

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental

MARIA EDNA TENÓRIO NUNES

Avaliação dos efeitos de agrotóxicos sobre a fauna edáfica por meio de ensaios ecotoxicológicos com *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) e com comunidade natural de solo

São Carlos - SP
2010

MARIA EDNA TENÓRIO NUNES

Avaliação dos efeitos de agrotóxicos sobre a fauna edáfica por meio de ensaios ecotoxicológicos com *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) e com comunidade natural de solo

Tese apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências da Engenharia Ambiental

Orientador: Prof. Dr. Evaldo L. G. Espíndola

São Carlos - SP
2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

N972a Nunes, Maria Edna Tenório
Avaliação dos efeitos de agrotóxicos sobre a fauna edáfica por meio de ensaios ecotoxicológicos com *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) e com comunidade natural de solo / Maria Edna Tenório Nunes ; orientador Evaldo Luiz Gaeta Espíndola. -- São Carlos, 2010.

Tese (Doutorado-Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Ciências da Engenharia Ambiental) -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2010.

1. . Pesticidas. 2. Fauna edáfica. 3. Pesticidas - avaliação de risco. 4. Minhocas - mortalidade; reprodução. 5. Poluição do solo. 6. Ecotoxicologia.
I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): Engenheiro Agrônomo MARIA EDNA TENÓRIO NUNES.

Tese defendida e julgada em 10.12.2010 perante a Comissão Julgadora:



Prof. Associado **EVALDO LUIZ GAETA ESPINDOLA** – (Orientador)
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP) APROVADA



Prof. Dr. **JOSÉ PAULO FILIPE AFONSO DE SOUSA**
(Universidade de Coimbra/UC) APROVADA



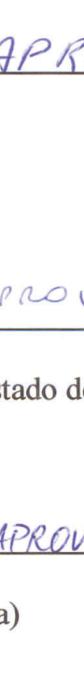
Prof. Dr. **RUI GODINHO LOBO GIRÃO RIBEIRO**
(Universidade de Coimbra/UC) APROVADA



Prof^a. Dr^a. **MARA MERCEDES DE ANDRÉA**
(Instituto Biológico – Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Estado de São Paulo) APROVADA



Dr^a. **CINTIA CARLA NIVA**
(Pesquisadora - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/Embrapa) APROVADA



Prof. Associado **FRANCISCO ARTHUR DA SILVA VECCHIA**
Vice-Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Engenharia Ambiental



Prof. Associado **PAULO CÉSAR LIMA SEGANTINE**
Presidente da Comissão de Pós-Graduação da EESC

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos

ANA CAROLINA

“A primeira vez em que eu a vi.

Eu nunca me esqueci daquele dia...

... havia tanta paz no seu olhar!

Percebi então que o seu olhar

alguma coisa me dizia.

Tanta coisa linda!!!

TUDO AQUILO QUE MEU CORAÇÃO QUERIA”

(Roberto Carlos)

JEFFERSON

**“Pois o verdadeiro amigo é confiável e estimulante,
engraçado e grave, às vezes irritante.**

Pode se afastar, mas sabemos que retorna.

Ele nos agüenta e nos chama, nos dá impulso e abrigo.

E nos faz ser melhores: como o VERDADEIRO AMOR.”

(Lya Luft)

“CANAIA-DO-PAI-JOÃO”

“Bom cidadão

Riso aberto, amigo certo

Alegria sincera

Na primavera

Ou qualquer estação do ano

Este seu mano

De braços abertos

Lhe espera.”

(Luiz Gonzaga)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas oportunidades que sempre me apresentou, por ter me permitido aproveitá-las, e principalmente por todas as pessoas que pude conhecer, das quais levo comigo muitos ensinamentos e grandes amizades.

Ao meu marido Jefferson e minha filha Ana Carolina, que são “meu Norte, meu Sul, meu Leste e meu Oeste”. Agradeço por existirem em minha vida!

Aos meus pais, Maria Helena e Cícero, pelo exemplo de força e pelo porto seguro que representam, e a meus irmãos e sobrinhos, pelo exemplo, carinho, apoio, preocupação, e incentivo constantes.

Ao Prof. Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola, pela confiança em mim depositada, pelo grande incentivo para que eu retomasse o caminho da pesquisa, pela constante atenção e disposição em me atender para encaminhamentos processuais, discussões, esclarecimentos e, principalmente, pela grande e muito valiosa amizade.

À Janete Brigante pela amizade e por, juntamente com o prof. Evaldo, ter me oferecido a oportunidade de integrar a equipe do Projeto Mogi-Guaçu e, assim, de redescobrir-me capaz.

À Natália Costa de Lima, Beatriz Kawamura Rodrigues e Dulcelaine Nishikawa, que aceitaram fazer parte da equipe do Núcleo de Agrotóxicos e Agricultura Alternativa do Projeto Mogi-Guaçu e ao Thiago G. T. Decina que, além do interesse, empenho, seriedade e profissionalismo com que desenvolveram suas atividades, brindaram-me com suas amizades e muitos ótimos momentos de convivência.

Aos produtores de Bom Repouso, que sempre nos receberam de forma atenciosa e souberam entender os propósitos de nossos trabalhos. Em especial ao Lidelmo, Silvanei, André e Anilton.

A todos os integrantes do Projeto Mogi-Guaçu, coordenadores de núcleos (Yuri, Ana Lúcia, Domingos, Giselle, Andréa, Rita, Márcia, Edmilson, Fabiano e Welber) pelo companheirismo e colaboração, e aos secretários Peterson e Elaine, pelos prontos atendimentos às solicitações e necessidades do Núcleo de Agrotóxicos e Agricultura Alternativa.

A todos os estagiários e integrantes das equipes dos Núcleos do projeto Mogi-Guaçu, pela convivência e auxílios diretos ou indiretos às ações do Núcleo de Agrotóxicos e Agricultura Alternativa.

Aos prefeitos, gestores, secretários, diretores e demais auxiliares da Prefeitura de Bom Repouso, MG, ao Grupo GAIA e à Emater-MG, escritório de Bom Repouso, que apoiaram e auxiliaram as ações do Núcleo de Agrotóxicos e Agricultura Alternativa no município.

Aos funcionários e pesquisadora do NEEA/CRHEA, Amândio, Marcelo e Clarice, pelo suporte logístico à pesquisa e pelo apoio nas atividades laboratoriais, mas principalmente pela convivência harmoniosa e alegre, que tornaram os dias de trabalho tão prazerosos.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental e do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada, Claudete, Nelson, Jose Luiz, Mara, Sônia, Paulo, Rogério e Lourdes, pela atenção e disposição para ajudar, sempre que necessitei.

Aos professores e pesquisadores em Ecotoxicologia de Solos, Marcos V. B. Garcia (Embrapa Amazônia Ocidental), José Paulo Souza (Universidade de Coimbra), Sônia Chelinho (Universidade de Coimbra), Thiago Natal da Luz (Universidade de Coimbra), Xavier Domene (Universidade Autônoma de Barcelona), Júlia Carina Niemeyer (Universidade Federal da Bahia), Mara Mercedes de Andréa (Instituto Biológico de São Paulo) e Andréia Waichman (Universidade Federal do Amazonas), por estarem sempre dispostos a atender-me e a trocar informações valiosas para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Prof. Dilmar Baretta (Universidade do Estado de Santa Catarina) e à Dra. Maria Elizabeth Fernandes Correia (EMBRAPA/Agrobiologia), pela identificação dos organismos da fauna de solo.

Aos queridos colegas do NEEA/CRHEA e PPG-SEA, Fernanda Marciano, Andréa, Danilo, Liliane, Augusto, Aline, Bruna, Ana, Cláudia, Lucas, Denise, Fernanda Massaro, Luciana, Renata, Netto e Ângela, pela alegre convivência e apoio constantes.

Às amigas Evellyn, Mara e Clarice, pelos momentos gostosos, pela atenção, carinho e incentivo que sempre me ofereceram.

Ao Programa Petrobras Ambiental, pelo patrocínio ao Projeto Mogi-Guaçu.

Ao CNPQ (Processo 142656/2006-2), pela concessão da bolsa de Doutorado.

Às “meninas” Vera, Dirlene, Rosana, Rosane, Rita e Viviana, pela valiosa amizade e os momentos de descontração e apoio incondicional; à Mônica e Isabela, presentes todos os dias; e à Rita Porto, pela valiosa amizade e incentivo constante.

RESUMO

NUNES, M.E.T. **Avaliação dos efeitos de agrotóxicos sobre a fauna edáfica por meio de ensaios ecotoxicológicos com *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) e com comunidade natural do solo.** 2010. 175 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

Os impactos ambientais relacionados ao uso de agrotóxicos em áreas agrícolas vêm sendo considerados como preocupantes nas últimas décadas, verificando-se efeitos adversos em diferentes níveis de organização biológica nos ecossistemas terrestres e aquáticos e, conseqüentemente, com elevados riscos à saúde humana. No município de Bom Reposo, MG, com economia baseada na produção de batata e morango, a situação é similar, evidenciando-se a utilização intensiva e inadequada de agrotóxicos (mais de 80 produtos), muitos com alta periculosidade ambiental e toxicológica, entre eles o Vertimec[®] 18 EC. No sentido de verificar os impactos do uso deste agrotóxico, estudos experimentais foram conduzidos para avaliação de efeitos agudo, crônico (reprodução) e comportamental (rejeição) com *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta), além da realização de ensaio multi-espécies, com populações da fauna edáfica extraídas de área do CRHEA/SHS/EESC/USP, Itirapina, SP. Por meio dos resultados obtidos, verifica-se que para *E. andrei* a CL50,14dias foi de 7,64 mg/kg, sendo que a sobrevivência dos organismos nos ensaios crônicos (28 dias) só diferiu significativamente ($p < 0,05$) do controle na maior concentração (10,5 mg/kg). Os sobreviventes apresentaram alterações morfológicas (afilamento e descoloração da parte posterior; estrangulamentos em diferentes regiões do corpo; fragmentação e perda de segmentos, principalmente posteriores), comportamentais (letargia ou lentidão na resposta a estímulos mecânicos) e diminuição do peso corporal, correlacionadas ao aumento das concentrações do agrotóxico. Em relação à reprodução, o número médio de juvenis ($n = 4$) passou de 33 (Controle) para 3 (0,875 mg de abamectina/kg SAT), não ocorrendo reprodução nos demais tratamentos. Nos ensaios de comportamento, houve rejeição, com diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle, a partir de 1,75 mg abamectina/kg. Nos ensaios com multi-espécies verificou-se efeito significativo na densidade ($p < 0,05$), sendo maior no controle, no qual também foram registrados os maiores índices de diversidade e riqueza para fauna edáfica, e menor índice de dominância, em relação à dose recomendada (DR).

Palavras-chave: Agrotóxicos; abamectina; fauna de solo; avaliação de risco; efeitos agudos e crônicos; rejeição; Ecotoxicologia do solo; poluição do solo

ABSTRACT

NUNES, M.E.T. **Assessment of pesticides effects on soil fauna through ecotoxicological tests with *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) and natural soil fauna community.** 2010. 175 p. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

Environmental impacts of pesticides use in agricultural areas have been a matter of worry in the last decades, with adverse effects on different levels of biological organization of terrestrial and aquatic ecosystems and, consequently, denoting high risks to human health. At Bom Repouso, MG, Brazil, where economy is based on potato and strawberry production, the situation is similar, with intensive and inappropriate pesticide use (more than 80 products), many very dangerous and toxic to the environment and humans, such as Vertimec[®] 18 EC. Aiming to verify the impacts of the use of this pesticide, experimental studies were conducted to evaluate the acute, chronic (reproduction) and behavioral (avoidance) effects on *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta), in addition to a multi-species assay, with edaphic fauna populations extracted from an area at CRHEA/SHS/EESC/USP, Itirapina, SP. The LC_{50,14d} for *E. andrei* was 7.64 mg/kg and the survival of earthworms on chronic test (28 days) differed significantly ($p < 0.05$) from control only at the highest concentration (10.5 mg abamectin/kg soil). Survivors showed morphological (threadlike and colorless posterior region; constrictions on different body regions; fragmentation and loss of segments) and behavioral (lethargy or slowness to respond to mechanical stimuli) alterations and weight loss correlated to increasing pesticide concentrations. Respecting to reproduction, average ($n = 4$) number of juvenile was 33 (Control); 3 (0.875 mg de abamectin/kg soil) and 0 (other treatments). Earthworms avoided contaminated soils, with significant difference ($p < 0.05$) from control, from 1.75 mg abamectin/kg soil. Multi-species tests showed significant effect ($p < 0.05$) on density, higher on control, which showed higher diversity and richness indexes for edaphic fauna, and small dominance index, compared to recommended dose (DR).

Keywords: Pesticides; abamectin; soil fauna; risk assessment; acute and chronic effects; avoidance; soil Ecotoxicology; soil pollution.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 Localização do município de Bom Repouso, MG.....	29
Figura 3.2 a) Áreas de cultivo de morango; b) Áreas de cultivo de batata: preparada para o plantio (esquerda) e com cultura em início de desenvolvimento (direita).....	32
Figura 3.3 Respostas dos agricultores de Bom Repouso, MG à pergunta “Com quem aprendeu a trabalhar com agrotóxicos?”, em entrevista realizada em 2005.	35
Figura 3.4 Periculosidade ambiental dos agrotóxicos mais citados pelos produtores rurais de Bom Repouso, MG, em 2005.	38
Figura 3.5 Classificação toxicológica dos agrotóxicos mais citados pelos produtores.....	39
Figura 3.6 a) Agricultor trabalhando em cultura de morango; b) Aplicação de agrotóxico sem utilização de Equipamento de Proteção Individual; c) Aplicação de agrotóxico com utilização de EPI, mas na presença de pessoas sem proteção.....	41
Figura 3.7 Descarte inadequado e reutilização de embalagens vazias de agrotóxicos. Bom Repouso (MG), 2005. Fotos: Acervo Projeto Mogi-Guaçu.....	43
Figura 4.1 Preparo do terreno, aplicação do agrotóxico nas parcelas e coleta das amostras para condução de ensaio com solo natural (SN).....	59
Figura 4.2 Mortalidade média (n = 4) de minhocas (<i>Eisenia andrei</i>), aos 14 dias, quando expostas a diferentes diluições, em solo controle, de solo natural pulverizado com duas vezes a dose de Vertimec® 18 EC recomendada para a cultura do morango (2DR), e a solo natural pulverizado com a dose recomendada (DR).....	66
Figura 4.3 Mortalidade média (n = 4) de minhocas (<i>Eisenia andrei</i>), aos 14 dias, quando expostas a diferentes concentrações de abamectina incorporada a solo artificial tropical (SAT) pela adição de Vertimec® 18 EC.*	66
Figura 4.4 Variação média (n = 4) na biomassa aos 28 dias, em relação ao peso no início do teste, de minhocas adultas da espécie <i>Eisenia andrei</i> expostas a diferentes diluições, em solo controle, de solo natural pulverizado com duas vezes a dose de Vertimec® 18 EC recomendada para a cultura do morango (2DR) e a solo natural pulverizado com a dose recomendada (DR).....	68
Figura 4.5 Efeito de doses de abamectina, incorporada em solo artificial tropical (SAT) como Vertimec® 18 EC, sobre a sobrevivência de adultos de <i>Eisenia andrei</i> , aos 28 dias, e a produção de juvenis, aos 56 dias.	68
Figura 4.6 Efeito de doses de abamectina, incorporada em solo artificial tropical (SAT) como Vertimec® 18 EC, sobre a perda de peso de adultos de <i>Eisenia andrei</i> , aos 28 dias, em relação ao peso inicial.	69
Figura 4.7 Tipos de alterações morfológicas apresentadas por adultos de <i>Eisenia andrei</i> sobreviventes, após 28 dias de exposição a SAT sem (Controle) e com incorporação de Vertimec® 18 EC.	70
Figura 4.8 Efeito de doses de abamectina, incorporada em solo artificial tropical (SAT) como Vertimec® 18 EC, sobre a ocorrência de alterações morfológicas em adultos sobreviventes de <i>Eisenia andrei</i> , aos 28 dias.	70

Figura 5.1 Porcentagem de organismos (média + desvio padrão, n = 10) em cada lado do recipiente no ensaio de controle duplo para os solos artificial (SAT) e natural (SN).....	91
Figura 5.2 Porcentagem média (n = 4) de resposta de rejeição de <i>Eisenia andrei</i> a solo artificial (SAT) com diferentes concentrações de abamectina. As barras representam os desvios-padrão.	92
Figura 5.3 Porcentagem de resposta de rejeição (médias + desvio padrão, n = 4) de <i>Eisenia andrei</i> a solo natural (SN) com diferentes concentrações de abamectina, correspondentes a diluições em solo controle de solo pulverizado com 2DR (●) e a solo pulverizado com DR (□).....	93
Figura 6.1 Detalhes da área de onde foram coletadas amostras de solo para extração da fauna edáfica e da coleta de monólitos para extração da fauna edáfica. Itirapina, SP, 2008	108
Figura 6.2 Detalhes das armadilhas utilizadas para extração da fauna do solo.	110
Figura 6.3 Comparação entre valores médios de densidade de organismos edáficos, após exposição a solo controle (CT) e a solo contaminado com Vertimec® 18 EC (DR).	118
Figura ApB.1 a) <i>Eisenia fetida</i> (acima) e <i>Eisenia andrei</i> (abaixo); b) <i>Eisenia fetida</i> (esquerda) e <i>Eisenia andrei</i> (direita).....	140
Figura ApB.2 Detalhes da manutenção de minhocas de <i>Eisenia andrei</i> no laboratório do NEEA/CRHEA/SHS/EESC/USP.....	142
Figura ApB.3 Aspectos dos testes agudos e crônicos com <i>Eisenia andrei</i> : à direita, colocação das minhocas nos potes com o solo-teste; ao centro, potes dispostos nas prateleiras durante o período de condução dos testes; à esquerda, detalhe da suplementação alimentar com esterco, nos testes crônicos.....	143
Figura ApB.4 Aspectos do aparato para extração de juvenis, aos 56 dias, nos testes crônicos.	144
Figura ApB.5 Aspectos da montagem e condução dos testes de rejeição: à esquerda, pesagem e colocação dos solos em cada um dos lados do recipiente; ao centro: colocação dos organismos na linha divisória entre os solos; à direita, disposição dos recipientes durante a condução do teste.	144
Figura ApC.1 Detalhes do aparato para determinação da capacidade de retenção de água das amostras de solos.	149

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Nível de escolaridade de produtores do município de Bom Repouso, MG, com base em entrevistas realizadas no ano de 2005.....	33
Tabela 3.2. Produtos comerciais, número de vezes em que foram citados, princípios ativos, tipos e classificações toxicológica e quanto à periculosidade ambiental dos produtos mais citados pelos produtores de Bom Repouso, MG, 2005.....	37
Tabela 3.3 Cenários considerados, concentração ambiental estimada (CAE) e quociente de risco (QR)* para abamectina, para a cultura do morango.	45
Tabela 4.1 Características químicas e físicas do solo artificial tropical (SAT) e do solo natural (SN) coletado em área do CRHEA/SHS/EESC/USP, Itirapina, SP.	60
Tabela 4.2 Concentrações de abamectina (mg/kg) nas amostras de solo natural (SN) submetido à pulverização com Vertimec® 18 EC, nas dosagens de 0,9 L/ha (DR) e 1,8 L/ha (2DR), detectadas por cromatografia líquida.....	64
Tabela 5.1 Características químicas e físicas do solo artificial tropical (SAT) e do solo natural (SN) coletado em área do CRHEA/SHS/EESC/USP, Itirapina, SP.	87
Tabela 5.2 Concentrações de abamectina (mg/kg) nas amostras de solo natural (SN) submetido à pulverização com Vertimec 18® EC, nas dosagens de 0,9 L/ha (DR) e 1,8 L/ha (2DR), detectadas por cromatografia líquida.....	90
Tabela 6.1 Valores de Nitrogênio total, Fósforo total, metais, teor de umidade, capacidade máxima de retenção de água (CMRA), pH, matéria orgânica (MO), areia, silte e argila presentes nas amostras de solo dos 4 pontos utilizados para extração da fauna edáfica (R1, R2, R3 e R4) e do solo-teste em que os organismos foram expostos a Vertimec® 18EC e dos valores orientadores de referência de qualidade, prevenção e intervenção para metais estabelecidos pela Resolução Conama nº 420.	116
Tabela 6.2 Densidade total, número de grupos identificados e índices de diversidade da fauna edáfica encontrada em solo não submetido aos tratamentos (Inicial) e após exposição ao solo-controle (Controle) e solo com Vertimec® 18 EC (DR), para cada um dos pontos de coleta (R1 a R4).....	117
Tabela 6.3 Densidade total e frequência relativa dos principais grupos de fauna de solo encontrados nos tratamentos solo-controle (CT) e solo-teste, contaminado com dose máxima de Vertimec® 18 EC recomendada para a cultura do morango (DR).....	120
Tabela 7.1 Observação de efeitos na função habitat do solo, por meio de diferentes respostas dos organismos à presença de Vertimec® 18 EC.....	132

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 O USO DOS AGROTÓXICOS E A CONTAMINAÇÃO DO SOLO	1
1.2 A ABORDAGEM ECOTOXICOLÓGICA NOS ESTUDOS AMBIENTAIS	5
1.3 A ECOTOXICOLOGIA TERRESTRE	6
1.4 A ECOTOXICOLOGIA TERRESTRE EM REGIÕES TROPICAIS	10
1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
CAPÍTULO 2	17
CONCEPÇÃO, HIPÓTESE E OBJETIVOS	17
2.1 CONCEPÇÃO DA PESQUISA	17
2.2 HIPÓTESE	20
2.3 OBJETIVO GERAL.....	20
2.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
2.5 CONFIGURAÇÃO DA APRESENTAÇÃO DA TESE.....	21
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
CAPÍTULO 3	25
USO DE AGROTÓXICOS NO MUNICÍPIO DE BOM REPOUSO, MINAS GERAIS, BRASIL E RISCO DE CONTAMINAÇÃO DO SOLO	25
3.1. RESUMO	25
3.2 INTRODUÇÃO.....	26
3.3 MATERIAL E MÉTODOS	29
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
3.5 CONCLUSÃO.....	46
3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

CAPÍTULO 4	51
EFEITOS DE VERTIMEC® 18 EC SOBRE A SOBREVIVÊNCIA, REPRODUÇÃO E MORFOLOGIA DE <i>EISENIA ANDREI</i>	51
4.1 RESUMO	51
4.2 INTRODUÇÃO.....	52
4.3 MATERIAL E MÉTODOS	55
4.4 RESULTADOS.....	64
4.5 DISCUSSÃO.....	71
4.6 CONCLUSÃO.....	73
4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
CAPÍTULO 5	79
SENSIBILIDADE DE <i>EISENIA ANDREI</i> A ABAMECTINA EM ENSAIOS DE REJEIÇÃO REALIZADOS COM SUBSTRATO ARTIFICIAL E SOLO NATURAL, SOB CONDIÇÕES TROPICAIS	79
5.1 RESUMO	79
5.2 INTRODUÇÃO.....	80
5.3 MATERIAL E MÉTODOS	83
5.4 RESULTADOS.....	90
5.5 DISCUSSÃO.....	93
5.6 CONCLUSÕES.....	96
5.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97
CAPÍTULO 6	101
AVALIAÇÃO DO EFEITO NÃO-ALVO DO INSETICIDA/ACARICIDA VERTIMEC® 18 EC SOBRE UMA COMUNIDADE EDÁFICA	101
6.1 RESUMO	101
6.2 INTRODUÇÃO.....	102
6.3 MATERIAL E MÉTODOS	105
6.4 RESULTADOS.....	114
6.5 DISCUSSÃO.....	119
6.6 CONCLUSÕES.....	122
6.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
CAPÍTULO 7	127
CONSIDERAÇÕES FINAIS, RECOMENDAÇÕES E CONCLUSÃO	127

7.1 A SITUAÇÃO DO MUNICÍPIO DE BOM REPOUSO.....	127
7.2 OS ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS COM ORGANISMOS DE SOLO	130
7.3 OS ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS COM VERTIMEC® 18 EC	131
7.4 CONCLUSÃO.....	134
APÊNDICE A.....	135
QUESTIONÁRIO UTILIZADO PARA LEVANTAMENTO DE INFORMAÇÕES SOBRE ATIVIDADES AGRÍCOLAS EM BOM REPOUSO, MG.....	135
APÊNDICE B.....	139
DETALHES SOBRE A ESPÉCIE DO ORGANISMO-TESTE, SUA MANUTENÇÃO EM LABORATÓRIO E A CONDUÇÃO DOS TESTES DE TOXICIDADE.....	139
1. <i>EISENIA FETIDA</i> E <i>EISENIA ANDREI</i>	139
2. MANUTENÇÃO DOS ORGANISMOS EM LABORATÓRIO.....	140
3. CONDUÇÃO DOS TESTES DE TOXICIDADE AGUDA, CRÔNICA E DE REJEIÇÃO	142
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	144
APÊNDICE C.....	147
DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE MÁXIMA DE RETENÇÃO DE ÁGUA E AJUSTE DA UMIDADE DOS SOLOS-TESTE	147
APÊNDICE D.....	151
DADOS RELATIVOS À REPRODUÇÃO DE <i>EISENIA ANDREI</i> EM ENSAIOS COM SOLO NATURAL (SN) PULVERIZADO COM VERTIMEC® 18 EC	151

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

1.1 O USO DOS AGROTÓXICOS E A CONTAMINAÇÃO DO SOLO

Em todo o mundo, a preocupação com a contaminação do solo tem crescido nas últimas décadas. Na Europa, esta tem sido identificada pelo *Thematic Strategy for Soil Protection* como uma das principais ameaças à sustentabilidade deste recurso. Consequentemente, nos últimos 20 a 30 anos, países europeus tem desenvolvido e implementado políticas de proteção do solo, incluindo a prevenção e a remediação de áreas contaminadas, seja em nível nacional (Reino Unido, Dinamarca, Holanda, Alemanha, Áustria, Bélgica, Itália e Espanha) ou da União Europeia. O mesmo tem ocorrido em outros países, como Estados Unidos, Canadá, China e Japão (RODRIGUES et al., 2009).

No Brasil, recentemente entrou em vigor legislação específica sobre o gerenciamento de áreas contaminadas, estabelecendo critérios e valores orientadores de qualidade do solo, bem como diretrizes para sua preservação, por meio de uma resolução estabelecida pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA (2009). Esta foi elaborada com base na experiência da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – CETESB, em São Paulo, que registrou em 2002 as áreas contaminadas no estado, em um processo pioneiro no Brasil. Desde então, o número de áreas contaminadas cadastradas aumentou de 255 para 2904, em 2008. Destas, 110 (4%) já foram reabilitadas e 819 (28%) estão em processo de reabilitação (COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL, 2009). Em 2008, o estado de Minas Gerais também iniciou o cadastramento de áreas contaminadas

(CONSELHO ESTADUAL DE POLÍTICA AMBIENTAL – COPAM, 2008). Com a vigência da resolução do Conama, cada vez mais áreas contaminadas deverão ser oficialmente identificadas no Brasil e cada órgão ambiental estadual deverá cadastrá-las e gerenciá-las.

A contaminação do solo por atividades antrópicas pode derivar tanto de fontes pontuais como difusas e geralmente é refletida pelo aumento da concentração de contaminantes acidificantes (como SO₂ e NO_x); metais (como cádmio, mercúrio, chumbo); metalóides como arsênio; e compostos orgânicos, como agrotóxicos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), bifenis policlorinados (PCBs) e dioxinas. As principais fontes antrópicas de contaminação do solo são mineração e fundição, combustão de combustíveis fósseis; lodo de esgoto; indústrias (especificamente metalúrgicas, eletrônicas e químicas); disposição e incineração do lixo; deposição atmosférica de emissões de automóveis; derramamento de líquidos, como solventes ou óleos; práticas de irrigação com água contaminada; e aplicação de agrotóxicos, fertilizantes e outros materiais agrícolas (RODRIGUES et al., 2009).

No que se refere aos agrotóxicos, sua utilização faz parte de um conjunto de tecnologias associadas ao processo de modernização da agricultura ocorrido a partir dos anos 1960, a chamada “Revolução Verde”, que teve como premissa o aumento da produtividade para suprir a crescente demanda mundial por alimentos. No Brasil, essa política de modernização levou o país a figurar sempre entre os maiores mercados consumidores mundiais de agrotóxicos (RODRIGUES, 2003).

Entre 1964 e 1991, houve um aumento no emprego desses produtos no país, da ordem de 276,2% que, no entanto, não foi acompanhada por drástica redução nas perdas atribuídas a pragas e doenças nas culturas agrícolas (CAMPANHOLA; BETTIOL, 2003; PERES et al., 2003). Entre 1997 e 2000 houve um aumento médio de 18,0% nas vendas de agrotóxicos, com destaque para os herbicidas, cujas vendas cresceram 31,0% (FARIA et al., 2004). Em

2008, segundo dados do Sindicato Nacional das Indústrias de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG), o país passou a ser o maior mercado mundial consumidor de agrotóxicos. Em 2009, houve um acréscimo de 7,7% nas quantidades totais comercializadas, em relação a 2008. E, nos cinco primeiros meses de 2010, estimou-se um aumento de 5% nas vendas brasileiras em relação ao mesmo período de 2009 (FERREIRA; VEGRO; CAMARGO, 2010). Esse crescimento se deve a vários fatores de natureza complexa, que incluem a expansão da fronteira agrícola; a intensificação do desequilíbrio biológico do agroecossistema e a fenômenos de ordem sócio-econômica (RIBEIRO, 2001).

Apesar de constituírem uma pequena porcentagem dos poluentes totais, não se pode ser complacente com o uso intensivo e até abusivo de agrotóxicos, uma vez que, por sua natureza e propósitos, são venenos e seu impacto no ambiente pode ser considerável (SILVA; FAY, 2004). Como poluentes, podem significar um problema ambiental em função de sua persistência, toxicidade e bioacumulação (FAY; SILVA, 2004).

O problema da contaminação do solo por agrotóxicos se agrava pelo fato de que boa parte do que é aplicado em campo é perdida. Estima-se que 90% não atingem o alvo, sendo dissipados para o ambiente e tendo como ponto final reservatórios de água e, principalmente, o solo (BETTIOL; GHINI, 2003). CHAIM et al. (1999a), por exemplo, verificaram que em cultura de tomate estaqueado de 24% a 41% do produto aplicado ficam na planta, de 20% a 30% vão para o solo e de 30% a 45% são perdidos por evaporação e/ou deriva. Em estudo realizado no estado de São Paulo (RAMOS, 2001) os pulverizadores costais ou semi-estacionários, que proporcionam baixa eficiência nas aplicações, representavam 46% dos equipamentos em utilização em pequenas propriedades, onde predominavam culturas como melancia, melão, morango, tomate, figo, goiaba e uva, entre outras. O número de pulverizações anuais variava de 20 a 70, com perdas superiores a 60% do volume de produtos aplicados. Para a cultura do feijão, Chaim et al. (1999b) observaram que, dependendo do

porte das plantas, as perdas de agrotóxicos permaneceram entre 49 e 88%. Para compensar a baixa eficiência das aplicações, os agricultores fazem pulverizações repetidas, o que aumenta os custos de produção e o potencial de impactos ao ambiente, além dos riscos associados à saúde humana.

Os volumes de calda de agrotóxicos utilizados por área também são bastante elevados, o que aumenta o potencial de perda e, conseqüentemente, de impacto ambiental. Como exemplo, no cultivo de morango, apesar do baixo porte da cultura, os volumes de caldas variam de 680 a 5700 L/ha, com maior frequência na faixa de 1000 a 1600 L/ha, com 2 a 3 aplicações semanais durante o ciclo da cultura (RAMOS, 2001).

Os agrotóxicos podem interagir com as fases sólida, líquida e gasosa do solo e também com os organismos vivos aí presentes. Os resíduos dos agrotóxicos podem, ainda, passar por vários processos que afetam diferentes compartimentos do agroecossistema: o ar, por meio da evaporação de resíduos das superfícies das culturas ou dos solos contaminados; as águas superficiais, por meio de escoamento superficial, erosão e arraste de solo contaminado; e a água subterrânea, pela lixiviação através dos perfis do solo. A possibilidade de contaminação de águas superficiais e subterrâneas justifica o grande interesse pelo comportamento de agrotóxicos em solos, uma vez que quando esses produtos são introduzidos, os recursos hídricos aparecem como principal destino final (FERRACINI et. al., 2001; GEVAO; JONES, 2002; SPADOTTO, 2002; RODRIGUES, 2003; FAY; SILVA, 2004).

Quando no solo os agrotóxicos entram em contato íntimo com os organismos edáficos, com os quais interagem direta ou indiretamente. Assim, tem aumentado o interesse nos impactos de agrotóxicos sobre a diversidade da fauna e as funções do solo, bem como a atenção para a necessidade de métodos apropriados para avaliar os efeitos negativos dos agrotóxicos sobre o ecossistema solo (GARCIA, 2004).

1.2 A ABORDAGEM ECOTOXICOLÓGICA NOS ESTUDOS AMBIENTAIS

O termo Ecotoxicologia foi sugerido pela primeira vez em 1969, por René Truhaut, para denominar uma nova área de estudo que refletia a crescente preocupação com danos de substâncias químicas sobre outras espécies, além do homem. Zagatto (2006) define a Ecotoxicologia como a ciência que estuda os efeitos dos poluentes aos organismos e como esses interagem com seus habitats.

