimento sistemático voltado à avaliação dos efeitos genotóxicos induzidos por elementos como lodos, substâncias sólidas ou líquidas e fertilizantes sobre as raízes secundárias da espécie *Vicia faba*. O método preconizado oferece duas modalidades distintas de exposição: uma direta ao solo, proporcionando uma reflexão do potencial genotóxico efetivo, e outra por meio da exposição ao extrato aquoso do solo, possibilitando a identificação de agentes mutagênicos que não foram absorvidos pelo solo e que têm potencial para alcançar ambientes aquáticos (International Organization for Standardization, 2013).

O procedimento de análise baseia-se na detecção de micronúcleos presentes nas células das raízes secundárias da *Vicia faba*, tendo como objetivo primordial a identificação dessas estruturas no citoplasma celular. A formação de micronúcleos pode advir de quebras cromossômicas ou de anomalias no fuso mitótico. Tais eventos podem ocasionar a incapacidade de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros migrarem de maneira adequada durante a anáfase da divisão mitótica, culminando na formação de um ou mais micronúcleos (International Organization for Standardization, 2013).

Posteriormente, a frequência de micronúcleos é comparada entre as células das raízes expostas às amostras de solo ou extrato aquoso e as células de um grupo controle que não foi exposto. A comparação desses dados é submetida a análises estatísticas rigorosas para determinar a relevância e significância dos resultados obtidos (International Organization for Standardization, 2013).

Os detalhes específicos e os procedimentos experimentais delineados na normativa ISO 29200:2013 são meticulosamente sumarizados e apresentados no Quadro 3, promovendo a facilitação da compreensão e a aplicação prática deste guia.

Quadro 3 – Normativas, diretrizes e guias que padronizam os bioensaios com plantas terrestres, contendo informações e detalhes essenciais extraídos destes documentos (Continua)

Test No. 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test	
Princípio do teste	Sementes de plantas modelo são expostas a vasos contendo terra arenosa, areia argilosa, ou argila arenosa, solo comercial para plantio ou mistura de solo sintético que contenha até 1,5% de carbono orgânico. O solo deve ser umedecido com diferentes concentrações da substância teste.
Condições experimentais	Ambiente: Câmara ambiental controlada, fitotron, sala de crescimento de plantas ou estufa Capacidade de retenção do solo: Não especificado Temperatura: $22 \pm 10^{\circ}\text{C}$ Fotoperíodo: 16 horas de luz e 8 horas de escuridão ($350 \pm 50 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$.) Umidade: $70 \pm 25\%$
Duração do teste	14 a 21 dias
Número de tratamentos	No mínimo cinco tratamentos + grupo controle
Número de repetições	4 repetições
Número de sementes ou plantas por repetição	3 a 10 sementes por 100 cm^2
Número mínimo de espécies empregadas	Não especificado
Espécies recomendadas	<i>Allium cepa</i> , <i>Avena sativa</i> , <i>Beta vulgaris</i> , <i>Brassica campestris var. chinensis</i> , <i>Brassica napus</i> , <i>Brassica oleracea var. capitata</i> , <i>Brassica rapa</i> , <i>Daucus carota</i> , <i>Fagopyrum esculentum</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Helianthus annuus</i> , <i>Hordeum vulgare</i> , <i>Lactuca sativa</i> , <i>Linum usitatissimum</i> , <i>Lolium perene</i> , <i>Lotus corniculatus</i> , <i>Lepidium sativum</i> , <i>Oryza sativa</i> , <i>Phaseolus aureus</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>Raphanus sativus</i> , <i>Secale cereale</i> , <i>Sinapis alba</i> , <i>Solanum lycopersicon</i> , <i>Sorghum bicolor</i> , <i>Trifolium pratense</i> , <i>Trigonella foenum-graecum</i> , <i>Triticum aestivum</i> , <i>Vicia sativa</i> , <i>Zea mays</i> .
Endpoints avaliados	Porcentagem de germinação, biomassa das plantas (seca e fresca), efeitos prejudiciais (necrose, perda de coloração), e comprimento da parte aérea
Validação do teste	70% de germinação e 90% de sobrevivência no grupo controle

Quadro 3 – Normativas, diretrizes e guias que padronizam os bioensaios com plantas terrestres, contendo informações e detalhes essenciais extraídos destes documentos. (Continua)

Test No. 227: Terrestrial Plant Test: Vegetative Vigour Test	
Princípio do teste	Sementes são plantadas em vasos contendo terra arenosa, areia argilosa ou argila arenosa, solo comercial para plantio ou mistura de solo sintético contendo até 1,5% de carbono orgânico. Após o estabelecimento das plantas (2-4 folhas verdadeiras), a substância de teste é pulverizada sobre as folhas.
Condições experimentais	Ambiente: Câmara ambiental controlada, fitotron, sala de crescimento de plantas ou estufa Capacidade de retenção do solo: Não especificado Temperatura: 22 ± 10°C Fotoperíodo: 16 horas de luz e 8 horas de escuridão (350 ± 50 µE/m ² /s) Umidade: 70% ± 25%
Duração do teste	21 a 28 dias
Número de tratamentos	No mínimo cinco tratamentos distintos + grupo controle,
Número de repetições	4 repetições por tratamento
Número de sementes ou plantas por repetição	De 1 a 5 plantas por vaso
Número mínimo de espécies empregadas	10 espécies vegetais
Espécies recomendadas	<i>Allium cepa</i> , <i>Avena sativa</i> , <i>Beta vulgaris</i> , <i>Brassica campestris</i> var. <i>chinensis</i> , <i>Brassica napus</i> , <i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> , <i>Brassica rapa</i> , <i>Daucus carota</i> , <i>Fagopyrum esculentum</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Helianthus annuus</i> , <i>Hordeum vulgare</i> , <i>Lactuca sativa</i> , <i>Linum usitatissimum</i> , <i>Lolium perene</i> , <i>Lotus corniculatus</i> , <i>Lepidium sativum</i> , <i>Oryza sativa</i> , <i>Phaseolus aureus</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>Raphanus sativus</i> , <i>Secale cereale</i> , <i>Sinapis alba</i> , <i>Solanum lycopersicon</i> , <i>Sorghum bicolor</i> , <i>Trifolium pratense</i> , <i>Trigonella foenum-graecum</i> , <i>Triticum aestivum</i> , <i>Vicia sativa</i> , <i>Zea mays</i> .
Endpoints avaliados	Crescimento prejudicado, clorose, necrose, mortalidade e efeitos no desenvolvimento da planta e biomassa das plantas (fresca e seca)
Validação do teste	O grupo de controle deve apresentar uma taxa de sobrevivência de 90%, e as plantas desse grupo não devem apresentar sinais evidentes de fitotoxicidade.

Quadro 3 – Normativas, diretrizes e guias que padronizam os bioensaios com plantas terrestres, contendo informações e detalhes essenciais extraídos destes documentos. (Continua)

ISO 11269-1:2012 Soil quality: Determination of the effects of pollutants on soil flora. Part 1: Method for the measurement of inhibition of root growth	
Princípio do teste	Sementes pré-germinadas são expostas em recipientes cilíndricos com dimensões de 8 cm de diâmetro e 11 cm de altura, preenchidos com solo contaminado proveniente de diferentes fontes ou com solo artificial (composição de 10% de turfa de <i>Sphagnum</i> , 20% de caulinita e 70% de areia do tipo quartzo), previamente umedecido com a substância em teste em uma série de diluições.
Condições experimentais	Ambiente: Câmara ambiental controlada, fitotron, sala de crescimento de plantas ou estufa Capacidade retenção do solo: 70 ± 5 % Temperatura: 20 ± 2 °C Fotoperíodo: escuridão total durante 14 horas Umidade: 80%
Duração do teste	5 dias
Número de tratamentos	Mínimo de cinco tratamentos + grupo controle
Número de repetições	3 repetições por tratamento
Número de sementes ou plantas por repetição	10 sementes pré-germinadas (48 horas)
Número mínimo de espécies empregadas	3
Espécies recomendadas	<i>Hordeum vulgare</i> L., <i>Avena sativa</i> L. e <i>Triticum aestivum</i> L.
Endpoints avaliados	Comprimento da raiz, comprimento da parte aérea (optativo)
Validação do teste	Não especificado

Quadro 3 – Normativas, diretrizes e guias que padronizam os bioensaios com plantas terrestres, contendo informações e detalhes essenciais extraídos destes documentos. (Continua)

ISO 11269-2:2012 Soil quality: Determination of the effects of pollutants on soil flora. Part 2: Effects of contaminated soil on the emergence and early growth of higher plants	
Princípio do teste	Sementes são semeadas em recipientes plásticos ou esmaltados, cujo diâmetro interno varia entre 85 e 95 mm. Esses recipientes contêm solos coletados em áreas industriais, agrícolas ou provenientes de resíduos, tais como dejetos animais, materiais degradados e lodo de esgoto. Estes solos são diluídos em um substrato artificial composto por 10% de Turfa de <i>Sphagnum</i> ou pó da fibra da casca de coco, 20% de caulinita e 69% de areia quartzo, criando assim diferentes diluições para o experimento.
Condições experimentais	Ambiente: Câmara ambiental controlada Capacidade de retenção do solo: 40 a 60% Temperatura: 23 ± 3°C Fotoperíodo: 16 h de luz a 7000 lux Umidade: 80% para <i>Avena sativa</i> L. e 60% para <i>Brassica rapa</i> L.
Duração do teste	14 a 21 dias
Número de tratamentos	12 tratamentos + grupo controle
Número de repetições	O grupo controle deve ter seis repetições e os tratamentos, duas repetições.
Número de sementes ou plantas por repetição	No início do experimento, são utilizadas 10 sementes em cada recipiente. Após 7 a 8 dias, avalia-se a germinação e são removidas 5 plantas.
Número mínimo de espécies empregadas	2 espécies vegetais
Espécies recomendadas	Obrigatórias: <i>Avena sativa</i> L., <i>Brassica rapa</i> L. Optativas: <i>Festuca rubra</i> , <i>Hordeum vulgare</i> , <i>Medicago sativa</i> e <i>Trifolium pratense</i> L.
Endpoints avaliados	Porcentagem de germinação e massa seca da parte aérea das plântulas
Validação do teste	50% de germinação no grupo controle

Quadro 3 – Normativas, diretrizes e guias que padronizam os bioensaios com plantas terrestres, contendo informações e detalhes essenciais extraídos destes documentos. (Continua)

ISO 18763:2016 Soil quality: Determination of the toxic effects of pollutants on germination and early growth of higher plants	
Princípio do teste	Sementes de diferentes modelos vegetais são dispostas em placas transparentes de cloreto de polivinila (PVC), contendo papel filtro preto (5 g/m ² , espessura de 0,17 mm e velocidade de filtração de 45 s), as quais são colocadas sobre 90 cm ³ de solo coletado de áreas industriais, agrícolas e locais restaurados. Alternativamente, pode-se utilizar solo artificial composto por 10% de Turfa de <i>Sphagnum</i> ou pó da fibra da casca de coco, 20% de caulinita e 69% de areia do tipo quartzo, tratado com a substância teste.
Condições experimentais	Ambiente: Incubadora ou sala controlada Capacidade de retenção do solo: 100% Temperatura: 25 ± 1 Fotoperíodo: Ausência de luminosidade
Duração do teste	72 ± 1 hrs
Número de tratamentos	Mínimo de seis tratamentos + grupo controle
Número de repetições	3 repetições por tratamento
Número de sementes ou plantas por repetição	10 sementes
Número mínimo de espécies empregadas	3 espécies vegetais
Espécies recomendadas	<i>Lepidium sativum</i> L., <i>Sinapis alba</i> L. e <i>Sorghum saccharatum</i> L.,
Endpoints avaliados	Porcentagem de germinação, comprimento da raiz e da parte aérea das plântulas
Validação do teste	70% de germinação no grupo controle. O comprimento médio mínimo das raízes no grupo controle deve ser de pelo menos 30 mm para cada espécie.

Quadro 3 – Normativas, diretrizes e guias que padronizam os bioensaios com plantas terrestres, contendo informações e detalhes essenciais extraídos destes documentos. (Continua)

EPA 600/3-88/029 Protocols For Short Term Toxicity Screening Of Hazardous Waste Sites. A 8.6 Lettuce Seed Germination (<i>Lactuca sativa</i>)	
Princípio do teste	Sementes são dispostas em placas de Petri plásticas (150 mm de largura por 15 mm de altura), contendo 100 g de solo coletado de distintos locais, que pode ser homogeneizado em solo artificial (areia sílica de malha 20) a fim de obter diferentes diluições, ou solo artificial umedecido com a substância teste.
Condições experimentais	Ambiente: Câmara ambiental controlada Capacidade de retenção do solo: 85% Temperatura: 25 ± 1°C Fotoperíodo: 48 horas de escuridão no início do teste, seguidas de 16 horas de luz e 8 horas de escuridão até a finalização (4300 ± 430 lux).
Duração do teste	120 horas
Número de tratamentos	No mínimo seis tratamentos + grupo controle
Número de repetições	3 repetições por tratamento
Número de sementes ou plantas por repetição	40 sementes
Número mínimo de espécies empregadas	01 espécie vegetal
Espécies recomendadas	<i>Lactuca sativa</i> L.
Endpoints avaliados	Porcentagem de germinação
Validação do teste	90% de germinação no grupo controle

Quadro 3 – Normativas, diretrizes e guias que padronizam os bioensaios com plantas terrestres, contendo informações e detalhes essenciais extraídos destes documentos. (Continua)

EPA 600/3-88/029 Protocols For Short Term Toxicity Screening Of Hazardous Waste Sites. A.8.7 Lettuce root elongation (<i>Lactuca sativa</i>)	
Princípio do teste	Sementes são dispostas em placas de Petri de vidro (100 mm de largura por 15 mm de altura) contendo papel filtro (Whatman No. 3) umedecido com a água coletada de locais distintos ou com a substância teste diluída em água deionizada.
Condições experimentais	Ambiente: Câmara ambiental controlada Umedecimento do papel: 4 mL de solução teste Temperatura: 24 ± 2°C Fotoperíodo: ausência de luminosidade
Duração do teste	120 horas
Número de tratamentos	No mínimo 5 tratamentos + grupo controle
Número de repetições	3 repetições por tratamento
Número de sementes ou plantas por repetição	05 sementes
Número mínimo de espécies empregadas	01 espécie vegetal
Espécies recomendadas	<i>Lactuca sativa</i> L.
Endpoints avaliados	Comprimento da raiz
Validação do teste	90% de germinação no grupo controle

Quadro 3 – Normativas, diretrizes e guias que padronizam os bioensaios com plantas terrestres, contendo informações e detalhes essenciais extraídos destes documentos. (Continua)

OPPTS 850.4200 Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test	
Princípio do teste	Sementes são dispostas em placas de Petri (200 mm) preenchidas com areia de quartzo umedecida com a substância teste diluída em água deionizada.
Condições experimentais	Ambiente: Câmara ambiental controlada Capacidade de retenção do solo: Não especificado Temperatura: 25 ± 1°C Fotoperíodo: ausência de luminosidade
Duração do teste	O experimento deve ser encerrado assim que o grupo controle alcançar uma taxa de germinação de 65% e as raízes atingirem um comprimento de 20 mm.
Número de tratamentos	No mínimo seis tratamentos + grupo controle.
Número de repetições	3 repetições por tratamento
Número de sementes ou plantas por repetição	10 sementes
Número mínimo de espécies empregadas	10 espécies vegetais
Espécies recomendadas	<i>Allium cepa</i> , <i>Avena sativa</i> , <i>Brassica oleracea</i> , <i>Cucumis sativus</i> , <i>Daucus carota</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Lactuca sativa</i> , <i>Lolium perene</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> e <i>Zea mays</i>
Endpoints avaliados	Porcentagem de germinação e comprimento das raízes
Validação do teste	65% de germinação e raízes com pelo menos 20 mm de comprimento no grupo controle

Quadro 3 – Normativas, diretrizes e guias que padronizam os bioensaios com plantas terrestres, contendo informações e detalhes essenciais extraídos destes documentos. (Continua)

OCSPP 850.4100: Seedling Emergence and Seedling Growth	
Princípio do teste	Sementes de diferentes plantas modelo são semeadas em vasos plásticos ou de vidro contendo solo, seja ele natural ou sintético, com um teor máximo de 3% de matéria orgânica, umedecido com a substância que está sendo avaliada.
Condições experimentais	Ambiente: Câmara de crescimento ou estufa Capacidade de retenção do solo: Não especificado Umidade: Mantida a $70 \pm 15\%$. Temperatura: Durante o dia, mantida a $25 \pm 6^\circ\text{C}$; durante a noite, a temperatura deve ser de $20 \pm 6^\circ\text{C}$. Fotoperíodo: Exposição a 16 horas de luz e 8 horas de escuridão, com intensidade luminosa de $350 \pm 50 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{seg}$.
Duração do teste	Duração inicial de 14 dias, com a possibilidade de extensão para 21 dias caso sejam observados efeitos fitotóxicos nos tratamentos.
Número de tratamentos	Mínimo de cinco tratamentos + grupo controle
Número de repetições	4 repetições por tratamento
Número de sementes ou plantas por repetição	10 sementes
Número mínimo de espécies empregadas	É necessário o uso de pelo menos 10 espécies vegetais, distribuídas da seguinte forma: (1) Dicotiledôneas: Seis espécies provenientes de no mínimo quatro famílias botânicas, com a inclusão obrigatória da soja (<i>Glycine max</i>). (2) Monocotiledôneas: Quatro espécies provenientes de pelo menos duas famílias botânicas, sendo o milho (<i>Zea mays</i>) uma delas.
Espécies recomendadas	<i>Allium cepa</i> , <i>Avena sativa</i> , <i>Beta vulgaris</i> , <i>Brassica rapa</i> , <i>Brassica napus</i> , <i>Brassica oleracea</i> , <i>Cucumis sativus</i> , <i>Daucus carota</i> , <i>Fagopyrum esculentum</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Gossypium spp.</i> , <i>Helianthus annuus</i> , <i>Lactuca sativa</i> , <i>Lolium perene</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> e <i>Zea mays</i>
Endpoints avaliados	Porcentagem de germinação, taxa de sobrevivência, comprimento da parte aérea e biomassa total da planta.
Validação do teste	90% de germinação e sobrevivência no grupo controle

Quadro 3 – Normativas, diretrizes e guias que padronizam os bioensaios com plantas terrestres, contendo informações e detalhes essenciais extraídos destes documentos. (Continua)

OCSPP 850.4230: Early Seedling Growth Toxicity Test	
Princípio do teste	Plântulas de diferentes espécies vegetais são expostas a vasos de vidro ou polietileno, contendo substratos como areia de quartzo, pérolas de vidro ou solução hidropônica. A substância em questão necessita ser incorporada à solução hidropônica nutritiva ou aplicada de maneira revestida no substrato para viabilizar a avaliação da exposição radicular. Como alternativa, nos testes de exposição foliar, é imprescindível que a substância seja pulverizada, polvilhada ou aplicada diretamente nas folhas para análise.
Condições experimentais	Ambiente: Câmara ambiental, sala de crescimento ou estufa Capacidade de retenção do solo: Não especificado Temperatura: durante o dia deve ser de 25 ± 3 °C, enquanto durante a noite deve ser de 20 ± 3 °C. Fotoperíodo: 16 horas de luz e 8 horas de escuridão, com uma intensidade luminosa de 350 ± 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ Umidade: 70 ± 15
Duração do teste	14 dias
Número de tratamentos	No mínimo cinco tratamentos + grupo controle
Número de repetições	4 repetições por tratamento
Número de sementes ou plantas por repetição	10 plântulas pré-germinadas em solução hidropônica ou areia do tipo quartzo.
Número mínimo de espécies empregadas	No mínimo, dez espécies de plantas são testadas, incluindo seis espécies de dicotiledôneas e quatro espécies de monocotiledôneas.
Espécies recomendadas	<i>Avena sativa</i> , <i>Allium cepa</i> , <i>Brassica oleracea</i> , <i>Cucumis sativus</i> , <i>Daucus carota</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Lactuca sativa</i> , <i>Lolium perene</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Zea mays</i>
Endpoints avaliados	Taxa de sobrevivência, comprimento da raiz e da parte aérea e massa fresca das plantas
Validação do teste	90% de sobrevivência no grupo controle