A Ecotoxicologia envolve diversas áreas de pesquisa, sendo que os mecanismos observados nos ecossistemas são resultantes de combinações de um infinito número de processos, que podem ser observados nos mais diversos níveis de organização. É a ciência responsável pela geração do conhecimento que subsidiará a formulação segura de dispositivos legais, normas, programas e diretrizes gerenciais para enfrentar questões de risco ecotoxicológico potencial e real, geradas pela introdução de agentes químicos no ambiente (ZAGATTO, 2006).

Segundo o mesmo autor, a Ecotoxicologia Aquática foi o primeiro ramo a se desenvolver, com testes de toxicidade implementados para organismos aquáticos na década de 1930, com o objetivo de estabelecer a relação causa/efeito de substâncias químicas e despejos líquidos. Esta área cresce a cada ano e os testes de toxicidade aquática são desenvolvidos por várias instituições de pesquisa e órgãos de monitoramento ambiental, em todo o mundo. São realizados experimentos com agrotóxicos, metais, efluentes industriais, amostras ambientais de água e sedimentos e várias outras substâncias. Como organismos-teste são utilizados algas e bactérias, invertebrados aquáticos zooplanctônicos e bentônicos e os peixes, entre outros. Nesses estudos são considerados desde os parâmetros dos testes de toxicidade padronizados, como sobrevivência ou mortalidade, crescimento e taxa de fecundidade, até parâmetros

bioquímicos, fisiológicos, histológicos, comportamentais, entre outros (RAND; PETROCELLI, 1995).

1.3 A ECOTOXICOLOGIA TERRESTRE

A importância dos estudos ecotoxicológicos para ambientes terrestres foi reconhecida posteriormente em relação à Ecotoxicologia Aquática e, conseqüentemente, refletiu no número de métodos padronizados (RÖMBKE; KNACKER, 2003). O ensaio de toxicidade aguda com minhocas (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD, 1984), testado e padronizado internacionalmente, tornou a espécie *Eisenia fetida* um organismo modelo para avaliação dos efeitos de substâncias químicas sobre invertebrados saprófitas terrestres (SPURGEON et al., 2003) e significou um impulso à Ecotoxicologia Terrestre. Pesquisas avaliando os efeitos de diferentes substâncias químicas sobre esses organismos, como metais e agrotóxicos, são frequentes na literatura internacional (EIJSSACKERS et al., 2005, JENSEN; DIAO; SCOTT-FORDSMAND, 2007, LUKKARI et al., 2005, VERMEULEN; REINECKE; REINECKE, 2001, YEARDLEY; LAZORCHAK; GAST, 1996).

Embora o número e também a complexidade de testes voltados à Ecotoxicologia Terrestre tenham crescido nos últimos 20 anos, a padronização internacional em grande escala dos mesmos começou há pouco mais de 10 anos. Até 1995, as normas internacionais existentes para organismos de solo eram os testes de toxicidade aguda para minhocas e para plantas (RÖMBKE; KNACKER, 2003).

A maior parte dos testes padronizados para invertebrados do solo foi desenvolvida para quantificar os efeitos da exposição a substâncias químicas sobre os organismos em

substratos ou solos artificiais formulados. O primeiro substrato artificial recomendado para ensaios de toxicidade com minhocas (*Eisenia fetida*) foi o Artisol (ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION – AFNOR, 1984), composto por sílica gel em mistura com bolas de vidro e água, sem qualquer similaridade física e química com os solos naturais. O protocolo 207 da OECD (1984) descreveu um solo artificial composto de 10% de turfa de esfagno finamente peneirada, 20% de argila caolinita (caulim) e 70% de areia.

De acordo com Silva e van Gestel (2009), desde sua descrição esse solo tem sido usado em muitos outros testes de toxicidade com minhocas, enquitreídeos e colêmbolos. Os autores salientam ainda que, embora a extrapolação para condições de campo dos dados gerados com o solo artificial seja muitas vezes difícil, seu uso permanece amplo, devido à existência de grande base de dados para muitos xenobióticos, como agrotóxicos e metais, e à fácil interpretação e comparação de resultados.

Usualmente os efeitos de estressores químicos em organismos de solo têm sido avaliados em ensaios laboratoriais com uma única espécie e entre os que já estão internacionalmente padronizados podem ser citados aqueles estabelecidos pela INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO) para microrganismos (ISO 14240-1, 1997; ISO 14240-2, 1997b; ISO 15685, 2004; ISO/TS 10832, 2009); para plantas (ISO 11269-1, 1993b; ISO 11269-2, 2005); e para invertebrados, como os testes agudos, crônicos e de rejeição com minhocas *Eisenia fetida* e *Eisenia andrei* (ISO 11268-1, 1993a; ISO 11268-2, 1998a e ISO 17512-1, 2008) e os testes de toxicidade crônica com colêmbolos (*Folsomia candida*) e com enquitreídeos (*Enchytraeus* sp.) (ISO 11267, 1999; ISO 16387, 2004 – respectivamente).

Esses testes têm sua importância e utilidade para muitos propósitos, mesmo quando se considera a avaliação de áreas contaminadas, como o estabelecimento de valores limites para uma avaliação inicial desses locais (KUPERMAN et al., 2009). No entanto, seja para

avaliação de substâncias isoladas ou para a análise de risco de áreas contaminadas, a falta de relevância ecológica dos mesmos é um problema, pois a complexidade do ecossistema solo é grande e no laboratório as interações entre os organismos e seu ambiente não são consideradas.

Com intuito de obter dados com maior relevância ecológica, ensaios laboratoriais e de semi-campo (micro e mesocosmos) com múltiplas espécies têm sido propostos para transpor a lacuna entre os ensaios com espécies únicas em laboratório e estudos em condições de campo (EDWARDS, 2002). Microcosmos podem ser definidos como modelos de ecossistemas que são completamente confinados (sem troca de materiais ou indivíduos com o meio externo), mantidos em laboratório ou no campo e envolvendo parte ou toda a comunidade do solo. Mesocosmos são microcosmos mantidos em condições de campo e que permitem a troca de material (gases, nutrientes, água), mas que limitam a troca de indivíduos com uma barreira física (ODUM, 1984). A principal limitação dos microcosmos/mesocosmos é sua reprodutibilidade, o que poderia explicar porque não existem protocolos padronizados com esses métodos.

Recentemente tem sido dada atenção para desenvolver um teste padronizado com múltiplas espécies, para avaliação de risco ambiental, os chamados Modelos de Ecossistema Terrestre (*Terrestrial Model Ecosystems* – TMEs) (KNACKER et al., 2004), que são definidos como sistemas controláveis e reproduzíveis que tentam simular os processos e interações de componentes em uma porção do ambiente terrestre. Consistem em blocos de solo coletados em campo, incluindo a biota nativa, que são tratados com contaminantes sob condições controladas. Diferentes parâmetros podem ser avaliados neste tipo de teste, como abundância, biomassa e diversidade de vários grupos de organismos, de micróbios a minhocas. Em adição, parâmetros funcionais como taxa de alimentação (com uso de “bait-

lamina”) ou perda de massa em estudos de decomposição podem ser avaliados (KUPERMAN et al., 2009).

No entanto, nenhum ensaio de campo com múltiplas espécies está padronizado, com exceção do ISO 11268-3 (1998b), um protocolo para avaliar o efeito de poluentes sobre comunidades de minhocas.

Testes relacionados com avaliação dos efeitos de poluentes sobre processos do solo podem ser utilizados em laboratório, campo e semi-campo e são relativamente fáceis. Um exemplo é o “litter-bag” (PAULUS et al., 1999), que mede a decomposição natural de material orgânico. Este método tem sido criticado por impedir o contato do material orgânico com o solo contaminado, talvez criando um microclima favorável aos decompositores. Outro é o “bait lamina test” (ANDRÉ et al., 2009), que mede a taxa de consumo de alimento pela fauna do solo, consistindo de placas de plástico com buracos cheios com um substrato alimentar que permitem determinar numericamente a taxa de consumo de alimento.

Kuperman et al. (2009) salientam que o desafio atual da Ecotoxicologia Terrestre no que diz respeito à avaliação de áreas contaminadas é exatamente integrar os efeitos das propriedades físicas e químicas de solos naturais, as variações na diversidade e, conseqüentemente, na sensibilidade de espécies e as interações entre os organismos pertencentes a vários níveis tróficos e estruturais.

Da mesma forma, Römbke, Bauer e Marschner¹ (1996, apud Garcia, 2004, p. 5) salientam que a avaliação de risco de substâncias, como agrotóxicos, deve ser realizada em etapas com crescente relevância ecológica e complexidade. Os autores sugerem que sejam realizadas, em seqüência, as seguintes etapas: a) ensaios laboratoriais básicos, principalmente agudos; b) ensaios laboratoriais crônicos; c) ensaios envolvendo microcosmos ou mesmo em campo. Entretanto, há que se considerar os problemas relacionados à complexidade, custos e

¹ ROMBKE, J.; BAUER, C.; MARSCHNER, A. Hazard assessment of chemicals in soils: proposed ecotoxicological test strategy. *Environ. Sci. Pollut. Res.*, v.3, p.78-82, 1996.

demanda de tempo para realização dos ensaios da última etapa. Por outro lado, seja para avaliação de risco de locais contaminados ou de substâncias, um ponto importante a se considerar é que os resultados dos testes são dependentes das propriedades do solo, que afetam os organismos e a biodisponibilidade do contaminante.

Assim, a definição de solos de referência para serem usados como controle experimental ou como substrato para diluição em série de solos contaminados ainda é um desafio para a Ecotoxicologia Terrestre. A isto se associam a identificação de espécies relevantes para diferentes regiões geográficas, representando diferentes zonas ecológicas, níveis tróficos e grupos taxonômicos, bem como o desenvolvimento e maior refinamento de ensaios com multi-espécies (KUPERMAN et al., 2009).

1.4 A ECOTOXICOLOGIA TERRESTRE EM REGIÕES TROPICAIS

A despeito de algumas mudanças recentes (GARCIA, 2004; GARCIA et al., 2007, RÖMBKE; WAICHMAN; GARCIA, 2008, SILVA; VAN GESTEL, 2009) a Ecotoxicologia em geral e a Ecotoxicologia Terrestre, em particular, ainda têm o foco em regiões temperadas do mundo, como América do Norte e Europa. Desta forma, em relação a essas regiões, ainda não incipientes as informações sobre os impactos de poluentes obtidas em testes padronizados adaptados para condições tropicais.

Garcia (2004) salienta ainda que o mesmo ocorre quando se consideram os agrotóxicos e que frequentemente muitos dos dados utilizados na avaliação do risco ambiental desses produtos em países tropicais são gerados em regiões temperadas. O autor, por exemplo, estudando o efeito dos fungicidas benomil e carbendazim e do inseticida lambda-cialothrina sobre minhocas e artrópodos da Amazônia, verificou que, conforme o produto, o

comportamento e efeitos no solo podem ser diferentes em condições tropicais e temperadas. O autor ainda destaca a necessidade de maior cautela na extrapolação de dados ecotoxicológicos de regiões temperadas para condições tropicais e, portanto, de serem realizados testes padronizados para obter dados para essas últimas.

Entretanto, em muitos países tropicais, os protocolos internacionais, como os da ISO e OECD de ensaios ecotoxicológicos para organismos de solo, não estão em uso. Como exemplo, até recentemente o Artisol era o substrato recomendado em protocolos locais no Brasil (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, 1990; CETESB, 1990) e somente há 3 anos foi adotada no país a norma para condução de ensaios de toxicidade aguda com minhocas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT, 2007), em que o solo artificial, como preconizado pelos protocolos internacionais, é indicado.

A principal limitação do uso do solo artificial padrão em regiões tropicais é a dificuldade de obtenção do tipo de matéria orgânica (turfa de esfagno) sugerido no protocolo nº 207 da OECD (1984). Originalmente, este método foi descrito para a situação dos países de regiões temperadas, onde a turfa de esfagno podia ser facilmente obtida, sendo bastante utilizada como substrato para cultivo de flores e hortaliças. A crescente conscientização dos impactos aos ecossistemas de pântanos de onde são retiradas salienta a necessidade de busca de substratos mais ambientalmente aceitáveis (SILVA; VAN GESTEL, 2009).

Garcia (2004) sugere a substituição da turfa de esfagno por resíduo de fibra de coco ou pó de xaxim e Silva e Van Gestel (2009) sugerem o uso de pó de fibra de coco submetida à compostagem. Quaisquer que sejam os substitutos, a realização de testes com diferentes contaminantes e organismos é importante para que a validade dessas substituições seja comprovada e, em um segundo momento, para que comecem a ser estabelecidos bancos de dados ecotoxicológicos a partir de testes realizados nas condições tropicais.

Com relação à utilização de solos naturais, a mesma consideração sobre o desafio que isso representa para a Ecotoxicologia Terrestre em geral vale para as regiões tropicais.

1.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. NBR 15537. **Ecotoxicologia terrestre. Ecotoxicidade aguda. Método de ensaio para minhocas.** Rio de Janeiro: ABNT, 11p. 2007.

ASSOCIATION FRANÇAISE DE NORMALISATION – AFNOR. **Qualité des soils:** détermination de la toxicité d'une substance vis-à-vis des lombriciens (espèce *Eisenia fetida*). Method "Artisol". Norme NFX 31-250, Paris.

ANDRÉ, A.; ANTUNES, S. C.; GONÇALVES, F.; PEREIRA, R. Bait-lamina assay as a tool to assess the effects of metal contamination in the feeding activity of soil invertebrates within a uranium mine area. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 2368–2377, 2009.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (Eds. Téc.). **Métodos alternativos de controle fitossanitário.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. p. 79-95. 2003.

CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. Panorama sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. **Métodos alternativos de controle fitossanitário.** Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, 2003. p.13-51.

CHAIM, A.; CASTRO, V.L.; CORRALES, F.; GALVÃO, J.A.H.; CABRAL, O.M.R. Método para monitorar perdas de aplicação de agrotóxicos na cultura do tomate. **Pesquisa Agropecuária Brasileira.** Brasília, v. 34, n. 5, p. 741-747. 1999a.

CHAIM, A.; VALARINI, P.J.; OLIVEIRA, D.A.; MORSOLETO, R.V.; PIO, L.C. **Avaliação de perdas de pulverização em culturas de feijão e tomate.** Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 29 p. 1999b. (Boletim de Pesquisa, 2).

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. **Solo: teste de toxicidade com *Eisenia foetida* (minhoca): método de ensaio.** Norma Técnica L6.401. São Paulo: Cetesb. 13p. 1990.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. O gerenciamento de áreas contaminadas no estado de São Paulo. Disponível em: http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/texto_areas_cont_nov_09.pdf. Acesso em 20 ago. 2010.

CONSELHO ESTADUAL DE POLÍTICA AMBIENTAL – COPAM. Deliberação Normativa n. 116, 27 de junho de 2008. Dispõe sobre a declaração de informações relativas à identificação de áreas suspeitas de contaminação e contaminadas por substâncias químicas no

Estado de Minas Gerais. Disponível em: <http://www.siam.mg.gov.br/sla/download.pdf?idNorma=7974>. Acesso em 20 ago. 2010.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução n. 420, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas.

EDWARDS, C.A. Assessing the effects of environmental pollutants on soil organisms, communities, processes and ecosystems. **European Journal of Soil Biology**. v.38, p.225-231, 2002.

EIJSACKERS, H.; BENEKEC, P.; MABOETAC, M.; LOUWD, J.P.E.; REINECKEC, A.J. The implications of copper fungicide usage in vineyards for earthworm activity and resulting sustainable soil quality. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, p. 99-111, 2005.

FARIA, N. M. X.; FACCHINI, L. A.; FASSA, A. G.; TOMASI, E. Trabalho rural e intoxicações por agrotóxicos. **Cadernos de Saúde Pública**, v.20, n.5, p.1298-1308, 2004.

FAY, E. F.; SILVA, C. M. M. de S. Comportamento e destino de agrotóxicos no ambiente solo-água. In: SILVA, C. M. de S.; FAY, E. F. (Eds. Téc.). **Agrotóxicos e ambiente**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2004. p. 108-143.

FERRACINI, V.; PESSOA, M.C.Y.P.; SILVA, A.S.; SPADOTTO, C.A. Análise do risco de contaminação das águas subterrâneas superficiais da região de Petrolina (PE) e Juazeiro (BA). **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.11, p.1-16, 2001.

FERREIRA, C. R. P. T.; VEGRO, C. L. R.; CAMARGO, M. L. B. Defensivos agrícolas: expectativas de aumento de vendas em 2010. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, v. 5, n. 7, p. 1-5, 2010.

GARCIA, M. **Effects of pesticides on soil fauna: development of ecotoxicological test methods for tropical regions**. 2004. 291 f. Tese (Doutorado) – Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät, Universidade de Bonn.

GARCIA, M.; RÖMBKE, J.; BRITO, M. T.; SCHEFFCZYK, A. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. **Environmental Pollution**. v. 153, n.2, p. 450-456. 2007.

GEVAO, B.; JONES, K. C. (2002). Pesticides and persistent organic pollutants. In: HAYGARTH, P. M.; JARVIS, S. C. (Eds.). **Agriculture, hydrology and water quality**. London: CAB International. p. 83-106.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA – **Manual de Testes para Avaliação da Ecotoxicidade de Agentes Químicos**. Parte D.5.1 Avaliação de toxicidade para organismos do solo – minhocas. 1990.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11268-1. **Soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*)**. Part 1: Determination of acute toxicity using soil substrate. Geneva: ISO. 1993a.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11269-1. **Soil quality: determination of the effects of pollutants on soil flora**. Part 1: Method for the measurement of inhibition of root growth. Geneva: ISO. 1993b.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 14240-1. **Determination of soil microbial biomass**. Part 1: Substrate-induced respiration method.. Geneva: ISO. 1997.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 14240-1. **Determination of soil microbial biomass**. Part 2: Fumigation-extraction method. Geneva: ISO. 1997b.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11268-2. **Soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*)**. Part 2: Determination of effects on reproduction. Geneva: ISO. 1998a.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11268-3. **Soil quality: Effects of pollutants on earthworms**. Part 3: Guidance on the determination of effects in field situations. Geneva: ISO. 1998b.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11267. **Soil quality: Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants**. Geneva: ISO. 1999.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 16387. **Soil quality: Effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.)**: Determination of effects on reproduction and survival. Geneva: ISO. 2004.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11269-2. **Soil quality: determination of the effects of pollutants on soil flora**. Part 2: Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants. Geneva: ISO. 2005.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 17512-1. **Soil quality: avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals on behaviour**. Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). Geneva: ISO. 2008.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO/TS 10832. **Soil quality: effects of pollutants on mycorrhizal fungi: Spore germination test**. Geneva: ISO. 2009.

JENSEN, J.; DIAO, X.; SCOTT-FORDSMAND, J. J. Sub-lethal toxicity of the antiparasitic abamectin on earthworms and the application of neutral red retention time as a biomarker. **Chemosphere**, v. 68, p.744–750, 2007.

KNACKER, T.; VAN GESTEL, C. A. M.; JONES, S. E.; SOARES, A. M. V. M.; SCHALLNAß, H. J.; FÖSTER, B.; EDWARDS, C. A. Ring-testing and field-validation of a terrestrial model ecosystem (TME): an instrument for testing potentially harmful substances: conceptual approach and study design. **Ecotoxicology**, v. 13, p. 9-27. 2004.

KUPERMAN, R.G.; CHECKAI, R.T.; GARCIA, M.V.B.; RÖMBKE, J.; STEPHENSON, G.L.; SOUSA, J.P. State of science and the way forward for the ecotoxicological assessment of contaminated land. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.8, p.811-824, 2009

LANDGRAF, M.D.; MESSIAS, R.A.; REZENDE, M.O.O. **A importância ambiental da vermicompostagem: vantagens e aplicações**. São Carlos:RiMa, 2005. 106p.

LUKKARI, T.; AATSINKI, M.; VÄISÄNEN, A.; HAIMI J. Toxicity of copper and zinc assessed with three different earthworm tests. **Applied Soil Ecology**, v. 30 , p.133–146, 2005.

ODUM, E. P. **The mesocosm**. BioScience, v. 34, n. 9, 1984.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT –. OECD. **Guideline for testing of chemicals n. 207: Earthworm acute toxicity test**. Paris: OECD. 1984.

PAULUS, R.; RÖMBKE, J.; RUF, A.; BECK, L. Comparison of the litterbag, minicontainer and bait-lamina method in a field study with Dimilin and Btk. **Pedobiologia**, v. 43, p. 120-133, 1999.

PERES, F.; MOREIRA, J.C.; DUBOIS, G.S. Agrotóxicos, saúde e ambiente: uma introdução ao tema. In: PERES, F. & MOREIRA. **É veneno ou remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, 2003. p.21-41.

RAMOS, H. H. Perdas ligadas à má aplicação de agrotóxicos. In: **Simpósio Internacional de Tecnologia de Aplicação de Agrotóxicos: Eficiência, Economia e Preservação da Saúde Humana e do AMBIENTE**, 2., Jundiaí. Anais... Jundiaí, 2001. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/Centros/centro%20de%20engenharia%20e%20automação/sintag/anais.htm>>. Acesso em 9 jul. 2005.

RAND, G.M., PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and application**. London, Hemisphere Publishing Corporation, 666p. 1995.

RIBEIRO, R. de L. D. Resíduos de agrotóxicos e piretróides nos alimentos e sua relação com doenças no homem. O problema dos resíduos de agrotóxicos nos alimentos: um enfoque agrônômico, político e estratégico. 2001. Disponível em: <<http://www.planetaorganico.com.br/trablucen.htm>>. Acesso em: 22 set. 2009.

RODRIGUES, G. S. Agrotóxicos e contaminação ambiental no Brasil. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (Eds. Téc.). **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. p. 217-265.

RODRIGUES, S.M.; PEREIRA, M.E.; SILVA, E.F.; HURSTHOUSE, A.S.; DUARTE, A.C. A review of regulatory decisions for environmental protection: Part I - Challenges in the implementation of national soil policies. **Environment International**, v.35, p.202–213, 2009

RÖMBKE, J.; KNACKER, T. Standardisation of terrestrial ecotoxicological effect methods: an example of successful international co-operation. **Journal of Soils and Sediments**, v. 3, n. 4, p. 237-238, 2003.

RÖMBKE, J. WAICHMAN, A.V.; GARCIA, M.V.B. Risk assessment of pesticides for soil of the Central Amazon, Brasil: comparing outcomes with temperate and tropical data. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v.4, n.1, p.94-104, 2008.

SILVA, C.M. de S.; FAY, E.F. Agrotóxicos: aspectos gerais. In: SILVA, C.M. de S.; FAY, E.F. (Eds. Técns.). **Agrotóxicos e ambiente**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 2004. p.17-73.

SILVA, P.M.C.S. de; VAN GESTEL, C.,A.M. Development of an alternative artificial soil for earthworm toxicity testing in tropical countries. **Applied Soil Ecology**, v.43, n.2-3, p.170-174, 2009.

SPADOTTO, C. A. (2002) Screening method for assessing pesticide leaching potential. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v.12, p. 69-78.

SPURGEON, D. J.; WEEKS, J. M.; VAN GESTEL, C. A. M. A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology. **Pedobiologia**, v. 47, p. 588-606. 2003.

VERMEULEN, L. A.; REINECKE, A. J. ; REINECKE, S. A. Evaluation of the fungicide Manganese-Zinc Ethylene Bis(dithiocarbamate) (Mancozeb) for sublethal and acute toxicity to *Eisenia fetida* (Oligochaeta). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 48, p.183-189, 2001.

YEARDLEY, R. B.; LAZORCHAK, J. M.; GAST, L. C. The potential of an earthworm avoidance test for evaluation of hazardous waste sites. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, n. 9, p. 1532–1537, 1996.

ZAGATO, P.A. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos, RiMa. p.1-12. 2006.

CAPÍTULO 2

CONCEPÇÃO, HIPÓTESE E OBJETIVOS

2.1 CONCEPÇÃO DA PESQUISA

A utilização de agrotóxicos é crescente em todo o mundo, em função de seus benefícios para controlar pragas, doenças e plantas invasoras de cultivos agrícolas. No entanto, os mesmos constituem fonte de contaminação de organismos não-alvo devido a sua utilização intensiva e, por vezes, abusiva, implicando em danos estruturais e funcionais nos ecossistemas terrestres e em riscos a saúde humana.

No município de Bom Repouso (MG), localizado na região sudoeste de Minas Gerais, essa também é a realidade, uma vez que a atividade econômica principal é baseada na agricultura, com batata-inglesa e morango como os principais cultivos. De acordo com Brigante e Espíndola (2003), a região é rica em nascentes e as micro-bacias que integram o município são, via-de-regra, de primeira ou segunda ordem, compostas por pequenos corpos de água categorizados como de alto gradiente e baixo volume hídrico, muito suscetíveis aos impactos ambientais como o assoreamento e a entrada de agrotóxicos. Os processos de escoamento superficial daquela região são acelerados pela declividade natural e pela prática de aração sem curvas-de-nível. A aração geralmente é feita no sentido longitudinal do terreno, uma exigência que evita o tombamento do trator. Além disso, os autores salientam os impactos da demanda de água para irrigação, bem como as altas cargas de agrotóxicos e fertilizantes utilizadas nas culturas.

Essas características chamaram a atenção ao desenvolvimento de pesquisas na região, que visaram caracterizar os impactos sobre os recursos hídricos. Em relação a agrotóxicos, Brigante et al. (2003) mencionam a ocorrência de organoclorados como aldrin, trans-heptacloro e α -endosulfan em amostras de sedimentos coletadas nas nascentes dos rios Espirado, Mogi-Guaçu e do Peixe, todas localizadas em Bom Repouso. Em relação aos organofosforados, os autores verificaram a presença de paration etil e metil nos mesmos pontos.

Em estudo buscando avaliar os resíduos de agrotóxicos e metais em solos sob cultivo de batata-inglesa e morango no município de Bom Repouso, Rodrigues (2007) detectou a presença de aldrin, heptacloro e heptacloro epóxido em amostras de solo sob cultura de batata, e de aldrin, heptacloro epóxido e endosulfan-I nas amostras provenientes de cultura de morango. Mesmo em áreas de mata foram detectados resíduos de heptacloro, gama-BHC, aldrin, heptacloro epóxido, endosulfan II, endosulfan sulfato, paration, acefato e clorpirifós. Em ensaio utilizando percolado de solo sob cultura de batata, a autora também verificou a ocorrência de efeitos subletais em juvenis de *Danio rerio*, com os organismos expostos ao percolado apresentando comprimento significativamente menor em relação aos considerados controle, submetidos à água destilada. Alterações histopatológicas, em geral relacionadas à proliferação celular, dilatação de capilares, deslocamento de epitélio, aneurismas e fusão de lamelas, foram observadas nas brânquias dos organismos submetidos aos testes.

Resende (2009), em análise de amostras de água coletas em Bom Repouso em julho de 2008, verificou a presença de alfa-BHC, aldrin, alfa-endosulfan, clordano, endrin, gama-BHC, metacloro e dieldrin. Para o sedimento, a autora verificou a presença de abamectina em 3 pontos de amostragem.

Lima (2010) desenvolveu pesquisa de forma similar aos estudos de Rodrigues (2007), utilizando, no entanto, organismos terrestres (*Eisenia andrei*) para avaliação da contaminação

de solos cultivados com batata e morango, além de solos de mata. Os resultados obtidos pela autora não demonstraram riscos ambientais em função do uso de agrotóxicos mediante a utilização de testes agudos e crônicos com *E. andrei*, evidenciando efeitos negativos mais em relação aos testes comportamentais.

Os resultados apresentados por Lima (2010) foram desenvolvidos concomitantemente a esta pesquisa, integrando muitos dos resultados obtidos preliminarmente pela equipe dentro do escopo do Projeto Mogi-Guaçu, patrocinado pela Petrobras, no âmbito do Programa Petrobrás Ambiental (ESPINDOLA; BRIGANTE, 2009). Enfatiza-se, no entanto, que a maioria das pesquisas desenvolvidas no local tinha como foco principal o uso sustentável dos recursos hídricos (proposta do edital da Petrobras) e que, mediante as características locais (e todos os problemas detectados), optou-se em fazer a avaliação dos riscos associados ao uso de agrotóxico por meio de testes ecotoxicológicos.

De acordo com Römcke e Garcia (2000) e Garcia (2004), em relação ao ambiente aquático, pouco é sabido sobre efeitos ecotoxicológicos de agrotóxicos em ambiente terrestre e a maioria dos trabalhos realizados diz respeito a produtos antigos e com base em testes não padronizados, sendo escassas as informações sobre produtos atualmente utilizados. Frequentemente, as informações usadas na avaliação de risco em países tropicais são geradas na América do Norte ou na Europa, exigindo uma extrapolação de dados de regiões temperadas para tropicais que pode levar a resultados errôneos.

Römcke, Waichman e Garcia (2008) também salientam que a avaliação de risco ecológico para solos tropicais é extremamente afetada pela existência de poucos dados sobre o comportamento desses produtos no solo e, de forma mais pronunciada, de dados sobre seus efeitos nos organismos, para essas regiões. Desta forma, a realização de estudos e desenvolvimento de novas ferramentas para avaliar impactos diretos e indiretos de

agrotóxicos sobre comunidades edáficas, em condições tropicais, tornam-se cada vez mais necessários.

Nesse sentido, Garcia (2004) propôs modificações nas metodologias descritas para a realização de testes ecotoxicológicos para o ambiente terrestre, de modo a adaptá-las às condições tropicais, as quais foram utilizadas no presente estudo.

2.2 HIPÓTESE

Diante do exposto, o presente estudo pretendeu comprovar a hipótese de que agrotóxicos atualmente utilizados nos cultivos de batata e morango no município de Bom Repouso afetam negativamente a comunidade edáfica, podendo levar à instabilidade do solo como ecossistema.

2.3 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar os efeitos ecotoxicológicos da pulverização de agrotóxicos em culturas de morango e batata-inglesa de Bom Repouso (MG), sobre a biota do solo, utilizando, para tal finalidade, um produto representativo daqueles utilizados atualmente por produtores locais, procurando-se identificar os riscos ambientais e subsidiar medidas efetivas para o controle do uso de agrotóxicos, visando à sustentabilidade da produção agrícola no município.

2.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Levantar informações sobre o uso de agrotóxicos no município de Bom Repouso e das características dos produtos mais citados pelos produtores locais, de modo a permitir a escolha de um produto representativo e ecotoxicologicamente relevante para ser utilizado nos testes;
- b) Verificar efeitos diretos do agrotóxico selecionado sobre minhocas da espécie *Eisenia andrei*, por meio dos parâmetros mortalidade, reprodução e peso corporal de adultos, avaliados com testes de toxicidade aguda e de reprodução;
- c) Verificar efeitos sobre o comportamento dos organismos, por meio de testes de rejeição;
- d) Verificar os efeitos sobre comunidades do solo, por meio da exposição de organismos retirados de um solo natural a solo contendo o agrotóxico, em condições de laboratório.

2.5 CONFIGURAÇÃO DA APRESENTAÇÃO DA TESE

A estrutura desta tese foi configurada no formato de artigos científicos, apresentados em capítulos específicos. Em cada capítulo (excetuando-se os capítulos 1, 2 e 7) foram incluídos os itens resumo, introdução, embasamento teórico, objetivos, materiais e métodos, discussão, considerações e conclusões sobre os resultados obtidos, além das referências bibliográficas, as quais seguiram as normas recomendadas para apresentação de teses e dissertações da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo.

Salienta-se que, neste formato de apresentação, muitas vezes foi inevitável a repetição de algumas informações para que cada artigo pudesse ter todas as informações necessárias.

Desta forma, estruturou-se a tese em 4 artigos científicos, além dos capítulos 1, 2 e 7, relacionados à introdução geral ao tema da pesquisa, com um embasamento em dados de literatura sobre a questão do uso de agrotóxicos e a contaminação do solo, bem como da abordagem ecotoxicológica para analisar os efeitos da introdução no ambiente desses poluentes (**Capítulo 1**); à concepção, hipótese e objetivos da pesquisa, bem como a configuração da estrutura da tese apresentada (**Capítulo 2**) e às considerações finais sobre os estudos realizados e resultados obtidos, bem como a conclusão final sobre o desenvolvimento da pesquisa (**Capítulo 7**).

Nos demais capítulos (3, 4, 5 e 6), procurou-se descrever sobre o resultado do levantamento de informações sobre o uso de agrotóxicos em Bom Repouso, MG, e o risco de contaminação do solo (**Capítulo 3**); os efeitos agudos e crônicos do agrotóxico mais citado pelos produtores locais sobre uma espécie de minhoca (*Eisenia andrei*), padrão para testes ecotoxicológicos com organismos de solo (**Capítulo 4**); as respostas comportamentais da mesma espécie de minhoca à presença do agrotóxico no solo, em concentrações subletais (**Capítulo 5**) e os efeitos do agrotóxico sobre a estrutura de uma comunidade natural do solo, exposta a solo contaminado, em condições de laboratório (**Capítulo 6**).

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRIGANTE, J. ESPÍNDOLA, E. L. G. (Eds.) **Limnologia Fluvial**: um estudo no rio Mogi-Guaçu. São Carlos: RiMa Editora, 2003. 255 p.

BRIGANTE, J.; MERENGO, M. C.; ESPINDOLA, E. L. G.; VIEIRA. Praguicidas no sedimento do rio Mogi-Guaçu. In: BRIGANTE, J.; ESPINDOLA, E. L. G. (Eds.) **Limnologia Fluvial**: Um estudo no Rio Mogi-Guaçu. São Carlos: RiMa Editora, 2003. cap. 7. p. 121-128.

ESPÍNDOLA, E.L.G.; BRIGANTE, J. (Orgs.). **Projeto Mogi-Guaçu**: desenvolvendo ações socioambientais. São Carlos: Rima, 2009. 382 p.

GARCIA, M. **Effects of pesticides on soil fauna**: development of ecotoxicological test methods for tropical regions. 2004, 291 f. Tese (Doutorado) – Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät, Universidade de Bonn.

LIMA, N. C. **Avaliação do impacto da contaminação do solo de áreas agrícolas de Bom Repouso (MG) por meio de ensaios ecotoxicológicos**. 2010. 124 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

RESENDE, J. **Avaliação das águas de abastecimento da área rural do município de Bom Repouso, MG**. 2009. 130 f. Monografia do curso de Graduação em Engenharia Ambiental - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

RODRIGUES, B. K. **Avaliação dos impactos de agrotóxicos na região do Alto Mogi-Guaçu (MG) por meio de ensaios laboratoriais com Danio rerio (CYPRINIDAE, CYPRINIFORMES)**. 2007. 148 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

RÖMBKE, J. WAICHMAN, A.V.; GARCIA, M.V.B. Risk assessment of pesticides for soil of the Central Amazon, Brasil: comparing outcomes with temperate and tropical data. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v.4, n.1, p.94-104, 2008.

RÖMBKE, J.; GARCIA, M. Assessment of ecotoxicological effects of pesticides on the soil fauna and soil processes under tropical conditions. In: LIEBEREI, R.; BIANCHI, H-K.; BOEHM, V.; REISDORFF, C. (Eds.). **GERMAN-BRAZILIAN WORKSHOP ON NEOTROPICAL ECOSYSTEMS: ACHIEVEMENTS AND PROSPECTS OF COOPERATIVE RESEARCH**. Hamburg, 2000. p. 543-548.

CAPÍTULO 3

USO DE AGROTÓXICOS NO MUNICÍPIO DE BOM REPOUSO, MINAS GERAIS, BRASIL E RISCO DE CONTAMINAÇÃO DO SOLO

3.1. RESUMO

Considerando a característica essencialmente agrícola de Bom Repouso, MG, Brasil, com batata-inglesa e morango como principais culturas, este estudo objetivou caracterizar as atividades agrícolas no município. Utilizando-se questionários estruturados, as informações foram levantadas, por meio de entrevistas com produtores rurais e suas famílias, com destaque à utilização de agrotóxicos. As entrevistas evidenciaram utilização intensiva e inadequada de agrotóxicos e a aplicação de produtos de alta periculosidade ambiental e toxicológica, caracterizando potencial alto de risco ambiental, o que é agravado pelas características topográficas e pluviométricas da região. O Quociente de Risco para o solo do agrotóxico mais citado pelos produtores foi calculado, com base na Concentração Ambiental Estimada (CAE) considerando propriedades do solo, características do produto e taxas de aplicação. Comparou-se o valor obtido de CAE com Concentração Letal Mediana, aos 14 dias ($CL_{50,14\text{dias}}$) para minhocas, obtida em ensaios adaptados às condições tropicais. Em 3 cenários que consideraram taxas reais de aplicação do produto, com base nas informações fornecidas pelos entrevistados, o risco potencial crônico para organismos do solo foi identificado. Os dados obtidos no presente estudo são importantes subsídios para futuras avaliações de risco ecológico.

Palavras-chave: Atividades agrícolas, diagnóstico, avaliação de risco, solo, abamectina.

3.2 INTRODUÇÃO

A degradação do solo por fatores antropogênicos é alarmante e a necessidade de sua proteção, bem como das comunidades a ele inerentes, tem se tornado objeto principal de políticas ambientais no mundo todo. Na Europa, nos últimos 20-30 anos, políticas de proteção do solo, incluindo a prevenção e a remediação de áreas contaminadas, têm sido desenvolvidas e colocadas em prática. Uma ampla revisão sobre decisões regulatórias para áreas contaminadas para diversos países é apresentada por Rodrigues et al. (2009). Recentemente também foi aprovada no Brasil resolução que estabelece as diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA, 2009).

Dentre as principais fontes antrópicas de contaminação do solo estão incluídas as aplicações de agrotóxicos, fertilizantes e outros materiais agrícolas, cuja intensificação no uso acompanhou o crescimento tanto em produtividade como em área cultivada da agricultura mundial, ao longo dos anos (ARMAS et al., 2005). No Brasil, o cenário não é diferente, o que levou o país a se estabelecer como um dos maiores mercados mundiais de agrotóxicos (RODRIGUES, 2003). Em 2008, segundo dados do Sindicato Nacional das Indústrias de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG), o país passou a ser o maior mercado mundial consumidor de agrotóxicos. Em 2009, houve um acréscimo de 7,7% nas quantidades totais comercializadas, em relação a 2008 e nos cinco primeiros meses de 2010, estimou-se um aumento de 5% nas vendas brasileiras em relação ao mesmo período de 2009 (FERREIRA; VEGRO; CAMARGO, 2010).

Os agrotóxicos representam uma pequena parcela dos poluentes totais, porém, não se deve ter complacência com seu uso indiscriminado, pois estes produtos são venenos, podendo ter impactos consideráveis no ambiente, mesmo estando em baixas concentrações (SILVA;

FAY, 2004). Problemas associados ao uso intensivo de agrotóxicos na agricultura envolvem a contaminação de solo, água, ar, animais e alimentos; a intoxicação de agricultores; a ocorrência de patógenos, pragas e plantas invasoras com resistência a determinados produtos; o desequilíbrio biológico que altera a ciclagem de nutrientes e da matéria orgânica; a eliminação de organismos benéficos e a redução da biodiversidade (BETTIOL; GHINI, 2003; GHINI; KIMATI, 2000; OMOTO, 2009; VIEIRA, 2004).

Diferentes causas podem levar a perda de agrotóxicos no campo, as quais estão relacionadas à tecnologia de aplicação, como a rotação inadequada do equipamento, que prejudica a agitação e a segregação dos produtos com formulação do tipo pó-molhável e a inadequação do tamanho das gotas à operação de pulverização, que potencializa as perdas por evaporação, deriva ou vazamentos (RAMOS, 2001); ou relacionadas ao momento da aplicação, como pulverizações baseadas em calendários pré-fixados e não na ocorrência de problemas com pragas ou doenças (BETTIOL; GHINI, 2003).

Os efeitos ambientais dos agrotóxicos são, em geral, agravados por problemas relacionados à tecnologia de aplicação desses produtos, que levam a perdas para o ambiente de boa parte das caldas aplicadas às culturas, com conseqüente poluição de águas e solos que não eram alvo das aplicações (RAMOS, 2001). Estima-se que 90% não atingem o alvo, sendo dissipados para o ambiente e tendo como ponto final reservatórios de água e, principalmente, o solo (BETTIOL; GHINI, 2003). Para compensar a baixa eficiência das aplicações, os agricultores fazem pulverizações repetidas, o que aumenta os custos de produção e o potencial de impactos ao ambiente. Os volumes de calda de agrotóxicos utilizados por área também são bastante elevados, o que aumenta o potencial de perda e, conseqüentemente, de impacto ambiental. No cultivo de morango, por exemplo, apesar do baixo porte da cultura, os volumes de caldas variam de 680 a 5700 L/ha, com maior freqüência na faixa de 1000 a 1600 L/ha, com 2 a 3 aplicações semanais durante o ciclo da cultura (RAMOS, 2001).

De acordo com Soares, Almeida e Moro (2003), ainda há muito a ser feito para reduzir possíveis danos ambientais provocados pela má utilização de agrotóxicos, em função do comumente baixo nível educacional e de conscientização da população rural em relação a isso, associado às dificuldades na fiscalização e controle de sua utilização, bem como para a implementação de ações abrangentes de orientação a usuários e comerciantes.

A avaliação de risco é uma importante ferramenta que pode ser utilizada para determinar em que nível a integridade de um ecossistema pode ser perturbada por diferentes estressores, como os agrotóxicos, e fornecer suporte para tomadas de decisões que visem mitigar o problema. Segundo Waichman (2008), embora por razões práticas as ferramentas e os métodos de avaliação internacionalmente utilizados para avaliar riscos para a saúde humana tenham sido desenvolvidos independentemente daqueles utilizados para a avaliação de riscos ambientais, atualmente se propõe uma abordagem integrada. Da mesma forma, há controvérsias quanto ao uso das expressões “avaliação de risco ambiental” e “avaliação de risco ecológico (ARE)” como sinônimos e em relação à inclusão de aspectos relacionados à saúde humana (SPADOTTO, 2006).

A estrutura geral de uma ARE adotada atualmente é derivada das recomendações da Agência Americana de Proteção Ambiental (*U. S. Environmental Protection Agency - USEPA*) (EHRlich, 1988) e de Sutter II et al. (2003), e consiste em 3 etapas ou fases: formulação do problema, avaliação da exposição e caracterização do risco. Na primeira fase (formulação do problema) são discutidos os objetivos, as limitações e levantados os riscos potenciais com base em informações pré-existentes, fornecendo subsídios para a realização da avaliação da exposição.

Dentro deste contexto, objetivou-se fazer uma caracterização da atividade agrícola do município de Bom Repouso, Minas Gerais, notadamente em relação à utilização de agrotóxicos, e discutir seu potencial risco ambiental, em particular para o compartimento solo.

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Área de estudo

O município de Bom Repouso (MG) está localizado a sudoeste do estado de Minas Gerais (Figura 3.1.), com latitude $22^{\circ} 28' 15''$ S e longitude $46^{\circ} 08' 42''$ O. Seu clima é tropical de altitude Cwb, com pluviosidade média de 1500 mm, segundo a classificação de Köppen. É uma área rica em nascentes, incluindo a do rio Mogi-Guaçu. Os domínios fitoecológicos são formados, basicamente, por Mata Atlântica, intercalada com agrupamentos de araucárias. Porém, a região já se apresenta bastante devastada, em função da exploração da madeira e do uso de áreas para atividades agrícolas, além da pecuária e criação de pequenos animais. O município destaca-se pela produção de batata-inglesa e morango (ESPÍNDOLA; BRIGANTE; ELER, 2003).

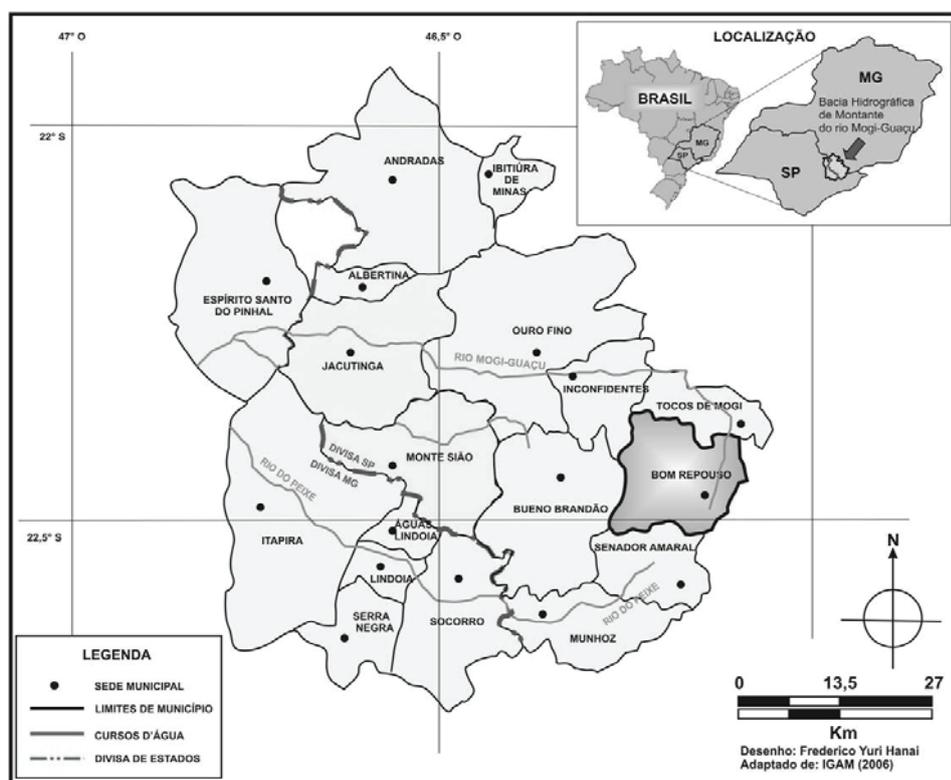


Figura 3.1 Localização do município de Bom Repouso, MG.

3.3.2 Caracterização das atividades agrícolas no município

Essa caracterização fez parte das atividades desenvolvidas pelo Núcleo de Agrotóxicos/Agricultura Alternativa do Projeto Mogi-Guaçu, patrocinado pelo Programa Petrobras Ambiental, e que teve como área de atuação a bacia de montante do Rio Mogi-Guaçu, com maior parte das atuações no município de Bom Repouso. Foram visitadas, entre abril e julho de 2005, 166 propriedades em 21 bairros do município. Por meio de entrevistas com os produtores e suas famílias, com aplicação de questionários padronizados (Apêndice A), foram levantadas informações sobre a escolaridade dos mesmos, estrutura agrária dos estabelecimentos, produtos cultivados, pragas e doenças mais comuns nas culturas, agrotóxicos mais utilizados e forma de utilização dos mesmos, jornada de trabalho, utilização de equipamentos de proteção durante o manuseio e aplicação dos agrotóxicos, conhecimento dos produtores sobre período de carência dos agrotóxicos utilizados, tríplice lavagem, assistência recebida e casos de intoxicações por agrotóxicos.

3.3.3 Estimativa do risco para solo do agrotóxico mais citado

O risco para abamectina (ingrediente ativo de Vertimec[®] 18EC) foi estimado pela Razão Toxicidade/Exposição (*Toxicity Exposure Ratio* – TER), em que o dado toxicológico agudo ou crônico é dividido pela Concentração Ambiental Estimada (CAE). Foi considerado o valor da $CL_{50,14\text{dias}}$ para minhocas (8,41 mg de abamectina/kg de solo) considerando todas as concentrações testadas em ensaios realizados com solo artificial tropical (ver Capítulo 4 desta tese).

A CAE foi calculada com o modelo FOCUS (FOCUS Soil Modeling Work Group, 1997) e para cada aplicação o valor foi estimado considerando as taxas de aplicação, a

profundidade e a densidade do solo. Para múltiplas aplicações, o cálculo envolveu as mesmas informações, mais a CAE inicial para 1 aplicação, a constante de dissipação do agrotóxico e os números de aplicações e o intervalo entre elas (dias).

Os dados de taxa de aplicação (g do ingrediente ativo/ha) foram calculados considerando 2 cenários: o pior, com a maior dose recomendada no Brasil para a cultura do morango (75 ml de Vertimec/100L de água), com aplicação de um volume de calda de 1250 L/ha; e um menos drástico, ou seja, a menor dose recomendada (50 ml/100 L de água e 1000 L de calda/ha).

Em relação ao número de aplicações e intervalo entre elas, considerou-se a recomendação para a cultura do morango e as informações fornecidas pelos produtores entrevistados em Bom Repouso.

O dado de taxa de dissipação do produto (28 dias, para condições tropicais) foi obtido em literatura (RÖMBKE; WAICHMAN; GARCIA, 2008), bem como os de densidade do solo (ROCHA, 2009).

O Quociente de Risco (QR) obtido foi então comparado a valores críticos, tendo sido utilizados aqueles propostos pela União Europeia: 10 para dados de toxicidade aguda e 5 para dados de toxicidade crônica (ROMBKE; WAICHMAN; GARCIA, 2008).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No levantamento realizado em 2005, junto aos produtores rurais do município de Bom Repouso, MG, verificou-se que os principais cultivos comerciais são de morango e batata-inglesa, com alho, mandioquinha-salsa e ervilha sendo cultivados em menor escala. Feijão e milho são culturas de subsistência presentes em quase todas as propriedades e em algumas há o cultivo de cana-de-açúcar, utilizada junto com o milho na alimentação animal.

Os cultivos de morango e batata-inglesa caracterizam-se pelo uso intensivo de agrotóxicos e o fato de serem praticados em áreas de grande declividade (Figura 3.2), que são características no município, estabelecido em uma região montanhosa, amplia o potencial de risco sobre o meio ambiente devido ao uso de agrotóxicos. Associadas à grande quantidade de chuvas que ocorrem nos pontos mais elevados, as características físicas do município permitem um maior escoamento superficial e, assim, favorecem que os agrotóxicos possam ser espalhados para além dos alvos das aplicações.



(a)



(b)

Figura 3.2 a) Áreas de cultivo de morango; b) Áreas de cultivo de batata: preparada para o plantio (esquerda) e com cultura em início de desenvolvimento (direita). Fotos: Acervo fotográfico do Projeto Mogi-Guaçu (2005).

3.4.1 Perfil socioeconômico dos produtores e sua influência na utilização de agrotóxicos

Verificou-se que a estrutura fundiária de Bom Repouso era baseada em pequenas propriedades rurais, com a mão-de-obra quase exclusivamente familiar.

Soares, Almeida e Moro (2003), em estudo que caracterizou o trabalho rural em nove municípios de Minas Gerais, mostram que trabalhadores rurais sujeitos a maior risco de intoxicação foram os de municípios com propriedades que apresentavam as menores áreas médias. A média de escolaridade encontrada nos municípios analisados era de aproximadamente 3,35 anos, com 87,5% dos entrevistados possuindo apenas o Ensino Fundamental incompleto.

De forma similar, o grau de escolaridade de produtores rurais em Bom Repouso (Tabela 3.1) é baixo, uma vez que a maioria (57,8%) cursou no máximo até a quarta série do Ensino Fundamental ou sem nenhuma instrução formal (11,56%).

Tabela 3.1 Nível de escolaridade de produtores do município de Bom Repouso, MG, com base em entrevistas realizadas no ano de 2005.

Nível de Escolaridade	%
1 ^a a 4 ^a séries do Ensino Fundamental incompletas	32,37
1 ^a a 4 ^a séries do Ensino Fundamental completas	25,43
Nenhuma instrução formal	11,56
Ensino Médio completo	9,25
5 ^a a 8 ^a séries do Ensino Fundamental incompletas	7,51
5 ^a a 8 ^a séries do Ensino Fundamental completas	7,51
Não responderam	4,05
Ensino Médio incompleto	1,16
Curso Superior Completo	0,58
Curso Técnico Completo	0,58

Associados à baixa escolaridade, outros fatores contribuem para o aumento no risco de contaminação ambiental por agrotóxicos, por influenciarem a adoção de práticas inadequadas, como: pulverizações constantes com agrotóxicos, seguindo calendário pré-definido e não tendo

por base a real necessidade de controle de pragas ou doenças, e queima, enterro ou abandono das embalagens vazias de agrotóxicos em área próximo à lavoura ou aos cursos d'água.

A renda da maioria da população rural do município é baixa, de até um salário mínimo, e advinda principalmente de aposentadorias e de trabalhos em lavoura própria ou pela prestação de serviço a outros produtores.

O acesso à assistência técnica é precário, sendo que 40% dos entrevistados responderam não receber qualquer orientação. Isso se confirma quando se analisa os dados relacionados a orientação sobre uso correto e seguro de agrotóxicos. Para a pergunta “*Com quem aprendeu a trabalhar com agrotóxicos*”, a maioria (53%) respondeu que com outro agricultor ou familiares (Figura 3.3). Com isso, acabam se perpetuando formas errôneas de utilização desses produtos e, conseqüentemente, aumentando os riscos potenciais à saúde desses agricultores e ao meio ambiente.

Além disso, mesmo entre aqueles que disseram ter acesso a informações sobre práticas adequadas de manejo das culturas e/ou de uso correto e seguro de agrotóxicos por vias diversas (extensionistas, televisão, entre outras fontes), percebeu-se que, muitas vezes, essas não têm sentido prático para eles.

A baixa escolaridade, em contraponto ao nível técnico das informações, impossibilita uma compreensão real dos efeitos negativos que o uso inadequado desses produtos podem causar a sua saúde, do meio ambiente e dos consumidores. Um agravante é que muitos dos entrevistados mencionaram que os produtos utilizados nas culturas não se alteram ao longo dos anos e, então, consideram que não há necessidade de receberem orientação de técnicos especializados, ou mesmo que estes façam visitas às propriedades para dar assistência. Afirmam o mesmo em relação à necessidade do Receituário Agrônômico para aquisição de agrotóxicos.

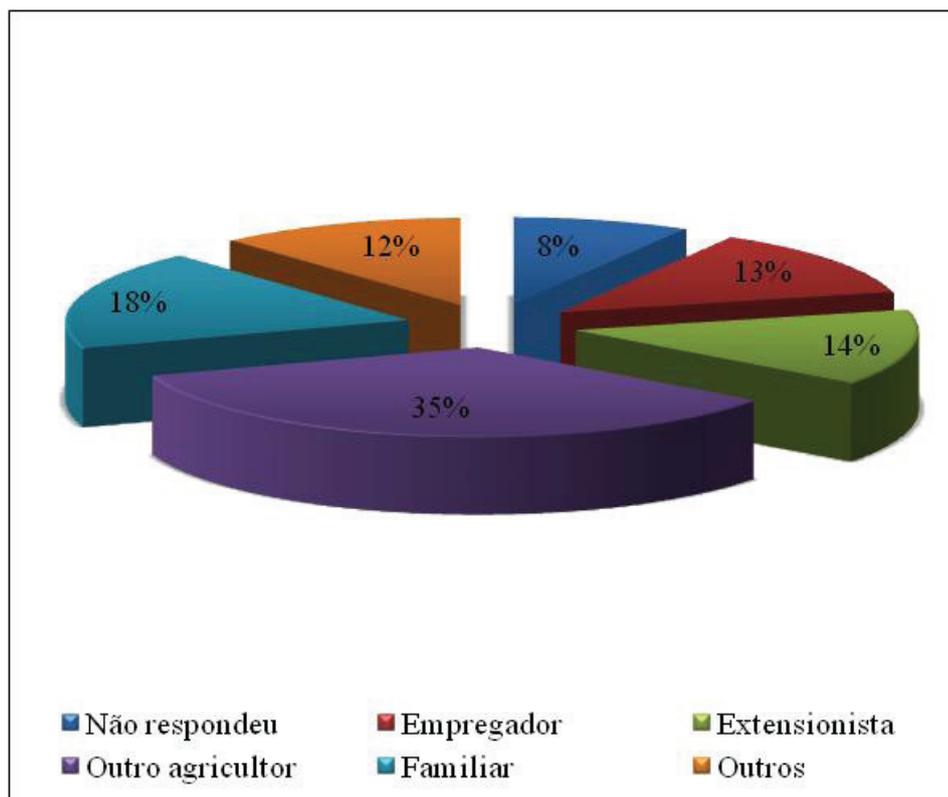


Figura 3.3 Respostas dos agricultores de Bom Repouso, MG à pergunta “Com quem aprendeu a trabalhar com agrotóxicos?”, em entrevista realizada em 2005.

O quadro de deficiência de formação se refletiu também nas respostas dos agricultores em relação ao grau de toxicidade e período de carência dos produtos. Para a pergunta sobre quais as cores das faixas dos rótulos de produtos que caracterizam o maior grau de perigo, as seguintes respostas foram dadas: 55,8% disseram ser a faixa vermelha a que representa maior perigo; 29,8% disseram não saber; 7,2% não responderam; 5% informaram ser a amarela; e 2,2%, a azul ou a verde.

Embora a maioria tenha informado, corretamente, ser a faixa vermelha a que indica maior grau de toxicidade do produto, um alto índice (37%) representou os que disseram não saber ou que evitaram responder, talvez até porque não soubessem. Isso ocorre porque o percentual de indivíduos que lê os rótulos das embalagens e o compreendem é restrito, o que pode ser explicado pelos níveis de escolaridade encontrados na comunidade.

Quanto ao período de carência dos produtos, apesar de responderem que sabem o que é e o respeitem, quando a pergunta é direta, no decorrer da entrevista acabam por relatar que a aplicação é constante, em todo o ciclo de cultivo. Para a cultura de morango, por exemplo, em que a colheita se estende por vários meses, muitos dos entrevistados relataram não fazer aplicações apenas no dia em que os frutos são colhidos. Ou, ainda mais preocupante, como muitos dos pequenos produtores locais compartilham pequenas áreas para o cultivo, foi comum verificarmos que um produtor fazia a colheita em sua área, enquanto na adjacente, outro pulverizava suas plantas. Mal orientados, julgam que, à medida que não estejam fazendo pulverizações, sua cultura está isenta de agrotóxicos, mesmo que ao lado esteja havendo aplicação.

Os produtores citaram 83 diferentes produtos comerciais como sendo utilizados nas culturas de morango e batata. Destes, a maior parte (60%) é de fungicidas, seguidos por acaricidas (20%) e inseticidas (12%). Isso está relacionado ao fato de que as doenças causadas por fungos e os ataques por ácaros serem os problemas mais comuns relatados pelos produtores de morango, maioria entre os entrevistados.

A Tabela 3.2 apresenta os 25 produtos mais citados. De acordo com o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (Agrofit), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, em relação à periculosidade ambiental (Figura 3.4), 57% deles são considerados muito perigosos (Classe II); 30%, perigosos (Classe III); e 13%, altamente perigosos (Classe I).

Quanto à classificação toxicológica, a maioria (40%) pertence à classe III (faixa azul), considerados medianamente tóxicos. Em segundo lugar (28%) estão os produtos de classe II (faixa amarela), considerados altamente tóxicos, seguindo-se os de classe IV (faixa verde), pouco tóxicos, com 24%, e por último (8%) os de classe I (faixa vermelha), extremamente tóxicos (Figura 3.5).

Tabela 3.2. Produtos comerciais, número de vezes em que foram citados, princípios ativos, tipos e classificações toxicológica e quanto à periculosidade ambiental dos produtos mais citados pelos produtores de Bom Repouso, MG, 2005.

Nome Comercial	Número de vezes que foi citados	Princípio Ativo	Tipo	Classe Toxicológica	Cor	Periculosidade ambiental
Vertimec	84	Abamectina (Avermectina)	Acaricida/ Inseticida	III – Produto Medianamente Tóxico	Azul	II – Produto Muito Perigoso Altamente Persistente
Amistar	69	Azoxistrobina (Estróbilurina)	Fungicida	IV – Produto Pouco Tóxico	Verde	III – Produto Perigoso
Score	33	Difenoconazol (Triazol)	Fungicida	I – Produto Extremamente Tóxico	Vermelha	II – Produto Muito Perigoso Altamente Persistente
Gramoxone	32	Dicloreto de Paraquate (Bipiridílio)	Herbicida	II – Produto Altamente Tóxico	Amarela	II – Produto Muito Perigoso Altamente Persistente
Cercobin	29	Tiofanato-Metílico (Benzimidazol)	Fungicida	IV – Produto Pouco Tóxico	Verde	III – Produto Perigoso Altamente Persistente
Manzate	26	Mancozebe (Alquilenobis (Ditiocarbamato))	Acaricida/ Fungicida	III – Produto Medianamente Tóxico	Azul	Em adequação à lei 7.082/89 Baixa Persistência
Frownice	24	Fluazinam (Fenilpiridilamina)	Acaricida/ Fungicida	II – Produto Altamente Tóxico	Amarela	I – Produto Altamente Perigoso Altamente Persistente
Dithane	20	Mancozebe (Alquilenobis (Ditiocarbamato))	Acaricida/ Fungicida	III – Produto Medianamente Tóxico	Azul	II – Produto Muito Perigoso
Curzate	19	Cimoxamil (Acetamida) e Mancozebe (Alquilenobis (Ditiocarbamato))	Fungicida	III – Produto Medianamente Tóxico	Azul	III – Produto Perigoso
Roundup	19	Glifosato (Glicina substituída)	Herbicida	IV – Produto Pouco Tóxico	Azul	III – Produto Perigoso
Orthocide	18	Capitana (Dicarboximida)	Fungicida	III – Produto Medianamente Tóxico	Azul	Em adequação à lei 7.082/89
Stalex	17	Procloraz (Dicarboximida)	Fungicida	II – Produto Altamente Tóxico	Amarela	II – Produto Muito Perigoso Altamente Persistente
Bravonil	13	Clorotalomil (Isoflonitrila)	Fungicida	II – Produto Altamente Tóxico	Vermelha	II – Produto Muito Perigoso Altamente persistente
Ridomil	13	Metalaxil-M (Acilalaminato) e Mancozebe (Alquilenobis (Ditiocarbamato))	Fungicida	III – Produto Medianamente Tóxico	Azul	II – Produto Muito Perigoso Altamente persistente
Folpan Agricur	11	Folpete (Dicarboximida)	Fungicida	IV – Produto Pouco Tóxico	Verde	III – Produto Perigoso
Decis	10	Deltametrina (Piretróide)	Inseticida	III – Produto Medianamente Tóxico	Azul	I – Produto Altamente Perigoso Altamente Bioconcentrável
Rovral	10	Iprodiona (Dicarboximida)	Fungicida	IV – Produto Pouco Tóxico	Verde	II – Produto Muito Perigoso
Tamaron	8	Metamidofos (Organofosforado)	Acaricida/ Inseticida	II – Produto Altamente Tóxico	Amarela	II – Produto Muito Perigoso
Derosal	6	Carbendazim (Benzimidazol)	Fungicida	III – Produto Medianamente Tóxico	Azul	III – Produto Perigoso Altamente Persistente
Folicur	6	Tebuconazol (Triazol)	Fungicida	III – Produto Medianamente Tóxico	Azul	II – Produto Muito Perigoso
Manage	6	Imibenconazol (Triazol)	Fungicida	II – Produto Altamente Tóxico	Amarela	II – Produto Muito Perigoso Altamente Persistente
Sportak	6	Procloraz (Imidazolilcarboxamida)	Fungicida	I – Produto Extremamente Tóxico	Vermelha	II – Produto Muito Perigoso Altamente Persistente
Astro	5	Clorpirifós (Organofosforado)	Inseticida	III – Produto Medianamente Tóxico	Azul	II – Produto Muito Perigoso Altamente Bioconcentrável
Karate	4	Lambda-Cialotrina (Piretróide)	Inseticida	II – Produto Altamente Tóxico	Amarela	I – Produto Altamente Perigoso
Fungiscan	4	Tiofanato-Metílico (Benzimidazol)	Fungicida	IV – Produto Pouco Tóxico	Verde	III – Produto Perigoso

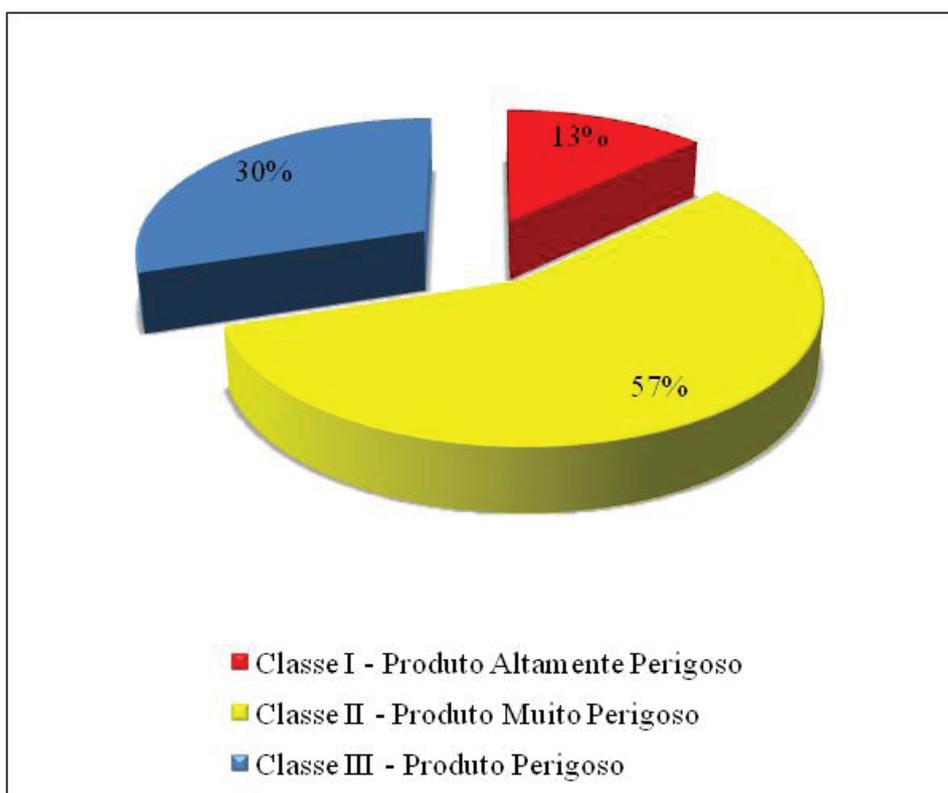


Figura 3.4. Periculosidade ambiental dos agrotóxicos mais citados pelos produtores rurais de Bom Repouso, MG, em 2005.

O produto mais citado, Vertimec[®] 18 EC, tem classificação toxicológica III – “medianamente tóxico” e, em relação à periculosidade ambiental, é enquadrado como classe II – muito perigoso ao meio ambiente. Caracteriza-se, ainda, como altamente persistente no meio ambiente e extremamente tóxico para microcrustáceos e peixes.

Os dados das entrevistas também evidenciaram que os produtores do município fazem pulverizações baseadas em calendário pré-definido. De 142 que responderam à pergunta relativa à frequência de pulverizações, 87 disseram fazer pulverizações semanais e 27, quinzenais, durante todo o ciclo das culturas. Não se considera aqui a quantos produtos se referem essas aplicações.