Quadro 3 – Normativas, diretrizes e guias que padronizam os bioensaios com plantas terrestres, contendo informações e detalhes essenciais extraídos destes documentos. (Continua)

OCSPP 850.4800: Plant Uptake and Translocation Test	
Princípio do teste	As plântulas são expostas em vasos de vidro ou polietileno, contendo areia de quartzo ou solução hidropônica. A substância teste deve ser adicionada ao substrato em questão.
Condições experimentais	Ambiente: Câmara ambiental, sala de crescimento ou estufa Capacidade de retenção do solo: Não especificado Temperatura: durante o dia deve ser de 25 ± 3 °C, enquanto durante a noite deve ser de 20 ± 3 °C. Fotoperíodo: 16 horas de luz e 8 horas de escuridão, com uma intensidade luminosa de 350 ± 50 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ Umidade: 70 ± 5
Duração do teste	O período de exposição, tanto para substâncias de teste sólidas quanto líquidas, deve coincidir com o tempo requerido para que a espécie testada atinja uma biomassa adequada para análise ou até que os frutos ou sementes atinjam a maturidade.
Número de tratamentos	No mínimo três tratamentos + grupo controle
Número de repetições	6 repetições por tratamento
Número de sementes ou plantas por repetição	1 a 4 plântulas pré-germinadas em solução hidropônica ou areia do tipo quartzo.
Número mínimo de espécies empregadas	2 espécies (1 monocotiledônea e 1 eudicotiledônea)
Espécies recomendadas	<i>Allium cepa</i> , <i>Avena sativa</i> , <i>Beta vulgaris</i> , <i>Brassica rapa</i> , <i>Brassica napus</i> , <i>Brassica oleracea</i> , <i>Cucumis sativus</i> , <i>Daucus carota</i> , <i>Fagopyrum esculentum</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Gossypium spp.</i> , <i>Helianthus annuus</i> , <i>Lactuca sativa</i> , <i>Lolium perene</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Pisum sativum</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> e <i>Zea mays</i>
Endpoints avaliados	Retardamento do crescimento, descoloração, clorose e/ou necrose das folhas, peso fresco, peso seco, teor percentual de umidade, taxa de absorção, taxa fotossintética, transpiração e condutância estomática
Validação do teste	Ausência de sinais de estresse decorrentes de competição ou superlotação de plantas no grupo controle

Quadro 3 – Normativas, diretrizes e guias que padronizam os bioensaios com plantas terrestres, contendo informações e detalhes essenciais extraídos destes documentos. (Continua)

ASTM E1963-22 Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests	
Princípio do teste	Sementes são semeadas em vasos de vidro, polietileno, aço inoxidável ou placas de Petri contendo solo coletado de locais distintos com possível contaminação, ou solo natural, solo comercial, misturas de solo sintético ou areia de quartzo tratados com amostras ambientais, tais como amostras líquidas, lodos de esgoto e efluatos.
Condições experimentais	Ambiente: Câmara ambiental controlada ou estufa Capacidade de retenção do solo: 85% Temperatura: 20 a 30°C Fotoperíodo: 16 horas de luz e 8 horas de escuridão (100 a 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) Umidade: 50%
Duração do teste	96 horas ou meses
Número de tratamentos	Não especificado
Número de repetições	5 repetições por tratamento
Número de sementes por repetição	5 a 20 sementes
Número mínimo de espécies empregadas	Não especificado
Espécies recomendadas	<i>Allium cepa</i> , <i>Atriplex patula</i> , <i>Avena sativa</i> , <i>Brassica alba</i> , <i>Brassica campestris var. chinensis</i> , <i>Brassica napus</i> , <i>Brassica oleracea</i> , <i>Brassica rapa</i> , <i>Cucumis sativus</i> , <i>Daucus carota</i> , <i>Echinochloa crusgalli</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Lactuca sativa</i> , <i>Lepidium sativum</i> , <i>Leersia oryzoides</i> , <i>Lolium perene</i> , <i>Lycopersicon esculentum</i> , <i>Nelumbo lutea</i> , <i>Oryza sativa</i> , <i>Phaseolus aureus</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Raphanus sativus</i> , <i>Rorippa nasturtium-aquaticum</i> , <i>Sorghum bicolor</i> , <i>Spartina alterniflora</i> , <i>Trifolium ornithopodioides</i> , <i>Trifolium pratense</i> , <i>Triticum aestivum</i> , <i>Vicia sativa</i> , <i>Zea mays</i> e <i>Zizania aquática</i> .
Endpoints avaliados	Porcentagem de germinação, comprimento e biomassa das plantas e alterações no desenvolvimento
Validação do teste	Porcentagem de germinação superior a 70% e uma taxa de sobrevivência acima de 80% no grupo controle.

Quadro 3 – Normativas, diretrizes e guias que padronizam os bioensaios com plantas terrestres, contendo informações e detalhes essenciais extraídos destes documentos. (Conclusão)

ISO 29200:2013(en) Soil quality - Assessment of genotoxic effects on higher plants - <i>Vicia faba</i> micronucleus test	
Princípio do teste	Sementes pré-germinadas (3 dias) e com raízes primárias são introduzidas no solo, possivelmente contaminado, utilizando vasos plásticos (diâmetro de 9 cm e altura de 10 cm), até o desenvolvimento de raízes secundárias. Para substâncias líquidas ou extrato do solo, sementes pré-germinadas com raízes primárias desenvolvidas têm suas raízes seccionadas e são expostas a um recipiente de vidro (com capacidade de 200 mL), contendo solução Hoagland saturada de oxigênio, até o desenvolvimento de raízes secundárias. Após o desenvolvimento das raízes secundárias, as mesmas são expostas à substância teste diluída em solução de Hoagland. Em ambos os testes, após a exposição, as raízes secundárias são coletadas, fixadas e analisadas em microscópio óptico.
Condições experimentais	Ambiente: Câmara ambiental controlada ou estufa Capacidade de retenção do solo: 70% Temperatura: 24 ± 1°C Fotoperíodo: 16 horas de luz e 8 horas de escuridão (5000 lux) ou na ausência de luz, caso esteja avaliando substâncias líquidas
Duração do teste	Substâncias sólidas: 3 a 5 dias de exposição Substâncias líquidas: 30 ou 48 horas de exposição
Número de tratamentos	Não especificado
Número de repetições	3 repetições
Número de sementes por repetição	3 sementes pré-germinadas
Número mínimo de espécies empregadas	1 espécie vegetal
Espécies recomendadas	<i>Vicia faba</i>
Endpoints avaliados	Índice mitótico e frequência de micronúcleos
Validação do teste	20 células em divisão para cada 1000 células avaliadas

Fonte: Autor (2024)

2.4 Citogenética vegetal aplicada a estudos ecotoxicológicos

Os primórdios da investigação citológica remontam aos anos 1591 a 1608, quando Sachariassen e Jansen conceberam o primeiro microscópio composto. Contudo, o verdadeiro marco histórico ocorreu em 1663, quando Hooke, ao examinar um fragmento de cortiça sob o microscópio, identificou minúsculos compartimentos aos quais denominou células. Posteriormente, após as observações pioneiras de Hooke, dois séculos de meticulosa observação e experimentação foram necessários para a formulação da Teoria Celular, que postula a célula como a menor unidade dotada de vida autônoma em todos os organismos vivos. Adicionalmente, foram demandados anos de pesquisas suplementares para uma compreensão abrangente dos mecanismos celulares e hereditários (Brammer, Zanotto, Caverzan, 2007).

Desde os tempos de Mendel, a Genética e a Citologia convergiram, amalgamando seus conhecimentos no campo da citogenética. A partir desse ponto, a citogenética experimentou um notável crescimento, permeando diversos ramos da biologia, como bioquímica, taxonomia, medicina clínica e melhoramento genético vegetal e animal (Guerra, 1988; Bass; Birchler, 2012).

A citogenética, enquanto disciplina científica, concentra-se no estudo da hereditariedade mediante uma abordagem citológica. Seu escopo abrange a compreensão da estrutura (número e forma) e do comportamento (organização e movimento) dos cromossomos e cromatina no interior da célula. Além disso, busca elucidar a função dos cromossomos e suas implicações na transmissão, recombinação e expressão genética (Sumner, 2003; Bass; Birchler, 2012). Notavelmente, a citogenética tem sido empregada como ferramenta na disciplina da ecotoxicologia, contribuindo para a análise toxicológica de diversas substâncias químicas mediante o estudo do ciclo celular de organismos modelos, notadamente as plantas *Allium cepa* e *Lactuca sativa* (Andrade; Davide; Gedraite, 2010; Andrade-Vieira *et al.*, 2011; Dho *et al.*, 2010; Kumari *et al.*, 2011)

A cebola (*Allium cepa*), uma monocotiledônea pertencente à família Amaryllidaceae, é amplamente consumida globalmente e apresenta a vantagem de um rápido crescimento em qualquer estação do ano. Suas raízes, finas e macias, com meristema abundante, possuem células e cromossomos de dimensões consideráveis, proporcionando uma visualização mais nítida no microscópio óptico. Em comparação com outras espécies vegetais, a cebola exhibe cromossomos em menor número e de maiores dimensões ($2n=2x=16$) (De Oliveira Poletto *et al.*, 2011; Lessa; Silva; Cariello, 2017; Anacleto; Roberto; Marin-Morales, 2017)

A alface (*Lactuca sativa*), uma eudicotiledônea da família Asteraceae, apresenta um baixo número cromossômico ($2n=2x=18$), com dimensões variando de 2,8 a 5,5 μ m (Matoba *et al.*, 2007). Esta espécie, assim como *Allium cepa*, permite uma observação facilitada dos cromossomos pelo microscópio óptico. A utilização de *Lactuca sativa* como organismo experimental em estudos quimioecológicos é justificada pela elevada sensibilidade da espécie, mesmo em concentrações diminutas de substâncias analisadas, além dos custos acessíveis de pesquisa. Adicionalmente, características como germinação rápida (aproximadamente 24 horas) e crescimento linear em ampla faixa de pH destacam a utilidade desta espécie (Simões *et al.*, 2013).

A análise do ciclo celular, abrangendo a intérfase (G1, S, G2) e as fases mitóticas (prófase, metáfase, anáfase e telófase) da zona meristemática e F1 das raízes desses organismos, fornece informações cruciais sobre a organização e comportamento dos cromossomos durante a divisão celular. Através de análises toxicológicas, esta abordagem permite a detecção de anomalias como aberrações cromossômicas e nucleares, geralmente decorrentes da exposição a agentes tóxicos. A avaliação citogenética por meio da análise do ciclo celular possibilita a quantificação de quatro parâmetros citogenéticos: índice mitótico (IM), aberrações cromossômicas (AC), aberrações nucleares (NA) e micronúcleos (MN) (Leme; Marin-Morales, 2009)

2.4.1 Índice Mitótico

A avaliação da citotoxicidade de diversas substâncias tem sido efetuada por meio do índice mitótico, conceituado como o número total de células em processo de divisão durante o ciclo celular. Alterações quantitativas no índice mitótico, seja em aumento ou diminuição, proporcionam uma medida do nível de citotoxicidade de uma substância em questão (Fernandes; Mazzeo; Marin-Morales, 2007)

De acordo com Hoshina (2002), índices mitóticos significativamente inferiores ao valor do controle sugerem modificações decorrentes da ação química sobre o crescimento e desenvolvimento dos organismos expostos. Em contrapartida, índices mitóticos superiores ao controle negativo indicam um aumento na taxa de divisão celular, o que pode ser prejudicial às células, culminando em proliferação celular desordenada e, potencialmente, no desenvolvimento de tumores.

A inibição do índice mitótico está associada ao impacto de substâncias químicas na síntese de DNA/proteína nas células (Andrade; Campos; Davide, 2008). Em organismos

modelos, uma redução do IM abaixo de 22% em relação ao controle é considerada letal, enquanto uma redução inferior a 50% (limite citotóxico) geralmente desencadeia efeitos subletais (Abdel Migid *et al.*, 2007).

2.4.2 Aberrações cromossômicas

As aberrações cromossômicas, que podem ocorrer de forma espontânea ou como resultado da exposição a agentes físicos ou químicos, se caracterizam por modificações na estrutura cromossômica ou no número total de cromossomos (Leme; Marin-Morales, 2009). A interação com substâncias consideradas tóxicas desencadeia anormalidades cromossômicas estruturais mediante clivagem do DNA, inibição da síntese de DNA e alterações na replicação do DNA. As aberrações cromossômicas numéricas, como aneuploidia e poliploidia, resultam de segregação cromossômica anormal, podendo ocorrer tanto de forma espontânea quanto como consequência da exposição a agentes aneugênicos (Albertini *et al.*, 2000)

Os processos clastogênicos e aneugênicos são responsáveis pelas aberrações cromossômicas. O efeito aneugênico implica na inativação de componentes celulares, como o fuso mitótico, resultando em perdas cromossômicas, enquanto o efeito clastogênico é caracterizado pela promoção de quebras cromossômicas durante a divisão celular. Diversas anomalias cromossômicas podem ser observadas, incluindo aderências cromossômicas, fragmentos cromossômicos, pontes telofásicas ou anafásicas, segregação cromossômica tardia ou desorientada, c-metáfase, poliploidia e anáfase multipolar (Iqbal *et al.*, 2019).

A aderência cromossômica ocorre quando o agente tóxico interage com grupos fosfatos do DNA, influenciando a condensação do DNA ou formando ligações intracromátides (El-Ghamery *et al.*, 2003). Essa aderência cromossômica representa um indicador característico de estresse genotóxico, podendo desencadear consequências irreversíveis para a célula, inclusive o desencadeamento do processo de morte celular e a formação de pontes cromossômicas, resultando em quebras cromossômicas (Türkoğlu, 2007).

Além disso, a presença de segregação cromossômica tardia, c-metáfases e anáfases multipolares evidencia a interferência da substância analisada na função dos microtúbulos, fenômeno conhecido como envenenamento do fuso. Os microtúbulos desempenham papel crucial em diversos processos ao longo do crescimento e ciclo mitótico, incluindo o movimento dos cromossomos, a construção da estrutura celular e o desenvolvimento da parede celular (Jordan; Wilson, 1998).

2.4.3 Alterações nucleares

As alterações nucleares compreendem modificações morfológicas nos núcleos interfásicos, resultantes da influência da substância em avaliação. Dentre as principais alterações identificáveis, destacam-se núcleos lobulados, núcleos com brotos, células polinucleares, minicélulas, núcleos condensados e células binucleadas (Leme; Marin-Morales, 2009; Iqbal *et al.*, 2019).

2.4.4 Micronúcleos

Os micronúcleos emergem como o *endpoint* mais eficaz e acessível para investigar o impacto mutagênico induzido por produtos químicos (Ribeiro, 2003). Esta preferência advém da natureza dos micronúcleos, que surgem como resultado de danos não reparados ou reparados de forma inadequada nas células progenitoras, sendo prontamente visíveis nas células-filhas como estruturas semelhantes ao núcleo principal, mas de tamanho reduzido. A formação de micronúcleos pode ser atribuída ao desenvolvimento de diversas aberrações cromossômicas, como quebras e perdas cromossômicas. Além disso, os MN podem originar-se de processos como a poliploidização, onde resultam da eliminação do excesso de DNA do núcleo principal na tentativa de restaurar a ploidia normal (Fernandes; Mazzeo; Marin-Morales, 2007).

A avaliação dos MN no teste utilizando *Allium cepa* pode ser conduzida tanto nas células meristemáticas quanto nas células radiculares F1. Em células meristemáticas, a análise de micronúcleos é frequentemente combinada com a avaliação de aberrações cromossômicas, exigindo um período mais extenso para conclusão. No entanto, ambas as metodologias demonstraram ser suficientemente sensíveis para a detecção de mutagênicos ambientais (Leme *et al.*, 2008; Palmieri *et al.*, 2016).

Leme *et al.* (2008) ressaltam que, dado o cariótipo simétrico e homogêneo de *Allium cepa*, caracterizado por cromossomos grandes e em número reduzido, o tamanho dos micronúcleos pode ser um critério eficaz para avaliar os efeitos clastogênicos e aneugênicos nesta espécie. Sendo que micronúcleos de maiores dimensões sugerem impacto aneugênico, indicando perda cromossômica, enquanto MN menores podem apontar para atividade clastogênica, associada a quebras cromossômicas.

2.5 Fisiologia da germinação

A semente, enquanto entidade biológica de profunda complexidade, desempenha um papel crucial no ciclo de vida das plantas. Em perspectiva botânica, a semente constitui o órgão primordial de reprodução dos vegetais, abrigando em seu interior o embrião em processo de desenvolvimento, bem como reservas nutritivas e um envoltório protetor. Essa estrutura se configura após a fertilização bem-sucedida de um óvulo pela célula reprodutiva masculina, evento que se materializa no curso do fenômeno da polinização (Bewley *et al.*, 2012; Baskin; Baskin, 2014; Raven, Evert; Eichhorn, 2014; Taiz *et al.*, 2017).

A composição da semente é caracterizada por distintas camadas, cada qual desempenhando funções específicas e intrínsecas. A camada externa, denominada tegumento, assume a posição de barreira protetora, eficaz na salvaguarda contra danos mecânicos, patógenos e dessecação. Logo abaixo, emerge o endosperma, um reservatório de substâncias nutritivas como amido, proteínas e lipídios, fundamentais para sustentar o crescimento inicial do embrião. Este último, por sua vez, abriga os primórdios das futuras estruturas, tais como folhas, raízes e caule (Bewley *et al.*, 2012; Baskin; Baskin, 2014; Raven, Evert; Eichhorn, 2014; Taiz *et al.*, 2017).

Para além de sua relevância ecológica incontestável, as sementes ostentam um impacto econômico considerável, figurando como fonte alimentar e matéria-prima essencial em variados produtos agroindustriais. No contexto agrícola, a utilização de sementes de qualidade superior, capazes de gerar plantas vigorosas e produtivas de maneira uniforme e eficiente, torna-se uma peça fundamental para o sucesso de empreendimentos dedicados à exploração comercial do cultivo de hortaliças (Raven, Evert; Eichhorn, 2014).

Notavelmente, as sementes têm sido adotadas em estudos ecotoxicológicos com o propósito de avaliar o potencial fitotóxico e citogenotóxico de substâncias químicas (Andrade-Vieira *et al.*, 2008). Nesse contexto, torna-se crucial uma compreensão meticulosa dos intrincados mecanismos fisiológicos que regem a germinação das sementes. Tal compreensão é fundamental para viabilizar uma análise aprofundada e uma discussão embasada dos resultados obtidos em avaliações ecotoxicológicas.

Após a conclusão do processo de desenvolvimento em associação com a planta progenitora, as sementes estão preparadas para a dispersão e o início de seu próprio processo de desenvolvimento. O período necessário para o início da germinação pode variar conforme a dormência ou quiescência das sementes (Bewley *et al.*, 2012; Baskin; Baskin, 2014; Raven, Evert; Eichhorn, 2014; Taiz *et al.*, 2017).

O processo de germinação inicia-se com a absorção de água pela semente seca e culmina com a emergência do eixo embrionário, comumente a radícula, transpondo os tecidos circundantes. Elementos ambientais como água, temperatura, oxigênio, luz e nitrato desempenham papéis preponderantes nesse processo, sendo a água o fator primordial. O teor de água nas sementes maduras e secas varia de 5% a 15%, um intervalo substancialmente abaixo do limiar necessário para um metabolismo plenamente funcional. Ademais, a pressão de turgor, alicerçada na absorção de água, emerge como essencial para a expansão celular, sendo a base do crescimento e desenvolvimento vegetativo (Bewley *et al.*, 2012; Baskin; Baskin, 2014; Raven, Evert; Eichhorn, 2014; Taiz *et al.*, 2017).