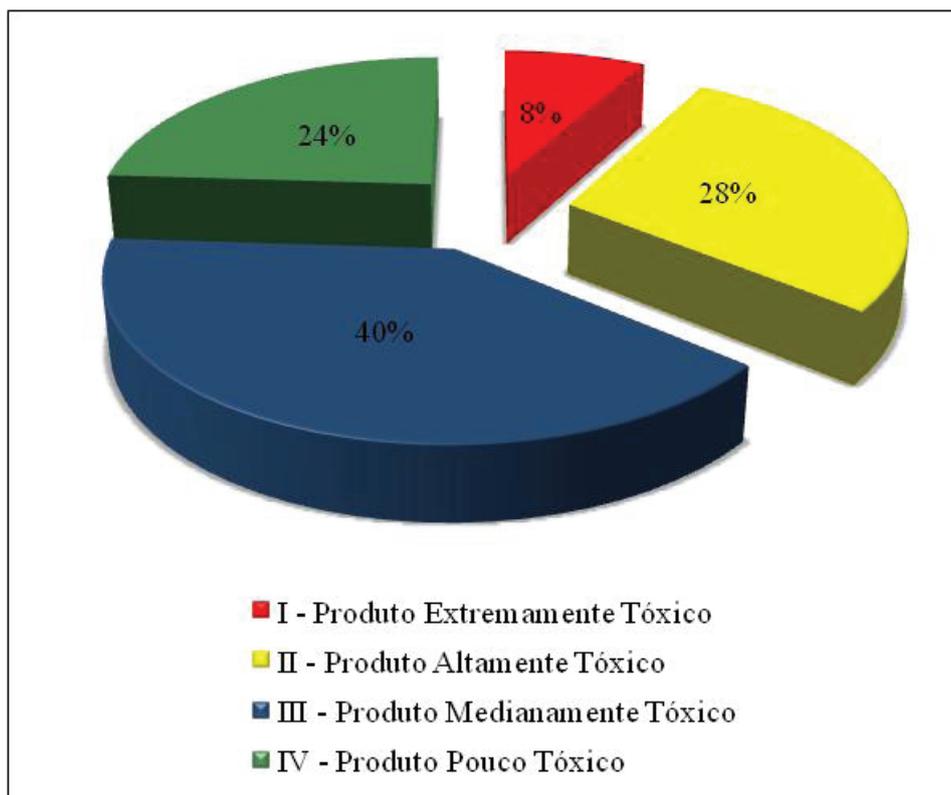


Figura 3.5 Classificação toxicológica dos agrotóxicos mais citados pelos produtores.

Considerando Vertimec[®] 18 EC, dos 84 produtores que relataram sua utilização (Tabela 1), treze afirmaram usar apenas este produto. Destes, oito disseram fazer aplicações semanais do produto, durante todo o ciclo da cultura, três citaram aplicações quinzenais e os outros dois, entre 2 e 3 aplicações semanais.

De acordo com o Sistema Agrofít, as recomendações de aplicação para as duas principais culturas comerciais do município seriam até duas pulverizações por ciclo da cultura, para morango, e até quatro para batata-inglesa.

Todos os oito produtores que relataram fazer pulverizações semanais com Vertimec[®] 18 EC plantavam morango. Assim, considerando-se o ciclo da cultura de 7 a 8 meses, poderiam ser feitas de 28 a 30 aplicações do produto na cultura, de acordo com o que relataram os produtores entrevistados. Com base nessas informações foram

consideradas 20 aplicações para a estimativa de risco para organismos do solo, realizada no presente estudo.

Este produto continua a ser o mais utilizado no município. Em novo levantamento realizado no município em julho de 2010 (Espíndola, informação verbal)², o Vertimec[®] 18 EC foi citado por todos os 50 produtores entrevistados.

Os efeitos de agrotóxicos na população humana são diretamente proporcionais à concentração e à exposição. Nesse sentido, a realidade encontrada em Bom Repouso é preocupante, com um descaso dos agricultores com a própria saúde, trabalhando descalços (Figura 3.6a), inclusive no momento de aplicação dos agrotóxicos. Verificou-se, tanto nas respostas aos questionários, quanto nas observações em campo, que o uso de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) durante o preparo da calda e aplicação de agrotóxicos também é raro (Figura 3.6b). Apenas 14% afirmaram usar o kit completo de EPIs.

Durante as visitas às propriedades pôde-se verificar que muitos agricultores realizam a aplicação com a mesma vestimenta utilizada em outras atividades na cultura, sem se preocupar com uma maior proteção. Mesmo em raros momentos em que se observou a utilização de equipamentos de proteção individual durante a aplicação de agrotóxicos, verificou-se que a conscientização não é tão grande, uma vez que outras pessoas continuavam a trabalhar na cultura, sem proteção alguma, enquanto a aplicação era realizada (Figura 3.6c). A situação se agrava pelo fato de a maioria (69%) dos entrevistados utilizar pulverizadores costais manuais, significando maior risco pela maior exposição aos agrotóxicos.

Problema adicional se relaciona com os cuidados com o próprio EPI, uma vez que esses são armazenados na própria residência, lavados no próprio corpo ou simplesmente usados sem qualquer limpeza adicional (Espíndola, informação verbal, 2010).

² Informação fornecida por Espíndola, em São Carlos, em 2010.



a)

b)



c)

Figura 3.6 a) Agricultor trabalhando em cultura de morango; b) Aplicação de agrotóxico sem utilização de Equipamento de Proteção Individual; c) Aplicação de agrotóxico com utilização de EPI, mas na presença de pessoas sem proteção. Fotos: Acervo fotográfico do Projeto Mogi-Guaçu.

De acordo com Soares, Almeida e Moro (2003), um trabalhador rural desprotegido tem 72% mais chance de se intoxicar em relação ao protegido. No Sri Lanka, por exemplo, foi observado que, embora mais de 90% dos trabalhadores fossem conscientes sobre 9 entre 11 itens de proteção química, a grande maioria não usava EPI, em razão de desconforto e custos (FARIA et al., 2004). Em Bom Repouso também foi unânime a afirmação de não usar EPIs por serem desconfortáveis e caros. Por desinformação, desconsideraram o aumento do risco de intoxicação pela maior exposição e também consideram “fracos” os produtos

que utilizam, justificando também por essa razão a não utilização de proteção ao manuseá-los e pulverizá-los.

Muitos agricultores entrevistados citaram ser, ou ter membros da família, acometidos por doenças. Entre as mais citadas estão: câncer de mama, estômago, cérebro, garganta, problemas endócrinos, hipertensão, problemas cardíacos, hepáticos, renais e distúrbios mentais. Porém, em sua maioria não acreditam que possa haver uma relação entre essas doenças e o uso de agrotóxicos. Dos entrevistados, 32% afirmaram já ter sido acometidos por distúrbios ocasionados pela aplicação de agrotóxicos, citando sintomas como dores de cabeça e náusea.

Outro problema encontrado, relacionado à saúde ambiental, envolve o descarte inadequado de embalagens vazias de agrotóxicos. Dos entrevistados, 32% afirmaram queimar as mesmas; e 22%, enterrar, guardar, deixar na lavoura ou destinar ao lixo comum. Embora 47% dos produtores entrevistados em Bom Repouso tenham afirmado devolver as embalagens no local de compra dos produtos, a realidade encontrada nas visitas a campo não confirma isso. Muitas embalagens vazias de agrotóxicos foram observadas próximo aos córregos, nas matas ciliares e junto às lavouras. A reutilização de embalagens vazias também era comum e não foi difícil confirmá-la, bem como o descarte inadequado, em visitas a campo (Figura 3.7).

No Brasil, a Lei Federal 9.974/00 (BRASIL, 2000) distribui responsabilidades a agricultores, fabricantes, sistema de comercialização e poder público em relação à destinação adequada das embalagens vazias de agrotóxicos. Campanhas de sensibilização e orientação são realizadas, coordenadas pelo Instituto Nacional de Processamento de Embalagens Vazias (InpEV) e muitas vêm sendo aplicadas.



Figura 3.7 Descarte inadequado e reutilização de embalagens vazias de agrotóxicos. Bom Repouso (MG), 2005. Fotos: Acervo fotográfico do Projeto Mogi-Guaçu.

Os produtores entrevistados tinham informações, mesmo que incompletas, sobre o assunto, e era comum comentarem sobre a fiscalização e aplicação de multas ocorrendo na região. Isso certamente se refletiu nas respostas dadas, uma vez que muitas vezes informavam que devolviam as embalagens na revenda, por saber ser a resposta correta, e a entrevista ocorria ao lado de embalagens abandonadas na área de cultivo. Além disso, no período em que as entrevistas foram realizadas, não havia no município uma unidade de recebimento de embalagens vazias de agrotóxicos.

3.4.2 Risco estimado para solo, em relação à abamectina

A Tabela 3.3 apresenta o risco potencial para solo, estimado para o ingrediente ativo de Vertimec[®] 18 EC (abamectina), levando-se em consideração informações fornecidas pelos produtores entrevistados em Bom Repouso, em 2005, e o que é recomendado no Brasil para a cultura do morango.

No presente estudo três cenários de risco crônico para organismos do solo foram identificados, todos envolvendo a aplicação da dosagem máxima recomendada para a cultura e o volume máximo de calda aplicado por área (ha), que correspondem a uma concentração de 16,88 g de abamectina/ha. Esses cenários também envolveram número excessivo de aplicações (20), que foi baseado nas respostas de produtores entrevistados.

No entanto, observa-se que, mesmo para três outros cenários avaliando a dosagem correspondente à recomendada no Brasil para a cultura do morango, os valores de QR estão próximos ao limite proposto pela União Europeia para toxicidade crônica (5,0). Estes também estão associados ao uso intensivo do produto (20 aplicações).

Embora sejam apenas estimativas, a ocorrência de cenários mostrando risco chama a atenção para a situação de Bom Repouso, notadamente com respeito ao número abusivo de pulverizações relatadas por produtores locais, como para o Vertimec[®] 18 EC.

Römbke, Waichman e Garcia (2008) avaliaram o risco de 11 agrotóxicos para o solo, em 4 áreas próximas a Manaus, AM., com o mesmo processo realizado no presente trabalho. Os autores não detectaram risco da abamectina para minhocas, nos três cenários analisados, mesmo considerando doses de aplicação de 2,8 a 21,1 g i.a/ha; número de aplicações variando de 5 a 7; e intervalos de 7-10 dias entre as aplicações, de acordo com informações de produtores locais, para diferentes culturas.

Tabela 3.3 Cenários considerados, concentração ambiental estimada (CAE) e quociente de risco (QR)* para abamectina, para a cultura do morango.

g i.a./ha ¹	Número de aplicações por ciclo ²	Intervalo entre aplicações (dias)	Densidade do solo	CAE (mg/kg)	CL ₅₀ para minhocas (mg/kg) ³	CENO ⁴ para minhocas (CL ₅₀ /10) (mg/kg)	QR agudo	QR crônico
16,88	20	7	1,240	0,270	8,41	0,841	31,15	3,12
9,00	20	7	1,240	0,144	8,41	0,841	58,40	5,84
16,88	20	7	1,210	0,277	8,41	0,841	30,36	3,04
9,00	20	7	1,210	0,148	8,41	0,841	56,82	5,68
16,88	20	7	1,190	0,281	8,41	0,841	29,93	2,99
9,00	20	7	1,190	0,156	8,41	0,841	53,91	5,39
16,88	2	7	1,240	0,052	8,41	0,841	161,73	16,17
9,00	2	7	1,240	0,029	8,41	0,841	290,00	29,00
16,88	2	7	1,210	0,053	8,41	0,841	158,68	15,87
9,00	2	7	1,210	0,029	8,41	0,841	290,00	29,00
16,88	2	7	1,190	0,054	8,41	0,841	155,74	15,57
9,00	2	7	1,190	0,028	8,41	0,841	300,36	30,04

*Destacam-se em vermelho os valores abaixo dos limites propostos pela União Europeia (10, para dados de toxicidade aguda, e 5, para crônicos)

¹ 16,88g i.a/ha, para aplicação de 75 ml de Vertimec/100L de água e volume de calda de 1250 L/ha; e 9,00 g i.a/ha, para aplicação de 50 ml/100 L de água e 1000 L de calda/ha.

² 20 = número de aplicações por ciclo, com base em respostas de produtores de Bom Repouso, em 2005; 2 = número máximo de aplicações recomendadas no Brasil.

³ CL₅₀ = Concentração letal mediana. O valor foi obtido em ensaios com *Eisenia andrei*, realizados a 25 ± 2°C, utilizando solo artificial tropical (SAT).

⁴ CENO = Maior concentração sem efeito observado. No caso, estimativa obtida dividindo-se o valor da CL₅₀ por 10.

É importante salientar que resíduos de abamectina foram encontrados por Lima (2010), em amostras de solo provenientes de Bom Repouso, sendo 1 coletada sob cultura de morango e 3, sob mata nativa. O princípio ativo também foi detectado em amostras de sedimento coletadas no município em julho de 2008, em 3 pontos, em um estudo sobre qualidade da água de abastecimento de áreas rurais (RESENDE, 2009). Tais dados evidenciam o potencial de contaminação de áreas do município por este produto.

3.5 CONCLUSÃO

Considerando as informações relativas ao uso de agrotóxicos em Bom Repouso, levantadas em 2005; o resultado de estimativa de risco para minhocas encontrado para abamectina neste estudo; o número de agrotóxicos citados pelos produtores entrevistados (83 produtos comerciais), muitos apresentando alta periculosidade ambiental; e a presença de resíduos do agrotóxico mais utilizado, inclusive em área de mata preservada, acredita-se que o potencial risco ambiental, e mais especificamente, para o solo, decorrente da utilização desses produtos no município existe e não deve ser ignorado.

A obtenção de dados sobre efeitos desse principal agrotóxico utilizado no município em organismos do solo, sob condições tropicais, permitirá uma estimativa mais realística deste risco e, conseqüentemente, da necessidade de medidas para sua mitigação.

Em adição, tendo em vista a forma de utilização dos agrotóxicos no município, bastante intensiva, até abusiva, e com alto potencial de exposição de diferentes organismos, deve-se salientar também a necessidade de atenção para uma análise integrada, incluindo diferentes compartimentos ambientais e os efeitos à saúde humana.

3.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARMAS, E.D.; MONTEIRO, R.T.R.; AMÂNCIO, A.V.; CORREA, R.M.L.; GUERCIO, M.A. Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na bacia do rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica. **Química Nova**, v. 28, p. 975-982. 2005.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (Eds. Técns.). **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. p. 79-95.

BRASIL. Lei n. 9.974, de 6 de junho de 2000. Altera a Lei n. 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 7 jun. 2000.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução n. 420, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 30 dez. 2009, n 249, p. 81-84. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>>. Acesso em 20 jul. 2010.

EHRlich, A. **Risk assessment guidelines update**. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., EPA/600/D-88/264 (NTIS PB89133417). 1988

ESPÍNDOLA, E. L. G.; BRIGANTE, J.; ELER, M. N. Avaliação ambiental preliminar do uso e ocupação do solo da bacia hidrográfica do Rio Mogi-Guaçu. In: BRIGANTE, J.; ESPINDOLA, E. L. G. (Eds.). **Limnologia Fluvial: um estudo no Rio Mogi-Guaçu**. 1. ed. São Carlos: RiMa, 2003. cap. 3, p. 28-37.

FARIA, N. M. X.; FACCHINI, L. A.; FASSA, A. G.; TOMASI, E. 2004. Trabalho rural e intoxicações por agrotóxicos. **Cadernos de Saúde Pública**, v.20, p.1298-1308.

FAY, E. F.; SILVA, C. M. M. de S. Comportamento e destino de agrotóxicos no ambiente solo-água. In: SILVA, C. M. de S.; FAY, E. F. (Eds. Técns.). **Agrotóxicos e ambiente**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2004. p. 108-143.

FERREIRA, C. R. R. P. T.; VEGRO, C. L. R.; CAMARGO, M. L. B. Defensivos agrícolas: expectativas de aumento de vendas em 2010. **Análises e Indicadores de Agronegócio**, v. 5, n. 7, p. 5, 2010.

FOCUS SOIL MODELING WORK GROUP. **Soil persistence models and EU registration**. Doc. 7617/VI/96. Directorate General VI. Russels: European Commission. 1997

GHINI, R.; KIMATI, H. 2000. **Resistência de fungos a fungicidas**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna. 78p.

LIMA, N. C. **Avaliação do impacto da contaminação do solo de áreas agrícolas de Bom Repouso (MG) por meio de ensaios ecotoxicológicos**. 2010. 124 p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

OMOTO, C. **Resistência de pragas a pesticidas: princípios e práticas: introdução e conceitos**. Disponível em <http://www.irac-br.org.br/curso01.htm>. Acesso: 2 abr. 2009.

RAMOS, H. H. 2001. Perdas ligadas à má aplicação de agrotóxicos. En: **Anais do Simpósio Internacional de Tecnologia de Aplicação de Agrotóxicos: Eficiência, Economia e Preservação da Saúde Humana e do Ambiente**. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/Centros/centro%20de%20engenharia%20e%20automação/sintag/anais.htm>. Acesso: 10 abr. 2009.

RESENDE, J. **Avaliação das águas de abastecimento da área rural do município de Bom Repouso, MG**. 2009. 130 f. Monografia do curso de Graduação em Engenharia Ambiental - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

ROCHA, I.G. **Estudo de atributos físicos do solo sob cultivo de morangueiro em diferentes formas de manejo no sul de Minas Gerais**. 2009. 30 f. Trabalho de conclusão de curso. (Tecnologia em Gestão Ambiental) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, Inconfidentes, 2009.

RODRIGUES, G.S. Agrotóxicos e contaminação ambiental no Brasil. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (Eds. Técns.). **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. p. 217-265.

RODRIGUES, S.M.; PEREIRA, M.E.; SILVA, E.F.; HURSTHOUSE, A.S.; DUARTE, A.C. 2009. A review of regulatory decisions for environmental protection: Part I - Challenges in the implementation of national soil policies. **Environment International**, v.35, p.202–213.

RÖMBKE, J. WAICHMAN, A.V.; GARCIA, M.V.B. Risk assessment of pesticides for soil of the Central Amazon, Brasil: comparing outcomes with temperate and tropical data. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v.4, n.1, p.94-104, 2008.

SILVA, C.M. de S.; FAY, E.F. Agrotóxicos: aspectos gerais. In: SILVA, C.M. de S.; FAY, E.F. **Agrotóxicos e ambiente**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília, 2004. p.17-73.

SOARES, W.; ALMEIDA, R. M. V. R.; MORO, S. Trabalho rural e fatores de risco associados ao regime de uso de agrotóxicos em Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, p.1117-1127, 2003.

SPADOTO, C.A. **Avaliação de riscos ambientais de agrotóxicos em condições brasileiras**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2006, 20p. (Embrapa Meio Ambiente, Documentos, 58).

SUTTER II, G.W.; VERMEIRE, T.; MUNNS, W.R.; SEKIZAWA, J. Framework for the intergration of health and ecological risk assessment. **Human and Ecological Risk Assessment**, v.9, n.1, p. 281-301, 2003.

VIEIRA, R.F. 2004. Efeito de agrotóxicos em organismos não-alvo do solo. En: SILVA, C.M. de S.; FAY, E.F. **Agrotóxicos e ambiente**. Embrapa Informação Tecnológica, Brasília. p.108-143.

WAICHMAN, A.V. Uma proposta de avaliação integrada de risco do uso de agrotóxicos no estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**. v. 38, n.1, p.45 – 50, 2008.

CAPÍTULO 4

EFEITOS DE VERTIMEC[®] 18 EC SOBRE A SOBREVIVÊNCIA, REPRODUÇÃO E MORFOLOGIA DE *EISENIA ANDREI*

4.1 RESUMO

O inseticida/acaricida Vertimec[®] 18 EC é um dos agrotóxicos mais utilizados por produtores de morango e batata no município de Bom Repouso, MG. Brasil. No entanto, poucos dados estão disponíveis em literatura sobre seus efeitos sobre organismos não-alvo do solo, notadamente em condições de clima tropical. Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo avaliar, por meio de ensaios agudos e crônicos, seu efeito tóxico sobre *Eisenia andrei*. Para tanto, foram realizados ensaios com substrato artificial (SA) e solo natural (SN), com adaptações nos protocolos padronizados, tornando-os mais condizentes com a realidade de regiões tropicais: a) no solo artificial tropical (SAT), substituição da turfa de esfagno por pó de fibra de coco, como fonte de matéria orgânica e b) estabelecimento da temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ para condução de todos os ensaios. No solo artificial, o agrotóxico foi incorporado nas concentrações de 0-14 e de 0-10,5 mg de abamectina/kg de solo, respectivamente, para o ensaio agudo e o crônico. Nos ensaios com SN o produto foi pulverizado sobre o solo, em campo, com a dosagem máxima recomendada no Brasil para a cultura do morango (DR); com duas vezes essa dosagem (2DR); e com água destilada (Controle). Os organismos foram expostos aos solos Controle, DR e às diluições de 12,5%, 25%, 50%, 75% e 100% de 2DR, obtidas por meio da mistura com o solo Controle. A $CL_{50,14\text{dias}}$ determinada no ensaio com SAT foi de 7,64 mg/kg. No ensaio crônico, só houve diferença significativa na sobrevivência

aos 28 dias, em relação ao controle, para a concentração mais alta avaliada (10,5 mg/kg), com $CL_{50,28 \text{ dias}}$ estimada em 8,65 mg/kg. Os organismos expostos ao agrotóxico apresentaram alterações morfológicas (afilamento e descoloração da parte posterior; estrangulamentos em diferentes regiões do corpo; fragmentação e perda de segmentos, principalmente da parte posterior), bem como comportamentais (letargia ou lentidão na resposta a estímulos mecânicos), além de diminuição do peso corporal. A ocorrência de tais alterações relacionou-se diretamente com o aumento das concentrações do agrotóxico. O número médio de juvenis ($n = 4$) passou de 33 (Controle) para 3 (0,875 mg de abamectina/kg SAT), não tendo ocorrido reprodução nos demais tratamentos. Nos ensaios realizados com SN, não houve resposta dos organismos para quaisquer dos parâmetros analisados.

Palavras-chave: minhocas, abamectina, alterações morfológicas, efeitos agudos e crônicos

4.2 INTRODUÇÃO

Agrotóxicos são bem conhecidos como um método com boa relação custo/benefício no controle de pragas e outras ameaças das culturas agrícolas, mas também podem ser tóxicos a espécies não-alvo e benéficas. Podem ser aplicados diretamente no solo, para controle de pragas e patógenos aí presentes, ou chegar a esse compartimento pelo escoamento e deposição de calda aplicada na parte aérea, em concentrações que podem ser altas o suficiente para afetar organismos edáficos que não era seu alvo.

Dentre os organismos naturalmente presentes no solo, as minhocas se destacam, pois com seus deslocamentos revolvem o solo, misturando os horizontes, e por seus hábitos alimentares influenciam as transformações de matéria orgânica em decomposição e a ciclagem de nutrientes. Além disso, os canais que formam no solo permitem a passagem de ar e água e podem conduzir

agrotóxicos para horizontes mais profundos do solo (LANGENBACH et al., 2002, PAPINI; ANDRÉA, 2004, SILVA; FAY, 2004, LANDGRAF; MESSIAS; REZENDE, 2005). Esses organismos representam interessante indicador para monitorar impactos ambientais (PAOLETTI, 1999, SPURGEON; WEEKS; VAN GESTEL, 2003, SCHAEFER, 2003).

O teste de toxicidade aguda com minhocas (OECD, 1984), padronizado internacionalmente, tornou a espécie de minhoca *Eisenia fetida* um organismo modelo para avaliação dos efeitos de substâncias químicas sobre invertebrados saprófitas terrestres (SPURGEON; WEEKS e VAN GESTEL, 2003) e significou um impulso à ecotoxicologia terrestre. Entretanto, embora o número e também a complexidade de testes voltados à ecotoxicologia terrestre tenham crescido nos últimos 20 anos, a padronização internacional em grande escala dos mesmos começou há pouco mais de 10 anos (RÖMBKE; KNACKER, 2003). Em relação à proteção ambiental, a importância do solo foi reconhecida depois da água e do ar (BECK et al., 2005) e a ecotoxicologia terrestre despertou maior interesse dos pesquisadores consideravelmente depois da aquática, havendo conseqüentemente menor número de ensaios padronizados para este ambiente. Até 1995, as normas internacionais existentes para organismos de solo eram os testes de toxicidade aguda para minhocas e para plantas (RÖMBKE; KNACKER, 2003).

Ahlers e Martin (2003) apontam que os principais progressos recentes para a avaliação dos efeitos de substâncias químicas no compartimento terrestre se deveram ao desenvolvimento de novos testes, especialmente estudos crônicos e investigações relacionadas a efeitos subletais.

A maior parte dos testes e ensaios, entretanto, foram desenvolvidos e realizados em países de clima temperado, pois, a despeito de algumas mudanças recentes (GARCIA, 2004; GARCIA et al., 2007, RÖMBKE; WAICHMAN; GARCIA, 2008, SILVA; VAN GESTEL, 2009) a Ecotoxicologia em geral e a Ecotoxicologia Terrestre em particular ainda têm o foco

em regiões temperadas do mundo, como América do Norte e Europa. Neste sentido, pouca informação ainda é disponível sobre impactos de poluentes obtidas em testes padronizados adaptados para condições tropicais.

Garcia (2004) salienta que poucos estudos têm sido feitos sobre os impactos de agrotóxicos em condições tropicais e frequentemente muitos dos dados utilizados na avaliação do risco ambiental desses produtos em países tropicais são gerados em regiões temperadas. Destaca, ainda, a necessidade de cautela na utilização de dados ecotoxicológicos de regiões temperadas para condições tropicais.

Entre os diversos agrotóxicos utilizados, destaca-se a abamectina, que faz parte de um grupo de substâncias chamadas avermectinas, assim como a ivermectina e doramectina. Tais substâncias são derivadas da fermentação realizada pela bactéria *Streptomyces avermitilis* (BURG et al., 1979). É constituída por uma mistura de 80% de avermectina B_{1a} (C₄₈H₇₂O₁₄) e 20% de avermectina B_{2b} (C₄₇H₇₀O₁₄) (FISHER; MROZIK, 1989). Sua baixa solubilidade em água e rápida fotodegradação (TIŠLER; ERŽEN, 2006) poderiam indicar baixo risco ambiental. No entanto, alguns estudos demonstram o efeito deletério sobre organismos não-alvo. Insetos (principalmente coleópteros e dípteros) associados ao esterco de animais tratados com abamectina podem ser afetados, especialmente suas fases larvais (HALLEY; VANDENHEUVEL; WISLOCKI, 1993). Tišler e Eržen (2006), estudando efeito ecotoxicológico da abamectina no ambiente aquático, também observaram toxicidade extremamente alta (aguda e crônica) a *Daphnia magna* (Concentração Efetiva Mediana – CE₅₀ = 49,3µg/L) e *Scenedemus subspicatus* (CE₅₀ = 4,4 mg/L)

Tais efeitos têm despertado, cada vez mais, a preocupação com as avermectinas, de forma geral, e da abamectina em particular, como contaminantes. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), tendo em vista estudos realizados que apresentam resultados preocupantes relativos à toxicidade aguda e suspeita de toxicidade

reprodutiva de abamectina e de seus metabólitos, incluiu os produtos técnicos e os formulados com este ingrediente na lista dos que deveriam ser submetidos à reavaliação, para o ano de 2008 (ANVISA, 2008). No entanto, o resultado final desta avaliação ainda não foi disponibilizado.

Embora rapidamente fotodegradada em água, com meia-vida de 0,5 dia ou menos, a abamectina desaparece mais lentamente do compartimento solo, com meia-vida de 2 a 8 semanas (HALLEY; JACOB; LU, 1989, McCracken, 1993), o que a torna um potencial risco para organismos não-alvo no solo (DIAO; JENSEN; HANSEN, 2007). Entretanto, pouco é conhecido sobre os possíveis efeitos sobre minhocas e organismos edáficos em geral (SUN et al., 2005, JENSEN; DIAO; SCOTT-FORDSMAND, 2007, KOLAR et al., 2008) e menos ainda quando se consideram as regiões de clima tropical.

Considerando o exposto, o presente estudo teve por objetivo avaliar a toxicidade aguda e crônica da abamectina sobre minhocas da espécie *Eisenia andrei*, por meio da exposição a solo natural e substrato artificial com a presença de Vertimec® 10 EC, sob condições tropicais.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Organismo-teste

A escolha do organismo-teste, sua manutenção em laboratório e exigências para sua utilização nos testes basearam-se nas recomendações dos protocolos OECD (1984; 2004); ISO (1993; 1998); CETESB (1990) e ABNT (2007) e em GARCIA (2004).

Lotes de minhocas da espécie *Eisenia andrei* (ver Apêndice B) foram obtidos junto a produtores comerciais de Campinas, SP e mantidas no laboratório de Ecotoxicologia do NEEA/CRHEA/SHS/EESC/USP, São Carlos, SP, em substrato constituído de pó de fibra de coco e esterco bovino seco (50:50 v/v), em caixas de material plástico resistente, com capacidade para 1000g do substrato seco (Apêndice B). A fibra de coco utilizada foi o substrato agrícola Golden Mix T-80, da empresa Amafibra (Artur Nogueira, SP).

Antes de ser utilizado o substrato foi submetido a um tratamento de desfaunagem (PESARO et al., 2003), com ao menos 2 ciclos de congelamento de 48 h, seguidos de descongelamento. O pH do substrato foi ajustado (Apêndice B) e regularmente monitorado para $6,0 \pm 0,5$, com adição de quantidades suficientes de CaCO_3 , quando necessário. A umidade foi ajustada e monitorada semanalmente, visualmente, conforme indicado nos protocolos citados. A alimentação dos organismos foi suplementada com fornecimento quinzenal de flocos de aveia, previamente cozidos em água destilada. O cultivo foi mantido a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, sob regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, com uma intensidade de luz de 400-800 lux. Antes de serem submetidos aos ensaios, os organismos foram aclimatados aos substratos-teste (solo artificial tropical ou solo natural não submetido à pulverização) com uma antecedência de 48 horas. Nos ensaios foram utilizados organismos adultos, apresentando clitelo, e com peso médio de 300-600 mg.

4.3.2 Substância-teste

Vertimec[®] 18 EC (Syngenta Proteção de Cultivos Ltda) tem propriedades como acaricida, inseticida e nematicida. Formulado como concentrado emulsionável, é constituído de 18 g de abamectina/L. Por apresentar efeito tóxico sobre várias pragas, Vertimec[®] 18 EC é utilizado para proteger diversas culturas agrícolas. No Brasil, de acordo com o Sistema de

Agrotóxicos Fitossanitários (Agrofit), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, ele é registrado para 23 culturas. Para morango, a dosagem recomendada no país é de 50 a 75 ml/100 L de água, com aplicação de 1000 a 1250 L de calda/ha.

A abamectina pertence ao grupo das lactonas macrocíclicas e é estruturalmente idêntica à ivermectina, exceto pelo fato de apresentar uma ligação insaturada dupla na posição C22-23, enquanto a ivermectina apresenta uma simples (MOLINARI; SOLONESKI; LARRAMENDY, 2010). Em vertebrados, a ivermectina tem ação neurotóxica, ligando-se aos receptores do neurônio pós-sináptico (posterior), estimulando maior liberação do neurotransmissor gama-aminobutírico (GABA) no neurônio pré-sináptico (anterior). Isso causa uma hiperpolarização do potencial de repouso das células pós-sinápticas, tornando mais difícil a neurotransmissão dos estímulos e, como consequência, a contração muscular. O resultado é paralisia e morte dos organismos. Em invertebrados, o alvo é o glutamato nos canais de cloro localizados nas junções neuromusculares, independentemente do GABA, paralisando músculos somáticos e faríngeais (CAMPBELL, 1989). Recentemente foi sugerido que ambos os canais são os alvos das lactonas macrocíclicas em geral (McCAVERA; WALSH; WOLSTENHOLME, 2007). O modo de ação primário da abamectina é o distúrbio dos receptores de GABA nas células nervosas dos insetos, resultando na inibição tanto das comunicações nervo a nervo, como de nervo a músculos, induzindo a paralisia e a morte do organismo (MOLINARI; SOLONESKI; LARRAMENDY, 2010).

4.3.3 Solos-teste

Nos ensaios com solo natural (SN) foram utilizadas amostras de solo provenientes de uma área do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CRHEA/SHS/EESC/USP), em

Itirapina, SP. No local, após preparo do solo, três parcelas de 8m², separadas por áreas de 2m, foram submetidas à pulverização com, respectivamente: 0,9 L de Vertimec[®] 18 EC/ha, correspondente à dosagem máxima recomendada no Brasil para a cultura do morango (DR); duas vezes essa dosagem (2DR); e água destilada (Controle). A pulverização foi feita sobre solo sem qualquer cobertura vegetal, de modo a simular uma situação de pior cenário, ou seja, que todo o volume de calda aplicado a uma cultura de morango chegasse ao solo, assim como a utilização da dosagem 2DR objetivou simular situações em que os produtores aplicam dosagens acima das recomendadas. As amostras de solo foram retiradas da camada mais superficial (0-10 cm). Considerando a densidade do solo como 1,5 g/cm³, a concentração esperada de abamectina no solo, para a dose mais alta aplicada (2DR), seria de 0,0216 mg. A Figura 4.1 apresenta imagens do preparo do terreno, aplicação do agrotóxico e coleta das amostras de solo.

Nos ensaios foram utilizadas amostras de solo controle, de solo contaminado com DR e de diluições correspondentes a 12,5%, 25%, 50%, 75% e 100% do solo contaminado com 2DR, por meio da mistura com solo controle. A umidade foi ajustada para 50% da capacidade máxima de retenção de água do solo, previamente determinada. Antes de ser utilizado nos testes, o solo foi peneirado (5 mm de abertura de malha) e submetido a processo de desfaunagem, como descrito anteriormente, para o substrato de cultivo.

No ensaio com solo artificial utilizou-se uma adaptação proposta por Garcia (2004) ao substrato preconizado pelas normas OECD (1984) e ISO (1993), que se constituiu de uma mistura (70:20:10, em porcentagem de peso seco) de areia, argila branca (caulim) e pó de fibra de coco, denominada Solo Artificial Tropical (SAT). A areia utilizada é proveniente de área do município de Biritiba Mirim e foi adquirida junto ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), onde é submetida à lavagem com água para retirada de material orgânico, seca em forno rotativo a temperatura aproximada de 250°C e peneirada. A argila

branca (caulim em pó U.S.P. 26) foi adquirida da empresa Labsynth Produtos para Laboratório (Diadema, SP).



Figura 4.1 Preparo do terreno, aplicação do agrotóxico nas parcelas e coleta das amostras para condução de ensaio com solo natural (SN). Fotos: Maria Edna T. Nunes.

O agrotóxico foi diluído em água destilada nas concentrações de 0-14 e de 0-10,5 mg de abamectina/kg de SAT, respectivamente para o ensaio agudo e para o crônico. Para o ensaio agudo foram realizados diferentes testes, com concentrações que variaram de 0 a 56 mg de abamectina/kg, até a definição das concentrações utilizadas neste ensaio.

A incorporação ao SAT foi feita uma única vez, no início dos ensaios, misturando-se manualmente as soluções do agrotóxico com o substrato. No tratamento controle, água destilada foi incorporada. As quantidades de água destilada para incorporação do agrotóxico ao SAT foram

calculadas de forma a ajustar a umidade para 50% de sua Capacidade Máxima de Retenção de Água (CMRA), determinada previamente (ver Apêndice C). O mesmo ajuste foi feito nos ensaios com SN.

4.3.4 Caracterização físico-química dos solos-teste e análise de resíduos de abamectina

Amostras de SAT e de SN foram analisadas no laboratório de Limnologia do NEEA/CRHEA/EESC/USP quanto às características: pH, umidade e capacidade de retenção de água (MONTEIRO; FRIGHETTO, 2000); teor de matéria orgânica (TRINDADE, 1980); granulometria (ABNT, 1968); e nitrogênio orgânico total (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA, 1995). A Tabela 4.1 apresenta as características físicas e químicas dos solos.

Tabela 4.1 Características químicas e físicas do solo artificial tropical (SAT) e do solo natural (SN) coletado em área do CRHEA/SHS/EESC/USP, Itirapina, SP.

Solos	pH*		Matéria orgânica (%)	Areia (%)	Silte (%)	Argila (%)	Nitrogênio orgânico total (%)	Capacidade máxima de retenção de água (%)
	KCl 1M	H ₂ O						
SAT	4,48 ± 0,18	5,86 ± 0,20	5,4	76	19	5	0,4	58,4
SN	5,33 ± 0,107	5,39 ± 0,09	13,45	72	18	10	4,64	69,8

* Valores médios e desvios-padrão.

Amostras de SN e de das diluições de solo pulverizado com 2DR foram também submetidas à análise de resíduos de abamectina, no Laboratório de Química Ambiental do Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, por meio de Cromatografia Líquida (modelo SCL-10A-Shimadzu), com detector UV-SPD-10A e a confirmação feita por GC-MS (modelo QP2010-Shimadzu), com utilização de colunas C-18 e Rtx 5MS, Shimadzu, respectivamente. Os analitos foram extraídos pelo método SPE, em coluna C18 (EPA 3500) e ultra-som (EPA 3550B). A recuperação do método de extração foi de 79-86% ($\pm 1,7$). O limite de detecção do método foi de 12,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Para os ensaios com SAT, não foram feitas análises de resíduos. Assim, os valores citados referem-se a concentrações nominais de abamectina.

4.3.5 Condução dos testes

Testes de toxicidade aguda

Os testes de toxicidade aguda seguiram as recomendações dos protocolos da ISO (1993) e ABNT (2007), excetuando-se a temperatura em que os mesmos foram conduzidos. Detalhes e fotos da condução dos testes podem ser vistos no Apêndice B. Os testes de toxicidade aguda com o SAT foram conduzidos com o intuito de determinar a Concentração Letal Mediana (CL_{50}) do agrotóxico. Foram utilizados potes plásticos, com tampa perfurada, com diâmetro de 11,5 cm e altura de 9,5 cm. Foram adicionadas 10 minhocas por recipiente, com quatro repetições (recipientes) por tratamento. Foram colocados 500g de solo (peso seco) em cada recipiente.

Os ensaios foram realizados sob condições de 12h de luz/12 h de escuro e temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. A mortalidade das minhocas foi avaliada aos 7 e aos 14 dias, retirando-as do meio de teste e testando sua reação a estímulos mecânicos na parte frontal.

Para avaliar o efeito agudo nas minhocas da pulverização do agrotóxico, os testes seguiram o mesmo procedimento, alterando-se apenas o solo-teste.

Testes de toxicidade crônica

A condução dos testes de toxicidade crônica seguiu as recomendações do protocolo ISO (1998). O procedimento de montagem do teste e as condições de manutenção foram os mesmos descritos para o teste de toxicidade aguda. A alteração efetuada relaciona-se à suplementação de alimentação para os organismos. Para tanto, semanalmente, 5 g de esterco bovino seco e triturado foi colocado em cada pote (replicata). Detalhes e fotos podem ser vistos no Apêndice B.

Como detalhado anteriormente (item 4.3.3), a umidade dos solos-teste (SN ou SAT) foi ajustada para 50% de sua capacidade máxima de retenção de água, no momento da montagem dos testes. A manutenção desta umidade durante todo o período de condução do teste foi semanal. Para tanto, imediatamente após a montagem dos testes cada pote (replicata) foi pesado em balança Toledo Modelo Prix III e o peso anotado. Semanalmente, os potes foram pesados novamente e uma quantidade de água correspondente à perda de peso dos mesmos foi adicionada.

Após 4 semanas (28 dias) do início do teste os indivíduos adultos foram retirados, manualmente, observando-se e anotando-se mudanças morfológicas (como afinamento e descoloração da parte posterior; estrangulamentos em diferentes regiões do corpo;

fragmentação e perda de segmentos) e comportamentais (como letargia ou lentidão na resposta a estímulos mecânicos), e o número de sobreviventes em cada pote. Os sobreviventes foram pesados individualmente, em balança analítica.

Após a retirada dos adultos, os potes foram mantidos por mais 4 semanas sob as mesmas condições descritas anteriormente, inclusive com relação à adição de alimento e manutenção da umidade. Oito semanas (56 dias) depois de iniciado o teste, os juvenis foram retirados, com o método de extração por aquecimento em banho-maria (ISO, 1998; GARCIA, 2004) anotando-se o número de juvenis em cada pote (ver Apêndice B).

4.3.6 Análise dos dados

Nos testes de toxicidade aguda com SAT, o cálculo da Concentração Letal Mediana, aos 14 dias ($CL_{50,14\text{dias}}$) foi feito pelo método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON; RUSO; THURSTON, 1977). Para a determinação da Menor Concentração com Efeito Observável (CEO) e da Maior Concentração Sem Efeito Observável (CENO) os dados foram analisados quanto à sua normalidade (teste de Shapiro Wilks) e homogeneidade de variâncias (testes de Bartlett, Hartley e Cochran). Como os dados não tinham distribuição normal e as variâncias não eram homogêneas, foram submetidos ao teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguido de teste de comparações múltiplas de Dunn para verificar diferença das médias dos tratamentos em relação ao controle.

Em relação à mortalidade dos organismos nos ensaios com solo natural (SN), como os dados apresentavam distribuição normal e variâncias homogêneas, foram submetidas à análise de variância (ANOVA), seguida de teste de Dunnett para comparação entre médias de tratamentos e do controle.

Nos testes de toxicidade crônica, para a análise do número de sobreviventes (teste com SAT) e de variação no peso (teste com SN) dos adultos, aos 28 dias, os dados foram analisados quanto à sua normalidade (teste de Shapiro-Wilks) e homogeneidade de variâncias (teste de Cochran). Posteriormente, efetuou-se análise de variâncias, seguida por teste de Dunnett para comparação das médias dos tratamentos com a média do controle.

Todas as análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa Toxstat 3.4.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Resíduos de abamectina em amostras de SN

A Tabela 4.2 apresenta as concentrações de abamectina encontrada nas amostras de SN submetido à pulverização (DR e 2DR) e das diluições deste em solo controle.

Tabela 4.2 Concentrações de abamectina (mg/kg) nas amostras de solo natural (SN) submetido à pulverização com Vertimec[®] 18 EC, nas dosagens de 0,9 L/ha (DR) e 1,8 L/ha (2DR), detectadas por cromatografia líquida.

Controle	DR	Proporções de 2DR				
		12,5%	25%	50%	75%	100%
nd	0,0195	0,0020	0,00376	0,00832	0,00974	0,0207

nd = não detectado.

Limite de detecção do método = 0,0012 mg/kg

A concentração de abamectina detectada no solo submetido à pulverização com dose correspondente a 2DR (0,0207 mg/kg) está de acordo com o que era esperado pela estimativa de concentração (0,0216 mg/kg), considerando $1,5 \text{ g/cm}^3$ de densidade do solo e coleta das amostras nos primeiros 10 cm de solo para realização dos testes.

4.4.2 Testes de toxicidade aguda

Em relação ao teste com solo natural (SN), a taxa de mortalidade foi pequena em todos os tratamentos (Figura 4.2). A maior taxa média de mortalidade (20%) ocorreu para o solo pulverizado com duas vezes a dose recomendada para a cultura do morango (2DR), com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle.

Para os demais tratamentos, as porcentagens médias de mortalidade foram: 2,5% para as diluições de 12,5%, 25% e 50% de solo pulverizado com 2DR (igual à obtida no tratamento controle); 5% para a diluição de 75%; e 7,5% para o solo pulverizado com a dose recomendada (DR).

Nos ensaios com o solo artificial tropical (SAT) as taxas médias de mortalidade foram maiores (Figura 4.3), chegando a 100% no tratamento com 14 mg de abamectina/kg de SAT. Nos demais tratamentos, as médias de mortalidade foram de 0% (controle e tratamento com 1,75 mg de abamectina/kg de SAT); e de 10%, 25% e 82,5%, respectivamente, para os tratamentos com 3,5; 7 e 10,5 mg de abamectina/kg de SAT. Como os dados não tinham distribuição normal ou homogeneidade de variâncias, procedeu-se teste estatístico não paramétrico para comparação das médias, resultando em diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle apenas para a maior concentração testada (14 mg de abamectina/kg de SAT).

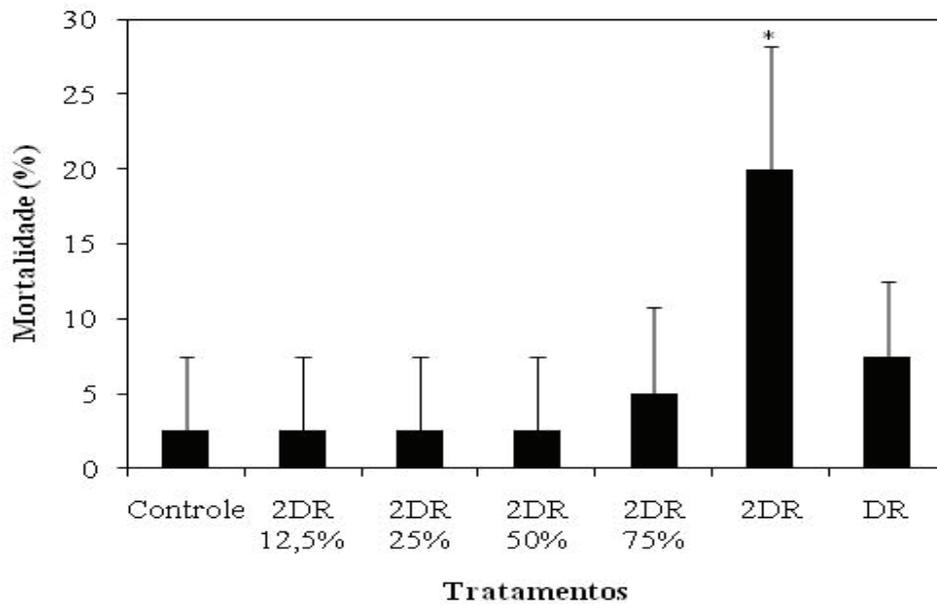


Figura 4.2 Mortalidade média ($n = 4$) de minhocas (*Eisenia andrei*), aos 14 dias, quando expostas a diferentes diluições, em solo controle, de solo natural pulverizado com duas vezes a dose de Vertimec® 18 EC recomendada para a cultura do morango (2DR), e a solo natural pulverizado com a dose recomendada (DR). * = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação ao controle, de acordo com teste de Dunnett. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.

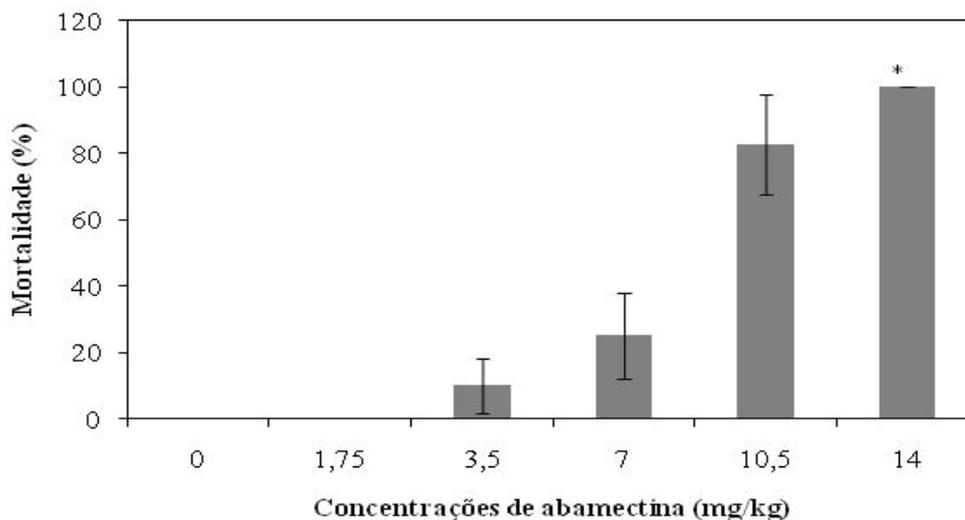


Figura 4.3 Mortalidade média ($n = 4$) de minhocas (*Eisenia andrei*), aos 14 dias, quando expostas a diferentes concentrações de abamectina incorporada a solo artificial tropical (SAT) pela adição de Vertimec® 18 EC.* = diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em relação ao controle, de acordo com Teste de Kuskall-Wallis seguido de Teste de Dunn para comparações múltiplas. Barras de erro correspondem a desvios-padrão.

O valor estimado da Concentração Letal Mediana aos 14 dias ($CL_{50,14 \text{ dias}}$) foi de 7,64 mg de abamectina/kg de SAT, com limites inferior e superior de 6,86 e 8,51 mg de abamectina/g de SAT, respectivamente.

A Menor Concentração com Efeito Observável (CEO) foi 14 mg de abamectina/kg de SAT e a Maior Concentração de Efeito Não Observável (CENO) foi 10,5 mg de abamectina /kg de SAT.

4.4.3 Testes de toxicidade crônica

Nos testes de toxicidade crônica com SN, as minhocas não se reproduziram de modo a satisfazer o critério de validade estabelecido pelo protocolo ISO (1998), de haver no mínimo 30 juvenis em cada replicata do solo controle, de forma que esses dados não foram analisados. No entanto, observou-se que o número de juvenis foi menor à medida que aumentaram as concentrações do agrotóxico no solo (ver Apêndice D).

Aos 28 dias, não foi observada mortalidade de organismos adultos, em qualquer dos tratamentos. No mesmo período, verificou-se aumento de peso dos organismos adultos, em relação ao início do ensaio, para todos os tratamentos (Figura 4.4). O ganho de peso foi menor à medida que aumentaram as concentrações de abamectina no solo. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa, em relação ao controle, para qualquer dos tratamentos.

Para os ensaios realizados com SAT, verificou-se efeito na reprodução dos organismos e também na sobrevivência de adultos aos 28 dias (Figura 4.5). O número médio de juvenis caiu de 33, no controle, para 3, no tratamento com a menor concentração de abamectina (0,88 mg/kg de solo). Para os demais tratamentos não houve produção de juvenis.

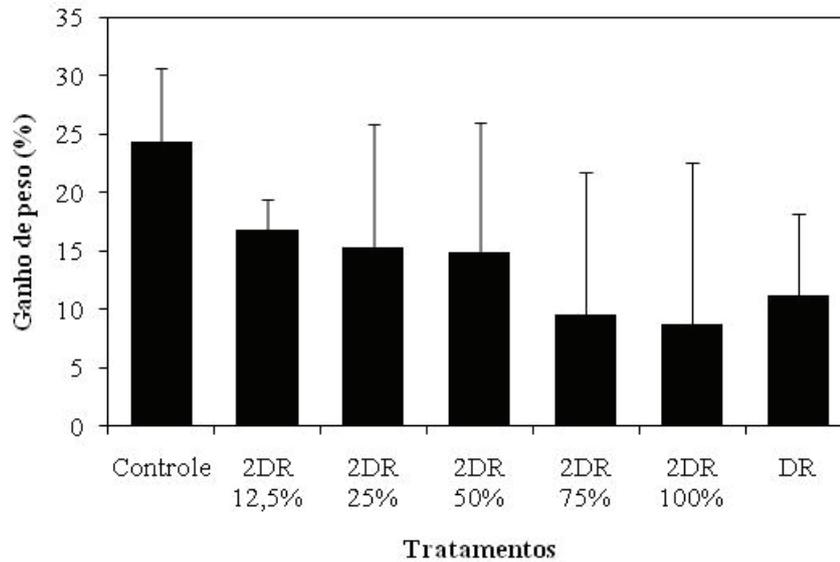


Figura 4.4 Variação média ($n = 4$) na biomassa aos 28 dias, em relação ao peso no início do teste, de minhocas adultas da espécie *Eisenia andrei* expostas a diferentes diluições, em solo controle, de solo natural pulverizado com duas vezes a dose de Vertimec[®] 18 EC recomendada para a cultura do morango (2DR) e a solo natural pulverizado com a dose recomendada (DR). Barras de erro correspondem a desvios-padrão.

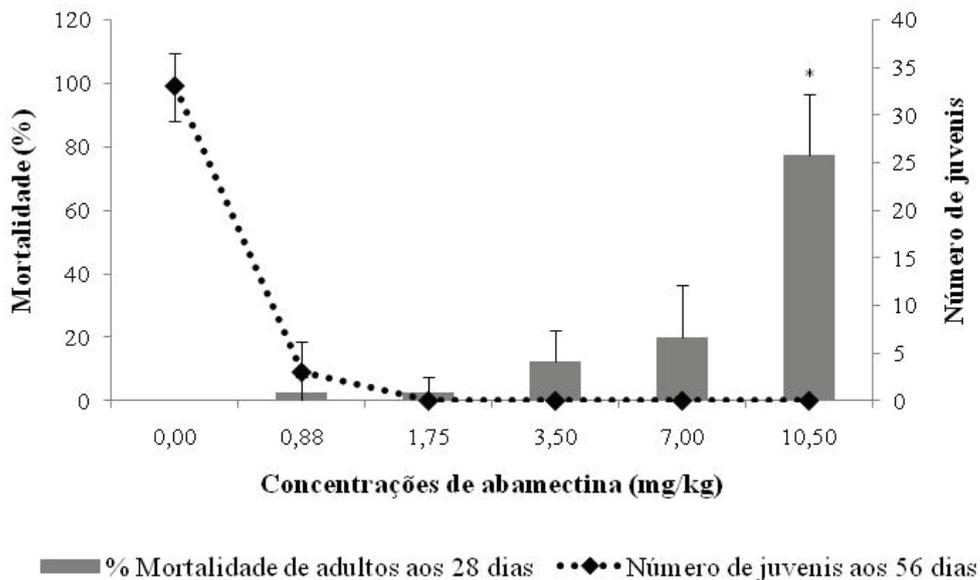


Figura 4.5 Efeito de doses de abamectina, incorporada em solo artificial tropical (SAT) como Vertimec[®] 18 EC, sobre a sobrevivência de adultos de *Eisenia andrei*, aos 28 dias, e a produção de juvenis, aos 56 dias. * = diferença significativa ($p < 0,05$), em relação ao controle, pelo teste de Dunnett. Os valores são médias ($n = 4$) e as barras de erro correspondem a desvios-padrão.

Em relação à mortalidade de organismos adultos aos 28 dias, verificou-se uma relação dose-resposta positiva (Figura 4.5). A $CL_{50,28 \text{ dias}}$ estimada foi de 8,65 mg de abamectina/kg de SAT. A maior taxa média (77,5%) ocorreu para a dose de 10,5 mg de abamectina/kg de SAT. Neste tratamento também ocorreu a maior variação média de biomassa dos organismos adultos sobreviventes aos 28 dias (Figura 4.6) em relação ao peso inicial. Para os dois parâmetros a resposta encontrada neste tratamento diferiu significativamente do controle ($p < 0,05$).

Os organismos adultos sobreviventes apresentaram alterações morfológicas (Figura 4.7), como estrangulamentos em diferentes regiões do corpo, fragmentação e perda de segmentos (amputação), principalmente da parte posterior e possível regeneração da mesma, quando os organismos apresentavam esta região mais afilada e descolorida. A ocorrência de tais alterações relacionou-se diretamente com o aumento das concentrações do agrotóxico (Figuras 4.8). Alterações comportamentais (letargia ou lentidão na resposta a estímulos mecânicos) também foram observadas em alguns organismos, embora não tenham sido quantificadas.

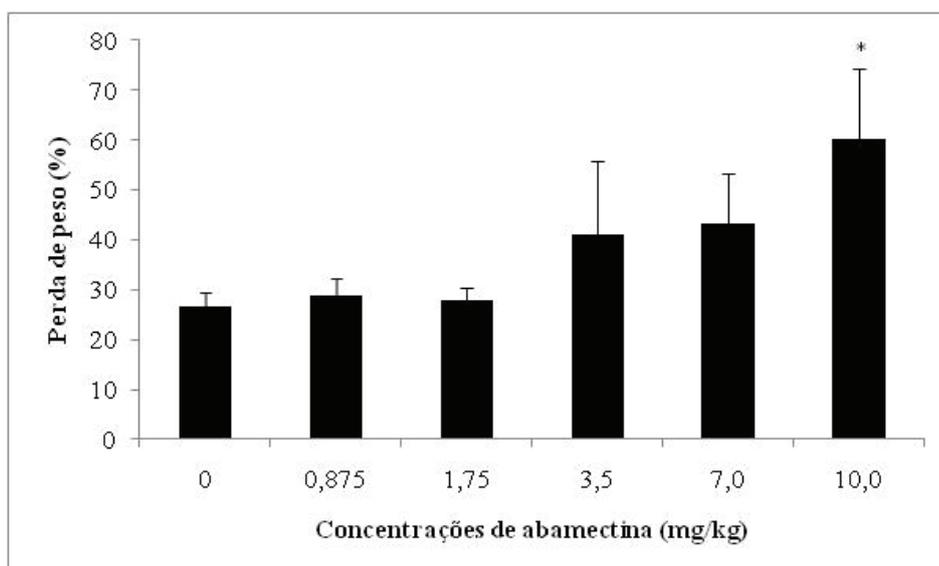


Figura 4.6 Efeito de doses de abamectina, incorporada em solo artificial tropical (SAT) como Vertimec[®] 18 EC, sobre a perda de peso de adultos de *Eisenia andrei*, aos 28 dias, em relação ao peso inicial. * = diferença significativa ($p < 0,05$), em relação ao controle, pelo teste de Dunnett. Valores são médias ($n = 4$) e barras de erros correspondem a desvios-padrão.

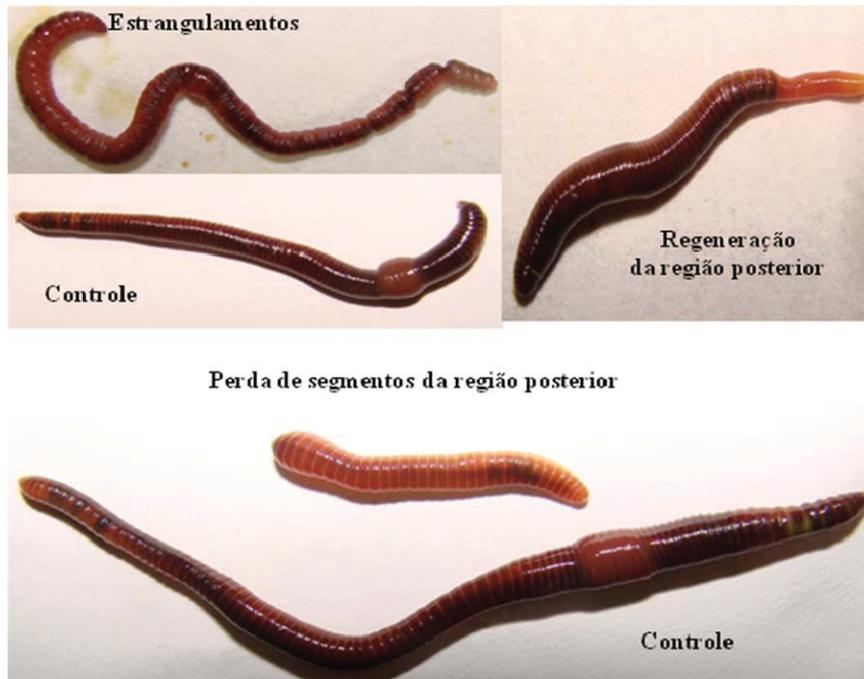


Figura 4.7 Tipos de alterações morfológicas apresentadas por adultos de *Eisenia andrei* sobreviventes, após 28 dias de exposição a SAT sem (Controle) e com incorporação de Vertimec® 18 EC.

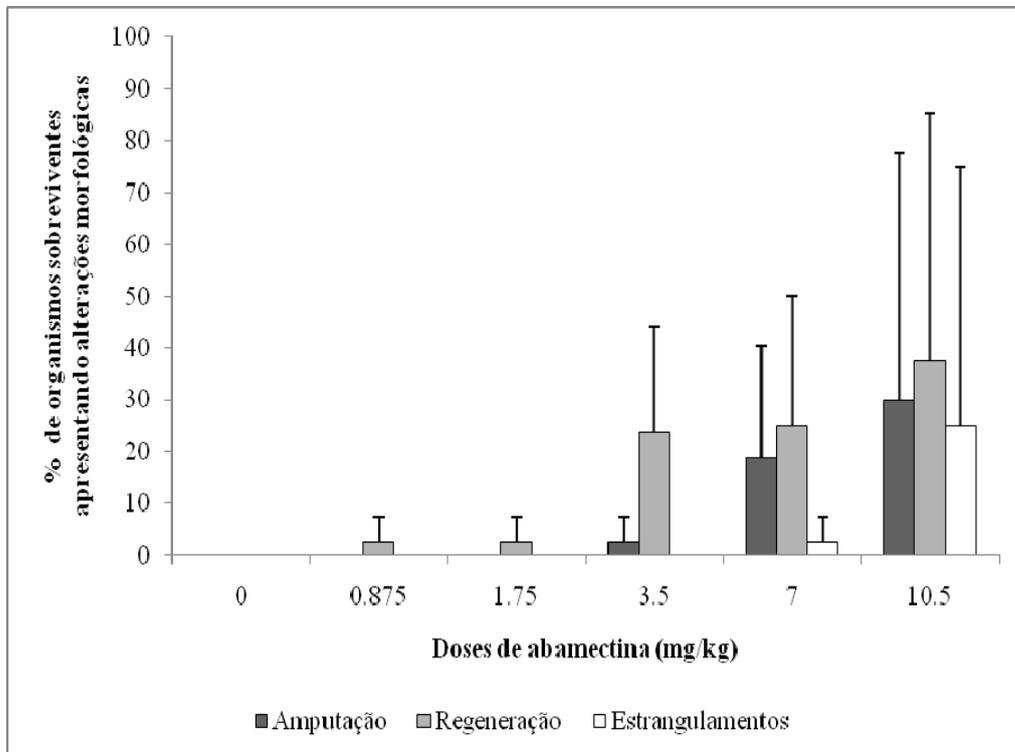


Figura 4.8 Efeito de doses de abamectina, incorporada em solo artificial tropical (SAT) como Vertimec® 18 EC, sobre a ocorrência de alterações morfológicas em adultos sobreviventes de *Eisenia andrei*, aos 28 dias. Os valores são médias ($n = 4$) e as barras de erro correspondem a desvios-padrão.

4.5 DISCUSSÃO

A abamectina é o ingrediente ativo de agrotóxicos com eficiência em controle de pragas de diversas culturas agrícolas e sua importância por isso é inquestionável. No entanto, a presença de resíduos no solo pode ser prejudicial para organismos não-alvo, o que torna imprescindível conhecer o efeito deste produto sobre fauna edáfica. No presente estudo, por exemplo, foram verificados efeitos subletais importantes sobre a espécie *Eisenia andrei*, o que demonstra o risco potencial do uso do produto, apesar dos benefícios existentes.

Nos ensaios com SN não foram observados efeitos agudos ou crônicos significativos, o que é condizente com a concentração de abamectina determinada nas amostras de solo natural, as quais são bem menores que as concentrações em que foram observados efeitos no SAT. Enquanto no SAT a $CL_{50,14 \text{ dias}}$ foi de 7,64 mg de abamectina/kg e a concentração a partir da qual não ocorreu produção de juvenis foi de 1,75 mg/kg, a concentração máxima de abamectina encontrada no SN foi de 0,0207 mg/kg de solo.

Jensen, Diao e Scott-Fordsmand (2007) também não observaram mortalidade de minhocas adultas (*Eisenia fetida*), aos 28 dias, em concentrações de até 5 mg de abamectina/kg de solo, quando os organismos foram expostos ao produto em um solo natural. Por outro lado, os autores detectaram menor produção de casulos a partir da concentração de 0,25 mg de abamectina/kg de solo, com redução de mais de 50% em concentrações acima de 1 mg/kg de solo e chegando a zero na concentração de 5 mg/kg. No presente estudo verificou-se resultados semelhantes, com redução no número de juvenis, de 33 no Controle, para 3 na concentração de 0,875 mg de abamectina/kg de SAT, chegando a zero nas concentrações maiores que 1,75 mg/kg.

Outro efeito subletal verificado no presente estudo foi a variação no peso dos organismos, que mostrou relação direta com o aumento das concentrações de abamectina, tanto nos ensaios crônicos com solo natural (SN) quanto com substrato artificial (SAT). Kolar et al. (2008), que

expuseram *Eisenia andrei* a abamectina em solo natural padronizado para regiões temperadas (Lufa 2.2), também observaram a mesma resposta, com valores de CEO e CENO de 29 e 9,8 mg de abamectina/kg de solo seco, respectivamente, quando um solo natural padrão para condições temperadas (Lufa) foi utilizado. O resultado é compatível com o resposta significativa verificada apenas no tratamento correspondente a 10,5 mg de abamectina/kg de SAT, no presente estudo.

Em relação ao efeito letal, o valor de $CL_{50,14 \text{ dias}}$ estimado no presente estudo foi de 7,64 mg/kg e a $CL_{50, 28 \text{ dias}}$, de 8,65 mg de abamectina/kg de substrato seco. Para minhocas, dados conflitantes relativos à toxicidade de abamectina são disponíveis em literatura, referentes a ensaios desenvolvidos com o solo artificial preconizado pela OECD (1984) ou Lufa e sob temperatura de $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$. Halley, Jacob e Lu (1989) fornecem um valor de CL_{50} de ivermectina para *Eisenia fetida* de 314 mg/kg. Wislocki, Grosso e Dybas (1989) encontraram, para a mesma espécie, uma $CL_{50, 28 \text{ dias}}$ de 38 mg/kg, enquanto para Sun et al. (2005) os valores foram de 24 e 17 mg/kg, para 7 e 14 dias de exposição dos organismos, respectivamente, os quais são comparáveis com o encontrado por Kolar et al. (2008), de 18 mg/kg aos 28 dias de exposição quando utilizado solo natural padrão (Lufa).

Todos os resultados são superiores aos encontrados no presente estudo para o ensaio agudo (14 dias) e o crônico (28 dias), sendo que os diferentes tipos de substrato e de temperatura em que os ensaios foram conduzidos podem ser as causas dessas discrepâncias, indicando a necessidade de mais estudos com solo artificial tropical.

Outro diferencial é que no presente estudo foi utilizada uma formulação comercial de abamectina (Vertimec[®]18 EC). A presença de outros ingredientes (adjuvantes, antiespumantes, antioxidantes, solventes, entre outros) nas formulações comerciais dos agrotóxicos também pode estar relacionada à maior toxicidade desses produtos. Este ponto de vista tem sido discutido por diferentes autores (OAKES; POLLAK 2000, SOLOMON; THOMPSON, 2003). Marques, Pereira e Gonçalves (2009) apontam esta como a causa de ter havido maior rejeição de *Eisenia andrei* a

solo tratado com o produto comercial Viper, em relação àquele ao qual o ingrediente-ativo do herbicida (penoxsulam) foi incorporado. Pereira et al. (2009), por outro lado, observaram tanto aumento quanto redução da toxicidade dos produtos formulados em relação a seus ingredientes-ativos. Tais resultados salientam a necessidade de cuidado com o uso apenas de dados relativos à toxicidade de ingredientes ativos na avaliação de risco de agrotóxicos.