A absorção de água pela semente, em condições normais, desdobra-se em fases distintas, caracterizando-se como um processo trifásico.

Fase I: Durante esta etapa, as sementes, encontrando-se em estado seco, experimentam uma absorção rápida de água por meio do processo de embebição (Bewley *et al.*, 2012; Taiz *et al.*, 2017).

Fase II: Na segunda fase, observa-se uma diminuição na absorção de água pela embebição, enquanto os processos metabólicos, incluindo transcrição e tradução, são reiniciados. O embrião expande-se, e a radícula emerge da casca da semente (Bewley *et al.*, 2012; Taiz *et al.*, 2017).

Fase III: A terceira fase é caracterizada pela retomada da absorção de água, motivada por uma redução no potencial hídrico (Ψ), à medida que a plântula cresce. Nesse contexto, as reservas de nutrientes presentes nas sementes são completamente mobilizadas (Bewley *et al.*, 2012; Taiz *et al.*, 2017).

A embebição, termo intrinsecamente associado à fisiologia vegetal, caracteriza-se como a absorção precoce e veloz de água pela semente no estágio I, contrapondo-se à absorção de água no estágio III. Apesar do gradiente de potencial hídrico induzir a captação hídrica em ambos os contextos, as determinantes subjacentes dos gradientes são discerníveis. Na semente seca, o componente potencial matricial (Ψ_m) da equação do potencial hídrico reduz o Ψ , instaurando, assim, o gradiente. O potencial matricial da água emerge de sua habilidade de aderir a superfícies sólidas, como os microcapilares das paredes celulares e as superfícies de proteínas e outras macromoléculas. A reidratação de macromoléculas celulares desencadeia processos metabólicos primordiais, englobando respiração, transcrição e tradução (Bewley *et al.*, 2012; Taiz *et al.*, 2017).

No ponto em que todos os sítios possíveis de conexão da água alcançam a saturação, a embebição cessa e o Ψ_m torna-se menos negativo. Na fase II, verifica-se uma redução na

absorção de água pela semente até a restauração do gradiente de potencial hídrico. Assim, a fase II pode ser interpretada como um período preparatório prévio ao desenvolvimento, durante o qual o potencial de solutos (Ψ_s) do embrião diminui de maneira constante, devido à liberação de solutos osmoticamente ativos e à dissipação das reservas acumuladas. O volume da semente pode expandir, resultando na ruptura do tegumento. Ademais, a reorganização do citoesqueleto e a ativação dos mecanismos de reparo do DNA também são desencadeadas neste momento, como partes integrantes da resposta metabólica (Bewley *et al.*, 2012; Taiz *et al.*, 2017).

O desfecho do processo germinativo se consuma quando a radícula emerge do tegumento da semente na fase II. Essa emergência pode ocorrer em um único estágio, em que a radícula emerge imediatamente após a ruptura do tegumento da semente (testa + tégmen), ou em dois estágios, nos quais o endosperma deve primeiramente sofrer amolecimento antes que a radícula possa emergir (Bewley *et al.*, 2012; Taiz *et al.*, 2017).

2.6 Utilização do microcrustáceo *Artemia salina* em estudos ecotoxicológicos

O microcrustáceo *Artemia salina*, pertencente ao subfilo Crustacea Brünnich, 1772, classe Branchiopoda Latreille, 1817, subclasse Sarsostraca Tasch, 1969, ordem Anostraca Sars, 1867, família Artemiidae Grochowski, 1896, e gênero *Artemia* Leach, 1819 (Martin *et al.*, 2001), destaca-se por apresentar uma notável adaptação a ambientes marinhos extremamente salinos.

Populações vinculadas ao gênero *Artemia* revelam uma distribuição geográfica abrangente, abarcando todos os continentes, com exceção da Antártida. Estas espécies são proeminentemente encontradas em mais de 500 lagos salgados, predominando em zonas de temperaturas variáveis, desde temperadas a subtropicais e tropicais. A adaptação primordial é observada em ambientes lacustres com elevada salinidade, onde demonstram uma notável capacidade de tolerância a níveis de até 70 g/L e, de forma surpreendente, até 250 g/L (Ruppert; Barnes, 1994). Tais locais caracterizam-se pela relativa escassez de diversidade biológica e pela ausência de predadores ou competidores. Nesse tipo de habitat, o processo evolutivo das espécies de *Artemia* é especialmente favorecido pela abundância de microorganismos, como bactérias, protozoários e algas, que constituem a base fundamental de sua dieta (Amat, 1985).

A estrutura anatômica destes organismos divide-se em cefalotórax e abdômen, cada qual desempenhando funções distintas. No cefalotórax, encontramos a cabeça, que abriga olhos compostos cruciais para a percepção visual do ambiente aquático, permitindo a detecção de variações de luz e sombra. As duas antenas desempenham um papel vital na detecção de

substâncias químicas na água e na orientação espacial. As mandíbulas, também denominadas maxilas, projetam-se como estruturas alimentares, desempenhando um papel crucial na fragmentação de partículas de alimentos e permitindo que este microcrustáceo se alimente de matéria orgânica suspensa na água. Além disso, os maxilípedes desempenham papel importante na manipulação de alimentos e auxiliam no movimento. No contexto do abdômen, *Artemia salina* apresenta características anatômicas e fisiológicas associadas à reprodução e digestão (Abatzopoulos *et al.*, 2013; Browne *et al.*, 2018).

O primeiro bioensaio empregando *Artemia salina* foi conduzido por Meyer *et al.* (1982) com o objetivo de realizar uma triagem preliminar da toxicidade de extratos de plantas medicinais. Este bioensaio, posteriormente, adquiriu grande popularidade e é extensivamente utilizado na avaliação de amostras ambientais, resíduos industriais, metais pesados, agrotóxicos e outras substâncias. Além dos bioensaios que avaliam a toxicidade aguda e crônica, o organismo também se presta a estudos sobre efeitos teratogênicos (Kerster; Schaeffer, 1983; Lestari *et al.*, 2017) e comportamentais (Venkateswara Rao *et al.*, 2007; Alyuruk; Demir; Cavas, 2013).

Artemia salina apresenta diversas vantagens como organismo teste. Em primeiro lugar, demonstra sensibilidade ao estresse ambiental, respondendo de maneira delicada às alterações em seu ambiente, tornando-se assim um modelo apropriado para a detecção mesmo de pequenas quantidades de substâncias tóxicas. Adicionalmente, a facilidade na obtenção de cistos de *Artemia salina* durante todo o ano facilita o cultivo em laboratório, possibilitando a produção em larga escala de organismos para experimentos (Nunes *et al.*, 2006; Kalčíková; Zagorc-Končan; Žgajnar Gotvajn, 2012; Libralato, 2014; Libralato *et al.*, 2016; Ntungwen *et al.*, 2020; Albarano *et al.*, 2022).

Destaca-se ainda a economia de custos associada ao uso de *Artemia salina*. A manutenção desse organismo em ambiente laboratorial é menos dispendiosa quando comparada a organismos modelo maiores e mais complexos, como camundongos de laboratório. Esta abordagem viabiliza a realização de mais experimentos, mesmo quando os recursos financeiros são limitados (Nunes *et al.*, 2006; Kalčíková; Zagorc-Končan; Žgajnar Gotvajn, 2012; Libralato, 2014; Libralato *et al.*, 2016; Ntungwen *et al.*, 2020; Albarano *et al.*, 2022).

A notável resposta rápida proporcionada pelo curto ciclo de vida de *Artemia salina* merece destaque. Os efeitos tóxicos podem ser observados em um curto período após a exposição (24 a 72 horas) às substâncias em análise, acelerando a obtenção de resultados e permitindo a avaliação precoce da toxicidade. Adicionalmente, a simplicidade do cultivo e o curto ciclo de vida do organismo facilitam a reprodutibilidade dos experimentos (Nunes *et al.*,

2006; Kalčíková; Zagorc-Končan; Žgajnar Gotvajn, 2012; Libralato, 2014; Libralato *et al.*, 2016; Ntungwen *et al.*, 2020; Albarano *et al.*, 2022). Ademais, normativas que estabelecem padrões para os bioensaios com *Artemia salina* contribuem significativamente para aumentar a validade e confiabilidade dos resultados obtidos.

Como exemplo, podemos citar a normativa intitulada "ISO/TS 20787:2017 Nanotechnologies - Aquatic toxicity assessment of manufactured nanomaterials in saltwater lakes using *Artemia* sp. Nauplii," desenvolvida pela renomada Organização Internacional de Normalização (ISO), concentrando-se na avaliação da toxicidade aquática de nanomateriais fabricados (NMFs) em ambientes marinhos de água salgada (International Organization for Standardization, 2017).

E a normativa brasileira NBR 16530, datada de setembro de 2021, intitulada "Ecotoxicologia Aquática Avaliação da Toxicidade Aguda utilizando *Artemia* sp. (Crustacea, Brachiopoda)," representa um padrão técnico concebido pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Este documento normativo delinea um protocolo de teste destinado à avaliação da toxicidade aguda de substâncias químicas ou compostos em organismos aquáticos, com ênfase na utilização de espécies do gênero *Artemia* (ABNT, 2021).

CONCLUSÃO

Os desdobramentos deste estudo revelam de maneira inequívoca os impactos substanciais ocasionados pela formulação comercial COLOSSO FC30, que engloba os princípios ativos clorpirifós, cipermetrina e fenthion, nos parâmetros de germinação e nas fases iniciais de desenvolvimento de distintos modelos vegetais. Os experimentos conduzidos evidenciaram respostas diversificadas entre as espécies vegetais, destacando-se, em particular, a inibição do crescimento das raízes e da parte aérea das plântulas.

Adicionalmente, observaram-se efeitos antimitóticos em células meristemáticas e na região F1 de *Allium cepa* expostas à formulação comercial, além da indução de micronúcleos e aberrações cromossômicas em todas as concentrações analisadas. Ressalta-se, ainda, que a formulação comercial demonstrou efeitos tóxicos para o microcrustáceo *Artemia salina*, impactando negativamente sua mobilidade.

A investigação do potencial ecogenotóxico desta formulação destaca-se pela ausência de estudos prévios que tenham abordado essa específica combinação de ingredientes ativos. Os resultados obtidos sugerem impactos adversos sobre organismos terrestres e aquáticos,

suscitando preocupações quanto ao potencial de contaminação ambiental e aos riscos para a biodiversidade.

Essas descobertas ressaltam a importância de avaliações mais abrangentes e detalhadas dos efeitos das formulações comerciais de agrotóxicos, especialmente considerando seu amplo uso na agricultura e na pecuária. Estudos dessa natureza são fundamentais para embasar práticas de manejo de pragas mais seguras e sustentáveis, com vistas à preservação dos ecossistemas e da saúde humana.

REFERÊNCIAS

ABATZOPOULOS, T. J. et al. *Artemia*: basic and applied biology. Springer Science & Business Media, 2013

ABDEL MIGID, H. M.; AZAB, Y. A.; IBRAHIM, W. M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 66, n. 1, p. 57-64, 2007.

ABNT. **NBR 16530**: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda. Método de ensaio com *Artemia* sp. (Crustacea, Brachiopoda). São Paulo, Brazil. 2021.

AGWUNOBI, D. O.; YU, Z.; LIU, J. A retrospective review on ixodid tick resistance against synthetic acaricides: implications and perspectives for future resistance prevention and mitigation. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 173, p. 104776, 2021.

AGUIAR, L. L.; ANDRADE-VIEIRA, L. F.; DE OLIVEIRA DAVID, J. A. Evaluation of the toxic potential of coffee wastewater on seeds, roots and meristematic cells of *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 133, p. 366-372, 2016.

AHMAD, L. et al. Cypermethrin induced anaemia in male rabbits. **Pak Vet J**, v. 29, n. 4, p. 191-195, 2009.

AKHTAR, N. et al. Assessment of chlorpyrifos toxicity on certain organs in rat, *Rattus norvegicus*. **J Environ Biol**, v. 30, n. 6, p. 1047-1053, 2009.

ALBARANO, L. et al. Genotoxicity in *Artemia* spp.: an old model with new sensitive endpoints. **Aquatic Toxicology**, p. 106320, 2022.

ALBERTINI, R. J. et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 463, n. 2, p. 111-172, 2000.

ALYURUK, H.; DEMIR, G. K.; CAVAS, L. A video tracking based improvement of acute toxicity test on *Artemia salina*. **Marine and freshwater behaviour and physiology**, v. 46, n. 4, p. 251-266, 2013.

AMAÇ, E.; LIMAN, R. Cytotoxic and genotoxic effects of clopyralid herbicide on *Allium cepa* roots. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 35, p. 48450-48458, 2021.

AMAT, F. Biology of Artemia. **Informes Técnicos del Instituto de Investigaciones Pesqueras**, 1985.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM E1963-22 Standard Guide for Conducting Terrestrial Plant Toxicity Tests**, 2022.

ANACLETO, L. R.; ROBERTO, M. M.; MARIN-MORALES, M. A.. Toxicological effects of the waste of the sugarcane industry, used as agricultural fertilizer, on the test system *Allium cepa*. **Chemosphere**, v. 173, p. 31-42, 2017.

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; SILVEIRA, G. L. Cyto (geno) toxic endpoints assessed via cell cycle bioassays in plant models. In: ÇELIK, Tulay. **Cytotoxicity**. London: Intech Open, p. 117-129, 2018.

ANDRADE-VIEIRA, L. F. et al. Spent Pot Liner (SPL) induced DNA damage and nuclear alterations in root tip cells of *Allium cepa* as a consequence of programmed cell death. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 74, n. 4, p. 882-888, 2011.

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides and inorganic oxides present in spent pot Liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 4, p. 626-631, 2010.

ANDRADE, L. F.; CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C. Cytogenetic alterations induced by SPL (spent potliners) in meristematic cells of plant bioassays. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 71, n. 3, p. 706-710, 2008.

ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária). **Publicada reclassificação toxicológica de agrotóxicos**, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/publicada-reclassificacao-toxicologica-de-agrotoxicos> Acesso em: 11 de ago. 2023.

APPAH, S, et al. Analysis of potential impactation and phytotoxicity of surfactant-plant surface interaction in pesticide application. *Crop protection*, v. 127, p. 104961, 2020.

ARAGÃO, F. B. et al. Toxicogenetic of tebuconazole based fungicide *through Lactuca sativa* bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 213, p. 111985, 2021.

ASITA, A. O.; MAKHALEMELE, R. E. Genotoxicity of Chlorpyrifos, Alpha-thrin, Efeito virikop and Springbok to onion root tip cells. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 23, 2008.

ASLANTÜRK, Ö. S. Cytotoxic and genotoxic effects of triphenyl phosphate on root tip cells of *Allium cepa* L. **Toxicology in Vitro**, v. 94, p. 105734, 2024.

BARBOSA, L. C. A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente** – Viçosa: UFV, 2004. 215 p.

BRAMMER, S. P.; ZANOTTO, M.; CAVERZAN, A. **Citogenética vegetal: da era clássica à molecular**. Embrapa Trigo. Documentos Online, 2007

BRASIL. **LEI Nº 7.802**, de 11 de Julho de 1989, 1989. Disponível em: [https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/prop_mostrarintegra?codteor=356265#:~:text=R regulamenta%20a%20Lei%20n%C2%BA%207.802,e%20embalagens%2C%20o%20registro%2C%20a%20Acesso%20em%2024%20de%20dez%202022](https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/prop_mostrarintegra?codteor=356265#:~:text=R%20regulamenta%20a%20Lei%20n%C2%BA%207.802,e%20embalagens%2C%20o%20registro%2C%20a%20Acesso%20em%2024%20de%20dez%202022). Acesso em: 24 de dez. 2022.

BASS, H.; BIRCHLER, J. A. **Plant cytogenetics: genome structure and chromosome function**. Springer Science & Business Media, 2011.

BASKARAN, L. et al. Phytotoxic effect to cockscomb (*Celosia cristata* L.) with response of chlorpyrifos treatments. **Journal of Applied and Advanced Research**, v. 1, n. 1, p. 40-45, 2016.

BASKIN, C. C.; BASKIN, J. M. **Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination**. Academic Press, 1998.

BAUDROT, V. et al. Trophic transfer of pesticides: The fine line between predator–prey regulation and pesticide–pest regulation. **Journal of Applied Ecology**, v. 57, n. 4, p. 806-818, 2020.

BAWEJA, P.; KUMAR, S.; KUMAR, G. **Fertilizers and pesticides: Their impact on soil health and environment**. Soil health, p. 265-285, 2020.

BEHRENS, R. **Quantitative determination of triazine herbicides in soils by bioassay**. Single Pesticide Volume: The Triazine Herbicides, p. 355-369, 1970.

BEWLEY, J. D. et al. **Seeds: physiology of development, germination and dormancy**. Springer Science & Business Media, 2012.

BRAGANÇA, I. et al. Phytotoxicity of pyrethroid pesticides and its metabolite towards *Cucumis sativus*. **Science of the Total Environment**, v. 619, p. 685-691, 2018.

BROWNE, R. A. et al. **Artemia biology**. CRC press, 2018.

BURGA, K.; VISITACIÓN, L.; CHIRE, T. Evaluación ecotoxicológica de pesticidas organofosforados sobre *Daphnia magna*. In: **Anales Científicos**. p. 11-18, 2009.

ÇAVUŞOĞLU, K. et al. Effects of cypermethrin on *Allium cepa*. **Environmental toxicology**, v. 27, n. 10, p. 583-589, 2012.

CARRASCO-LETELIER, L.; MENDOZA-SPINA, Y.; BRANCHICCELA, M. B. Acute contact toxicity test of insecticides (Cipermetrina 25, Lorsban 48E, Thionex 35) on honeybees in the southwestern zone of Uruguay. **Chemosphere**, v. 88, n. 4, p. 439-444, 2012.

CARNEIRO, F. F. et al. **Dossiê ABRASCO**: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. 2015. Disponível em: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-757007> Acesso em: 10 jan. 2023.

CORTÉS-ESLAVA, J. et al. The effects of organophosphorus insecticides and heavy metals on DNA damage and programmed cell death in two plant models. **Environmental pollution**, v. 240, p. 77-86, 2018.

COSKUN, Y. et al. The effects of the insecticide pyriproxyfen on germination, development and growth responses of maize seedlings. **Fresenius Environ. Bull**, v. 24, p. 278-284, 2015.

DAS, B. K.; MUKHERJEE, S. C. Toxicity of cypermethrin in *Labeo rohita* fingerlings: biochemical, enzymatic and haematological consequences. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 134, n. 1, p. 109-121, 2003.

DA SILVA, L. M. et al. Ibuprofeno induz toxicidade e mutagenicidade em diferentes organismos modelo expostos a concentrações ambientalmente relevantes e não relevante. **Saúde e meio ambiente: revista interdisciplinar**, v. 12, p. 245-258, 2023a.

DA SILVA, L. M.; DA SILVA, F. J. Toxic Effects Promoted by a Commercial Detergent on the Germination and Initial Development of Cucumber Seedlings (*Cucumis sativus* L.). **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 18, n. 2, p. 3-9, 2023.

DAMALAS, C. A.; ELEFTHEROHORINOS, I. G. Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators. **International journal of environmental research and public health**, v. 8, n. 5, p. 1402-1419, 2011.

DE, A. et al. **Targeted delivery of pesticides using biodegradable polymeric nanoparticles**. New Delhi: Springer India, 2014.

DE OLIVEIRA POLETTO, P. et al. Análise da mutagenicidade do extrato hidrossolúvel de *Derris rariflora* (mart. ex benth. jf macbr: fabaceae), timbó amazônico, através do teste micronúcleo em *Allium cepa*. **Revista Pesquisa & Criação**, v. 10, n. 1, p. 163-176, 2011.

DISNER, G. R. Métodos alternativos à experimentação animal: aspectos éticos, históricos e legais no Brasil. **Evidência**, v. 19, n. 2, p. 259-274, 2019

DOS REIS, G. B. et al. Reliability of plant root comet assay in comparison with human leukocyte comet assay for assessment environmental genotoxic agents. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 142, p. 110-116, 2017.