As alterações morfológicas encontradas nos adultos sobreviventes aos 28 dias, no ensaio crônico com SAT, podem ser um parâmetro interessante para monitorar a toxicidade de agrotóxicos e outros poluentes, já tendo sido relatado para outros produtos, como clorpirifós (RAO; PAVAN; MADHAVENDRA, 2003) e profenofós (REDDY; RAO, 2008), em relação a *Eisenia fetida*, em testes realizados pelo método OECD de exposição dos organismos em papel de filtro. Mais estudos para elucidar os mecanismos que levam a essas alterações, bem como sobre o tempo para que as mesmas possam ser detectadas, em ensaios com solo natural ou artificial, são recomendados.

4.6 CONCLUSÃO

O estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade do agrotóxico Vertimec[®] 18 EC sobre minhocas (*Eisenia andrei*). Pelos resultados obtidos, foram verificados efeitos importantes do produto sobre os organismos, com destaque às respostas subletais, como menor reprodução e biomassa de organismos expostos. A toxicidade, com base na dose do ingrediente ativo (abamectina), determinada no presente estudo, foi maior que a encontrada em estudos semelhantes, e o efeito de outros ingredientes presentes na formulação comercial (por exemplo, algum adjuvante, antiespumante, antioxidante, solvente, entre outros) deve ser o fator que levou a esta diferença. Os efeitos subletais (como redução na reprodução, alterações morfológicas, letargia, alteração na biomassa dos organismos) encontrados são importantes, o que chama a atenção para a inclusão

dessas respostas em análises de risco. Os resultados salientam ainda a necessidade de maior atenção com o uso exclusivo de dados relativos à toxicidade de ingredientes ativos na avaliação de risco de agrotóxicos.

4.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada** – RDC n.10, de 22 de fevereiro de 2008

AHLERS, J.; MARTIN, S. Risk assessment of chemicals in soil: recent development in the EU. **Journal of Soils and Sediments**, v.3, n.4, p.240-241, 2003.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. **Standard Methods for the examination of water and wastewater**. 19 ed. New York, 1995. 1268p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **Análise granulométrica de solos**. Rio de Janeiro, 1968.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. NBR 15537. **Ecotoxicologia terrestre. Ecotoxicidade aguda. Método de ensaio para minhocas**. Rio de Janeiro: ABNT, 11p. 2007

BECK, L.; RÖMBKE, J.; BREURE, A.M.; MULDER, C. Considerations for the use of soil ecological classification and assessment concepts in soil protection. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, p. 189-200, 2005.

BURG, R.W. et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 15, n. 3, p. 361-367, 1979.

CAMPBELL, W. **Ivermectin and abamectin**. New York: Springer Verlag, 1989. 363p.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. **Solo: teste de toxicidade com *Eisenia foetida* (minhoca): método de ensaio**. Norma Técnica L6.401. São Paulo: Cetesb. 13p. 1990.

DIAO, X.; JENSEN, J.; HANSEN, A.D. (2007). Toxicity of anthelmintic abamectin to four species of soil invertebrates. **Environmental Pollution**, v.148: 514-519.

FISHER, M. H.; MROZIK, H. Chemistry. In: CAMPBELL, W. **Ivermectin and Abamectin**. Springer Verlag, 1989. cap. 1, p. 1-23.

GARCIA, M. **Effects of pesticides on soil fauna: development of ecotoxicological test methods for tropical regions**. 2004, 291 f. Tese (Doutorado) – Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät, Universidade de Bonn.

GARCIA, M.; RÖMBKE, J.; BRITO, M. T.; SCHEFFCZYK, A. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. **Environmental Pollution**, v. 153, n.2, p. 450-456. 2007.

HALLEY, B. A.; VANDENHEUVEL, W. J. A.; WISLOCKI, P. G. Environmental effects of the usage of avermectins in livestock. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 48, p. 109-125, 1993.

HALLEY, B.A.; JACOB, T.A.; LU, A.Y.H. The environmental impact of the use of ivermectin: environment effects and fate. **Chemosphere**, v.18, p. 1543-1563, 1989.

HALLEY, B.A.; JACOB, T.A.; LU, A.Y.H. The environmental impact of the use of ivermectin: environmental effects and fate. **Chemosphere**, v.18, p.1543-1563, 1989.

HAMILTON, M.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, v.11, p.714-719, 1977.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11268-1. **Soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*)**. Part 1: Determination of acute toxicity using soil substrate. Geneva: ISO. 1993.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11268-2. **Soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*)**. Part 2: Determination of effects on reproduction. Geneva: ISO. 1998.

JENSEN, J.; DIAO, X.; SCOTT-FORDSMAND, J.J. Sub-lethal toxicity of the antiparasitic abamectin on earthworms and the application of neutral red retention time as a biomarker. **Chemosphere**, v. 68, p.744–750, 2007.

KOLAR, L.; ERŽEN, N.K.; HOGERWERF, L.; VAN GESTEL, C.A.M. Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. **Environmental Pollution**, v.151, p.182-189, 2008.

LANDGRAF, M.D.; MESSIAS, R.A.; REZENDE, M.O.O. **A importância ambiental da vermicompostagem: vantagens e aplicações**. São Carlos: Rima, 2005. 106 p.

LANGENBACH, T.; INÁCIO, M.V.S.; AQUINO, A.M.; BRUNNINGER, B. Influência da minhoca *Pontoscolex corethrurus* na distribuição do acaricida dicofol em um Argissolo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.37, n. 11, p. 1663-1668, 2002.

MARQUES, C.; PEREIRA, R.; GONÇALVES, F. Using earthworm avoidance behaviour to assess the toxicity of formulated herbicides and their active ingredients on natural soils. **Journal of Soils and Sediments**, v.9, p.137-147, 2003.

MCCAVERA S; WALSH, T.K.; WOLSTENHOLME, A.J. Nematode ligand-gated chloride channels: an appraisal of their involvement in macrocyclic lactone resistance and prospects for developing molecular markers. **Parasitology**, v.134, p. 1111–1121, 2007.

McCRACKEN, D.I. The potential for avermectins to affect wildlife. **Veterinary Parasitology**, v.48, p.272-280, 1993.

MOLINARI, G.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M.L. New ventures in the genotoxic and cytotoxic effects of macrocyclic lactones, abamectin and ivermectin. **Citogenetic and Genome Research**. 9 p., 2010. DOI: 10.1159/000293923

MONTEIRO, R.T.R.; FRIGHETTO, R.T.S. Determinação da umidade, pH e capacidade de retenção de água do solo. In: FRIGHETTO, R.T.S.; VALARINI, P.J. **Indicadores biológicos e bioquímicos da qualidade do solo**: manual técnico. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. p.37- 40. 2000.

OAKES, D.J.; POLLAK, J.K. The in vitro evaluation of the toxicities of three related herbicide formulations containing ester derivatives of 2,4,5-T and 2,4-D using sub-mitochondrial particles. **Toxicology**, v.151, p.1-9, 2000.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. **Guideline for testing of chemicals n. 207**: Earthworm acute toxicity test. Paris: OECD. 1984.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT –. OECD. **Guideline for testing of chemicals n. 222: Earthworm reproduction test**. Paris: OECD. 2004.

PAOLETTI, M.G. The role of earthworms for assessment of sustainability and bioindicators. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.74, n.1-3, p.137-155, 1999.

PAPINI, S.; ANDREA, M.M. Ação de minhocas *Eisenia foetida* sobre a dissipação dos herbicidas simazina e paraquat aplicados no solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p.67-73, 2004.

PEREIRA, J.L.; ANTUNES, S.C.; CASTRO, B.B.; MARQUES, C.R.; GONÇALVES, A.M.M; GONÇALVES, F.; PEREIRA, R. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. **Ecotoxicology**, v.18, p.455-463, 2009.

PESARO, M. WIDMER, F. NICOLLIER G. ZEYER, J. Effects of freeze-thaw stress during soil storage on microbial communities and methidathion degradation. **Soil Biology and Biochemistry**, n. 35, p. 1049-1061, 2003.

RAO, J.V.; PAVAN, Y.S.; MADHAVENDRA, S.S. Toxic effects of chlorpyrifos on morphology and acetylcholinesterase activity in the earthworm *Eisenia foetida*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.54, p.296-301, 2003.

REDDY, N.C.; VENKATESWARA, RAO. Biological response of earthworm *Eisenia foetida* (Savigny) to an organophosphorous pesticide, profenofos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.71, p.574-582, 2008.

RÖMBKE, J. WAICHMAN, A.V.; GARCIA, M.V.B. Risk assessment of pesticides for soil of the Central Amazon, Brasil: comparing outcomes with temperate and tropical data. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v.4, n.1, p.94-104, 2008.

RÖMBKE, J.; KNACKER, T. Standardisation of terrestrial ecotoxicological effect methods: an example of successful international co-operation. **Journal of Soils and Sediments**, v.3, n.4, p.237-238, 2003.

SCHAEFER, M. Behavioural endpoints in earthworm ecotoxicology. **Journal of Soils and Sediments**, v.3, n.2, p.79-84, 2003.

SILVA, C.M.M.S.; FAY, E.F. Agrotóxicos: aspectos gerais. In: SILVA, C.M.M.S.; FAY, E. F. (Eds. Téc.). **Agrotóxicos e ambiente**. Brasília: Embrapa Informação tecnológica. 2004. p. 17-73.

SILVA, P.M.C.S.; VAN GESTEL, C.,A.M. Development of an alternative artificial soil for earthworm toxicity testing in tropical countries. **Applied Soil Ecology**, v.43, n.2-3, p.170-174, 2009.

SOLOMON, K.R.; THOMPSON, D.G. Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.6, n.3, p.289-324, 2003

SPURGEON, D.J.; WEEKS, J.M.; VAN GESTEL, C.A.M.. A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology. **Pedobiologia**, v. 47, p. 588-606, 2003.

SUN, Y.; DIAO, X.; ZHANG, Q.; SHEN, J. Bioaccumulation and elimination of avermectin B1a in earthworms (*Eisenia fetida*). **Chemosphere**, v. 60, p. 699-704, 2005.

TIŠLER, T.; ERŽEN, N. K. Abamectin in the aquatic environment. **Ecotoxicology**, v. 15, p. 495-502, 2006.

TRINDADE, M. **Nutrientes em sedimentos da represa do Lobo (Brotas -Itirapina)**. 1980. 219 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1980.

WISLOCKI, G.; GROSSO, L.S.; DYBAS, R.A. Environmental aspects of abamectin use in crop protection. In: CAMPBELL, W.C. **Ivermectin and abamectin**. New York: Springer Verlag, p.182-200, 1989.

CAPÍTULO 5

SENSIBILIDADE DE *EISENIA ANDREI* A ABAMECTINA EM ENSAIOS DE REJEIÇÃO REALIZADOS COM SUBSTRATO ARTIFICIAL E SOLO NATURAL, SOB CONDIÇÕES TROPICAIS

5.1 RESUMO

A obtenção de dados ecotoxicológicos de agrotóxicos para regiões tropicais é necessária para que análises de risco mais realísticas possam ser efetuadas e, nesse sentido, ensaios de rejeição têm sido propostos como uma boa ferramenta, tendo em vista suas características de rapidez e baixo custo, em relação aos testes agudos e crônicos. Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar o comportamento de rejeição de *Eisenia andrei* ao produto formulado Vertimec[®] 18 EC (i.a. abamectina) em ensaios realizados com solo artificial tropical (SAT) e com solo tropical natural (SN). Nos ensaios com SAT utilizou-se uma adaptação do substrato preconizado pelas normas OECD e ISO, com resíduo de fibra de coco como fonte de matéria orgânica. Nos ensaios com SN foram utilizadas amostras provenientes de 3 parcelas de 8m² submetidas à pulverização com, respectivamente, 0,9 L de Vertimec[®] 18 EC/ha, correspondente à dosagem máxima recomendada no Brasil para a cultura do morango (DR); duas vezes essa dosagem (2DR); e água destilada (Controle). Os organismos foram expostos aos solos Controle, DR e às diluições de 12,5%, 25%, 50%, 75% e 100% de 2DR, obtidas por meio da mistura com o solo Controle. Todos os ensaios foram realizados sob temperatura também ajustada às condições tropicais ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e fotoperíodo de 12 h de luz: 12 h de escuro. Nos ensaios com SAT os organismos rejeitaram os solos contaminados, com resposta

significativa ($p < 0,05$) a partir da concentração correspondente a 1,75 mg de abamectina/kg de SAT. Foram determinadas a Concentração Efetiva Mediana – $CE_{50,48h}$ (3,918 mg de abamectina/kg de SAT), a Concentração de Efeito Não Observado – CENO (0,85 mg i.a./kg de SAT) e a Concentração Menor de Efeito Observado – CEO (1,75 mg de abamectina/kg de SAT). No ensaio com SN não houve resposta de rejeição significativa ($p < 0,05$) para qualquer das diluições solo-teste:solo controle avaliadas.

Palavras-chave: agrotóxicos, avaliação de risco, abamectina, comportamento, minhocas

5.2 INTRODUÇÃO

O solo é frequentemente considerado um “filtro”, por ser capaz de imobilizar e depurar grande parte das impurezas nele depositadas, mas essa capacidade é limitada, e sua qualidade pode ser alterada por efeito cumulativo da deposição de poluentes atmosféricos, aplicação de agrotóxicos e fertilizantes e disposição de resíduos sólidos industriais, urbanos, materiais tóxicos e radiativos (CETESB, 2010).

A degradação do solo por fatores antropogênicos é alarmante e a necessidade de sua proteção, bem como de suas comunidades inerentes, tem se tornado objeto principal de políticas ambientais no mundo todo (RODRIGUES et al., 2009). No Brasil, recentemente entrou em vigor legislação específica sobre o gerenciamento de áreas contaminadas, estabelecendo critérios e valores orientadores de qualidade do solo, bem como diretrizes para sua preservação (CONAMA 2009).

Dentre os contaminantes que ameaçam a qualidade do solo estão os agrotóxicos. Seu uso em sistemas agrícolas tem se intensificado e é uma das mais críticas consequências da busca por maiores produções e produtividades das culturas. Isto tem se tornado mais óbvio em regiões tropicais, onde o aumento no uso de agrotóxicos tem sido considerável nas últimas décadas (SILVA; VAN GESTEL, 2009). Um exemplo é o Brasil, que tem figurado entre os maiores mercados consumidores mundiais de agrotóxicos, alcançando o primeiro lugar em 2008 e com tendência a se manter neste patamar, dado o aumento das vendas (RODRIGUES, 2003; FERREIRA; VEGRO; CAMARGO, 2010).

Os contaminantes no solo possuem algumas frações distintas que dependem da contaminação e do tipo de solo, algumas das quais são biodisponíveis, dependendo de características físicas e químicas do solo, como pH, porcentagem de argila, capacidade de troca catiônica, teor de matéria orgânica, e da forma química do elemento. Então, apenas a determinação de conteúdos totais de substâncias químicas não é suficiente para avaliar o risco ecológico inerente. Assim, bioensaios são ferramentas úteis para medir de forma mais exata o risco potencial de contaminantes ao solo, com base em sua biodisponibilidade (LOUREIRO; SOARES; NOGUEIRA, 2005).

Usualmente, testes agudos e de reprodução para organismos de solo, como minhocas (*Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*) (OECD, 1984; ISO, 1993; ISO, 1998; OECD, 2004), colêmbolos (*Folsomia candida*) (ISO, 1999) e enquitreídeos (*Enchytraeus* sp.) (ISO 16387, 2004) são utilizados para este fim. Entretanto, a inabilidade em acessar efeitos sobre populações com os testes agudos e o trabalho intensivo e a longa duração que caracterizam os testes crônicos têm chamado a atenção para o desenvolvimento de métodos mais rápidos, mas sensíveis e ecologicamente relevantes (SILVA; VAN GESTEL, 2009).

O comportamento dos organismos como um parâmetro sensível e relevante para testes de toxicidade foi sugerido e utilizado por diferentes autores (YARDLEY et al., 1996;

SCHAFFER, 2003; NATAL-DA-LUZ; RIBEIRO; SOUSA, 2004, LOUREIRO; SOARES; NOGUEIRA, 2005, GARCIA et al., 2008).

O princípio do teste de rejeição sugerido baseia-se no fato de que as minhocas possuem quimiorreceptores nos segmentos anteriores e tubérculos sensores na superfície do corpo que permitem que esses organismos detectem a presença de diversos contaminantes (REINECKE et al., 2002). Este teste é considerado ideal para uma rápida avaliação de poluentes no solo em função de ser simples de realizar e demandar um período curto de tempo para ser concluído (YARDLEY et al., 1996).

Alguns autores também sugerem que a sensibilidade do teste de rejeição é comparável à de testes de reprodução para minhocas (HUND-RINKE; WIECHERING, 2003) e que poderiam ser utilizados em substituição aos mesmos, porém alguns resultados de estudos com minhocas e colêmbolos revelam que as propriedades dos solos afetou significativamente o comportamento dos organismos, principalmente texturas extremas e teores muito baixos de matéria orgânica (NATAL-DA-LUZ; RÖMBKE; SOUSA, 2008). Um protocolo padronizado para determinar a função de habitat do solo com testes de rejeição com minhocas foi estabelecido pela ISO (2008).

Em relação aos agrotóxicos, foi demonstrado que minhocas rejeitaram solos contaminados com fungicidas (GARCIA et al., 2008; NATAL-DA-LUZ et al., 2008), inseticidas (REINECKE; REINECKE, 2007) e herbicidas (MARQUES; PEREIRA; GONÇALVES, 2009).

Entre os agrotóxicos comumente utilizados, destaca-se a abamectina, que faz parte de um grupo de substâncias chamadas avermectinas, assim como a ivermectina e doramectina. Tais substâncias são derivadas da fermentação realizada pela bactéria *Streptomyces avermitilis* (BURG et al., 1979), sendo constituída por uma mistura de 80% de avermectina B_{1a} (C₄₈H₇₂O₁₄) e 20% de avermectina B_{2b} (C₄₇H₇₀O₁₄) (FISHER; MROZIK, 1989). Sua baixa

solubilidade em água e rápida fotodegradação (TIŠLER; ERŽEN, 2006) poderiam indicar baixo risco ambiental. No entanto, estudos demonstram o efeito deletério sobre organismos não-alvo, aquáticos e do solo (HALLEY; VANDENHEUVEL; WISLOCKI, 1993, TIŠLER; ERŽEN, 2006; SUN et al., 2005, JENSEN; DIAO; SCOTT-FORDSMAND, 2007, DIAO; JENSEN; HANSEN, 2007, KOLAR et al., 2008).

Relatos sobre respostas comportamentais de minhocas à presença de abamectina não foram encontrados em literatura. Da mesma forma, a falta de dados ecotoxicológicos e do comportamento deste produto em solo, para condições tropicais, são raros. Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar o comportamento de rejeição de *Eisenia andrei* ao produto formulado Vertimec[®] 18 EC (ingrediente ativo, abamectina) em ensaios realizados com um solo natural e um substrato artificial, em condições tropicais.

5.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.3.1 Organismo-teste

A escolha do organismo-teste, sua manutenção em laboratório e exigências para sua utilização nos testes basearam-se nas recomendações do protocolo ISO (2008). Lotes de minhocas da espécie *Eisenia andrei* (ver Apêndice B) foram obtidos junto a produtores comerciais de Campinas, SP e mantidas no laboratório de Ecotoxicologia do NEEA/CRHEA/SHS/EESC/USP, São Carlos, SP, em substrato constituído de pó de fibra de coco e esterco bovino seco (50:50 v/v), em caixas de material plástico resistente, com capacidade para 1000g do substrato seco (Apêndice B). A fibra de coco utilizada foi o substrato agrícola Golden Mix T-80, da empresa Amafibra (Artur Nogueira, SP). Antes de ser utilizado

o substrato foi submetido a um tratamento de desfaunagem (PESARO et al, 2003), com ao menos 2 ciclos de congelamento de 48 h, seguidos de descongelamento.

O pH do substrato foi ajustado (Apêndice B) e regularmente monitorado para $6,0 \pm 0,5$, com adição de quantidades suficientes de CaCO_3 , quando necessário. A umidade foi ajustada e monitorada semanalmente, visualmente. A alimentação dos organismos foi suplementada com fornecimento quinzenal de flocos de aveia, previamente cozidos em água destilada. O cultivo foi mantido a $20 \pm 2^\circ\text{C}$, sob regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, com uma intensidade de luz de 400-800 lux. Antes de serem submetidos aos ensaios, os organismos foram aclimatados aos substratos-teste (solo artificial tropical ou solo natural não submetido à pulverização) com uma antecedência de 48 horas. Nos ensaios foram utilizados organismos adultos, apresentando clitelo, e com peso médio de 300-600 mg.

5.3.2 Substância-teste

Vertimec[®] 18 EC (Syngenta Proteção de Cultivos Ltda) tem propriedades como acaricida, inseticida e nematicida. Formulado como concentrado emulsionável, é constituído de 18 g de abamectina/L e por apresentar efeito tóxico sobre diversas pragas é utilizado para proteger várias culturas agrícolas. No Brasil, de acordo com o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (Agrofit), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Vertimec[®] 18 EC é registrado para 23 culturas. Para morango, a dosagem recomendadas no país é de 50 a 75 ml/100 L de água, com aplicação de 1000 a 1250 L de calda/ha.

A abamectina pertence ao grupo das lactonas macrocíclicas e é estruturalmente idêntica à ivermectina, exceto pelo fato de apresentar uma ligação insaturada dupla na posição C22-23, enquanto a ivermectina apresenta uma simples (MOLINARI; SOLONESKI;

LARRAMENDY, 2010). Em vertebrados, a ivermectina tem ação neurotóxica, ligando-se aos receptores do neurônio pós-sináptico (posterior), estimulando maior liberação do neurotransmissor gama-aminobutírico (GABA) no neurônio pré-sináptico (anterior). Isso causa uma hiperpolarização do potencial de repouso das células pós-sinápticas, tornando mais difícil a neurotransmissão dos estímulos e, como consequência, a contração muscular. O resultado é paralisia e morte dos organismos.

Em invertebrados, o alvo é o glutamato nos canais de cloro localizados nas junções neuromusculares, independentemente do GABA, paralisando músculos somáticos e faríngeais (CAMPBELL, 1989). Recentemente foi sugerido que ambos os canais são os alvos das lactonas macrocíclicas (McCAVERA; WALSH; WOLSTENHOLME, 2007). O modo de ação primário da abamectina é o distúrbio dos receptores de GABA nas células nervosas dos insetos, resultando na inibição tanto das comunicações nervo a nervo, como de nervo a músculos, induzindo a paralisia e a morte do organismo (MOLINARI; SOLONESKI; LARRAMENDY, 2010).

5.3.3 Solos-teste

Nos ensaios com solo natural (SN) foram utilizadas amostras de solo provenientes de uma área do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CRHEA/SHS/EESC/USP), em Itirapina, SP. No local, após preparo do solo, três parcelas de 8m², separadas por áreas de 2m, foram submetidas à pulverização com, respectivamente, 0,9 L de Vertimec[®] 18 EC/ha, correspondente à dosagem máxima recomendada no Brasil para a cultura do morango (DR); duas vezes essa dosagem (2DR); e água destilada (Controle). A pulverização foi feita sobre solo sem qualquer cobertura vegetal, de modo a simular uma situação de pior cenário, ou seja, que todo

o volume de calda aplicado a uma cultura de morango chegasse ao solo, assim como a utilização da dosagem 2DR objetivou simular situações em que os produtores aplicam dosagens acima das recomendadas. Considerando a densidade do solo como $1,5 \text{ g.cm}^{-3}$, a concentração esperada de abamectina no solo, para a dose mais alta aplicada (2DR), seria de $0,0216 \text{ mg/kg}$.

Nos ensaios de rejeição foram utilizadas amostras de solo controle, de solo contaminado com DR e de diluições correspondentes a 12,5%, 25%, 50%, 75% e 100% do solo contaminado com 2DR, por meio da mistura com solo controle. A umidade foi ajustada para 50% (Apêndice C) da capacidade máxima de retenção de água do solo, previamente determinada.

Antes de ser utilizado nos testes, o solo foi peneirado (5 mm de abertura de malha) e submetido a processo de desfaunagem, como descrito anteriormente, para o substrato de cultivo.

No ensaio com solo artificial utilizou-se uma adaptação proposta por Garcia (2004) ao substrato preconizado pelas normas OECD (1984) e ISO (1993), que se constituiu de uma mistura (70:20:10, em porcentagem de peso seco) de areia, argila branca (caulim) e pó de fibra de coco, denominada Solo Artificial Tropical (SAT). A areia utilizada é proveniente de área do município de Biritiba Mirim e foi adquirida junto ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), onde é submetida à lavagem com água para retirada de material orgânico, seca em forno rotativo a temperatura aproximada de 250°C e peneirada. A argila branca (caulim em pó U.S.P. 26) foi adquirida da empresa Labsynth Produtos para Laboratório (Diadema, SP).

O agrotóxico foi diluído em água destilada nas concentrações de 0,87; 1,75; 3,5; 5,38 e 7,0 mg de abamectina/kg de SAT. A incorporação ao SAT foi feita uma única vez, no início do ensaio, misturando-se manualmente as soluções do agrotóxico com o substrato. No tratamento controle adicionou-se água destilada. As quantidades de água destilada para incorporação do agrotóxico ao SAT foram calculadas de forma a ajustar a umidade para 50% de sua Capacidade

Máxima de Retenção de Água (CMRA), determinada previamente (ver Apêndice C). O mesmo ajuste foi feito nos ensaios com SN.

5.3.4 Caracterização físico-química dos solos-teste e análise de resíduos de abamectina

Amostras de SAT e de SN foram analisadas no laboratório de Limnologia do NEEA/CRHEA/EESC/USP quanto às características: pH (medido em potenciômetro Micronal B374), umidade e capacidade de retenção de água (MONTEIRO; FRIGHETTO, 2000); teor de matéria orgânica (TRINDADE, 1980); granulometria (ABNT, 1968); e nitrogênio orgânico total (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION– APHA, 1995). A Tabela 5.1 apresenta as características físicas e químicas dos solos.

Tabela 5.1 Características químicas e físicas do solo artificial tropical (SAT) e do solo natural (SN) coletado em área do CRHEA/SHS/EESC/USP, Itirapina, SP.

Solos	pH		Matéria orgânica (%)	Areia (%)	Silte (%)	Argila (%)	Nitrogênio orgânico total (%)	Capacidade máxima de retenção de água (%)
	KCl 1M	H ₂ O						
SAT	4,48 ± 0,18	5,86 ± 0,20	5,4	76	19	5	0,4	58,4
SN	5,33 ± 0,107	5,39 ± 0,09	13,45	72	18	10	4,64	69,8

* Valores médios e desvios-padrão.

Amostras de SN e de das diluições de solo pulverizado com 2DR foram também submetidas à análise de resíduos de abamectina, no Laboratório de Química Ambiental do Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, por meio de Cromatografia Líquida (modelo SCL-10A-Shimadzu), com detector UV-SPD-10A e a confirmação feita por

GC-MS (modelo QP2010-Shimadzu), com utilização de colunas C-18 e Rtx 5MS, Shimadzu, respectivamente. Os analitos foram extraídos pelo método SPE, em coluna C18 (EPA 3500) e ultra-som (EPA 3550B). A recuperação do método de extração foi de 79-86% ($\pm 1,7$). O limite de detecção do método foi de 12,0 $\mu\text{g/Kg}$.

Para os ensaios com SAT, não foram feitas análises de resíduos. Assim, os valores citados referem-se a concentrações nominais de abamectina.

5.3.5 Testes de rejeição

Excetuando-se a temperatura (ver Apêndice B), os ensaios de rejeição foram realizados de acordo com o protocolo da ISO (2008), sob condições controladas de fotoperíodo (12h de luz:12h de escuro), utilizando-se 4 replicatas/tratamento, cada uma constituída de pote de plástico, com tampa perfurada, com diâmetro de 11,5 cm e altura de 9,5 cm, dividido ao meio por um divisor de plástico antes da introdução de 250 g (peso seco) de solo-controle e de solo-teste, respectivamente, nos lados esquerdo e direito do recipiente. Em seguida, após a retirada do divisor, 10 minhocas previamente lavadas e secas em papel absorvente foram colocadas exatamente na linha divisória entre os dois substratos.

Para a avaliação do ensaio, após 48 horas da montagem do experimento, o divisor de plástico foi novamente introduzido nos potes, separando o substrato contaminado do controle, e contando o número de minhocas que se encontrava em cada um dos lados.

5.3.6 Teste de controle duplo

O uso de rejeição como parâmetro assume que os organismos devem estar distribuídos de forma homogênea entre as duas seções do recipiente (ISO, 2008), quando este contém o mesmo

tipo de solo. Assim, para cada um dos solos, um teste de controle duplo foi realizado com 10 replicatas. A condução do teste foi a descrita para os testes com os solos contaminados.

5.3.7 *Análise dos dados*

Para o teste de controle duplo considerou-se o número médio de minhocas em cada lado do recipiente. O teste *t* foi utilizado para comparação entre os resultados.

Nos testes com os solos contaminados com Vertimec[®] 18 EC, a resposta foi calculada em termos de porcentagem de rejeição, de acordo com a fórmula (ISO, 2008):

$$\% \text{ de rejeição} = [(n_c - n_t)/N] \times 100$$

Em que:

n_c = número de minhocas no controle

n_t = número de minhocas no solo-teste

N = número total de minhocas

Respostas negativas são consideradas como 0% de rejeição.

O Teste Exato de Fisher foi utilizado para analisar a significância da resposta. Para o teste de controle duplo foi escolhido o teste bicaudal, considerando como hipótese nula a distribuição igual dos organismos nos dois lados do recipiente. Para o ensaio com os solos contaminados com o agrotóxico, foi escolhido o teste unicaudal, com a hipótese nula de que, quando não há efeito, metade dos organismos fica no solo contaminado (NATAL-DA-LUZ et al., 2008). Com base nos resultados do Teste Exato de Fisher, foram determinadas a Menor Concentração de Efeito Observável (CEO) e a Maior Concentração de Efeito Não Observável (CENO). O programa

Minitab 15.1 foi utilizado para realizar as análises e construir os gráficos. A Concentração Efetiva Mediana, para os efeitos após 48 horas de exposição ($CE_{50,48h}$) foi estimada pelo método Trimmed Spearman-Kärber (ISO, 2008).

5.4 RESULTADOS

5.4.1 Resíduos de abamectina em amostras de SN

A Tabela 5.2 apresenta as concentrações de abamectina encontrada na amostras de SN submetido à pulverização (DR e 2DR) e das diluições deste em solo controle. A concentração de abamectina detectada no solo submetido à pulverização com dose correspondente a 2DR (0,0207 mg/kg) está de acordo com o que era esperado pela estimativa de concentração (0,0216 mg/kg), considerando 1,5 g.cm³ de densidade do solo e coleta das amostras nos primeiros 10 cm de solo para realização dos testes.

Tabela 5.2 Concentrações de abamectina (mg/kg) nas amostras de solo natural (SN) submetido à pulverização com Vertimec 18[®] EC, nas dosagens de 0,9 L/ha (DR) e 1,8 L/ha (2DR), detectadas por cromatografia líquida.

Controle	DR	Proporções de 2DR				
		12,5%	25%	50%	75%	100%
nd	0,0195	0,0020	0,00376	0,00832	0,00974	0,0207

nd = não detectado.

Limite de detecção do método = 0,0012 mg/kg

5.4.2 Validade dos testes de rejeição

Ambos os critérios de validade foram satisfeitos, uma vez que não houve morte de organismos e os mesmos se distribuíram de forma homogênea nos dois lados do recipiente, nos testes de controle duplo (Figura 5.1), para os dois solos testados.

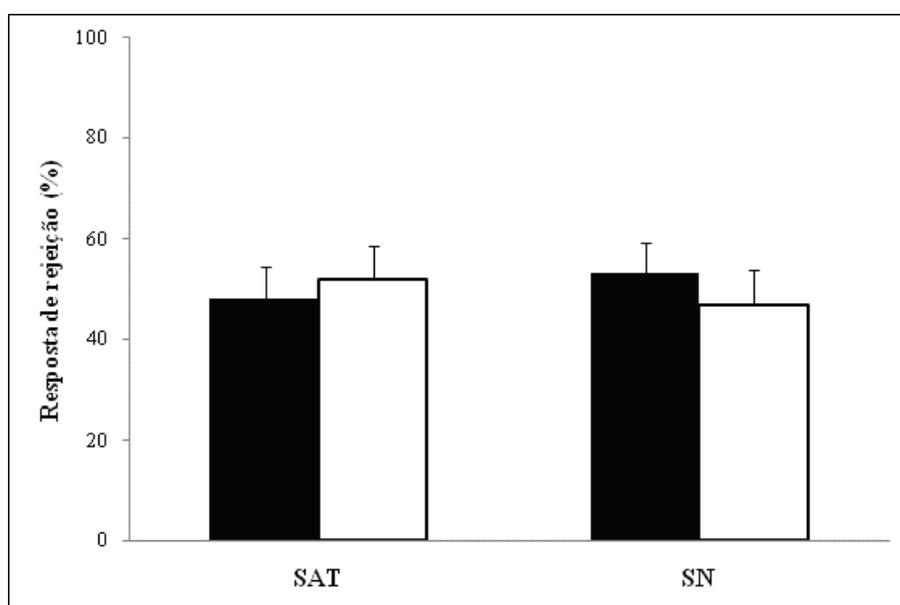


Figura 5.1 Porcentagem de organismos (média + desvio padrão, n = 10) em cada lado do recipiente no ensaio de controle duplo para os solos artificial (SAT) e natural (SN). Barras pretas = lado esquerdo do recipiente; barras brancas = lado direito do recipiente. Não houve diferença estatística na distribuição dos organismos ($p > 0,05$), teste exato de Fisher ($p > 0,05$).

5.4.3 Efeitos da presença de abamectina

As minhocas apresentaram resposta de rejeição aos solos contaminados com Vertimec[®] 18 EC, mostrando uma relação positiva entre concentrações de abamectina no solo

e resposta dos organismos, que foi significativa ($p < 0,05$), a partir da concentração correspondente a 1,75 mg de abamectina/kg de solo, nos ensaios com SAT (Figura 5.2).

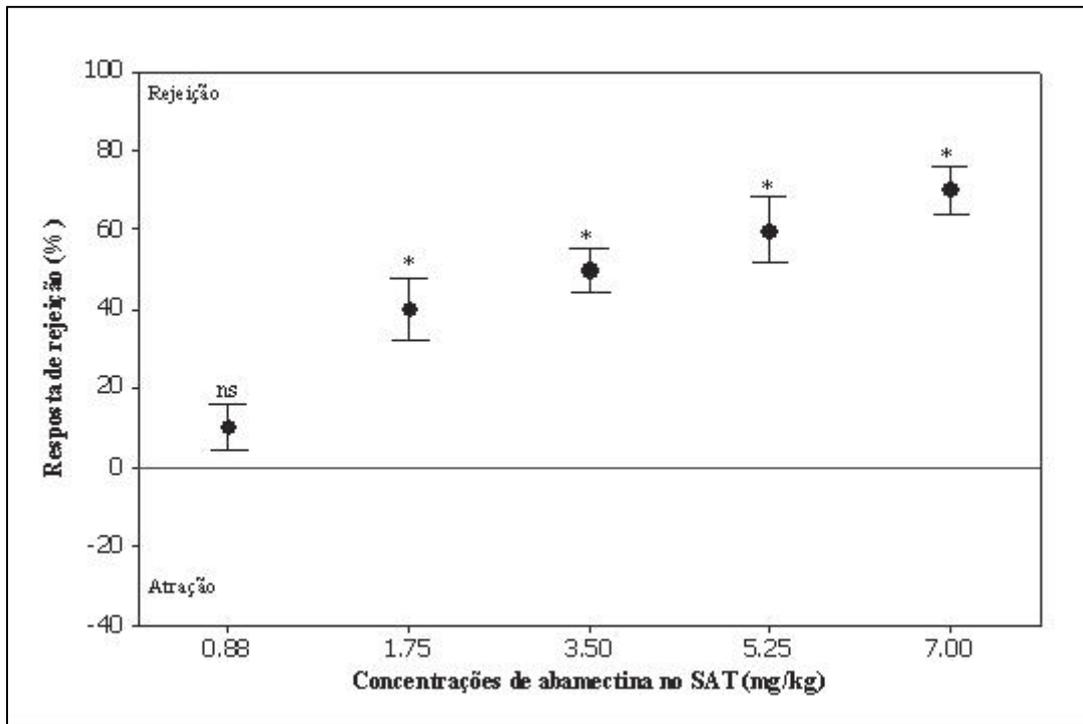


Figura 5.2 Porcentagem média ($n = 4$) de resposta de rejeição de *Eisenia andrei* a solo artificial (SAT) com diferentes concentrações de abamectina. As barras representam os desvios-padrão. (ns) = resposta não significativa ($p \geq 0,05$) e (*) = resposta significativa ($p < 0,05$), de acordo com Teste Exato de Fisher.

O valor de $CE_{50,48h}$ obtido foi de 3,918 mg de abamectina/kg de SAT; de CENO foi 0,85 mg de abamectina/kg de SAT e de CEO foi 1,75 mg de abamectina/kg de SAT.

Para as concentrações de 5,25 e 7,0 mg de abamectina/kg de solo a resposta de rejeição também suplantou o limite (60%) considerado indicativo de que o solo apresenta função de habitat limitada, pela presença de contaminantes (ISO, 2008, MARQUES, PEREIRA; GONÇALVES, 2009).

No ensaio com SN não houve resposta de rejeição significativa ($p < 0,05$) para qualquer das diluições solo-teste:solo controle avaliadas. As maiores respostas de rejeição

(25%) ocorreram na diluição com 75% de solo-teste e no solo-teste sem diluição (2DR), nas quais as concentrações de abamectina determinadas por cromatografia foram, respectivamente, 0,00974 e 0,0207 mg/kg de solo (Figura 5.3).

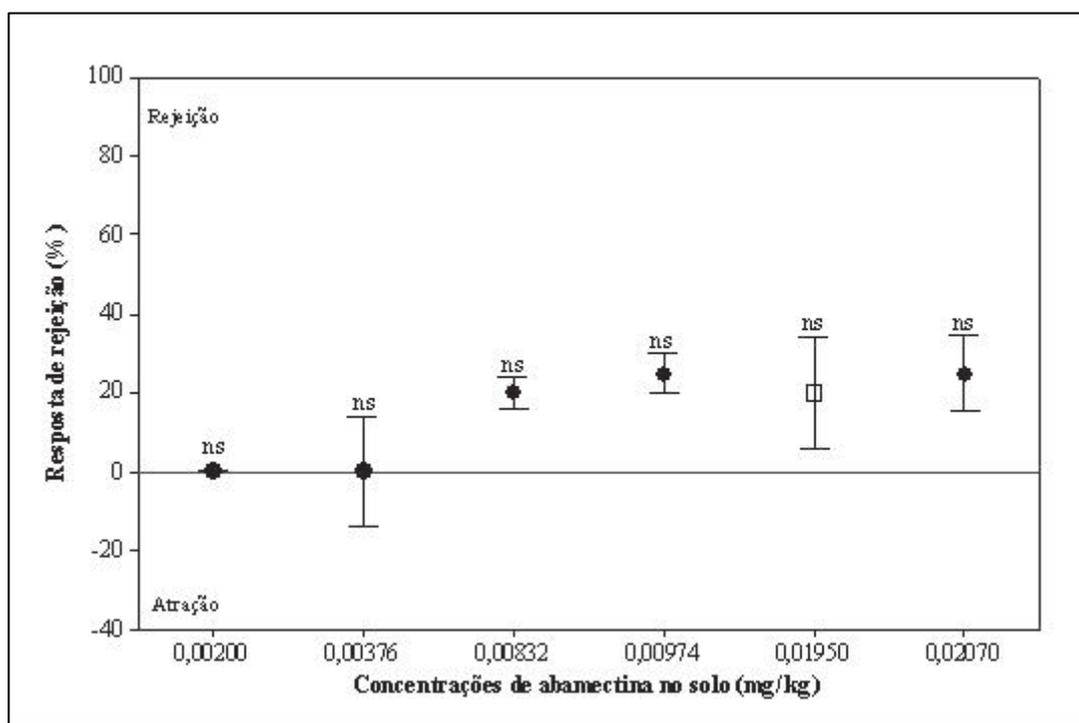


Figura 5.3. Porcentagem de resposta de rejeição (médias + desvio padrão, $n = 4$) de *Eisenia andrei* a solo natural (SN) com diferentes concentrações de abamectina, correspondentes a diluições em solo controle de solo pulverizado com 2DR (●) e a solo pulverizado com DR (□). As barras representam os desvios-padrão. (ns) = resposta não significativa ($p \geq 0,05$), de acordo com Teste Exato de Fisher.

5.5 DISCUSSÃO

O ensaio de rejeição utilizando minhocas é citado como um instrumento sensível para a análise de risco de locais contaminados ou de substâncias, uma vez que essas detectam uma variedade de contaminantes. Para testes com agrotóxicos, os dados de literatura em relação à resposta dos organismos são variáveis. Garcia et al. (2008) e Loureiro, Soares e Nogueira (2005), por exemplo, relatam que baixas concentrações de benomil e carbendazim foram detectadas pelos

organismos, enquanto ausência de resposta de rejeição foi relatada para os organofosforados diazinon e clorpirifós (HODGE et al., 2000).

Nos testes realizados com o substrato SAT no presente estudo, duas alterações foram feitas em relação às recomendações dos protocolos internacionais: uso de resíduo de casca de coco como fonte de matéria orgânica, em substituição à turfa de esfagno, e teste realizado a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Como as minhocas não mostraram uma distribuição significativamente diferente entre as duas metades do recipiente quando o SAT foi utilizado, o teste foi considerado válido. Da mesma forma, não houve mortalidade de organismos, o que satisfaz o segundo critério de validação do teste ($< 10\%$ de mortalidade). Assim, as alterações efetuadas na constituição do SAT e na temperatura não alteraram o desempenho do método. O mesmo foi relatado por Garcia et al. (2008), em ensaio com solo artificial com a mesma constituição do utilizado no presente estudo, em temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, para avaliar o efeito de benomil, carbendazim e lambda-cialotrina sobre o comportamento de rejeição de *Eisenia fetida*.

As minhocas evitaram SAT contaminado a partir da segunda menor concentração testada (1,75 mg de abamectina/kg de solo), o que revela maior sensibilidade do teste de rejeição em relação ao teste agudo realizado com o mesmo substrato e temperatura, em que o valor de $CL_{50,14 \text{ dias}}$ foi de 7,64 mg de abamectina/kg de solo (ver Capítulo 4 desta tese). Em relação à reprodução, sua sensibilidade pode ser considerada menor, uma vez que o número de juvenis produzidos foi igual a zero a partir de 1,75 mg de abamectina/kg de solo, enquanto a $CE_{50, 48h}$ estimada para resposta de rejeição foi de 3,918 mg/kg. O dado sobre o efeito na reprodução também foi obtido em ensaio anterior (ver Capítulo 4 desta tese).

Torkhani et al. (2010) obtiveram resultados contrários aos do presente estudo. Expondo *Eisena fetida* e *Lumbricus terrestris* a ivermectina em solo natural (Lufa 2.2) verificaram alta porcentagem de *Eisenia fetida* no solo-teste (contaminado). Os autores salientam não ter encontrado explicação para esta preferência dos organismos pelo solo contaminado. Citam, ainda, o trabalho de

Gunn e Sadd³ (1994), que trabalharam com um produto formulado e verificaram resposta de rejeição dos organismos, salientando que o produto formulado pode conter outros ingredientes que podem ser tóxicos e aumentem a resposta dos organismos. Essa pode ser a mesma explicação em relação aos resultados obtidos no presente estudo, em que se trabalhou com o produto comercial Vertimec[®] 18 EC.

Garcia et al. (2008) também verificaram atração de *Eisenia fetida* a solo OECD com 1 mg de carbendazim/kg. Hodge et al. (2000) relatam falha em resposta de rejeição de *Aporrectodea caliginosa* a solos contaminados com clorpirifós e diazinon, em ensaios em laboratório e campo. Tais resultados demonstram a necessidade de mais estudos, com diferentes produtos, para melhor validação do método.

A substituição de testes agudos e crônicos pelo teste de rejeição, que é defendida por alguns autores (HUND-RINKE et al., 2003), também é assunto de discussão. Silva e Van Gestel (2009) verificaram que a resposta de rejeição foi mais sensível que a de sobrevivência e menos que a de reprodução, em testes realizados com clorpirifós e carbofuran para *Eisenia andrei*, concluindo que esses testes comportamentais só poderiam ser usados em uma avaliação inicial da toxicidade de agrotóxicos a minhocas. Os mesmos autores fizeram uma compilação de resultados de 18 estudos de comparação de respostas de sobrevivência e reprodução com rejeição e de 7 comparando apenas os dois últimos parâmetros. Os autores relatam que em 67% dos casos a rejeição foi mais sensível que sobrevivência. Por outro lado, apontam que a reprodução geralmente foi o parâmetro mais sensível e que em 36% dos casos as diferenças entre os dois parâmetros não foi maior que duas vezes, chamando ainda a atenção para a maior relevância ecológica dos testes de reprodução.

³ GUNN, A., SADD, J.W. The effect of ivermectin on the survival, behaviour and cocoon production of the earthworm *Eisenia fetida*. **Pedobiologia**, v.38, p.327-333, 1994.

Da mesma forma, Marques, Pereira e Gonçalves (2009) salientam que testes de rejeição não são direcionados a efeitos fisiológicos nos quais a resposta de reprodução se baseia. Estudando os efeitos de dois ingredientes ativos de herbicidas (sulcotriona e penoxsulam) e seus respectivos produtos comerciais sobre o comportamento de rejeição de minhocas, os autores também consideraram os ensaios de rejeição como uma ferramenta preliminar de avaliação de risco dos produtos.

No presente estudo, apesar de ter havido resposta de rejeição das minhocas ao solo contaminado, nos ensaios com SAT, as concentrações utilizadas estão acima das taxas recomendadas de aplicação do produto em campo. Da mesma forma, quando os organismos foram expostos ao SN pulverizado com o produto, simulando uma situação real, mesmo considerando o pior cenário (aplicação de duas vezes a dosagem recomendada), não houve resposta de rejeição. As concentrações presentes no solo, da ordem de $\mu\text{g}/\text{kg}$, estão bem abaixo dos valores de CE_{50} e CEO determinados para abamectina (respectivamente 3,918 e 1,75 mg de abamectina/kg de SAT). Essas baixas concentrações no SN sugerem baixo risco à fauna do solo se forem respeitados a dosagem recomendada para a cultura do morango e considerando apenas uma única aplicação do produto.

5.6 CONCLUSÕES

A resposta de rejeição mostrou-se válida para determinar a toxicidade de Vertimec[®] 18 EC a *Eisenia andrei*. Os organismos mostraram resposta à presença do agrotóxico, com uma relação positiva com o aumento da concentração do produto. Para o agrotóxico em questão, a resposta de rejeição foi mais sensível que a resposta de sobrevivência dos organismos, porém menor que a de reprodução. Assim, esse parâmetro pode ser uma nova ferramenta para uma

avaliação inicial da toxicidade de agrotóxicos, bem como para dar suporte à avaliação de risco de áreas com histórico de aplicação intensiva dos mesmos. No entanto, mais estudos são necessários, visando elucidar variações nas respostas de rejeição das minhocas a alguns produtos, como encontrado em literatura, validando melhor o método. Os resultados obtidos contribuem para suprir a falta de dados ecotoxicológicos sobre efeito de agrotóxicos em condições tropicais.

5.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19 ed. New York, 1995. 1268p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **Análise granulométrica de solos**. Rio de Janeiro, 1968.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. NBR 15537. **Ecotoxicologia terrestre. Ecotoxicidade aguda. Método de ensaio para minhocas**. Rio de Janeiro: ABNT, 11p. 2007

BURG, R.W. et al. Avermectins, new family of potent anthelmintic agents: producing organism and fermentation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 15, n. 3, p. 361-367, 1979.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. **Solo: poluição**. Disponível em: < <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/solo/poluicao.asp>>. Acesso em 20 jul 2010.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. **Resolução n. 420, de 28 de dezembro de 2009**. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas.

DIAO, X.; JENSEN, J.; HANSEN, A. D. Toxicity of the anthelmintic abamectin to four species of soil invertebrates. **Environmental Pollution**. v. 148, p. 514-519, 2007.

ENVIRONMENT CANADA. **Biological test method: tests for toxicity of contaminated soil to earthworms (*Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*, or *Lumbricus terrestris*)**. Report EPS 1/RM/43, Environment Canada, Ottawa, Ontario, Canada.2004.

FERREIRA, C. R. P. T.; VEGRO, C. L. R.; CAMARGO, M. L. B. Defensivos agrícolas: expectativas de aumento de vendas em 2010. **Análises e Indicadores do Agronegócio**, v. 5, n. 7, p. 1-5, 2010.

FISHER, M. H.; MROZIK, H. Chemistry. In: CAMPBELL, W. **Ivermectin and Abamectin**. Springer Verlag, 1989. cap. 1, p. 1-23.

GARCIA, M. **Effects of pesticides on soil fauna**: development of ecotoxicological test methods for tropical regions. 2004. 291 f. Tese (Doutorado) – Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät, Universidade de Bonn.

GARCIA, M.; RÖMBKE, J.; DE BRITO; M.T.; SCHEFFCZYK, A. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. **Environmental Pollution**, v.153, 450-456, 2008.

HALLEY, B. A.; VANDENHEUVEL, W. J. A.; WISLOCKI, P. G. Environmental effects of the usage of avermectins in livestock. **Veterinary Parasitology**, v. 48, p. 109-125, 1993.

HODGE, S.; WEBSTER, K.M.; BOOTH, L.; HEPPLETHWAITE, V.; O'HALLORAN, K. Non-avoidance of organophosphate insecticides by the earthworm *Aporrectodea caliginosa* (Lumbricidae). **Soil Biology and Biochemistry**, v.32, p.425-428, 2000.

HUND-RINKE, K; WIECHERING, H. Earthworm avoidance test for soil assessment: an alternative for acute and reproduction tests. **Journal of Soils and Sediments**, v.1, n.1, p.15-20.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11267. **Soil quality: Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants**. Genebra: ISO. 1999.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11268-1. **Soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using soil substrate**. Genebra: ISO. 1993.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11268-2. **Soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction**. Genebra: ISO. 1998.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 16387. **Soil quality: Effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.): Determination of effects on reproduction and survival**. Genebra: ISO. 2004.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 17512-1. **Soil quality: avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals on behaviour. Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*)**. Genebra: ISO. 2008.

JENSEN, J.; DIAO, X.; SCOTT-FORDSMAND, J.J. Sub-lethal toxicity of the antiparasitic abamectin on earthworms and the application of neutral red retention time as a biomarker. **Chemosphere**, v.68, p.744–750, 2007.

KOLAR, L.; ERŽEN, N.K.; HOGERWERF, L.; van GESTEL, C.A.M. Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. **Environmental Pollution**, v.151, p.182-189, 2008.

LOUREIRO, S.; SOARES, A.M.V.M.; NOGUEIRA, J.A. Terrestrial avoidance behaviour tests as screening tool to assess soil contamination. **Environmental Pollution**, v.138, p.121-131, 2005.

MARQUES, C.; PEREIRA, R.; GONÇALVES, F. Using earthworm avoidance behaviour to assess the toxicity of formulated herbicides and their active ingredients on natural soils. **Journal of Soils and Sediments**, v.9, p.137-147, 2009.

MCCAVERA S; WALSH, T.K.; WOLSTENHOLME, A.J. Nematode ligand-gated chloride channels: an appraisal of their involvement in macrocyclic lactone resistance and prospects for developing molecular markers. **Parasitology**, v.134, p. 1111–1121, 2007.

MOLINARI, G.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M.L. New ventures in the genotoxic and cytotoxic effects of macrocyclic lactones, abamectin and ivermectin. **Citogenetic and Genome Research**. 9 p., 2010. DOI: 10.1159/000293923

MONTEIRO, R. T. R.; FRIGHETTO, R. T. S. Determinação da umidade, pH e capacidade de retenção de água do solo. In: FRIGHETTO, R.T.S.; VALARINI, P.J. **Indicadores biológicos e bioquímicos da qualidade do solo**: manual técnico. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. p.37- 40. 2000.

NATAL-DA-LUZ T.; RÖMBKE J.; SOUSA, J.P. Avoidance tests in site-specific risk assessment: influence of soil properties on the avoidance response of collembola and earthworms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.27, p.1112–1117, 2008.

NATAL-DA-LUZ, T., RIBEIRO, R., SOUSA, J.P. Avoidance tests with Collembola and earthworms as early screening tools for site-specific assessment of polluted soils. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.23, p.2188–2193, 2004.

NATAL-DA-LUZ, T; RÖMBKE J; SOUSA, J.P. Avoidance tests in site-specific risk assessment: influence of soil properties on the avoidance response of collembola and earthworms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.27, p.1112-1117, 2008.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. **Guideline for testing of chemicals n. 207: earthworm acute toxicity test**. Paris: OECD. 1984.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD. **Guideline for testing of chemicals n. 222: earthworm reproduction test**. Paris: OECD. 2004.

PESARO, M. WIDMER, F. NICOLLIER G. ZEYER, J. Effects of freeze-thaw stress during soil storage on microbial communities and methidathion degradation. **Soil Biology and Biochemistry**, n. 35, p. 1049-1061, 2003.

REINECKE, A.J., MABOETA, M.S., VERMEULEN, L.A., REINECKE, S.A. Assessment of lead nitrate and mancozeb toxicity in earthworms using the avoidance response. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.68, p.779–786, 2002.

REINECKE, S.A.; REINECKE A.J. The impact of organophosphate pesticides in orchards on earthworms in the Western Cape, South Africa. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.66, p.244–251; 2007.

RODRIGUES, G. S. Agrotóxicos e contaminação ambiental no Brasil. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (Eds. Técns.). **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. p. 217-265.

SCHAFER, M. Behavioural endpoints in earthworm ecotoxicology. **Journal of Soils and Sediments**, v. 3, n.2, p.79-84, 2003

SILVA, P.M.C.S. de; VAN GESTEL, C.A.M. Comparative sensitivity of *Eisenia andrei* and *Perionyx excavatus* in earthworm avoidance tests using two soil types in the tropics. **Chemosphere**, v.77, n.11, p.1609-1613, 2009.

SUN, Y.; DIAO, X.; ZHANG, Q.; SHEN, J. Bioaccumulation and elimination of avermectin B1a in earthworms (*Eisenia fetida*). **Chemosphere**, v. 60, p. 699-704, 2005.

TIŠLER, T.; ERŽEN, N. K. Abamectin in the aquatic environment. **Ecotoxicology**, v. 15, p. 495-502, 2006.

TORKHANI, A.L.; ERŽEN, N.K.; KOLAR, L.; CELESETINA, T.V.; LEŠTAN, D. Does ivermectin attract earthworms? **Journal of Soils Sediments**, DOI 10.1007/s11368-010-0284-5. out., 2010.

TRINDADE, M. **Nutrientes em sedimentos da represa do Lobo (Brotas - Itirapina)**. 1980. 219 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1980.

YEARLEY, R. B.; LAZORCHAK, J. M.; GAST, L. C. The potential of an earthworm avoidance test for evaluation of hazardous waste sites. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.15, n.9, p.1532–1537, 1996.

CAPÍTULO 6

AVALIAÇÃO DO EFEITO NÃO-ALVO DO INSETICIDA/ACARICIDA VERTIMEC® 18 EC SOBRE UMA COMUNIDADE EDÁFICA

6.1 RESUMO

Poucos são os estudos sobre os efeitos de abamectina sobre organismos de solo e em sua maioria, quando existem, envolvem normalmente ensaios com espécies padronizadas, desconhecendo-se os efeitos tóxicos sobre múltiplas espécies. Nesse sentido, procurou-se avaliar o efeito de Vertimec® 18 EC (abamectina) sobre a comunidade edáfica, por meio da exposição a solo em que o produto foi incorporado, em laboratório, de organismos intrínsecos a amostras de solo coletados em uma área do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CRHEA/SHS/EESC/USP), Itirapina, SP, Brasil. As amostras de solo foram coletadas nos primeiros 10 cm de solo, de quatro pontos em linha reta e para a extração dos organismos utilizou-se uma adaptação do funil de Berlese. Os frascos de coleta abaixo das armadilhas representaram 3 diferentes tratamentos: etanol 70% (objetivando a caracterização da fauna inicial do solo); solo tratado com Vertimec® 18 EC em concentração correspondente à dosagem mais alta recomendada no Brasil para a cultura do morango (0,9 L/ha); e solo controle, ao qual foi adicionada apenas água destilada. Os organismos coletados em potes com solo controle e solo contaminado ficaram expostos aos mesmos, durante 28 dias, em laboratório, sob temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h de luz/12 h de escuro. Após esse período, realizou-se a extração dos organismos contidos nos potes de cada tratamento, procedendo-se sua identificação e contagem. A partir do número de organismos de cada grupo da fauna edáfica capturados, convertido para indivíduos/m² (densidade total), foram obtidos os índices de

diversidade, dominância, equitabilidade e riqueza para cada tratamento. Os resultados encontrados permitem concluir que a presença de Vertimec® 18 EC, na concentração máxima recomendada no Brasil para a cultura do morango, afetou a estrutura (densidade e composição) da comunidade edáfica. Considerando que os organismos foram expostos a uma única incorporação do produto no solo-teste, diferente do que acontece em áreas agrícolas em que é utilizado, em que normalmente mais de uma aplicação é realizada, destaca-se a importância de atenção aos potenciais impactos da utilização do produto sobre o ecossistema solo.

Palavras-chave: agrotóxicos; abamectina; fauna do solo; efeitos não-alvo.

6.2 INTRODUÇÃO

A crescente pressão por maior produção de alimentos provocou, ao longo do tempo, grandes mudanças no panorama das técnicas agrícolas. As novas tecnologias empregadas neste segmento, a partir da chamada “Revolução Verde”, na década de 1960, embora positivas no sentido de aumentar a produtividade das culturas, também podem levar a significativos impactos ambientais. Dentre as inovações, destaca-se o uso de agrotóxicos para defender as lavouras da ação danosa de insetos, patógenos e plantas invasoras. Sua utilização nos sistemas agrícolas se estende, hoje, por praticamente todas as terras cultiváveis, com alguns impactos ambientais imediatos e bem conhecidos e outros que dependem de anos e até décadas para se manifestar e ser avaliados em suas consequências totais (BRAGA et al., 2005). No Brasil a situação não é diferente e, como resultado, desde 2008 o país ocupa o primeiro lugar dentre os mercados mundiais consumidores de agrotóxicos, com estimativa para crescimento das vendas em 2010 (FERREIRA; VEGRO; CAMARGO, 2010).

Os agrotóxicos representam uma pequena parcela dos poluentes totais, porém, não se deve ter complacência com seu uso indiscriminado, pois por sua natureza e propósitos, são tóxicos, podendo ter impactos consideráveis no ambiente, mesmo estando em baixas concentrações (SILVA; FAY, 2004a).

As perdas que ocorrem durante as aplicações de agrotóxicos contribuem com esse cenário, sendo estimado que 90% do volume de calda não atingem o alvo, sendo dissipados para o ambiente e tendo como ponto final reservatórios de água e, principalmente, o solo. Tais perdas se devem tanto a problemas no momento da aplicação, como ocorrência de vazamentos, como às aplicações baseadas em calendários pré-fixados e não na real necessidade, pela presença de pragas e doenças em níveis que poderiam causar dano econômico (BETTIOL; GHINI, 2003). Chegando ao solo, podem ter efeitos deletérios sobre a fauna edáfica, de grande importância neste ecossistema, afetando negativamente sua sobrevivência, reprodução e atividade (CORREIA; OLIVEIRA, 2000; SILVA; FAY, 2004b).

O uso de invertebrados do solo como bioindicadores de danos causados por atividades agrícolas, entre elas a contaminação por agrotóxicos, aparece como uma boa estratégia para avaliação de risco do uso indiscriminado dessas atividades (PAOLETTI, 1999). Dentre esses, a mesofauna, cujos componentes apresentam diâmetro corporal entre 100 µm e 2 mm, vem sendo utilizada (CORREIA; OLIVEIRA, 2000, PARISI et al., 2005). Os colêmbolos são exemplos deste grupo de organismos e, na última década, protocolos com espécies padronizadas, como *Folsomia candida*, para monitoramento de poluentes no solo, têm sido desenvolvidos (ISO, 1999). Da mesma forma, a macrofauna também tem sido utilizada na avaliação ambiental. A macrofauna compreende organismos maiores de 2 mm, como cupins (Isoptera), aranhas (Arachnida), tatuzinhos (Isopoda), centopéia (Chilopoda), piolhos-de-cobra (Diplopoda), moluscos (Mollusca), algumas formigas (Hymenoptera) e minhocas (Oligochaeta), entre outros.

Ensaio com minhocas foram os primeiros a ser desenvolvidos para avaliação dos efeitos de substâncias químicas sobre invertebrados saprófitas terrestres (SPURGEON; WEEKS; VAN GESTEL, 2003) e significaram um impulso ao desenvolvimento da ecotoxicologia terrestre. A partir de então, outros testes e protocolos padronizados foram desenvolvidos, na sua maioria utilizando uma única espécie, como os testes agudos, crônicos e de rejeição com minhocas *Eisenia fetida* e *Eisenia andrei* (ISO 11268-1, 1993; ISO 11268-2, 1998; ISO 17512-1, 2008; ABNT, 2007).

Com intuito de obter dados com maior relevância ecológica, ensaios laboratoriais e de semi-campo com múltiplas espécies (micro e mesocosmos) são mais interessantes e têm sido propostos, como o chamado Modelo de Ecossistema Terrestre (MET) (KNACKER et al., 2004). No entanto, a falta de estudos ecotoxicológicos sobre os efeitos de poluentes sobre a fauna de solo é ainda uma realidade, pois a ecotoxicologia terrestre e, mais especificamente, a ecotoxicologia do solo, é um ramo bastante novo. Assim, ainda existem poucos testes padronizados internacionalmente para a condução de estudos nesta área, os quais começaram a surgir em grande escala há aproximadamente 15 anos (RÖMBKE; KNACKER, 2003). Tal situação torna-se ainda mais grave quando se consideram os efeitos sobre a biodiversidade do solo causada por agrotóxicos, tema cujos estudos são escassos (XIONG et al., 2008).

Em relação aos agrotóxicos, tem-se verificado a ampla utilização de Vertimec[®] 18 EC, cujo ingrediente ativo é a abamectina, para o controle de insetos, ácaros e nematóides de culturas agrícolas, o que é uma realidade em muitas regiões, como é o caso do município de Bom Repouso, MG, que se destaca pela produção de batata-inglesa e morango. Apesar de sua eficiência em controlar tais pragas agrícolas, vem crescendo a preocupação com os efeitos nocivos da abamectina sobre organismos não-alvo. Tišler e Eržen (2006), por exemplo, em estudo sobre os efeitos tóxicos da abamectina em ambiente aquático, verificaram alta toxicidade do composto sobre *Daphnia magna*, concluindo que tal substância pode

representar sério risco aos ecossistemas, pois apesar de ser rapidamente fotodegradada nesse ambiente, é extremamente tóxica. Por outro lado, os poucos trabalhos que avaliaram a toxicidade da abamectina sobre o ecossistema solo, em sua maioria realizados sob condições de laboratório e em ensaios com espécies únicas e padronizadas, indicam significativo efeito deletério do produto sobre a fauna do solo (DIAO; JENSEN; HANSEN, 2007; HALLEY; VANDENHEUVEL; WISLOCKI, 1993; KOLAR et al., 2007).

Esse cenário orientou a realização do presente estudo, que envolveu a execução de ensaio em laboratório, porém com múltiplas espécies de uma comunidade edáfica natural, visando integrar a análise de índices para monitorar a biodiversidade de solo submetido à contaminação por agrotóxicos, a ensaios ecotoxicológicos. Pretendeu-se, com o mesmo, comprovar a hipótese de que o agrotóxico Vertimec[®] 18 EC pode afetar negativamente o compartimento solo, em função de efeitos deletérios sobre a comunidade edáfica.

6.3 MATERIAL E MÉTODOS

6.3.1 Substância-teste

Vertimec[®] 18 EC (Syngenta Proteção de Cultivos Ltda) tem propriedades como acaricida, inseticida e nematicida. Formulado como concentrado emulsionável, é constituído de 18 g de abamectina/L e por apresentar efeito tóxico sobre várias pragas, Vertimec[®] 18 EC é utilizado para proteger diversas culturas agrícolas. No Brasil, de acordo com o Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (Agrofit), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, ele é registrado para 23 culturas, sendo que para morango, a dosagem recomendada no país é de 50 a 75 ml/100 L de água, com aplicação de 1000 a 1250 L de calda/ha.

A abamectina pertence ao grupo das lactonas macrocíclicas e é estruturalmente idêntica à ivermectina, exceto pelo fato de apresentar uma ligação insaturada dupla na posição C22-23, enquanto a ivermectina apresenta uma simples (MOLINARI; SOLONESKI; LARRAMENDY, 2010). Em vertebrados, a ivermectina tem ação neurotóxica, ligando-se aos receptores do neurônio pós-sináptico (posterior), estimulando maior liberação do neurotransmissor gama-aminobutírico (GABA) no neurônio pré-sináptico (anterior). Isso causa uma hiperpolarização do potencial de repouso das células pós-sinápticas, tornando mais difícil a neurotransmissão dos estímulos e, como consequência, a contração muscular. O resultado é paralisia e morte dos organismos. Em invertebrados, o alvo é o glutamato nos canais de cloro localizados nas junções neuromusculares, independentemente do GABA, paralisando músculos somáticos e faríngeais (CAMPBELL, 1989). Recentemente foi sugerido que ambos os canais são os alvos das lactonas macrocíclicas em geral (McCAVERA; WALSH; WOLSTENHOLME, 2007). O modo de ação primário da abamectina é o distúrbio dos receptores de GABA nas células nervosas dos insetos, resultando na inibição tanto das comunicações nervo a nervo, como de nervo a músculos, induzindo a paralisia e a morte do organismo (MOLINARI; SOLONESKI; LARRAMENDY, 2010).