DORNELES, A. L.; DE SOUZA ROSA, A.; BLOCHTEIN, B. Toxicity of organophosphorus pesticides to the stingless bees *Scaptotrigona bipunctata* and *Tetragonisca fiebrigi*. **Apidologie**, v. 48, p. 612-620, 2017.

DURAN, R. E.; KILIC, S.; COSKUN, Y. Response of maize (*Zea mays* L. *saccharata* Sturt) to different concentration treatments of deltamethrin. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 124, p. 15-20, 2015.

DZEMO, W. D.; THEKISOE, O.; VUDRIKO, P. Development of acaricide resistance in tick populations of cattle: A systematic review and meta-analysis. **Heliyon**, 2022.

ECHEVERRI-JARAMILLO, G. et al. Acute toxicity of chlorpyrifos and its metabolite 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol alone and in combination using a battery of bioassays. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, p. 32770-32778, 2020.

EL-GHAMERY, A. A.; EL-KHOLY, M. A.; ABOU EL-YOUSER, M. A. Evaluation of cytological effects of Zn²⁺ in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 537, n. 1, p. 29-41, 2003.

ENNEVER, F. K.; ANDREANO, G.; ROSENKRANZ, H. S. The ability of plant genotoxicity assays to predict carcinogenicity. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 205, n. 1-4, p. 99-105, 1988.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Ecological Effects Test Guidelines OCSPP 850.4100**: Seedling Emergence and Seedling Growth. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, 2012a.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Ecological Effects Test Guidelines OCSPP 850.4230**: Early Seedling Growth Toxicity Test. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, 2012b.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Ecological Effects Test Guidelines OCSPP 850.4800**: Plant Uptake and Translocation Test, Office of Chemical Safety and Pollution Prevention, 2012c.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Ecological Effects Test Guidelines OPPTS 850.4200**: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test Public Draft. Prevention, Pesticides and Toxic Substances, 1996.

FARDER-GOMES, C. F. et al. Acute exposure to fipronil induces oxidative stress, apoptosis and impairs epithelial homeostasis in the midgut of the stingless bee *Partamona helleri* Friese (Hymenoptera: Apidae). **Science of the Total Environment**, v. 774, p. 145679, 2021.

FATMA, F. et al. Phytotoxicity of pesticides mancozeb and chlorpyrifos: correlation with the antioxidative defence system in *Allium cepa*. *Physiology and molecular biology of plants*, v. 24, p. 115-123, 2018.

FELISBINO, K. et al. Exposure to pesticides during pregnancy and the risk of neural tube defects: A systematic review. **Science of The Total Environment**, p. 169317, 2023.

FERNÁNDEZ-NAVEIRA, A. et al. Atrazine induced changes in elemental and biochemical composition and nitrate reductase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. **European Journal of Phycology**, v. 51, n. 3, p. 338-345, 2016.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pesticide Biochemistry and physiology*, v. 88, n. 3, p. 252-259, 2007.

FISPQ. **COLOSSO FC30**. Ouro Fino Agronegócio, 2017. Disponível em: <https://www.ourofinosaudeanimal.com/produtos/downloads/1064/> Acesso em 23 nov. 2023.

FLOOD, S.; BURKHOLDER, J.; COPE, G.. Assessment of atrazine toxicity to the estuarine phytoplankter, *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta), under varying nutrient conditions. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 12, p. 11409-11423, 2018.

FOONG, S.Y. et al. A recent global review of hazardous chlorpyrifos pesticide in fruit and vegetables: Prevalence, remediation and actions needed. **Journal of hazardous materials**, v. 400, p. 123006, 2020.

GALLEGOS, C. E. et al. Perinatal glyphosate-based herbicide exposure in rats alters brain antioxidant status, glutamate and acetylcholine metabolism and affects recognition memory. **Neurotoxicity Research**, v. 34, p. 363-374, 2018.

GALON, L. et al. Mobility and environmental monitoring of pesticides in the atmosphere—a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 25, p. 32236-32255, 2021.

GOLDONI, A. et al. DNA damage in Wistar rats exposed to organophosphate pesticide fenthion. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 36, n. 4, 2017.

GHOSH, P.; THAKUR, I. S.; KAUSHIK, A. Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 141, p. 259-270, 2017.

GRANELLA, V. et al. Resíduos de agrotóxicos em leites pasteurizados orgânicos e convencionais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 4, p. 1731–1740, 2013.

GRANT, W. F. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations—a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. **Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 107-112, 1999.

GRANT, W. F.; SALAMONE, M. F. Comparative mutagenicity of chemicals selected for test in the International Program on Chemical Safety's collaborative study on plant systems for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 310, n. 2, p. 187-209, 1994.

GRANT, W. F.; ZINOV'EVA-STACHEVITCH, A. E.; ZURA, K. D. **Plant genetic test systems for the detection of chemical mutagens**. In: Short-term tests for chemical carcinogens. New York, NY: Springer New York, p. 200-216, 1981.

GREENE, J. C. et al. **Protocols for short-term toxicity screening of hazardous-waste sites**. Environmental Protection Agency, Corvallis, OR (USA). Environmental Research Lab., 1988.

GRESSEL, J. B.; HOLM, L. G. Chemical inhibition of crop germination by weed seeds and the nature of inhibition by *Abutilon theophrasti*. **Weed research**, v. 4, n. 1, p. 44-53, 1964.

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos: mutações, reprodução e câncer**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 2005.

GUERRA, M. **Introdução a citogenética geral**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 1988.

GUNSTONE, T. et al. Pesticides and soil invertebrates: A hazard assessment. **Frontiers in Environmental Science**, v. 9, p. 122, 2021.

HEIDMANN, M. J. et al. Eficácia acaricida da associação de Cipermetrina, Fenthion e Clorpirifós em bovinos naturalmente infestados por *Rhipicephalus microplus* na Amazônia Matogrossense. **Veterinária e Zootecnia**, v. 23, n. 4, p. 713-721, 2016.

HENAO, B.; PALACIO, J. A.; CAMARGO, M.. Evaluación genotóxica de los plaguicidas Cipermetrina y Diazinón en Tilapia Roja (*Oreochromis* sp.). **Actualidades Biológicas**, v. 27, n. 82, p. 43-55, 2005.

HENRY, R. S.; JOHNSON, W. G.; WISE, K. A. The impact of a fungicide and an insecticide on soybean growth, yield, and profitability. **Crop Protection**, v. 30, n. 12, p. 1629-1634, 2011.

HERNANDES, Thais et al. Manejo Sanitário do rebanho leiteiro e resíduos de inseticidas Piretróides em leite de vaca produzido no município de Chapada dos Guimarães, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 2, p. 171-176, 2009.

HOROWITZ, M. Application of bioassay techniques to herbicide investigations. **Weed Research**, v. 16, n. 4, p. 209-215, 1976.

HOSHINA, M. M. **Avaliação da possível contaminação das águas do Ribeirão Claro município de Rio Claro, pertencente à bacia do rio Corumbataí, por meio de testes de mutagenicidade em *Allium cepa***, Trabalho de conclusão (Bacharel e Licenciatura -Ciências Biológicas), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2002, 52 p.

HSIAO, A. I.; SMITH, A. E. A root bioassay procedure for the determination of chlorsulfuron, diclofop acid and sethoxydim residues in soils. **Weed Research**, v. 23, n. 4, p. 231-236, 1983.

HURLE, K. et al. **Biotests for the detection of herbicides in the soil**. In: Crop protection agents-their biological evaluation. Proceedings of the international conference on the evaluation of biological activity, held at Wageningen, The Netherlands, Academic Press, p. 285-306, 1977.

IANNACONE, J. et al. Cuatro ensayos ecotoxicológicos para evaluar lindano y clorpirifos. **Gayana (Concepción)**, v. 64, n. 2, p. 139-146, 2000.

IQBAL, M. et al. Bioassays based on higher plants as excellent dosimeters for ecotoxicity monitoring: a review. **Chemistry International**, v. 5, n. 1, p. 1-80, 2019.

IQBAL, M. *Vicia faba* bioassay for environmental toxicity monitoring: a review. **Chemosphere**, v. 144, p. 785-802, 2016.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO/TS 20787:2017 Nanotechnologies**: Aquatic toxicity assessment of manufactured nanomaterials in saltwater lakes using *Artemia* sp. Nauplii, 2017.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 18763:2016 Soil quality**: Determination of the toxic effects of pollutants on germination and early growth of higher plants, 2016.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 29200:2013(en) Soil quality**: Assessment of genotoxic effects on higher plants - *Vicia faba* micronucleus test, 2013.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 11269-1:2012 Soil quality**: Determination of the effects of pollutants on soil flora. Part 1: Method for the measurement of inhibition of root growth, 2012a.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 11269-2:2012 Soil quality**: Determination of the effects of pollutants on soil flora. Part 2: Effects of contaminated soil on the emergence and early growth of higher plants, 2012b.

JAENSSON, A. et al. Effects of a pyrethroid pesticide on endocrine responses to female odours and reproductive behaviour in male parr of brown trout (*Salmo trutta* L.). **Aquatic Toxicology**, v. 81, n. 1, p. 1–9, 2007

JORDAN, M. A.; WILSON, L. The use and action of drugs in analyzing mitosis. **Methods in cell biology**, v. 61, p. 267-295, 1998.

KALČÍKOVÁ, G.; ZAGORC-KONČAN, J.; ŽGAJNAR GOTVAJN, A. *Artemia salina* acute immobilization test: a possible tool for aquatic ecotoxicity assessment. **Water Science and Technology**, v. 66, n. 4, p. 903-908, 2012.

KALYABINA, V. P. et al. Pesticides: formulants, distribution pathways and effects on human health—a review. **Toxicology reports**, v. 8, p. 1179-1192, 2021.

KAMEL, F.; HOPPIN, J. A. Association of pesticide exposure with neurologic dysfunction and disease. **Environmental health perspectives**, v. 112, n. 9, p. 950-958, 2004.

KANTER, A.; CELIK, I. Acute effects of fenthion on certain oxidative stress biomarkers in various tissues of frogs (*Rana ridibunda*). **Toxicology and Industrial Health**, v. 28, n. 4, p. 369-376, 2012.

KARUNARATHNE, A. et al. How many premature deaths from pesticide suicide have occurred since the agricultural Green Revolution? **Clinical toxicology**, v. 58, n. 4, p. 227-232, 2020.

KASAIJA, P. D. et al. Cattle ticks and tick-borne diseases: a review of Uganda's situation. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 12, n. 5, p. 101756, 2021.

KEREM, M. et al. Effects of acute fenthion toxicity on liver and kidney function and histology in rats. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 37, n. 5, p. 281-288, 2007.

KERSTER, H. W.; SCHAEFFER, D. J. Brine shrimp (*Artemia salina*) nauplii as a teratogen test system. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 7, n. 3, p. 342-349, 1983.

KHABIB, M. N. H. et al. Alternative animal models in predictive toxicology. **Toxicology**, v. 465, p. 153053, 2022.

KHALIL, A. M. Toxicological effects and oxidative stress responses in freshwater snail, *Lanistes carinatus*, following exposure to chlorpyrifos. **Ecotoxicology and Environmental safety**, v. 116, p. 137-142, 2015.

KLANČNIK, K. et al. Use of a modified *Allium* test with nanoTiO₂. **Ecotoxicology and environmental safety**, New York, v. 74, n. 1, p. 85-92, 2011.

KONWICK, B. J. et al. Bioaccumulation, biotransformation, and metabolite formation of fipronil and chiral legacy pesticides in rainbow trout. **Environmental science & technology**, v. 40, n. 9, p. 2930-2936, 2006.

KORADE, D. L. et al. Effect of organic contaminants on seed germination of *Lolium multiflorum* in soil. *Biol Med*, v. 1, n. 1, p. 28-34, 2009.

KRISHNASWAMY, V. G. et al. Effect of chlorpyrifos on the earthworm *Eudrilus euginae* and their gut microbiome by toxicological and metagenomic analysis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 1-12, 2021.

KUMAR, M. et al. Biodiversity of pesticides degrading microbial communities and their environmental impact. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 31, p. 101883, 2021.

KUMAR, V. et al. Toxicity analysis of endocrine disrupting pesticides on non-target organisms: A critical analysis on toxicity mechanisms. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 474, p. 116623, 2023.

KUMAR, V. et al. Evaluation of cytotoxicity and genotoxicity effects of refractory pollutants of untreated and biomethanated distillery effluent using *Allium cepa*. **Environmental Pollution**, v. 300, p. 118975, 2022.

KUMARI, M. et al. Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa*. **Journal of hazardous materials**, v. 190, n. 1-3, p. 613-621, 2011.

LAWS JR, Edward R. **Classes of pesticides**. Elsevier, 2013.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation research/reviews in mutation research**, v. 682, n. 1, p. 71-81, 2009.

- LEME, D. M.; DE ANGELIS, D. D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. **Aquatic Toxicology**, v. 88, n. 4, p. 214-219, 2008.
- LESSA, L. R.; SILVA, M. C. C.; CARIELLO, F. DE M. R. Fundamentos e aplicações do *Allium cepa* L. como bioindicador de mutagenicidade e citotoxicidade de plantas medicinais. **Revinter**, v. 10, n. 3, p. 39-48, 2017.
- LESTARI, M. W. et al. The capability of brine shrimp test as a teratogenicity screening system. **Asian J Pharm Clin Res**, v. 10, n. 3, p. 454-7, 2017.
- LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. **Hereditas**, v. 24, n. 4, p. 471-486, 1938.
- LI, X. et al. Phytotoxicity response of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) seedlings to herbicide fomesafen in soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 239, p. 113628, 2022.
- LIBRALATO, G. et al. A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. **Ecological Indicators**, v. 69, p. 35-49, 2016.
- LIBRALATO, G. The case of *Artemia* spp. in nanoecotoxicology. **Marine environmental research**, v. 101, p. 38-43, 2014.
- LIU, T. F. et al. Single and joint toxicity of cypermethrin and copper on Chinese cabbage (Pakchoi) seeds. **Journal of Hazardous Materials**, v. 163, n. 1, p. 344-348, 2009.
- LUNARDI, J. S.; ZALUSKI, R.; ORSI, R. O. Evaluation of motor changes and toxicity of insecticides fipronil and imidacloprid in Africanized honey bees (Hymenoptera: Apidae). **Sociobiology**, p. 50-56, 2017.
- MA, T.-H. The international program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China. **Mutation Research/fundamental And Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 103-106, 1999.
- MA, T.-H.; GRANT, W. F.; DE SERRES, F. J. The genotoxicity monitoring of air, water and soil-A preliminary report of the International Programme on Plant Bioassays (IPPB). **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 379, n. S1, p. S99-S99, 1997.
- MANSOUR, S. A.; MOSSA, A. T. H. Adverse effects of exposure to low doses of chlorpyrifos in lactating rats. **Toxicology and industrial health**, v. 27, n. 3, p. 213-224, 2011.
- MARCUSSI, S. et al. Plant cytogenetics tests can predict toxic effects on human cells: genotoxic and mutagenic effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom on vegetal and human cells. **Ciência e Natura**, v. 45, p. e19-e19, 2023.
- MARTIN, J. W. et al. **An updated classification of the recent Crustacea**. Los Angeles: Natural History Museum of Los Angeles County, 2001.

- MATOBA, H. et al. Chromosomal study of lettuce and its allied species (*Lactuca* spp., Asteraceae) by means of karyotype analysis and fluorescence in situ hybridization. **Hereditas**, v. 144, n. 6, p. 235-243, 2007.
- MAURO, M. O. et al. Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of the fructooligosaccharide inulin in the meristematic cells of *Allium cepa* culture. **Genetics and Molecular Research**, p. 4808-4819, 2014.
- MCNAUGHTON, S. J. Autotoxic feedback in relation to germination and seedling growth in *Typha latifolia*. **Ecology**, v. 49, n. 2, p. 367-369, 1968.
- MENDES, C. R. A. et al. Agrotóxicos: principais classificações utilizadas na agricultura brasileira-uma revisão de literatura. **Revista Maestria**, n. 17, p. 95-107, 2019.
- MEHTA, G. et al. Cytotoxic response of endosulfan and chlorpyrifos pesticides in poultry lymphocyte culture. **Toxicology International**, v. 15, n. 2, p. 97, 2008.
- MERCADO, S. A. S.; BAYONA, H. A. M. Evaluation of cytotoxic potential of chlorpyrifos using *Lens culinaris* Med as efficient bioindicator. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 183, p. 109528, 2019.
- MEYER, B. N. et al. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 5, p. 31-34, 1982.
- MIRANDA, L. A. et al. Phytotoxicity and cytogenotoxicity of pesticide mixtures: analysis of the effects of environmentally relevant concentrations on the aquatic environment. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-15, 2023.
- MONTANHA, F. P. et al. Clinical, biochemical and haemathological effects in *Rhamdia quelen* exposed to cypermethrin. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, p. 697-704, 2014.
- MONTANHA, F. P. et al. Pyrethroid toxicity in silver catfish, *Rhamdia quelen*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, p. 1297-1303, 2012.
- MORAES, R.M. et al. Effects of copper on physiological and cytological aspects in *Lactuca sativa* L. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 13, n. 2, p. 115-121, 2015.
- MOREIRA, J. C. et al. Contaminação de águas superficiais e de chuva por agrotóxicos em uma região do estado do Mato Grosso. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 6, p. 1557-1568, 2012.
- MOURA, J. A. S; SOUZA-SANTOS, L. P. Environmental risk assessment (ERA) of pyriproxyfen in non-target aquatic organisms. **Aquatic Toxicology**, v. 222, p. 105448, 2020.
- MURALIDHARAN, L. Chronic toxicity studies on proximate composition of *Cyprinus carpio* exposed to fenthion. **International Journal of Fisheries and Aquatic Studies**, v. 1, n. 5, p. 221, 2014.

- NASON, M. A.; FARRAR, J.; BARTLETT, D. Strobilurin fungicides induce changes in photosynthetic gas exchange that do not improve water use efficiency of plants grown under conditions of water stress. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 63, n. 12, p. 1191-1200, 2007.
- NAVARRO, O. E. et al. Cypermethrin induced alterations on seminiferous tubules of *Dugesia gonocephala*, macroinvertebrate from the chilean altiplano. **Interciencia**, v. 41, n. 1, p. 29-33, 2016.
- NISHIO, T. et al. Simultaneous determination of fenthion and its metabolites in a case of fenthion self-poisoning. **Legal Medicine**, v. 65, p. 102323, 2023.
- NTUNGWE N, E. et al. *Artemia* species: An Important Tool to Screen General Toxicity Samples. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 24, p. 2892–2908, 2020.
- NUNES, M. E. M et al. Oxidative effects of the acute exposure to a pesticide mixture of cypermethrin and chlorpyrifos on carp and zebrafish—a comparative study. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 206, p. 48-53, 2018.
- NUNES, B. S. et al. Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. **Environmental pollution**, v. 144, n. 2, p. 453-462, 2006.
- NWANI, C. D. et al. Genotoxicity assessment and oxidative stress responses in freshwater African catfish *Clarias gariepinus* exposed to fenthion formulations. **Drug and chemical toxicology**, v. 40, n. 3, p. 273-280, 2017.
- OBIDOLA, S. M. et al. Phytotoxicity of cypermethrin pesticide on seed germination, growth and yield parameters of cowpea (*Vigna unguiculata*). **Asian Journal of Agricultural and Horticultural Research**, v. 3, n. 2, p. 1-10, 2019.
- OECD. **Test No. 208**: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, p. 1-21, 2006a.
- OECD, **Test No. 227**: Terrestrial Plant Test: Vegetative Vigour Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, p. 1-21, 2006b.
- OJEZELE, M. O. et al. Toxicological effects of chloropyrifos and methidathion in young chickens. **African journal of biochemistry Research**, v. 3, n. 3, p. 048-051, 2009.
- ONUMINYA, T. O.; EZE, T. E. Cytogenotoxic effects of cypermethrin on root growth: *Allium sativum* as a model system. **Asia-Pac J Mol Biol Biotechnol**, v. 27, n. 4, p. 54-61, 2019.
- OURO FINO SAÚDE ANIMAL. **Colosso FC30**: Formulação pioneira de Fenthion, Cipermetrina e 30% de Clorpirifós. Ectoparasiticidas, 2023. Disponível em: <https://www.ourofinosaudeanimal.com/produtos/bovinos/ectoparasiticidas/colosso-fc30/> Acesso em: 12 jan. 2024.

- PALMIERI, M. J. et al. Cytogenotoxic effects of spent pot liner (SPL) and its main components on human leukocytes and meristematic cells of *Allium cepa*. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 227, p. 1-10, 2016.
- PATHIRATNE, A. Toxicity of Fenthion in Lebaycid® to Tilapia, *Oreochromis mossambicus* (Peteres): effects on survival, growth and brain **Acetylcholinesterase activity**. Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka, v. 27, n. 2, 1999.
- PAUMGARTTEN, F. JR. Pesticides and public health in Brazil. **Current opinion in toxicology**, v. 22, p. 7-11, 2020.
- PEREIRA, N. C.; DINIZ, T. O.; RUVOLO-TAKASUSUKI, M. C. C. Toxicity and genetic analysis of *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836 contaminated with the pyrethroid cypermethrin. **Scientific Electronic Archives**, v. 14, n. 1, p. 59-66, 2021.
- PERES, F.; MOREIRA, J. C.; DUBOIS, G. S. **Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. É veneno ou é remédio**, p. 21-41, 2003.
- PETIT, A. N. et al. Photosynthesis limitations of grapevine after treatment with the fungicide fludioxonil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 15, p. 6761-6767, 2008.
- PELOSI, C. et al. Pesticides and earthworms. A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 34, p. 199-228, 2014.
- PORCELLA, D. B. **Protocol for bioassessment of hazardous waste sites**. Final report. Tetra Tech, Inc., Lafayette, CA (USA), 1983.
- QIU, J. et al. In vivo monitoring and exposure potency assessment of phase I metabolism of fenthion in vegetables. **Journal of Hazardous Materials**, v. 399, p. 123013, 2020.
- RATSCH, H. C. **Interlaboratory root elongation testing of toxic substances on selected plant species**. NTIS, PB, v. 83226, 1983.
- RAVEN, P.H., EVERT, R.F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**, 8ª ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 2014
- RIBEIRO, V. H. V. et al. Sensitivity of the macrophytes *Pistia stratiotes* and *Eichhornia crassipes* to hexazinone and dissipation of this pesticide in aquatic ecosystems. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 168, p. 177-183, 2019.
- RIBEIRO, L. R. et al. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. **Mutagênese ambiental**, p. 173-200, 2003.
- RIO, A. del et al. Effects of the pesticide Furadan on traits associated with reproduction in wild potato species. **American Journal of Plant Sciences**, 2012.
- RODRIGUES, F. P. et al. Genotoxic evaluation of an industrial effluent from an oil refinery using plant and animal bioassays. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, p. 169-175, 2010.

RUPPERT, E. E.; BARNES, R. D. **Invertebrate zoology**. Fort Worth: Saunders College Publishing, 1994.

SAI, L. et al. Effects of chlorpyrifos on reproductive toxicology of male rats. **Environmental toxicology**, v. 29, n. 9, p. 1083-1088, 2014.

SALVIO, C. et al. Toxicidad subletal de clorpirifos sobre *Octolasion cyaneum* (Annelida: Oligochaeta, Lumbricidae). **Agriscientia**, v. 32, n. 2, p. 131-138, 2015.

SÁNCHEZ-BAYO, F. Indirect effect of pesticides on insects and other arthropods. **Toxics**, v. 9, n. 8, p. 177, 2021.

SÁNCHEZ-SANTED, F.; COLOMINA, M. T.; HERNÁNDEZ, E. H. Organophosphate pesticide exposure and neurodegeneration. **Cortex**, v. 74, p. 417-426, 2016.

SANTHOSHKUMAR, M. et al. Chlorpyrifos toxicity in green gram (*Vigna radiata* L.). **Journal of Environmental Treatment Techniques**, v. 3, n. 1, p. 25-27, 2015.

SANTOS, K. R. et al. Toxicogenetic, biochemical, and anatomical effects of the herbicide Clethodim on *Allium cepa* L. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-10, 2023.

SAXENA, P. N.; CHAUHAN, L. K. S.; GUPTA, S. K. Cytogenetic effects of commercial formulation of cypermethrin in root meristem cells of *Allium sativum*: spectroscopic basis of chromosome damage. **Toxicology**, v. 216, n. 2-3, p. 244-252, 2005.

SCHUIJT, L. M. et al. (Eco) toxicological tests for assessing impacts of chemical stress to aquatic ecosystems: facts, challenges, and future. **Science of the total environment**, v. 795, p. 148776, 2021.

SHARMA, A. et al. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. **SN Applied Sciences**, v. 1, p. 1-16, 2019.

SHARMA, A.; JHA, P.; REDDY, G. VP. Multidimensional relationships of herbicides with insect-crop food webs. **Science of the total environment**, v. 643, p. 1522-1532, 2018.

SHAKIR, S. K. et al. Effect of some commonly used pesticides on seed germination, biomass production and photosynthetic pigments in tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Ecotoxicology**, v. 25, p. 329-341, 2016.

SHEIKH, N.; PATOWARY, H.; LASKAR, R. A. Screening of cytotoxic and genotoxic potency of two pesticides (malathion and cypermethrin) on *Allium cepa* L. **Molecular & Cellular Toxicology**, v. 16, p. 291-299, 2020.

SILVA, R. A. et al. Toxicidade de produtos fitossanitários utilizados na cultura do cafeeiro a larvas de *Chrysoperla externa* (Hagen)(Neuroptera: Chrysopidae) e efeitos sobre as fases subsequentes do desenvolvimento do predador. **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 951-959, 2005.

- SILVEIRA, B. D. et al. *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze allelopathic activity on germination and initial growth of *Lactuca sativa* L. **Ciência Florestal**, v. 24, n. 1, p. 79-85, 2014.
- SIMÕES, M. S. et al. Padronização de bioensaios para detecção de compostos alelopáticos e toxicantes ambientais utilizando alface. **Biotemas**, v. 26, n. 3, p. 29-36, 2013.
- SODERLUND, D. M. et al. Mechanisms of pyrethroid neurotoxicity: implications for cumulative risk assesment. **Toxicology**, v. 171, n. 1, p. 3-59, 2002.
- SOMDARE, P. O. et al. Fenthion induced toxicity and histopathological changes in gill tissue of freshwater African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 25, p. 2103-2113, 2015.
- STEJSKALOVÁ, M.; KONRADYOVÁ, V.; KAZDA, J. The influence of pesticides repellency used in oilseed rape (*Brassica napus* subsp. *napus*) on the preference by bees (*Apis mellifera* L.). **Journal of Apicultural Research**, v. 60, n. 2, p. 270-276, 2021.
- SUMNER, A. T. **Chromossomes organization and function**. North Berwick, Reino Unido: Blackwell, p.287, 2003.
- TAIZ, L. et al. **Fisiologia e desenvolvimento vegetal**. Artmed Editora, 2017.
- THOMAS, J. M.; CLINE, J. F. Modification of the Neubauer technique to assess toxicity of hazardous chemicals in soils. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 4, n. 2, p. 201-207, 1985.
- TONGO, I. et al. Levels, bioaccumulation and biomagnification of pesticide residues in a tropical freshwater food web. **International Journal of Environmental Science and Technology**, p. 1-16, 2022.
- TRIANA VELÁSQUEZ, T. M et al. Toxicidad aguda del insecticida cipermetrina (Cypermon® 20 EC) en cuatro especies de anuros colombianos. **Acta biológica colombiana**, v. 22, n. 3, p. 340-347, 2017.
- TRIASSI, M. et al. Ecological risk and estimates of organophosphate pesticides loads into the Central Mediterranean Sea from Volturno River, the river of the “Land of Fires” area, southern Italy. **Science of The Total Environment**, v. 678, p. 741–754, 2019.
- TUDI, M. et al. Agriculture development, pesticide application and its impact on the environment. **International journal of environmental research and public health**, v. 18, n. 3, p. 1112, 2021.
- TUDI, M. et al. Exposure routes and health risks associated with pesticide application. **Toxics**, v. 10, n. 6, p. 335, 2022.
- TULER, S. M.; BOWEN, J. M. Chronic fenthion toxicity in laying hens. **Veterinary and human toxicology**, v. 41, n. 5, p. 302-307, 1999.

TÜRKOĞLU, Ş. Determination of genotoxic effects of chlorfenvinphos and fenbuconazole in *Allium cepa* root cells by mitotic activity, chromosome aberration, DNA content, and comet assay. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 3, p. 224-230, 2012.

ÜNER, N. et al. N-Acetylcysteine provides dose-dependent protection against fenthion toxicity in the brain of *Cyprinus carpio* L. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 150, n. 1, p. 33-38, 2009.

UTZIG, L. M. et al. Ecotoxicity response of chlorpyrifos in *Aedes aegypti* larvae and *Lactuca sativa* seeds after UV/H₂O₂ and UVC oxidation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, p. 449-456, 2019.

VASSEUR, P.; MASFARAUD, J. F.; BLAISE, C. Ecotoxicology, revisiting its pioneers. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, p. 3852-3857, 2021.

VENKATESWARA RAO, J. et al. Toxicity of organophosphates on morphology and locomotor behavior in brine shrimp, *Artemia salina*. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 53, p. 227-232, 2007.

VERGARA-CHEN, C. et al. Toxicidad en *Xiphophorus maculatus* por cipermetrina. **Revista de Iniciación Científica**, v. 5, p. 35-40, 2019.

WAHYUNI, E. A. et al. The cytotoxicity and genotoxicity of single and combined fenthion and terbufos treatments in human liver cells and zebrafish embryos. **Science of The Total Environment**, v. 758, p. 143597, 2021.

WANG, Q. et al. Phytoremediation of chlorpyrifos in aqueous system by riverine macrophyte, *Acorus calamus*: toxicity and removal rate. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 16241-16248, 2016.

YADAV, M. et al. Utilization of microbial community potential for removal of chlorpyrifos: a review. **Critical reviews in biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 727-742, 2016.

YANG, C.; LIM, W.; SONG, G. Immunotoxicological effects of insecticides in exposed fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 247, p. 109064, 2021.

YEKEEN, T. A.; ADEBOYE, M. K. Cytogenotoxic effects of cypermethrin, deltamethrin, lambda-cyhalothrin and endosulfan pesticides on *Allium cepa* root cells. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 41, 2013.

ZHANG, X. et al. Pesticides in the atmosphere and seawater in a transect study from the Western Pacific to the Southern Ocean: The importance of continental discharges and air-seawater exchange. **Water Research**, v. 217, p. 118439, 2022.

SEGUNDA PARTE**ARTIGO 1 – ECO(GENO)TOXICITY OF AN ACARICIDAL FORMULATION CONTAINING CHLORPYRIFOS, CYPERMETHRIN, AND FENTHION ON DIFFERENT PLANT MODELS AND *Artemia salina* L.**

Artigo formatado de acordo com as normas da revista Environmental Science Pollution
Research

Fator de impacto = 5.4

Title: Eco(genotoxicity of an acaricidal formulation containing chlorpyrifos, cypermethrin, and fenthion on different plant models and *Artemia salina* L.

Authors: Leonardo Mendes da Silva¹, Rafaela Carvalho de Souza¹, Tamara Alesssandra Costa Santos¹, Marcel José Palmieri¹, Larissa Fonseca Andrade Vieira^{1*}

Affiliations:

¹Departament of Ecology, Federal University of Lavras, 37200-000, Lavras, MG, Brazil

***Corresponding authors:** larissa.vieira@ufla.br; ORCID 0000-0002-7947-7498. Ecology and Conservation Department, Federal University of Lavras (UFLA). ZIP 37200-000 Lavras - MG, Brazil. Phone: +55 32 9 8490-0071

Acknowledgments: To the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for granting a Master scholarship; to the Federal University of Lavras (UFLA) that provide the conditions to development the work.

Abstract:

The mixture of pesticides is widely employed in cattle farming to combat ectoparasite resistance, such as ticks. The commercial formulation COLOSSO FC30, which contains three active ingredients (Cypermethrin, Chlorpyrifos, and Fenthion), stands out due to its efficiency. However, animals exposed to this product may become vectors of potentially toxic molecules, possibly causing contamination in aquatic and terrestrial ecosystems. In light of this, this study evaluated the eco(geno)toxic potential of the commercial formulation COLOSSO FC30, plants (*Allium cepa* L., *Lactuca sativa* L., *Raphanus sativus* L., *Pennisetum glaucum* L., and *Triticum aestivum* L.) and *Artemia salina* L. as model organisms. In the phytotoxicity test, the species were ranked in order of sensitivity to the commercial formulation as follows: *P. glaucum* > *L. sativa* > *T. aestivum* > *R. sativus*. The most sensitive parameters were root length (RL) and shoot length (SL) of seedlings. The results of the mean effective concentration (EC₅₀) varied for each species: *L. sativa* (RL = 0.346 mL L⁻¹ and SL = 0.617 mL L⁻¹), *R. sativus* (RL = 0.676 mL L⁻¹ and SL = 3.313 mL L⁻¹), *P. glaucum* (RL = 0.356 mL L⁻¹ and SL = 0.190 mL L⁻¹), *T. aestivum* (RL = 0.687 mL L⁻¹ and SL = 0.217 mL L⁻¹). In the cytogenotoxicity test with *A. cepa*, cell division was decreased at concentrations from 0.351 mL L⁻¹ in the meristematic region and root F1. Chromosomal aberrations and micronucleus were observed at all concentrations. In the test with *A. salina*, the IC₅₀ after 24 hours of exposure was 0.01207 mL L⁻¹ of the commercial formulation. The results highlight the need for further research and regulations to understand and minimize the potential environmental impacts of COLOSSO FC30.

Keywords: Aquatic ecotoxicology. Pesticide mixture. Phytotoxicity Test. Risk analysis. Terrestrial ecotoxicology. Tick control.

Introduction

The global production of beef has experienced a steady increase in recent years, recording an average annual rate of 1.59%, reaching 67.354 million tons in 2018. Projections indicate further growth, ranging between 69 and 89 million tons by 2030 (Pulina et al. 2021). However, this positive scenario is impacted by climate changes over the last five decades, resulting in annual increases in global temperatures. Since the pre-industrial period (1850-1900), there has been an average warming of 1°C, with projections indicating the possibility of exceeding 1.5-2°C by 2081-2100 (Gilbert 2021). This phenomenon has direct impacts on the reproduction and proliferation of ectoparasites, notably ticks (*Rhipicephalus microplus* Canestrini, 1888), posing a significant concern for cattle farming (Gilbert 2021; Puentes and Riet-Correa 2023).

Ticks stand out as one of the major threats to livestock, as they feed on animal protein and consume the blood of hosts, resulting in reduced milk and meat production, as well as delays in the growth and development of animals. At high infestation levels, these ectoparasites can even lead to bovine mortality. The damages caused by ticks are estimated to total approximately 3.2 billion dollars annually in the Brazilian cattle production chain, generating both direct and indirect costs (Grisi et al. 2014). Globally, losses related to tick-borne diseases are estimated to range between US\$ 22 to 30 billion per year (Singh et al. 2022).

The traditional approach for tick control involves the use of pesticides from the acaricide class. However, this method has faced significant challenges due to the increasing resistance of these organisms to the chemicals used (Obaid et al. 2022; Junior et al. 2022; De Rouck et al. 2023). In response to this resistance, commercial formulations containing mixtures of active ingredients have emerged, aiming to overcome this issue. Studies have shown that one of the most widely used acaricidal formulations with greater efficiency in mite control is known as COLOSSO FC30 (Junior et al. 2022). Comprising a mixture of elements from the organophosphorus group (Chlorpyrifos and Fenthion) and pyrethroids (Cypermethrin), this formulation is applied by spraying throughout the cattle herd with the aim of controlling parasites (Ouro Fino Saúde Animal, 2023).

Despite the intrinsic advantages offered by this product, its use is associated with a significant environmental issue. After the acaricide application, animals are not restricted and can move around rural properties, becoming potential carriers of potentially toxic molecules present in their fur. When lying on the ground or accessing lakes and rivers, the product can be disseminated in the environment, especially during rainy periods, significantly increasing the risk of leaching into terrestrial and aquatic ecosystems.

It is crucial to note that the active ingredients of the acaricide COLOSSO FC30 have already been identified in the environment. Studies reveal high concentrations of cypermethrin, ranging from 37.39–367.60 ng L⁻¹ in a river in Fortaleza, Brazil (Duaví et al. 2023). In a study conducted by Zhong et al. 2014, the analysis of atmospheric air and seawater samples contained the presence of chlorpyrifos at concentrations ranging from 0.08 to 0.85 pg L⁻¹ in seawater and from 0.5 to 2 pg m³ in atmospheric air. A survey in the southwestern region of Bahia, Brazil, found fenthion concentrations ranging from 0.308 to 6.916 ng L⁻¹ in sediments (Lima do Rêgo et al. 2021). The compound was also identified in surface waters in China at extremely high concentrations (above 100 ng L⁻¹) (Zhong et al. 2022). These studies established the correlation between the presence of these compounds in the environment and agricultural and livestock activities.

In the current scientific literature, there are no available toxicological studies regarding the commercial formulation COLOSSO FC30, which combines the three active ingredients. Additionally, the product's safety data sheet lacks crucial information, such as ecotoxicity data and the product's persistence in the environment (Ouro Fino Saúde Animal, 2023). In the face of this gap, it becomes imperative to investigate the potential environmental effects of the COLOSSO FC30 formulation.

To assess the impacts on terrestrial ecosystems, seed plants have been used in ecotoxicological tests, representing a viable approach. These tests are recognized for their speed, effectiveness, reproducibility, and low cost (Ghosh et al. 2017; Vieira et al. 2018; Iqbal et al. 2019). International agencies such as the United States Environmental Protection Agency (EPA), the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), and the International Organization for Standardization (ISO) recommend and endorse the use of plant bioassays as a valuable tool in assessing the toxicity of chemicals (OECD 2006; EPA 2012; ISO, 2016). In plant bioassays, critical parameters assessed include germination and the initial development of seedlings (Aragão et al. 2021; Silva and Silva 2023). Furthermore, cytogenotoxic effects on the meristematic region and F1 of the roots of model plants can be evaluated (Palmieri et al. 2016).

As a representative of aquatic ecosystems, the microcrustacean *Artemia salina* L. has stood out as a model organism. The testing method using *A. salina* presents several significant advantages. Firstly, the acquisition of cysts, which are used to generate nauplii employed in tests, is easily performed. Moreover, the speed of results is notable, as these are obtained after an exposure period of only 24 to 48 hours. It is worth noting that this organism is available throughout the year, eliminating the need for prior cultivation (Nunes et al. 2006; Manfra et al. 2012; Libralato et al. 2016). The test is also standardized by both national (NBR 16530) and international (ISO/TS 20787:2017) regulations. Other advantages include the detailed description of the biology and ecology of *A. salina*,

coupled with its considerably small size, facilitating its manipulation and accommodation in appropriate containers (Nunes et al. 2006; Kokkali et al. 2011).

The results obtained through bioassays with terrestrial plants and using the organism *A. salina* provide a preliminary understanding of toxicity, paving the way for further studies and the implementation of strategies to mitigate the effects of chemicals, such as the COLOSSO FC30 formulation. In this context, the present study aims to evaluate the eco(genotoxic) potential of the commercial formulation COLOSSO FC30 on the germination and initial development of seedlings of different plant species (*Lactuca sativa* L., *Pennisetum glaucum* L., *Raphanus sativus* L., and *Triticum aestivum* L.) and its cytogenotoxic effects on the roots of *Allium cepa* L., as well as its impacts on the mobility of *A. salina*.

Materials and Methods

Preparation of Solutions

The commercial formulation COLOSSO FC30 was obtained from an agro-input establishment. It is noteworthy that the composition of the active ingredients, per 100 mL of the commercial product, is as follows: 30 g of chlorpyrifos, 15 g of cypermethrin, and 15 g of fenthion.

In phytotoxicity assays, employing different plant models, 10 different concentrations of the commercial formulation COLOSSO FC30 diluted in distilled water were evaluated. One concentration followed the manufacturer's guidelines (1.25 mL L⁻¹), four concentrations were below recommendations (0.12, 0.21, 0.38, and 0.69 mL L⁻¹), while five concentrations exceeded recommendations (2.25, 4.05, 7.29, 13.12, and 23.61 mL L⁻¹). To achieve concentrations below the manufacturer's recommended dose, a dilution factor of 1.8 was applied, following OECD-208 guidelines (OECD, 2006a). Similarly, higher concentrations were obtained with a multiplication factor of 1.8. Additionally, reference controls were included: a negative control (NC), composed of distilled water, and a positive control (PC), consisting of the herbicide glyphosate Nortox, at a concentration of 5 mL L⁻¹.

In the cytogenotoxicity test, four concentrations of the commercial product (0.195, 0.351, 0.681, and 1.25 mL L⁻¹) were evaluated, which were determined based on the median effective concentration (EC₅₀) obtained for root length in the phytotoxicity assay.

In the lethality assay using *A. salina*, six test solutions were prepared, following a multiplication factor of 3.2 between concentrations, as recommended by OECD-202. Concentrations were established based on a preliminary test, namely 0.000976; 0.003125; 0.01; 0.032; 0.1024 mL L⁻¹ of the commercial formulation. The preparation of solutions involved diluting the commercial product in artificial seawater, obtained by using distilled water and commercial sea salt (35 g L⁻¹).

The concentrations of the commercial formulation of the acaricide COLOSSO FC30 (in mL L⁻¹) that were evaluated in the tests of phytotoxicity, cytogenotoxicity, and acute toxicity with *A. salina*, as well as the individual concentrations of each active ingredient contained in the formulation, are meticulously detailed in Table 1.

Phytotoxicity test with plant models

In this study, seeds from four different plant species were used to conduct the bioassays, aiming to evaluate the phytotoxicity of the commercial formulation of the acaricide COLOSSO FC30. These species included two dicotyledons, *Lactuca sativa* var. Elba (lettuce) and *Raphanus sativus* var. Crimson Gigante (radish) (TopSeed Blueline[®]), along with two monocotyledons, *Triticum aestivum* (wheat) and *Pennisetum glaucum* (millet).

The phytotoxicity test was conducted according to the EPA 600/3-88/029 protocol (EPA, 1988) and ISO 18763:2016 standard (ISO, 2016), with some specific adaptations. For each proposed plant model, the experiment was conducted in a completely randomized design, comprising twelve treatments (two controls + 10 concentrations of the commercial formulation) and six repetitions each. In each repetition, a Petri dish (90 x 80 mm) was used, containing 10 seeds arranged on previously moistened germination paper with 3 mL of the test solution or controls (distilled water and glyphosate). Subsequently, the plates were sealed with plastic film and kept under controlled temperature conditions at 24°C ± 1 and in the absence of light in a germination chamber.

To determine the germination percentage (%G) and calculate the germination speed index (GSI), germination assessments were conducted every 12 hours, totaling an exposure period of 72 hours. The germination percentage was calculated using the following formula:

$$\frac{\text{total germinated seeds}}{\text{total seeds in the treatment}} \times 100 \quad (1)$$

The germination speed index (GSI) was determined according to the formula proposed by Maguire (1962):

$$GSI = \sum (ni / ti) \quad (2)$$

Where:

- ni represents the total number of seeds that germinated in a specific period "i";
- ti is the time elapsed from the beginning of the experiment until period "i".

After an exposure period of 72 hours, the seedlings of each plant model were carefully removed from the Petri dishes, and their fresh mass (FM) was determined using a precision balance. Additionally, the root length (RL) and shoot length (SL) emitted by the seedlings were measured using a digital caliper.

Cytogenotoxicity test with *A. cepa*

Onion seeds (*Allium cepa* var. Red Creole) from the ISLA® brand were acquired from a local commercial establishment and utilized as test material for cytogenetic assays.

Initially, the seeds were arranged in Petri dishes containing germination filter paper soaked in 3 mL of distilled water. These plates were subsequently sealed and stored in a germination chamber at a controlled temperature of 24°C, without exposure to light, over a period of 60 hours. After this time interval, seeds with radicles measuring at least 2 millimeters in length were collected for the definitive test.

The experiment was conducted following a completely randomized design, comprising five treatments (control + four concentrations of the commercial acaricide formulation) with six replicates for each treatment. In each replicate, a Petri dish containing filter paper moistened with 3 mL of the test solutions was used, exposing 10 pre-germinated seeds. Subsequently, the plates were sealed and kept in the germination chamber for 48 hours at a controlled temperature of 24°C and in the absence of light.

After 48 hours of exposure, the radicles from each Petri dish were collected and fixed in Carnoy's fixative solution (alcohol/acetic acid in a ratio of 3:1). The samples were then stored in a refrigerated environment (-4°C) until the time of analysis. Before the actual analysis, the radicles underwent three washes in distilled water, each lasting 5 minutes. Subsequently, the roots were hydrolyzed in 5N HCl for a period of 20 minutes.

Slides were prepared following the protocol described by Guerra and Souza (2002). In each slide, one root was added, and the meristematic region was carefully sectioned with the aid of a stainless steel blade. Next, the F1 region of the radicle was also sectioned onto the slide, discarding the remaining material. A drop of 2% acetic orcein was added to each of the radicle regions on the slide (meristematic and F1 regions), followed by the squashing technique.

Slides were examined under a binocular optical microscope with a magnification of 400x. Six slides were prepared for each treatment, and 2000 cells were evaluated in each, divided into 1000 cells in the meristematic region and 1000 cells in the F1 region of the root. Parameters assessed in the meristematic region included the mitotic index, chromosomal aberrations, and micronucleus. In the F1 region of the radicle, the number of dividing cells and the frequency of cells presenting micronucleus were counted, following the recommendations of Palmieri et al. (2016).

Acute toxicity test with *A. salina*

Cysts of *A. salina* with a high hatching rate (90%) were commercially acquired from FishFood[®] and used as material to obtain nauplii that were employed in the tests.

To obtain these organisms, the cysts were exposed to artificial seawater (35 g L⁻¹ of commercial sea salt + distilled water) for a period of 30 hours, in an environment with a controlled temperature of 24 ± 1°C. After 30 hours, the newly hatched nauplii were collected and exposed to the test substance.

The acute toxicity test was conducted following the NBR 16530 standard (ABNT, 2021). The experiment was carried out in a completely randomized design, with 6 treatments (5 concentrations of the commercial formulation COLOSSO FC30 + negative control (NC), consisting of artificial seawater) and four repetitions for each treatment. In each repetition, a plastic container was used, into which 10 mL of the test substance and 10 newly hatched nauplii were added. The containers were sealed and stored in an environment with a controlled temperature of 24 ± 1°C, in the absence of light, for a period of 24 hours. After this period, the containers were evaluated using a stereomicroscope, counting the number of immobile organisms. Organisms were considered immobile if they remained without swimming movements for 20 seconds.

Ecotoxicity Data

From the results of the acute toxicity test with *A. salina*, it was possible to determine the median inhibitory concentration (IC₅₀), which represents the concentration responsible for immobilizing 50% of the organisms.

Similarly, from the data collected in the tests with different plant models, the median effective concentration (EC₅₀) was calculated for the evaluated parameters (%G, GSI, FM, RL, and SL). Using the EC₅₀ values, it was also possible to assess the sensitivity of each parameter for each plant model. Lower EC₅₀ values indicate higher sensitivity, while higher values denote lower sensitivity.

To calculate the sensitivity of each plant species in response to the commercial formulation COLOSSO FC30, the average of the EC₅₀ values for the parameters was applied. The formula used was as follows:

$$\text{Sensitivity} = \frac{\text{EC50 (\%G)} + (\text{GSI}) + (\text{FM}) + (\text{RL}) + (\text{SL})}{\text{number of parameters}} \quad (3)$$

All mentioned toxicological indices (IC₅₀ and EC₅₀) were determined using GraphPad Prism software.

Data analysis

The data from the variables analyzed in the acute toxicity tests with *A. Salina* (immobilization) and phytotoxicity tests with different plant models (%G, GSI, FM, RL, and SL) were subjected to a variance analysis. The means were compared using the Scott-Knott test, considering a significance level of 5%. All statistical analyses were conducted using the R statistical software, and the graphs were generated using GraphPad Prism software.

Results

Effects on seed germination of plant models

The germination percentage (%G) of plant models *L. sativa* and *P. glaucum* was affected starting at the concentration of 4.05 mL L⁻¹ of the commercial formulation COLOSSO FC30. In this case, the reduction in this

parameter was 15.25% and 18.64%, respectively, compared to the negative control (NC) (Figure 1a and Figure 1e).

Regarding the plant model *R. sativus*, a significant inhibition of %G was observed from the concentration of 13.12 mL L⁻¹, resulting in a reduction of 20.48% compared to the control (Figure 1c). On the other hand, the plant model *T. aestivum* had its %G affected from the concentration of 0.69 mL L⁻¹, which caused a decrease of 10.16% in this parameter compared to the negative control (Figure 1g).

Regarding the germination speed index (GSI) in the plant models *L. sativa*, *P. glaucum*, and *R. sativus*, an inhibition of this parameter was observed from the lowest concentration of the evaluated commercial formulation, which was 0.12 mL L⁻¹ (Figure 1b, d, and f). The inhibition values were 29.23% for *L. sativa*, 10.28% for *P. glaucum*, and 13.55% for *R. sativus*. As for the plant model *T. aestivum*, the GSI was inhibited from the concentration of 4.05 mL L⁻¹ (Figure 1h), with a reduction of 34.97% compared to the negative control (NC).

Effects on the initial development of plant models

Regarding seedling development, all evaluated plant models showed inhibition in root growth at the lowest tested concentration (0.12 mL L⁻¹) of the commercial formulation COLOSSO FC30. For the dicotyledonous plant models *L. sativa* and *R. sativus*, the reduction observed at this concentration was 39.36% and 31.72%, respectively, compared to the negative control (distilled water) (Figure 2a and 2b). As for the monocotyledonous plants *P. glaucum* and *T. aestivum*, the reduction observed at this concentration was 39.26% and 35.12%, respectively, compared to the negative control (Figure 2c and 2d).

Regarding the shoot length of the seedlings, the same pattern was observed in all plant models except for radish. The dose of 0.12 mL L⁻¹ of the commercial formulation caused a reduction of 29.21%, 41.34%, and 46.18% in the shoot length of *L. sativa*, *P. glaucum*, and *T. aestivum*, respectively. However, radish seedlings had significantly inhibited shoot length from the concentration of 0.69 mL L⁻¹, which caused a reduction of 20.01% compared to the negative control group (Figure 2b).

The relationship between fresh mass and seedling length is evident, as this parameter was significantly inhibited by the lowest concentration evaluated in all plant models, which was 0.12 mL L⁻¹ of the commercial formulation. Concerning the plant models of *L. sativa* and *R. sativus*, a reduction of 17.36% and 8.61% at this concentration, respectively, was observed compared to the negative control group (Figure 3a and b). However, in

the case of the monocotyledons *P. glaucum* and *T. aestivum*, the reduction was even more pronounced, reaching 23.26% and 20.73%, respectively (Figure 3c and d).

Ecotoxicity data obtained with plant models

Regarding ecotoxicity data, among the parameters evaluated using different plant models, germination percentage was found to be the least sensitive. The two models that exhibited greater sensitivity concerning this parameter were *P. glaucum* ($EC_{50} = 6.548 \text{ mL L}^{-1}$) and *T. aestivum* ($EC_{50} = 10.31 \text{ mL L}^{-1}$) (Table 2).

On the other hand, the parameters that demonstrated greater sensitivity were root and shoot length of the seedlings. Concerning root length, the most sensitive species were *L. sativa* ($EC_{50} = 0.346 \text{ mL L}^{-1}$) and *P. glaucum* ($EC_{50} = 0.356 \text{ mL L}^{-1}$). For shoot length, the most sensitive species were *P. glaucum* ($EC_{50} = 0.190 \text{ mL L}^{-1}$) and *T. aestivum* ($EC_{50} = 0.217 \text{ mL L}^{-1}$) (Table 2).

The sensitivity of the species to the commercial formulation followed the following order: *P. glaucum* > *L. sativa* > *T. aestivum* > *R. sativus* (Table 2).

Cytogenotoxicity test with *A. cepa*

The commercial formulation COLOSSO FC30 induced a significant reduction in dividing cells in the meristematic region of *A. cepa* roots, starting from the concentration of 0.351 mL L^{-1} . At this concentration, a 21.62% reduction in the mitotic index was observed compared to the control group. The recommended in-use dose (1.25 mL L^{-1}) resulted in the greatest reduction in this parameter, causing a decrease of 41.07% in the mitotic index (Figure 4a).

Regarding chromosomal aberrations, all evaluated concentrations induced the occurrence of these abnormalities, with the lowest evaluated concentration, 0.195 mL L^{-1} , showing the highest induction, with a frequency of 5.66 ± 1.63 aberrant cells per thousand cells evaluated (Figure 4a). The most prevalent chromosomal aberrations included the presence of sticky chromosomes (Figure 5a), followed by anaphase bridges (Figure 5b) and chromosomal fragments (Figure 5c). Conversely, less conspicuous aberrations involved delayed chromosomes (Figure 5d) and c-metaphases (Figure 5e).

A similar pattern was observed in the frequency of micronucleus, with all pesticide concentrations inducing the formation of this structure in meristematic cells. At a concentration of 0.195 mL L⁻¹, a frequency of 3.66 ± 1.03 micronucleus per thousand dividing cells was recorded (Figure 4a).

Concerning cytogenotoxic effects in the F1 region of *A. cepa* roots, it was observed that the concentration of 0.351 mL L⁻¹ resulted in a significant reduction in the rate of cell division, similar to the meristematic zone, showing a decrease of 34.33% compared to the control group. Regarding the frequency of micronuclei, only the concentrations of 0.195 and 0.351 mL L⁻¹ induced the formation of this structure, with a frequency of 2 ± 1.67 and 2.26 ± 1.16 micronucleus per thousand cells, respectively (Figure 4b).

Acute toxicity test with *A. salina*

The commercial formulation COLOSSO FC30 caused immobilization at all evaluated concentrations. However, significant results were observed from the concentration of 0.01 mL L⁻¹, where there was 37.5% immobilization compared to the negative control. The most significant results were found at concentrations of 0.032 and 0.1024 mL L⁻¹ of the commercial formulation, causing 92.5% and 100% immobilization, respectively (Figure 6a). The concentration causing 50% immobilization (IC₅₀) after 24 hours is 0.01207 mL L⁻¹ of the commercial formulation COLOSSO FC30 (Figure 6b).

Discussion

The commercial formulation COLOSSO FC30 represents a synergistic combination of three active ingredients, namely chlorpyrifos, cypermethrin, and fenthion, belonging to the class of insecticides. To date, there is a lack of research addressing the ecotoxicological potential of this formulation on both animal and plant organisms, highlighting the innovation and uniqueness of this study. It is noteworthy that previous studies have focused on assessing the toxicity of individual active ingredients in isolated contexts. Importantly, in the environment, these components may coexist with other substances, such as metals and microplastics, forming a complex of contaminants with the potential to trigger synergistic or potentiating effects (Relyea 2009; Borges-Ramírez et al. 2021; Roth and Wilks 2018).

In a study conducted by Nunes et al. 2018, a variation of the COLOSSO formulation containing cypermethrin and chlorpyrifos was investigated in experiments with aquatic organisms, specifically *Danio rerio*

and *Cyprinus carpio*. The exposure of these organisms to increasing concentrations of the commercial formulation for 96 hours revealed an increase in lipid peroxidation (LPO) activity and glutathione-S-transferase (GST) compared to the control group.

In the present study, the commercial formulation COLOSSO FC30, which includes chlorpyrifos, cypermethrin, and fenthion, was evaluated using seed plants as representatives of terrestrial organisms and *A. salina* as a representative of aquatic organisms. The application of these ecotoxicological tests proved effective in assessing the effects and potential environmental impacts of the formulation. Additionally, the selected organisms occupy key positions in the food chain, suggesting that damage to these organisms may lead to serious problems in terrestrial and aquatic ecosystems.

Previous studies indicate that the analysis of germination and the initial development of seedlings, along with the analysis of the cell cycle of model plants, is an effective approach to evaluating the toxic, cytogenotoxic, and environmental risk potential of chemical substances (Wang 1991; Boluda et al. 2011; Priac et al. 2017; Jitäreanu et al. 2019; Silva and Silva 2023). The correlation between the results obtained in tests with animal and plant organisms is supported by scientific research (Palmieri et al. 2016; Reis et al. 2017; Marcussi et al. 2023).

Furthermore, *A. salina* emerges as an excellent model organism for evaluating the toxicity of chemical substances, with immobilization being the most widely employed parameter (Pecoraro et al. 2021; Albendín et al. 2021; Palácio et al. 2021). This bioassay also presents a solid correlation with acute oral toxicity tests in rats (Lee et al. 1999; Lagarto Parra et al. 2001; Naidu et al. 2014;) and human tumor cell cultures (Silva et al. 2007; Hamimed et al. 2018).

Regarding the effects of the commercial formulation COLOSSO FC30 on different plant models, the results indicate a limited influence on the germination percentage, as illustrated in Figure 1 and Table 2. Notably, monocotyledonous species (*P. glaucum* and *T. aestivum*) showed greater sensitivity to this variable. The predominant impact of insecticides on seed germination is associated with their ability to interfere with the activity of specific hydrolytic enzymes, such as amylase, protease, lipase, and ATPase (Bashir et al., 2014). Previous studies suggest that the germination percentage has low susceptibility to chemical substances (de Brito Rodrigues et al. 2017; Balestri et al. 2019; Giorgetti et al. 2020; Silva and Silva 2023), attributed to the biological and anatomical characteristics of seeds, such as the seed coat, sheath, caryopsis, and seminal envelope, which provide mechanical protection and selective permeability (Wierzbicka and Obidzińska 1998).

These seed structures were effective in minimizing the impact on the germination rate at low concentrations in all evaluated plant models. However, the COLOSSO FC30 formulation exerted a significant

effect on the germination speed index (GSI), even at minimal doses. All evaluated concentrations significantly affected this parameter for the plants *L. sativa*, *P. glaucum*, and *R. sativus* (Figure 1). The GSI evaluation provided additional information about the toxic potential of the formulation, not revealed by the %G, indicating that *L. sativa* and *R. sativus* were more sensitive to this index (Table 2). This phenomenon may be related to the thinner seed coat, facilitating greater contact and imbibition in the seeds of these species. Seed size plays a crucial role in protection against pollutants, as larger seeds generally have thicker seed coats. (Fenner 1985; Robson et al. 2004; Jain et al. 2017; Kaur et al. 2017).

The observed delay in the germination speed index may be associated with the ability of insecticides to cause metabolic and physiological disturbances during the germination process, including oxidative and water stress, as well as interference with metabolic processes. Oxidative stress can disrupt the cellular redox state, leading to the production of reactive oxygen species, which, in turn, can damage plant cells (Liu and He 2016). Additionally, pesticides contain solvents with oil-like properties, which, due to their hydrophobic nature, can result in uneven water distribution after imbibition, causing water deficiency.

Regarding seedling growth, the root and shoot lengths were more susceptible to the COLOSSO FC30 formulation, as demonstrated in Figure 2 and Table 2. These results are in line with other studies on the toxic potential of pesticides in plant models (Shakir et al. 2016; Yengkokpam and Mazumder 2020; Shahid et al. 2021). For the eudicots *L. sativa* and *R. sativus*, the root was more sensitive to the commercial formulation, as detailed in Table 2.

During the process of plant development, the root stands out as the first organ to form and interact with the surrounding environment (Bewley et al. 2012). This initial interaction with the environment, potentially containing contaminants such as the commercial formulation COLOSSO FC30, may explain the phenomena observed in this study. Moreover, root growth inhibition may be associated with the pollutants' ability to inhibit cell division in meristematic regions (Dubey et al., 2015).

Throughout this research, a reduction in mitotic activity was observed in both the meristematic region and the F1 region of *A. cepa* cells, starting from concentrations of 0.351 mL L⁻¹ (Figure 4a and b), corroborating the observations of Dubey et al. (2015). However, for a substance to be considered cytotoxic, it is imperative to reduce mitotic activity by 50% compared to the control group (Fiskesjö 1993). This effect was not observed in the meristematic cells in the present study (Figure 4a). However, in the F1 cells, the cytotoxicity of the substance was evident at the concentration of 1.25 mL L⁻¹ (actual usage dose), causing a 71.85% inhibition of cell division compared to the control (Figure 4b).

Nevertheless, Abdel Migid et al. (2007) argue that reductions in the mitotic index above 22% indicate sublethal effects of the substance in question, with concentrations of 0.681 and 1.25 mL L⁻¹ causing reductions above 31% compared to the control in the meristem. The decrease in mitotic activity in the root meristems contributed to the inhibition of seedling growth exposed to the commercial formulation (Figure 2), as plant growth is regulated by cell proliferation and elongation in this location (Harashima and Schnittger 2010; Bewley et al. 2012; Taiz et al. 2017).

Beyond the reduction in cell division, the induction of chromosomal aberrations was observed in meristematic cells exposed to the commercial formulation. The most observed aberration in the treatments was chromosomal adhesion (Figure 5a), linked to both aneugenic effects, as it is associated with the process of polyploidization (Fernandes et al. 2009; Silveira et al. 2017), and clastogenic effects of the substance when it interacts with DNA phosphate groups, influencing DNA condensation or forming intrachromatid bond (El-Ghamery et al. 2003). Generally, this process can lead to irreversible cell death (Iqbal et al., 2019).

Chromosomal adhesion can also trigger bridge formation during anaphase, as chromosomes tend to remain attached until telophase. In case of separation, chromosomal fragments can be generated (Marcano et al. 2004; Fernandes et al. 2009). In this study, the presence of chromosomal bridges (Figure 5b) and chromosomal fragments (Figure 5c) associated with the clastogenic effect of the substance on DNA was observed (Fernandes et al. 2009; Silveira et al. 2017).

The formation of chromosomal bridges has a close correlation with successive events of chromosomal breaks, followed by fusion and subsequent formation of dicentric chromosomes (Andrade et al. 2008; Iqbal et al. 2019). During anaphase and telophase, each centromere of the dicentric chromosome binds to the mitotic spindle positioned at one of the cell poles. The chromatids located between the centromeres remain attached, giving the anaphase/telophase a distinctive bridge morphology between the two ends of the cell (Carvalho et al. 2019). The formation of chromosomal bridges is closely linked to the presence of chromosomal fragments, as DNA breakage can give rise to acentric fragments, which do not connect to the mitotic spindle and, consequently, remain unassociated in the cell cytoplasm (Campos et al. 2008; Carvalho et al. 2019).

In this study, the less frequent aberrations in the treatments were delayed chromosomes (Figure 5d), followed by c-metaphase (Figure 5e). Both are related to problems in chromosome segregation during mitosis due to the action of a substance characterized as aneugenic (Fernandes et al. 2009). The main mechanism of action of this substance affects microtubules, the cellular cytoskeleton structure responsible for chromosome movement, causing the phenomenon known as spindle poisoning (Andrade et al. 2008; Iqbal et al. 2019).

Micronucleus (Figure 6f) were also observed in both meristematic cells and daughter cells in this study, demonstrating the genotoxic and mutagenic potential of the commercial formulation COLOSSO FC30. These structures originate from whole chromosomes or small chromosomal fragments (Leme and Marin Morales 2009) or from the polyploidization process that results in the elimination of excess DNA (Fernandes et al. 2009; Iqbal et al. 2019). In this study, it was found that in treatments with higher cell division, the presence of micronucleus was more noticeable (Figure 4a and b). According to ISO 29200, substances with cytotoxic characteristics can mask a potential mutagenic effect, causing a reduction in the observation of micronuclei in treatments (ISO, 2013), a fact that was observed in this study in F1 region cells exposed to concentrations of 0.681 and 1.25 ml L⁻¹ of the commercial formulation, where the frequency of micronucleus was not significant (Figure 4b). Thus, a high rate of cell division is necessary for chromosomal loss or breaks to occur, which would later result in micronucleus.

Studies with the active ingredients present in the COLOSSO FC30 formulation obtained similar results. Exposure of *A. cepa* roots to different concentrations of chlorpyrifos (170, 340, and 680 ppm) found cytotoxicity at all evaluated concentrations and chromosomal aberrations, such as chromosomal adhesions, multipolar anaphases and telophases, chromosomal bridges, and delayed chromosomes (Asita and Makhalemele 2008). Another study with this active ingredient showed that concentrations of 8, 10, and 15 mg L⁻¹ of chlorpyrifos significantly induced micronucleus formation in *Lens culinaris* (Salazar Mercado and Maldonado Bayona 2019). The active ingredient cypermethrin, at concentrations of 1.5, 3.0, and 6.0 ppm, also demonstrated cytotoxic and genotoxic effects on *A. cepa* roots (Çavuşoğlu et al. 2012). Fenthion, at concentrations of 0.075, 0.75, and 7.5 M, also induced DNA damage in *Allium cepa* and *Vicia faba* exposed cells, causing cell death in the exposed roots (Cortés-Eslava et al. 2018).

In addition to the previously outlined mechanisms, the toxicity observed in different plant models may be intrinsically associated with the ability of the insecticides present in the commercial formulation COLOSSO FC30 to reduce photosynthetic rate and stomatal conductance (Bashir et al. 2014; Bragança et al. 2018)), as well as the decrease in photosynthetic pigments (Mohamed and Akladios 2017; Bragança et al. 2018). Moreover, plant exposure to these insecticides may also suppress the expression of important defense genes (Szczepaniec et al. 2013). Studies indicate that the production of special metabolites in plants, such as phenolic compounds, may be adversely affected by the presence of insecticides (Siddiqui and Sadaf 2001; Dubey et al. 2016). These compounds play a crucial role in plant defense, assisting in reducing oxidative stress caused by different classes of insecticides (Bragança et al. 2018). All these processes may have contributed to the observed toxicity in the morphological parameters of the various models evaluated in this study.

Although various ecotoxicological studies have used plant models to assess the effects of the active ingredients chlorpyrifos, cypermethrin, and fenthion present in the commercial formulation COLOSSO FC30, few of them have calculated toxicological indices. Comparing the ecotoxicity data obtained with COLOSSO FC30 and the results of studies with isolated active ingredients, it can be observed that the commercial formulation may exhibit antagonistic or synergistic effects, depending on the parameter evaluated.

For example, in this study, for the parameter of germination percentage, the median effective concentration for *P. glaucum* was 6.548 mL L⁻¹ (equivalent to 1.964 g L⁻¹ of chlorpyrifos and 0.982 g L⁻¹ of cypermethrin and fenthion), while for *T. aestivum*, it was 10.31 mL L⁻¹ (equivalent to 3.093 g L⁻¹ of chlorpyrifos and 1.546 g L⁻¹ of cypermethrin and fenthion). In a study that evaluated the effects of the active ingredient chlorpyrifos on the germination of *A. cepa* seeds, at concentrations ranging from 5 to 30 ppm, the EC₅₀ obtained for germination percentage was 9 ppm (Fatma et al. 2018). In another study where tomatoes were used as a model organism, the EC₅₀ for germination with the insecticide cypermethrin was 344.10 mg L⁻¹ (Shakir et al. 2016). No studies were found regarding the effects of the active ingredient fenthion on germination.

Comparing morphological aspects, specifically root growth in this study, the EC₅₀ values for the commercial formulation were lower in the plant models *L. sativa* (EC₅₀ = 0.346 mL L⁻¹, equivalent to 0.104 g L⁻¹ of chlorpyrifos and 0.052 g L⁻¹ of cypermethrin and fenthion) and *P. glaucum* (EC₅₀ = 0.356 mL L⁻¹, equivalent to 0.11 g L⁻¹ of chlorpyrifos, 0.053 g L⁻¹ of cypermethrin and fenthion). In a recent study that used the active ingredient chlorpyrifos and *L. sativa* as a model organism, the median effective concentration that inhibited seedling length by 50% was 125 mg L⁻¹ (Méndez-Rivera et al. 2023), while another study conducted by Iannacone et al. (2000) found an EC₅₀ of 1.05 mg L⁻¹. In the study by Utzig et al. (2019), chlorpyrifos concentrations ranging from 200, 20, 2, 0.2, and 0.02 µg L⁻¹ did not affect the behavior of *L. sativa* roots. Another study demonstrated that the active ingredient cypermethrin, at concentrations ranging from 0 to 500 mg L⁻¹, had no effects on the root length of *L. sativa* seedlings (Martin and Ronco 2006). In the study conducted by Sheikh et al. (2020), concentrations of cypermethrin ranging between 0.01 and 2% resulted in an EC₅₀ of 0.50% for the root length of *A. cepa*. Once again, no studies were found that evaluated the effects of the active ingredient fenthion on the mentioned parameters.

In relation to the effects and impacts of the formulation COLOSSO FC30 on aquatic organisms, the acute toxicity test using *A. salina* revealed toxic effects at extremely low concentrations (Figure 6). The IC₅₀ obtained after 24 hours was 0.01207 mL L⁻¹ (equivalent to 0.00362 g L⁻¹ of chlorpyrifos + 0.00181 g L⁻¹ of cypermethrin and fenthion). Few studies have investigated the toxic potential of the active ingredients present in the COLOSSO

FC30 commercial formulation using *A. salina* as a model organism. One study found an $IC_{50} = 0.385 \text{ mg L}^{-1}$ after 24 hours of exposure for chlorpyrifos (Venkateswara Rao et al. 2007), while for cypermethrin, the IC_{50} was $<10 \mu\text{g L}^{-1}$ (Gartenstein et al. 2006). No studies related to the effects of fenthion on *A. salina* were found.

The commercial formulation COLOSSO FC30 is composed of three active ingredients belonging to the class of insecticides: organophosphates (chlorpyrifos and fenthion) and pyrethroids (cypermethrin). The observed mortality in this study may be related to the toxicity of its active ingredients. Research indicates that organophosphate insecticides, such as chlorpyrifos, have the ability to affect locomotor activity, cause morphological changes, impact cyst hatching, and inhibit acetylcholinesterase activity in *A. salina* (Venkateswara Rao et al. 2007; Gambardella et al. 2018).

Pyrethroid insecticides also induce similar effects in microcrustaceans of the genus *Eucypris*, resulting in mortality, reduced swimming speed in exposed individuals, and chronic effects that decrease reproduction (Houssou et al. 2021). The effects of fenthion, a synthetic organophosphate, on microcrustaceans lack detailed information; however, it is known to cause a reduction in the population density of freshwater crustaceans (van Dyk et al. 1975), as well as genotoxicity in zebrafish embryos (Wahyuni et al. 2021) and neurotoxicity in the zebrafish adults (Zhang et al. 2021).

In addition to impacts on the aquatic environment, pesticides have the potential for prolonged persistence or reacting with other substances. Additionally, there is the possibility of bioaccumulation and biomagnification in the food chain (Hernández et al. 2017; Islam et al. 2022).

Given this integrated approach, which employs different ecotoxicological bioassays and assessed parameters, this study emphasizes the importance of not only considering the effects of active ingredients in isolation but also taking into account the impacts of commercial formulations. This underscores the crucial need to adopt integrated approaches for assessing environmental risks associated with these compounds.

Conclusion

The findings of this study unequivocally reveal substantial impacts caused by the commercial formulation COLOSSO FC30, which includes the active ingredients chlorpyrifos, cypermethrin, and fenthion, on germination parameters and the initial stages of development in various plant models. The conducted experiments highlighted diverse responses among plant species, particularly emphasizing the inhibition of root and shoot growth in seedlings.

Additionally, antimetabolic effects were observed in meristematic cells and the F1 region of *A. cepa* exposed to the commercial formulation, along with the induction of micronuclei and chromosomal aberrations at all analyzed concentrations. It is noteworthy that the commercial formulation exhibited toxic effects on the microcrustacean *A. salina*, negatively impacting its mobility.

The investigation of the ecogenotoxic potential of this formulation stands out due to the absence of previous studies addressing this specific combination of active ingredients. The obtained results suggest adverse impacts on terrestrial and aquatic organisms, raising concerns about the potential for environmental contamination and risks to biodiversity.

These findings underscore the importance of more comprehensive and detailed assessments of the effects of commercial pesticide formulations, especially considering their widespread use in agriculture and livestock farming. Studies of this nature are fundamental to support safer and more sustainable pest management practices, aiming at the preservation of ecosystems and human health.

STATEMENTS & DECLARATIONS

Ethical approval This work did not require ethical approval under the research governance guidelines operating at the time of the research.

Consent to Participate: All authors participated, read and approved the final manuscript.

Consent to Publish: All authors have given consent to the publication of this article.

Author contribution: L. M. da Silva and L. F. Andrade-Vieira conceived and designed the work; L. M. da Silva, R. C. de Souza, T. A. C. Santos, and M. J. Palmieri organized the experiments and collected the data; L. M. da Silva and L. F. Andrade-Vieira analyzed and interpreted the collected data, edited, and revised the manuscript; L. M. da Silva and L. F. Andrade-Vieira critically reviewed the article and edited the final version to be published.

Funding: This study was funded by the Brazilian funding agency “Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel” (CAPES – Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel)” as a master’s scholarship.

Competing Interests: The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- Abdel Migid HM, Azab YA, Ibrahim WM (2007) Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66:57–64. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.10.011>
- Albendín MG, Aranda V, Coello MD, et al (2021) Pharmaceutical Products and Pesticides Toxicity Associated with Microplastics (Polyvinyl Chloride) in *Artemia salina*. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 18:10773. <https://doi.org/10.3390/ijerph182010773>
- ABNT (2021) NBR16530 de 09/2021 Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Artemia* sp (Crustacea, Brachiopoda)
- Andrade LF, Campos JMS, Davide LC (2008) Cytogenetic alterations induced by SPL (spent potliners) in meristematic cells of plant bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71:706–710. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.02.018>
- Aragão FB, Duarte ID, Fantinato DE, et al (2021) Toxicogenetic of tebuconazole based fungicide through *Lactuca sativa* bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 213:111985. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.111985>
- Balestri E, Menicagli V, Ligorini V et al (2019) Phytotoxicity assessment of conventional and biodegradable plastic bags using seed germination test. *Ecological Indicators* 102:569–580. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2019.03.005>
- Bashir FOZIA, Zahid FAISAL, Iqbal M (2014). Growth performance, photosynthetic efficiency and pigment concentration of *Glycine max* (L.) Merr., as affected by alphamethrin, a synthetic pyrethroid insecticide. *Trends Biotechnol. Biol. Sci* 1:29-35.
- Bewley JD, Bradford K, Hilhorst H (2012) *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*. Springer Science & Business Media
- Boluda R, Roca-Pérez L, Marimón L (2011) Soil plate bioassay: An effective method to determine ecotoxicological risks. *Chemosphere* 84:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.013>
- Borges-Ramírez MM, Escalona-Segura G, Huerta-Lwanga E, et al (2021) Organochlorine pesticides, polycyclic aromatic hydrocarbons, metals and metalloids in microplastics found in regurgitated pellets of black

- vulture from Campeche, Mexico. *Science of The Total Environment* 801:149674. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149674>
- Bragança I, Grosso C, Rede D, et al (2018) Ecotoxicological Effects of Insecticides in Plants Assessed by Germination and Other Phytotoxicity Tools. In: Vats S (ed) *Biotic and Abiotic Stress Tolerance in Plants*. Springer Singapore, Singapore, pp 47–76
- Campos JMS, Viccini LF, Andrade LF, Davide LC, Rodrigues GS. (2008). Genetic toxicology and environmental mutagenesis in allelopathic interactions. *Plant bioassays*. Studium press, Houston, 1-344.
- Carvalho MSS, Andrade-Vieira LF, Santos FE dos, et al (2019) Allelopathic potential and phytochemical screening of ethanolic extracts from five species of *Amaranthus* spp. in the plant model *Lactuca sativa*. *Scientia Horticulturae* 245:90–98. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.10.001>
- Çavuşoğlu K, Kaya A, Yılmaz F, Yalçın E (2012) Effects of cypermethrin on *Allium cepa*. *Environmental Toxicology* 27:583–589. <https://doi.org/10.1002/tox.20681>
- Cortés-Eslava J, Gómez-Arroyo S, Risueño MC, Testillano PS (2018) The effects of organophosphorus insecticides and heavy metals on DNA damage and programmed cell death in two plant models. *Environmental Pollution* 240:77–86. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.04.119>
- de Brito Rodrigues L, de Oliveira R, Abe FR, et al (2017) Ecotoxicological assessment of glyphosate-based herbicides: Effects on different organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 36:1755–1763. <https://doi.org/10.1002/etc.3580>
- De Rouck S, İnak E, Dermauw W, Van Leeuwen T (2023) A review of the molecular mechanisms of acaricide resistance in mites and ticks. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 159:103981. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2023.103981>
- Duaví WC, Gama AF, Damasceno ÉP, et al (2023) Are pesticides only a problem from rural areas? The case of a highly urbanised tropical mangrove (Fortaleza, CE, Brazil). *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 103:5868–5886. <https://doi.org/10.1080/03067319.2021.1946524>
- Dubey G, Mishra N, Prasad SM (2016) Metabolic Responses of Pesticides in Plants and Their Ameliorative Processes. In: Singh A, Prasad SM, Singh RP (eds) *Plant Responses to Xenobiotics*. Springer Singapore, Singapore, pp 57–95

- Dubey P, Mishra AK, Shukla P, Singh AK (2015) Differential sensitivity of barley (*Hordeum vulgare* L.) to chlorpyrifos and propiconazole: Morphology, cytogenetic assay and photosynthetic pigments. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 124:29–36. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.03.013>
- El-Ghamery AA, El-Kholy MA, Abou El-Yousser MA (2003) Evaluation of cytological effects of Zn²⁺ in relation to germination and root growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 537:29–41. [https://doi.org/10.1016/S1383-5718\(03\)00052-4](https://doi.org/10.1016/S1383-5718(03)00052-4)
- EPA (2012) Ecological Effects Test Guidelines OCSPP 850.4800: Plant Uptake and Translocation Test. Office of Chemical Safety and Pollution Prevention.
- EPA (1988) Protocols For Short Term Toxicity Screening Of Hazardous Waste Sites.
- Fatma F, Verma S, Kamal A, Srivastava A (2018) Phytotoxicity of pesticides mancozeb and chlorpyrifos: correlation with the antioxidative defence system in *Allium cepa*. *Physiol Mol Biol Plants* 24:115–123. <https://doi.org/10.1007/s12298-017-0490-3>
- Fenner M (1985) Soil seed banks. In: Fenner M (ed) *Seed Ecology*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 57–71
- Fernandes TCC, Mazzeo DEC, Marin-Morales MA (2009) Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72:1680–1686. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.03.014>
- Fiskesjö G (1993) The *Allium* test in wastewater monitoring. *Environ Toxicol Water Qual* 8:291–298. <https://doi.org/10.1002/tox.2530080306>
- Gambardella C, Nichino D, Iacometti C, et al (2018) Long term exposure to low dose neurotoxic pesticides affects hatching, viability and cholinesterase activity of *Artemia* sp. *Aquatic Toxicology* 196:79–89. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.01.006>
- Gartenstein S, Quinnell RG, Larkum AWD (2006) Toxicity effects of diflubenzuron, cypermethrin, and diazinon on the development of *Artemia salina* and *Helicoidaris tuberculata*. *Australasian Journal of Ecotoxicology* 12:83-90.
- Ghosh P, Thakur IS, Kaushik A (2017) Bioassays for toxicological risk assessment of landfill leachate: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 141:259–270. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.03.023>

- Gilbert L (2021) The Impacts of Climate Change on Ticks and Tick-Borne Disease Risk. *Annual Review of Entomology* 66:373–388. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-052720-094533>
- Giorgetti L, Spanò C, Muccifora S, et al (2020) Exploring the interaction between polystyrene nanoplastics and *Allium cepa* during germination: Internalization in root cells, induction of toxicity and oxidative stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 149:170–177. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2020.02.014>
- Grisi L, Leite RC, Martins JRDS, et al (2014) Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 23:150–156. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014042>
- Guerra M, Souza MD (2002) Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: FUNPEC.
- Hamimed S, Boulebda N, Laouer H, Belkhiri A (2018) Bioactivity-guided isolation of alkamides from a cytotoxic fraction of the ethyl acetate extract of (*L.*) DC. roots. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences* 31:180–185. <https://doi.org/10.1515/cipms-2018-0033>
- Harashima H, Schnittger A (2010) The integration of cell division, growth and differentiation. *Current Opinion in Plant Biology* 13:66–74. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.11.001>
- Hernández AF, Gil F, Lacasaña M (2017) Toxicological interactions of pesticide mixtures: an update. *Arch Toxicol* 91:3211–3223. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2043-5>
- Houssou AM, Cocan D, Răducu CM, et al (2021) Acute and Chronic Effects of a Glyphosate and a Cypermethrin-Based Pesticide on a Non-Target Species *Eucypris* sp. Vavra, 1891 (Crustacea, Ostracoda). *Processes* 9:701. <https://doi.org/10.3390/pr9040701>
- Iannacone J, Alvarino L, Caballero C, Sánchez J (2000) Cuatro ensayos ecotoxicológicos para evaluar lindano y clorpirifos. *Gayana (Concepción)* 64:139–146. <https://doi.org/10.4067/S0717-65382000000200003>
- Iqbal M, Abbas M, J. Nisar, et al (2019) Bioassays Based on Higher Plants As Excellent Dosimeters for Ecotoxicity Monitoring: A Review. *Chemistry International* 5: 1-80.
- Islam MdA, Amin SMN, Rahman MA, et al (2022) Chronic effects of organic pesticides on the aquatic environment and human health: A review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management* 18:100740. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2022.100740>

- ISO (2016) ISO 18763:2016 Soil quality Determination of the toxic effects of pollutants on germination and early growth of higher plants.
- ISO (2013) ISO 29200:2013 Soil quality Assessment of genotoxic effects on higher plants *Vicia faba* micronucleus test
- Jain N, Bhargava A, Pareek V, et al (2017) Does seed size and surface anatomy play role in combating phytotoxicity of nanoparticles? *Ecotoxicology* 26:238–249. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1758-7>
- Jitäreanu A, Caba I-C, Trifan A, et al (2019) *Triticum aestivum* Assay - A Useful Tool for Environmental Monitoring and Toxicity Assessment. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 47:1005–1018. <https://doi.org/10.15835/nbha47411349>
- Junior PB, Barros JC, Maciel WG, et al (2022) Control Strategies for the Tick *Rhipicephalus Microplus* (Canestrini, 1888) on Cattle: Economic Evaluation and Report of a Multidrug-Resistant Strain. *Acta Parasit* 67:1564–1572. <https://doi.org/10.1007/s11686-022-00611-8>
- Kaur N, Erickson TE, Ball AS, Ryan MH (2017) A review of germination and early growth as a proxy for plant fitness under petrogenic contamination — knowledge gaps and recommendations. *Science of The Total Environment* 603–604:728–744. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.02.179>
- Kokkali V, Katramados I, Newman JD (2011) Monitoring the Effect of Metal Ions on the Mobility of *Artemia salina* Nauplii. *Biosensors* 1:36–45. <https://doi.org/10.3390/bios1020036>
- Lagarto Parra A, Silva Yhebra R, Guerra Sardiñas I, Iglesias Buela L (2001) Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* 8:395–400. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00044>
- Lee T-H, Chen Y-M, Chou H-N (1999) Toxicity Assay of Cyanobacterial Strains Using *Artemia salina* in Comparison with the Mouse Bioassay. *Acta zoologica taiwanica* 10:01-08.
- Libralato G, Prato E, Migliore L, et al (2016) A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. *Ecological Indicators* 69:35–49. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.04.017>
- Lima do Rêgo E, Santos da Silva JD, Costa Nakamura T, et al (2021) Distribution of organochlorine, organophosphates, carbamate, thiocarbamate, pyrethroids, and strobilurins in surface sediments of the

- Rio de Ondas watershed by GC-MS. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 56:357–369. <https://doi.org/10.1080/03601234.2021.1885263>
- Liu Y, He C (2016) Regulation of plant reactive oxygen species (ROS) in stress responses: learning from AtRBOHD. *Plant Cell Rep* 35:995–1007. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1950-x>
- Maguire JD (1962) Speed of germination-Aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci* 2:176–177
- Manfra L, Savorelli F, Pisapia M, et al (2012) Long-term Lethal Toxicity Test with the Crustacean *Artemia franciscana*. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* e3790. <https://doi.org/10.3791/3790>
- Marcano L, Carruyo I, Del Campo A, Montiel X (2004) Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. *Environmental Research* 94:221–226. [https://doi.org/10.1016/S0013-9351\(03\)00121-X](https://doi.org/10.1016/S0013-9351(03)00121-X)
- Marcussi S, Palmieri MJ, Andrade-Vieira LF, et al (2023) Plant cytogenetics tests can predict toxic effects on human cells: genotoxic and mutagenic effects of *Tityus serrulatus* scorpion venom on vegetal and human cells. *Ciência e Natura* 45:e19–e19. <https://doi.org/10.5902/2179460X66067>
- Martin ML, Ronco AE (2006) Effect of mixtures of pesticides used in the direct seeding technique on nontarget plant seeds. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 77, no. 2:.. <https://doi.org/10.1007/s00128-006-1054-3>
- Méndez-Rivera M, Ramírez-Morales D, Montiel-Mora JR, Rodríguez-Rodríguez CE (2023) Ecotoxicity of pesticide formulations and their mixtures: the case of potato crops in Costa Rica. *Ecotoxicology* 32:383–393. <https://doi.org/10.1007/s10646-023-02648-5>
- Mohamed HI, Akladios SA (2017) Changes in antioxidants potential, secondary metabolites and plant hormones induced by different fungicides treatment in cotton plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 142:117–122. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.04.001>
- Naidu JR, Ismail R, Sasidharan S (2014) Acute Oral Toxicity and Brine Shrimp Lethality of Methanol Extract of *Mentha Spicata* L (Lamiaceae). *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* 13:101–107. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i1.15>

- Nunes BS, Carvalho FD, Guilhermino LM, Van Stappen G (2006) Use of the genus *Artemia* in ecotoxicity testing. *Environmental Pollution* 144:453–462. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2005.12.037>
- Nunes MEM, Müller TE, Murussi C, et al (2018) Oxidative effects of the acute exposure to a pesticide mixture of cypermethrin and chlorpyrifos on carp and zebrafish – A comparative study. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 206–207:48–53. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2018.03.002>
- Obaid MK, Islam N, Alouffi A, et al (2022) Acaricides Resistance in Ticks: Selection, Diagnosis, Mechanisms, and Mitigation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 12:941831. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.941831>
- OECD (2006) Test No. 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264070066-en>.
- Ouro Fino Saúde Animal (2023) Colosso FC30: Formulação pioneira de Fenthion, Cipermetrina e 30% de Clorpirifós. <https://www.ourofinosaudeanimal.com/produtos/bovinos/ectoparasiticidas/colosso-fc30/> Accessed 27 december 2023.
- OECD (2004) Test No. 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264069947-en>
- Palácio SM, de Almeida JCB, de Campos ÉA, et al (2021) Silver nanoparticles effect on *Artemia salina* and *Allium cepa* organisms: influence of test dilution solutions on toxicity and particles aggregation. *Ecotoxicology* 30:836–850. <https://doi.org/10.1007/s10646-021-02393-7>
- Palmieri MJ, Andrade-Vieira LF, Campos JMS, et al (2016) Cytotoxicity of Spent Pot Liner on *Allium cepa* root tip cells: A comparative analysis in meristematic cell type on toxicity bioassays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 133:442–447. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.07.016>
- Pecoraro R, Scalisi EM, Messina G, et al (2021) *Artemia salina*: A microcrustacean to assess engineered nanoparticles toxicity. *Microscopy Research and Technique* 84:531–536. <https://doi.org/10.1002/jemt.23609>

- Priac A, Badot P-M, Crini G (2017) Treated wastewater phytotoxicity assessment using *Lactuca sativa*: Focus on germination and root elongation test parameters. *Comptes Rendus Biologies* 340:188–194. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2017.01.002>
- Puentes JD, Riet-Correa F (2023) Epidemiological aspects of cattle tick fever in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 32:e014422. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612023007>
- Pulina G, Acciaro M, Atzori AS, et al (2021) Animal board invited review – Beef for future: technologies for a sustainable and profitable beef industry. *Animal* 15:100358. <https://doi.org/10.1016/j.animal.2021.100358>
- Reis GBD, Andrade-Vieira LF, Moraes IDC, et al (2017) Reliability of plant root comet assay in comparison with human leukocyte comet assay for assessment environmental genotoxic agents. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 142:110–116. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.004>
- Relyea RA (2009) A cocktail of contaminants: how mixtures of pesticides at low concentrations affect aquatic communities. *Oecologia* 159:363–376. <https://doi.org/10.1007/s00442-008-1213-9>
- Robson DB, Germida JJ, Farrell RE, Knight DJ (2004) Hydrocarbon Tolerance Correlates with Seed Mass and Relative Growth Rate. *Bioremediation Journal* 8:185–199. <https://doi.org/10.1080/10889860490887536>
- Roth N, Wilks MF (2018) Combination (“cocktail”) effects of pesticide residues in food. SCAHT report for FSVO.
- Salazar Mercado SA, Maldonado Bayona HA (2019) Evaluation of cytotoxic potential of chlorpyrifos using *Lens culinaris* Med as efficient bioindicator. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 183:109528. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.109528>
- Shahid M, Manoharadas S, Chakdar H, Alrefaei AF, Albeshr MF, Almutairi MH (2021). Biological toxicity assessment of carbamate pesticides using bacterial and plant bioassays: An in-vitro approach. *Chemosphere* 278:130372. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.130372>
- Shakir SK, Kanwal M, Murad W, et al (2016) Effect of some commonly used pesticides on seed germination, biomass production and photosynthetic pigments in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Ecotoxicology* 25:329–341. <https://doi.org/10.1007/s10646-015-1591-9>

- Sheikh N, Patowary H, Laskar RA (2020) Screening of cytotoxic and genotoxic potency of two pesticides (malathion and cypermethrin) on *Allium cepa* L. *Mol Cell Toxicol* 16:291–299. <https://doi.org/10.1007/s13273-020-00077-7>
- Siddiqui ZS, Sadaf K (2001) Effect of Systemic Fungicides and Insecticides on Absorption Spectra, Chlorophyll and Phenolic Contents of *Vigna radiata* (L.) Wilczek. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2001.812.814>
- Silva LM da, Silva FJ da (2023) Toxic Effects Promoted by a Commercial Detergent on the Germination and Initial Development of Cucumber Seedlings (*Cucumis sativus* L.). *Ecotoxicology and Environmental Contamination* 18:3–9. <https://doi.org/10.5132/eec.2023.02.02>
- Silva TMS, Nascimento RJB, Batista MM, et al (2007) Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeastern Brazil. *Rev bras farmacogn* 17:35–38. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000100008>
- Silveira GL, Lima MGF, Reis GB dos, et al (2017) Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. *Chemosphere* 178:359–367. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.03.048>
- Singh K, Kumar S, Sharma AK, et al (2022) Economic impact of predominant ticks and tick-borne diseases on Indian dairy production systems. *Experimental Parasitology* 243:108408. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108408>
- Szczepaniec A, Raupp MJ, Parker RD, et al (2013) Neonicotinoid Insecticides Alter Induced Defenses and Increase Susceptibility to Spider Mites in Distantly Related Crop Plants. *PLOS ONE* 8:e62620. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062620>
- Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy A (2017) *Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal - 6ed.* Artmed Editora
- Utzig LM, Lima RM, Gomes MF, et al (2019) Ecotoxicity response of chlorpyrifos in *Aedes aegypti* larvae and *Lactuca sativa* seeds after UV/H₂O₂ and UVC oxidation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 169:449–456. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.11.003>
- van Dyk LP, Greeff CG, Brink JJ (1975) Total population density of crustacea and aquatic insecta as an indicator of fenthion pollution of river water. *Bull Environ Contam Toxicol* 14:426–431. <https://doi.org/10.1007/BF01705508>

- Venkateswara Rao J, Kavitha P, Jakka NM, et al (2007) Toxicity of Organophosphates on Morphology and Locomotor Behavior in Brine Shrimp, *Artemia salina*. Arch Environ Contam Toxicol 53:227–232. <https://doi.org/10.1007/s00244-006-0226-9>
- Vieira LFA, Silveira GL, Vieira LFA, Silveira GL (2018) Cyto(Geno)Toxic Endpoints Assessed via Cell Cycle Bioassays in Plant Models. In: Cytotoxicity. IntechOpen
- Wahyuni EA, Lin H-D, Lu C-W, et al (2021) The cytotoxicity and genotoxicity of single and combined fenthion and terbufos treatments in human liver cells and zebrafish embryos. Science of The Total Environment 758:143597. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143597>
- Wang W (1991) Literature review on higher plants for toxicity testing. Water Air Soil Pollut 59:381–400. <https://doi.org/10.1007/BF00211845>
- Wierzbicka M, Obidzińska J (1998) The effect of lead on seed imbibition and germination in different plant species. Plant Science 137:155–171. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00138-1](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00138-1)
- Yengkokpam P, Mazumder PB (2020) Phytotoxicity of malathion (PM) and tatafen (PTF) towards *Solanum melongena* L.cv. Longai: A case study. Plant Physiol Rep 25:149–156. <https://doi.org/10.1007/s40502-019-00498-0>
- Zhang K, Liang J, Brun NR, et al (2021) Rapid Zebrafish Behavioral Profiling Assay Accelerates the Identification of Environmental Neurodevelopmental Toxicants. Environ Sci Technol 55:1919–1929. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c06949>
- Zhong G, Tang J, Xie Z, et al (2014) Selected current-use and historic-use pesticides in air and seawater of the Bohai and Yellow Seas, China. Journal of Geophysical Research: Atmospheres 119:1073–1086. <https://doi.org/10.1002/2013JD020951>
- Zhong M, Wang T, Zhao W, et al (2022) Emerging Organic Contaminants in Chinese Surface Water: Identification of Priority Pollutants. Engineering 11:111–125. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.12>

Table 1 Concentrations of the commercial formulation COLOSSO FC30 evaluated in ecotoxicological bioassays using different plant models and *A. salina*.

Evaluated formulation concentrations (mL L ⁻¹)	Concentration of active ingredients present (g L ⁻¹)		
Phytotoxicity Test			
	Chlorpyrifos	Cypermethrin	Fenthion
0.12	0.036	0.018	0.018
0.21	0.063	0.0315	0.0315
0.38	0.114	0.057	0.057
0.69	0.207	0.1035	0.1035
1.25*	0.375	0.1875	0.1875
2.25	0.675	0.3375	0.3375
4.05	1.215	0.6075	0.6075
7.29	2.187	1.0935	1.0935
13.12	3.936	1.968	1.968
23.61	7.083	3.5415	3.5415
Cytogenotoxicity test			
	Chlorpyrifos	Cypermethrin	Fenthion
0.195	0.0585	0.02925	0.02925
0.351	0.1053	0.0565	0.0565
0.681	0.2043	0.10215	0.10215
1.25	0.375	0.1875	0.1875
Acute toxicity test with <i>A. salina</i>			
	Chlorpyrifos	Cypermethrin	Fenthion
0.000976	0,0002928	0.0001464	0.0001464
0.003125	0,009375	0.00046875	0.00046875
0.01	0.003	0.0015	0.0015
0.032	0.0096	0.0048	0.0048
0.1024	0.03072	0.01536	0.01536

*Recommended dose for use by the manufacturer

Table 2 Average effective concentration (EC₅₀) of the commercial formulation COLOSSO FC30 (CF30) and its active ingredients (chlorpyrifos - CPF, cypermethrin - CYP, and fenthion - FEN) under the evaluated parameters in tests with plant models: germination percentage (%G), germination speed index (GSI), root length (RL), shoot length (SL), and fresh mass (FM).

Average effective concentration (EC ₅₀) of the commercial formulation (mL L ⁻¹) and the active ingredients present (g L ⁻¹).																
Endpoints	<i>L. sativa</i>				<i>R. sativus</i>				<i>P. glaucum</i>				<i>T. aestivum</i>			
	CF30	CPF	CYP	FEN	CF30	CPF	CYP	FEN	CF30	CPF	CYP	FEN	CF30	CPF	CYP	FEN
%G	15.02	4.05	2.253	2.253	14.08	4,224	2.112	2.112	6.548	1.964	0.982	0.982	10.31	3.093	1.546	1.546
GSI	0.815	0.244	0.122	0.122	2.080	0.624	0.312	0.312	2.990	0.897	0.448	0.448	6.352	1.906	0.953	0.953
RL	0.346	0.104	0.052	0.052	0.676	0.202	0.101	0.101	0.356	0.107	0.053	0.053	0.687	0.206	0.103	0.103
SL	0.617	0.185	0.092	0.092	3.313	0.994	0.497	0.497	0.190	0.057	0.028	0.028	0.217	0.065	0.0325	0.0325
FM	2.213	0.664	0.331	0.331	2.657	0.796	0.398	0.398	0.430	0.129	0.064	0.064	n.d	n.d	n.d	n.d
Sensibility	3.80				4.56				2.10				4.39			

n.d = not determined

FIGURE CAPTIONS

Fig. 1 Germination percentage (%G) and germination speed index (GSI) of seeds from plant models (*L. sativa*, *P. glaucum*, *R. sativus*, and *T. aestivum*) exposed to different concentrations of the commercial formulation COLOSSO FC30. Data is presented as mean \pm standard deviation. *From this concentration, it differs statistically from the negative control (NC).

Fig. 2 Average length of root and shoot of seedlings of *L. sativa*, *R. sativus*, *P. glaucum*, and *T. aestivum* exposed to different concentrations (mL L^{-1}) of the commercial formulation COLOSSO FC30. Data is presented as mean \pm standard deviation. *From this concentration, it differs statistically from the negative control (NC).

Fig. 3 Fresh mass obtained from seedlings of *L. sativa*, *R. sativus*, *P. glaucum*, and *T. aestivum* after 72 hours of exposure to different concentrations of the commercial formulation COLOSSO F30. Data is presented as mean \pm standard deviation. *From this concentration, it differs statistically from the negative control (NC).

Fig. 4 Mitotic index and frequency of chromosomal aberrations and micronucleus (per thousand cells) observed in meristematic cells of *A. cepa* exposed to different concentrations of the commercial formulation COLOSSO FC30, containing the mixture of active ingredients cypermethrin, chlorpyrifos, and fenthion. Data is presented as mean \pm standard deviation. *Statistically differs from the control group (Scott-Knott Test 5%), ns = not significant.

Fig. 5 Chromosomal aberrations and micronucleus observed in meristematic cells and in the F1 region of the roots of the plant model *A. cepa*. a - Sticky chromosomes; b - Anaphase bridge; c - Chromosomal fragment; d - Delayed chromosomes; e - C-metaphase; f - Micronucleus

Fig. 6 Immobilization rate and average inhibitory concentration (IC_{50}) obtained in the acute toxicity test with *A. salina* nauplii exposed to the commercial acaricidal formulation COLOSSO FC30 for 24 hours. Data is presented as mean \pm standard deviation. *Statistically differs from the control group (Scott-Knott Test 5%), ns = not significant.