6.3.2 Solo-teste

O solo-teste utilizado nos ensaios foi obtido em uma área do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CRHEA/SHS/EESC/USP), em Itirapina, SP, a qual nunca foi utilizada para fins agrícolas. A área foi preparada previamente à retirada do solo, retirando-se as gramíneas que o recobriam e revolvendo as camadas superficiais (0-15 cm) com o auxílio de enxadas. As amostras retiradas foram acondicionadas em sacos plásticos pretos, para

transporte ao laboratório. Optou-se por este solo-teste uma vez que foi o mesmo utilizado em testes toxicológicos com o mesmo agrotóxico e a espécie padrão de minhoca (*Eisenia andrei*). As amostras foram retiradas de áreas Controle (sem aplicação do agrotóxico) dos ensaios com solo natural (SN) realizados com as minhocas.

As amostras foram mantidas sob refrigeração e, no dia seguinte à coleta, submetidas a peneiramento (5 mm de abertura de malha), com o objetivo de retirar raízes de plantas e torrões. Posteriormente, o solo foi submetido a processo de desfaunagem (PESARO et al., 2003), com ao menos 2 ciclos de congelamento de 48 h, seguidos de descongelamento.

Uma solução aquosa de Vertimec[®] 18 EC foi incorporada ao solo, em laboratório, com concentração correspondente à dose máxima recomendada no Brasil (DR), para a cultura do morango (0,9 L/ha). O tratamento controle correspondeu à incorporação de água destilada. Os volumes de calda do agrotóxico ou de água destilada incorporados ao solo foram calculados de modo a obter umidade final correspondente a 50% de sua capacidade máxima de retenção de água (MONTEIRO; FRIGHETTO, 2000). A homogeneização das misturas solo + substância-teste (ou água destilada) foi realizada manualmente e imediatamente após a homogeneização, o solo-teste foi distribuído nos potes plásticos utilizados no ensaio. Em cada tratamento (controle e DR) foram preparadas duas replicatas para cada um dos pontos de coleta da fauna de solo (R1, R2, R3 e R4).

6.3.3 Coleta de amostras de solo para extração e análise da fauna

Para a extração da fauna do solo foi escolhida uma área arborizada do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada (CRHEA/SHS/EESC/USP), em Itirapina, SP, de onde

foram retiradas amostras de solo de quatro pontos (R1, R2, R3 e R4) dispersos em um transecto.

Para a coleta das amostras de solo, utilizou-se uma sonda quadrada de madeira medindo 25 cm × 25 cm, para demarcação da área (CORREIA; OLIVEIRA, 2000). Ao redor desta sonda foi efetuada uma escavação, com auxílio de enxadões e pás, permitindo o isolamento e retirada da camada correspondente aos 10 cm superiores do solo (Figura 6.1). Os monólitos (amostras) retirados foram acondicionados em sacos plásticos pretos de 100 L e encaminhados ao laboratório para a extração dos organismos.

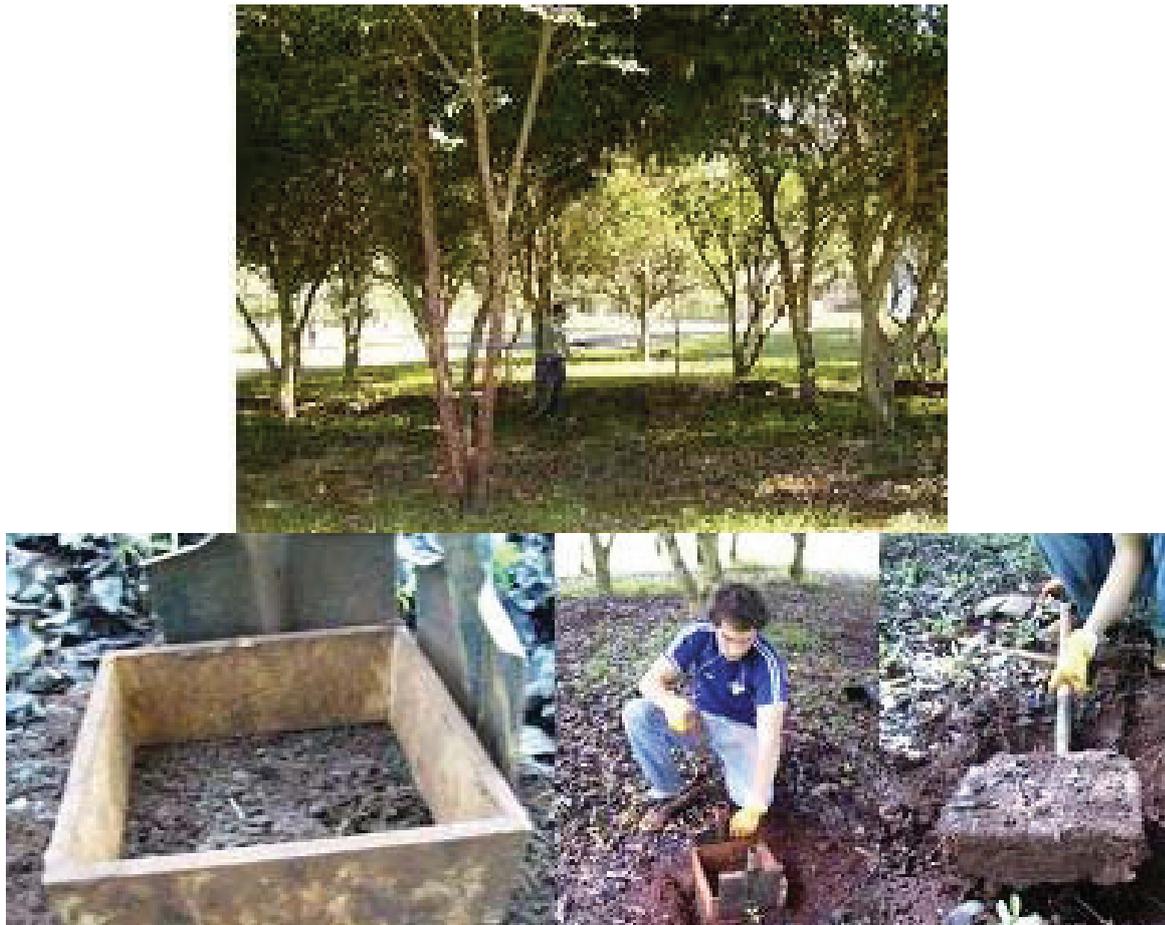


Figura 6.1 Detalhes da área de onde foram coletadas amostras de solo para extração da fauna edáfica e da coleta de monólitos para extração da fauna edáfica. Itirapina, SP, 2008.

6.3.4 Extração dos organismos edáficos

De cada monólito de solo (R1, R2, R3 e R4) foram retirados seis sub-amostras de 500g cada, as quais foram colocadas nas armadilhas para extração dos organismos. Duas sub-amostras foram utilizadas para cada tratamento, representado pelo substrato em que os organismos extraídos eram coletados: controle (solo tratado com água destilada), dose recomendada – DR (solo tratado com Vertimec[®] 18 EC) e etanol 70%. Este último tratamento teve a finalidade de conhecer a comunidade inicial de fauna do solo na área em que as amostras foram coletadas.

As armadilhas para extração da fauna (Figura 6.2) utilizadas no presente estudo consistiram de uma adaptação do funil de Berlese (CORREIA; OLIVEIRA, 2000) e basearam-se em metodologia utilizada por Domene Casadesus⁴ (informação verbal, 2007). Cada uma das amostras de 500 g de solo foi acondicionada sobre uma peneira de abertura de malha de 2 mm, a qual foi colocada sobre um funil feito com cartolina. Os conjuntos foram dispostos sobre galões de água abertos na parte superior, no interior dos quais foram colocados frascos com 50 ml de etanol 70% ou potes com solo-teste e solo-controle.

Sobre cada sistema desses foi acesa uma lâmpada de 100 W, que favorecia a migração dos animais para a ponta do funil e, conseqüentemente, sua queda diretamente nos frascos ou potes. As armadilhas foram assim mantidas (sob luz acesa constante) por 14 dias. A manutenção dada ao teste nessa etapa foi apenas colocação de etanol nos frascos com álcool em que houve evaporação, para que os 50 mL fossem constantes.

Ao término desse período as lâmpadas foram desligadas, as armadilhas desmontadas e os frascos com solução de etanol levados ao laboratório, para separação e posterior identificação dos organismos coletados.

⁴ Xavier Domene Casadesus é pesquisador na Universidade de Barcelona e em 2007 esteve no NEEA/CRHEA/SHS/EESC/USP, desenvolvendo ensaios com fauna de solo, em projeto de colaboração entre a EESC/USP, Universidade de Coimbra e Universidade de Barcelona.



Figura 6.2 Detalhes das armadilhas utilizadas para extração da fauna do solo.

6.3.5 *Exposição dos organismos a solo com Vertimec® 18 EC*

Para verificar o efeito de Vertimec® 18 EC sobre os organismos do solo, ao término do período de 14 dias em que as armadilhas foram mantidas sob luz (item 6.3.4), os potes com solo contaminado pelo agrotóxico e com solo controle foram levados para laboratório, onde foram mantidos por 28 dias sob temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 12 h de luz/12 h de escuro. Esta metodologia também foi baseada nas informações de Xavier Domene Casadesus, como citado no item anterior.

Durante esse período foi realizado controle semanal da umidade do solo nos potes, por meio de adição de água destilada, quando necessário. Tal tarefa foi realizada pesando-se os potes no início do teste e anotando-se a massa encontrada. Semanalmente os potes eram pesados novamente e, quando apresentavam uma massa menor, devido à evaporação da água, adicionava-se água destilada até alcançar a massa inicial.

Passado o período de 28 dias em condições controladas em laboratório, procedeu-se a extração dos organismos presentes em cada pote, da mesma forma que descrito no item 6.3.4. O conteúdo de cada pote foi colocado sobre a peneira da armadilha e acenderam-se

novamente as lâmpadas. Dessa vez, apenas soluções fixadoras de etanol 70% foram colocadas no fundo dos funis, para coleta dos organismos.

Ao fim de 14 dias, as lâmpadas foram apagadas e os frascos foram retirados e levados para a identificação e contagem dos organismos coletados.

6.3.6 Identificação e contagem da fauna de solo

As amostras de fauna presentes nos frascos com etanol 70% foram levadas para o laboratório e o conteúdo de cada frasco passado por peneira com abertura de malha de 0,053 mm, lavando-se com água de torneira, para se retirar detritos menores. O conteúdo retido na peneira foi, então, transferido para placas de Petri com água e submetido à identificação sob microscópio estereoscópico. Tal tarefa foi realizada com apoio do Laboratório de Microbiologia do Solo, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), Piracicaba, SP, e do Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia/EMBRAPA, Seropédica, RJ.

6.3.7 Conversão dos dados para número de indivíduos para indivíduos/m²

O número total de organismos encontrados em cada amostra de 500 g (quantidade de solo em cada armadilha) foi convertido para indivíduos/m², com base na massa específica do solo (1,41 g/cm³), determinada com emprego de cilindro de cravação (ABNT, 1987).

6.3.8 Cálculo dos índices de diversidade

Com os dados de número de organismos/m², foram calculados os índices de diversidade de Shannon (H), de dominância de Simpson (Js) e de riqueza (d) (ODUM, 1988) e equitabilidade de Pielou (e) para cada amostra, além da frequência relativa de cada grupo da fauna de solo em relação ao total de organismos do agrupamento considerado.

O índice de diversidade de Shannon (H) para uma determinada área foi definido por:

$$H = -\sum p_i \times \log p_i$$

em que:

$$p_i = n_i/n$$

n_i = número total de indivíduos de cada grupo na amostra

n = número total de indivíduos na amostra

Segundo Zar (1984) qualquer base logarítmica pode ser usada, sendo que, neste trabalho, adotou-se a base 2.

O índice de dominância de Simpson (Is) foi calculado de acordo com a fórmula:

$$I_s = \sum \frac{n_i(n_i - 1)}{n(n - 1)}$$

O índice de riqueza de Margalef (d) (ODUM, 1988) foi obtido por:

$$I_s = \frac{S - 1}{\log_2 n}$$

em que:

S = número de grupos taxonômicos da fauna de solo na amostra

O índice de equitabilidade de Pielou (e) foi definido por:

$$e = \frac{H}{\log_2 S}$$

em que:

H = índice de diversidade de Shannon

6.3.9 Determinação de parâmetros físicos e químicos do solo

Amostras de solo que foram utilizadas para extração da fauna edáfica (pontos R1, R2, R3 e R4), bem como do solo utilizado no qual os organismos foram expostos a Vertimec[®] 18 EC (solo-teste), foram analisadas no laboratório de Limnologia do NEEA/CRHEA/EESC/USP quanto às características: pH (medido em potenciômetro Micronal B374), umidade e capacidade de retenção de água (MONTEIRO; FRIGHETTO, 2000); teor de matéria orgânica (TRINDADE, 1980); granulometria (ABNT, 1968); fósforo total (ANDERSEN, 1976), nitrogênio orgânico total (AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION– APHA, 1995) e metais (SILVÉRIO, 1999; 2003).

6.3.10 Análise dos dados

Para avaliar o efeito de Vertimec[®] 18 EC, a análise dos dados de densidade total obtidos com a extração de organismos após exposição ao solo-controle e ao solo-teste foi realizada considerando-se cada armadilha extratora (ou cada pote) como uma replicata. Assim, a distribuição normal dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilks e a homogeneidade de variâncias, pelo teste F. Como os dados tinham distribuição normal e variâncias homogêneas, as médias dos dois tratamentos foram comparadas pelo teste *t*. Também foi feita análise dos dados de grupos encontrados inicialmente e nos tratamentos controle e DR. Os dados tinham distribuição normal (teste de Shapiro-Wilks) e variâncias homogêneas (teste de Bartlett) e foram analisados pelo teste de Dunnett. Todas as análises foram realizadas com o programa Toxstat 3.4.

6.4 RESULTADOS

6.4.1. Características físicas e químicas dos solos

A Tabela 6.1 apresenta os dados relativos aos atributos físicos e químicos das amostras de solo coletadas nos quatro diferentes pontos (R1, R2, R3 e R4) dos quais foi extraída a fauna edáfica, e do solo-teste, em que os organismos foram expostos a Vertimec[®] 18 EC. Também são apresentados nesta tabela os valores orientadores recomendados pela Resolução Conama nº 420 (Conama, 2009), para metais no solo.

Em relação às amostras de solo de onde foram extraídos os organismos, a do ponto R3 foi a que apresentou a maioria das características diferentes das demais, com valor de Nitrogênio Total de 0,12%, enquanto nas outras foi detectado de 1,54% a 1,98%; menor teor

de Manganês (19,75 mg/kg), sendo que nas outras amostras variou de 25,65 a 36,93 mg/kg. Neste ponto também foram determinados os maiores valores de Cobre, pH e umidade, respectivamente: 1,375 mg/kg, 5,91 e 10,13%.

O ponto R2 apresentou valor discrepante das demais em relação à concentração de Cr, que chegou a 0,125 mg/kg, sendo que nas demais esse metal não foi detectado (R1) ou foi detectado em menor concentração (0,05 mg/kg, para os pontos R3 e R4).

Nenhuma das amostras apresentou valores de metais superiores aos recomendados pela resolução do Conama (2009) para prevenção e intervenção em área agrícola.

6.4.2 *Composição inicial da fauna edáfica*

Os valores de densidade total, número de grupos encontrados e índices de diversidade da fauna de solo inicial e após exposição ao solo-controle e ao solo-teste, em que foi incorporado Vertimec[®] 18 EC são apresentados na Tabela 6.2

Em relação à fauna inicial, o ponto R3 foi o que apresentou menores valores de indivíduos/m² e para todos os índices, exceto dominância, o que condiz com os valores discrepantes de propriedades físicas e químicas, em relação aos demais pontos.

Também foi observada diminuição acentuada na densidade total de organismos, no número de grupos e na densidade de cada grupo inicialmente observados nas amostras de solo dos pontos de coleta R1 a R4, após a exposição dos organismos extraídos ao solo-teste, mesmo no tratamento controle.

Diferenças nas características físicas e químicas dos solos, como podem ser observadas na Tabela 6.1, podem explicar este fato.

Tabela 6.1

Valores de Nitrogênio total, Fósforo total, metais, teor de umidade, capacidade máxima de retenção de água (CMRA), pH, matéria orgânica (MO), areia, silte e argila presentes nas amostras de solo dos 4 pontos utilizados para extração da fauna edáfica (R1, R2, R3 e R4) e do solo-teste em que os organismos foram expostos a Vertimec® 18EC e dos valores orientadores de referência de qualidade, prevenção e intervenção para metais estabelecidos pela Resolução Conama nº 420.

Amostras	N- total (%)	P- total (µg/kg)	Metais (mg/kg)										Umidade			MO (%)	%						
			Fe	Pb	Mn	Zn	Cu	Cd	Cr	Co	Ni	Na	Al	(%)	areia		silte	argila					
R1	1,98	0,99	42,00	<LQ*	25,65	0,00	0,63	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	7,91	67,00	5,77	12,26	55	26	19	
R2	1,91	1,06	60,93	<LQ	36,08	0,00	0,25	<LQ	0,13	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	3,23	70,70	5,38	11,94	56	26	18	
R3	0,12	1,06	51,03	<LQ	19,75	0,00	1,38	<LQ	0,05	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	10,13	68,39	5,91	11,20	59	26	15	
R4	1,54	0,96	83,20	<LQ	36,93	0,00	0,88	<LQ	0,05	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	2,11	72,62	5,29	12,52	55	26	19	
Solo-teste	4,64	0,69	83,40	N.D.**	91,28	2,02	7,98	0,48	0,50	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	23,49***	69,81	5,39	13,45	72	18	10	
Referência de qualidade	-	-	-	17	-	60	35	0,5	40	13	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Prevenção	-	-	-	72	-	300	60	1,3	75	25	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Intervenção (agrícola)	-	-	-	180	-	450	200	3,0	150	35	70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* <LQ = abaixo do limite de quantificação do método (SILVÉRIO, 1999; 2003)

** ND = não determinado

*** valor ajustado para 50% da CMRA, no momento da adição de solução Vertimec® 18 EC.

6.4.3 Efeitos da exposição a solo contaminado com Vertimec® 18 EC sobre os índices de diversidade da fauna edáfica

Comparando-se os índices de diversidade obtidos para o solo-teste com os do solo-controle é possível notar mudanças em relação à fauna do solo. Em relação à densidade total (Figura 6.3), observou-se acentuada redução no número total de indivíduos no solo submetido ao tratamento com o agrotóxico. O índice médio (considerando os 4 pontos de coleta) passou de 8254 indivíduos/m² no solo controle para 4003 indivíduos/m², no solo em que foi incorporado o agrotóxico, com diferença significativa ($p < 0,05$; $H_0: \mu_{CT} = \mu_{DR}$). Essa tendência de diminuição do número de indivíduos no tratamento com Vertimec® 18 EC também é observada quando se comparam isoladamente os valores de densidade total de indivíduos para as amostras de cada ponto de coleta (Tabela 6.2).

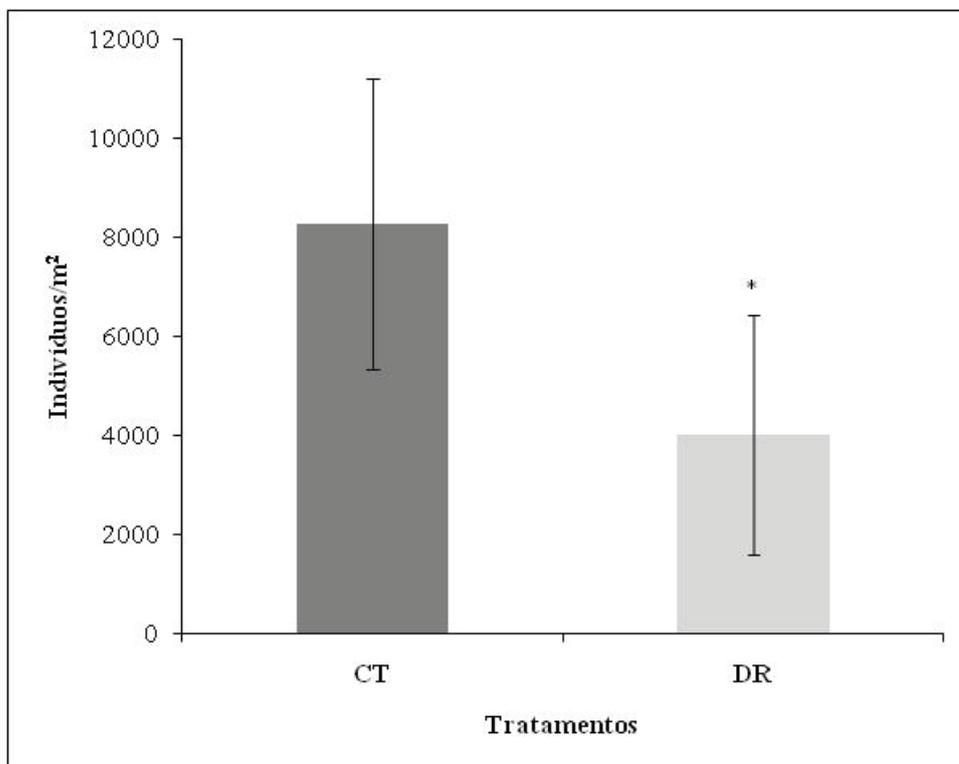


Figura 6.3 Comparação entre valores médios de densidade de organismos edáficos, após exposição a solo controle (CT) e a solo contaminado com Vertimec® 18 EC (DR). * = Diferença significativa ($p = 0,0289$, $n = 8$). Barras de erro representam os desvios-padrão.

Em relação ao número de grupos encontrados, também foi verificada uma mudança negativa relacionada ao uso do Vertimec[®] 18 EC, sendo identificados no controle um total de 7 táxons, contra 5 no tratamento com a dose recomendada do produto. Mesmo desconsiderando o grupo “outras larvas”, ainda há maior número de grupos (6) no solo-controle, em relação ao solo-teste (4). No entanto, a diferença não foi significativa ($p>0,05$).

Considerando-se os principais grupos (Acarina e Collembola), verificou-se redução nos números totais de organismos (soma dos 4 pontos) e também para cada ponto de coleta. Exceção ocorreu para o número de ácaros para o ponto R1, em que foi menor o número de organismos encontrados no solo controle. Para ácaros a redução no número total de organismos não foi tão marcante, mas para colêmbolos foi da ordem de 10 vezes. O número total de colêmbolos foi de 14736, no solo-controle, e 1417, no solo-teste.

Em relação aos índices ecológicos, foram verificados valores maiores de riqueza e diversidade para o tratamento com o solo-controle, em relação ao solo tratado com Vertimec[®] 18 EC. O índice de dominância de Simpson (d) calculado para o solo contaminado foi maior do que para o solo controle, em função do menor número de grupos diferentes no solo com abamectina. Tal constatação é reforçada quando se analisam as frequências relativas de cada grupo para os dois tratamentos (Tabela 6.3). Observou-se ainda um aumento da frequência dos ácaros, enquanto a de Collembola e Hymenoptera foi reduzida.

6.5 DISCUSSÃO

A baixa seletividade ainda é um problema de muitos dos agrotóxicos utilizados nas atividades agrícolas. Assim, o estudo dos efeitos da aplicação desses produtos sobre organismos não-alvo da fauna do solo se torna importante, pois permite avaliar de forma mais

ampla os potenciais efeitos sobre a fauna edáfica. Por outro lado, informações sobre os efeitos de abamectina sobre a fauna edáfica são raras em literatura e, em sua maioria, referem-se a testes com espécies únicas, o que limita uma maior análise do potencial de risco do produto.

Nesse sentido, no presente estudo procurou-se analisar os efeitos da presença de Vertimec[®] 18 EC no solo sobre a estrutura de uma comunidade edáfica natural, exposta aos tratamentos em condições de laboratório. Os resultados mostraram efeito negativo da presença do agrotóxico sobre os organismos do solo, observada inicialmente pela menor densidade total de organismos no solo-teste em relação solo-controle, além da redução no número de grupos encontrados no solo tratado com o agrotóxico, refletindo na diversidade da comunidade.

Tabela 6.3 - Densidade total e frequência relativa dos principais grupos de fauna de solo encontrados nos tratamentos solo-controle (CT) e solo-teste, contaminado com dose máxima de Vertimec[®] 18 EC recomendada para a cultura do morango (DR).

Grupos	CT		DR	
	Densidade (indivíduos/m ²)	Frequência relativa (%)	Densidade (indivíduos/m ²)	Frequência relativa (%)
Acarina	3861	46,78	2905	72,57
Collembola	3684	44,64	354	8,85
Chilopoda	2487	3,00	461	11,50
Hymenoptera	283	3,43	0	0,00
Protura	0,00	0,00	71	1,77
Outros	177	2,15	213	5,31
Total	8254	100,00	4003	100,00

Outra alteração interessante foi observada ao se compararem, entre o tratamento controle e o com o agrotóxico, as frequências relativas dos táxons. No que diz respeito aos ácaros, no tratamento controle estes representaram 46,78% dos indivíduos encontrados, enquanto no solo tratado com o agrotóxico sua frequência relativa aumentou para 72,57%. Em

uma primeira análise, tal constatação contraria o resultado esperado, pois o produto utilizado é um inseticida/acaricida. Porém, o efeito pode ser explicado pelo fato de que há uma grande diversidade de ácaros presentes no solo, com uma comunidade diferente dos ácaros fitófagos presentes na parte aérea das plantas e alvos diretos da aplicação do Vertimec[®] 18 EC que, portanto, devem ser mais sensíveis ao produto. Resultado e justificativa semelhantes são apresentados por Xiong et al. (2008) que, em estudo realizado para avaliar a seletividade de cinco produtos a microartrópodos do solo, também verificaram que a abamectina não teve efeito significativo sobre ácaros e colêmbolos do solo.

Em relação aos colêmbolos, no presente estudo houve uma redução em seu número quando a fauna extraída do solo foi exposta ao tratamento com o agrotóxico, o que está de acordo com resultados encontrados em literatura, que mostram a sensibilidade desses organismos a avermectinas, embora em sua maioria realizados com espécies únicas. Diao, Jensen e Hansen (2007), em estudo sobre os efeitos agudos e crônicos da abamectina em quatro espécies da fauna de solo (duas espécies de colêmbolos, *Folsomia fimetaria* e *Folsomia cândida*; uma espécie de enquitreídeo, *Enchytraeus crypticus*; e uma espécie de minhoca, *Eisenia foetida*) observaram que a abamectina afetou consideravelmente a sobrevivência de *Folsomia fimetaria*, porém não a de *Folsomia cândida*. Jensen, Krogh e Sverdrup (2003), também constataram alta toxicidade aguda da ivermectina, estruturalmente quase idêntica à da abamectina, sobre colêmbolos (*F. fimetaria*) e enquitreídeos (*E. crypticus*), com destaque para os primeiros. A ivermectina também afetou mais severamente a reprodução de *F. fimetaria* em comparação a *E. crypticus*.

A maior ou menor sensibilidade de espécies de um mesmo grupo de organismos a agrotóxicos pode alterar substancialmente os efeitos observados quando se considera a estrutura da comunidade edáfica. Trabalhos com colêmbolos realizados por Endlweber; Schädler e Scheu (2006) e por Fountain et al. (2007), em campo, com o inseticida clorpirifós

salientam isso. Endlweber; Schädler e Scheu (op. cit.) observaram que o clorpirifós reduziu a densidade total dos organismos, tendo praticamente eliminado espécies dos gêneros *Pseudosinella*, *Ceratophysella* e *Sminthuridae*, reduzindo significativamente as densidades dos animais pertencentes aos gêneros *Lepidocyrtus*, *Entomobrya*, *Isotoma*, *Friesea* e *Folsomia*. No estudo de Fountain et al (2007), a densidade total de colêmbolos aumentou. Porém, uma análise mais detalhada da taxonomia dos organismos encontrados mostrou que, dentre as 12 espécies identificadas, a única que foi favorecida pela aplicação da substância foi *Ceratophysella denticulata*, sendo todas as outras prejudicadas expressivamente, o que resultou em mudanças no índice de equitabilidade.

Assim, deve ser salientada a importância da identificação em um nível taxonômico apropriado quando se realiza estudos como este (FOUNTAIN et al., 2007). Portanto uma importante complementação ao presente estudo seria uma identificação mais detalhada dos organismos encontrados, para que possa haver uma maior compreensão dos efeitos da abamectina sobre a fauna de solo.

Além disso, é importante maior atenção aos efeitos das características do solo sobre as populações da fauna edáfica, uma vez que no presente estudo verificou-se uma redução acentuada na densidade de organismos e número de grupos encontrados quando os mesmos foram expostos ao solo-teste, em relação à fauna inicialmente identificada.

6.6 CONCLUSÕES

Os resultados encontrados no presente estudo permitem concluir que a presença do Vertimec[®] 18 EC, na concentração máxima recomendada no Brasil para a cultura do morango, afetou a comunidade edáfica, com efeito negativo, sobre populações de organismos

intrínsecos ao solo, extraídos de uma comunidade natural e expostos ao produto, em laboratório. O efeito foi significativo ($p < 0,05$) para a densidade total de organismos, reduzida quando os organismos foram extraídos e expostos a solo contendo o agrotóxico.

Considerando que os organismos foram expostos a uma única incorporação do produto no solo-teste, diferente do que acontece em áreas agrícolas em que é utilizado, em que normalmente mais de uma aplicação é realizada, destaca-se a importância de maior atenção aos potenciais impactos da utilização do produto sobre o ecossistema solo.

Mais estudos são necessários, envolvendo a identificação dos organismos em níveis taxonômicos mais apropriados, para elucidar os efeitos do produto sobre a estrutura da comunidade edáfica.

6.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15537. **Ecotoxicologia terrestre – ecotoxicidade aguda: método de ensaio com minhocas**. 11p. 2007.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 9813. **Solo**: determinação da massa específica aparente *in situ*, com emprego de cilindro de cravação: método de ensaio. Rio de Janeiro, 1987.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19 ed. New York, 1995. 1268p.

ANDERSEN, J.M. An ignition method for determination of total phosphorus in lake sediments. **Water Research**, v. 10, p. 329-331, 1976.

BETTIOL, W.; GHINI, R. Proteção de plantas em sistemas agrícolas alternativos. In: CAMPANHOLA, C.; BETTIOL, W. (Eds. Téc.). **Métodos alternativos de controle fitossanitário**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2003. p. 79-95

BRAGA, B. et al. Introdução à engenharia ambiental: **O desafio do desenvolvimento sustentável**. 2ª edição. São Paulo: Prentice Hall, 2005. 318 p.

CAMPBELL, W. **Ivermectin and abamectin**. New York: Springer Verlag, 1989. 363p.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução n. 420, de 28 de dezembro de 2009. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas.

CORREIA, M.E.F.; OLIVEIRA, L.C.M. de. **Fauna de solo**: aspectos gerais e metodológicos. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2000. 46p. (Embrapa Agrobiologia. Documentos, 112).

DIAO, X.; JENSEN, J.; HANSEN, A.D. Toxicity of the anthelmintic abamectin to four species of soil invertebrates. **Environmental Pollution**. v. 148, p. 514-519, 2007.

ENDLWEBER, K.; SCHÄDLER, M.; SCHEU, S. Effects of foliar and soil insecticide applications on the collembolan community of an early set-aside arable field. **Applied Soil Ecology**, v. 31, p. 136-146, 2006.

FERREIRA, C.R.R.P.T.; VEGRO, C.L.R. Defensivos agrícolas: expectativas conservadoras para o mercado. **Análises e Indicadores de Agronegócio**, v. 4, n. 10, p. 1-3, 2009.

FOUNTAIN, M. T. et al. The effects of the insecticide chlorpyrifos on spider and Collembola communities. **Pedobiologia**, v. 51, p. 147-158, 2007.

HALLEY, B.A.; VANDENHEUVEL, W.J.A.; WISLOCKI, P.G. Environmental effects of the usage of avermectins in livestock. **Veterinary Parasitology**, v.48, p.109-125, 1993.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11268-1. **Soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using soil substrate**. Genebra: ISO, 1993.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11268-2. **Soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction**. Genebra: ISO, 1998.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11267. **Soil quality: inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants**. Genebra: ISO, 1999.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 17512-1. **Soil quality: avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals on behaviour. Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*)**. Genebra: ISO. 2008.

JENSEN, J.; KROGH, P. H.; SVERDRUP, L. E. Effects of the antibacterial agents tiamulin, olanquinox and metronidazole and the anthelmintic ivermectin on the soil invertebrate species *Folsomia fimetaria* (Collembola) and *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae). **Chemosphere**, v. 50, p. 437-443, 2003.

KNACKER, T. et al. Ring-testing and field-validation of a terrestrial model ecosystem (TME): an instrument for testing potentially harmful substances: conceptual approach and study design. **Ecotoxicology**, v. 13, p. 9-27, 2004.

KOLAR, L. et al. Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. *Environmental Pollution*, v. 151, p. 182-189, 2007.

MCCAVERA S; WALSH, T.K.; WOLSTENHOLME, A.J. Nematode ligand-gated chloride channels: an appraisal of their involvement in macrocyclic lactone resistance and prospects for developing molecular markers. *Parasitology*, v.134, p. 1111–1121, 2007.

MOLINARI, G.; SOLONESKI, S.; LARRAMENDY, M.L. New ventures in the genotoxic and cytotoxic effects of macrocyclic lactones, abamectin and ivermectin. *Citogenetic and Genome Research*. 9 p., 2010. DOI: 10.1159/000293923

MONTEIRO, R.T R.; FRIGHETTO, R.T.S. Determinação da umidade, pH e capacidade de retenção de água do solo. In: FRIGHETTO, R. T. S.; VALARINI, P. J. **Indicadores biológicos e bioquímicos da qualidade do solo**: manual técnico. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. p.37- 40. 2000.

ODUM, E.P. **Ecologia**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. 434 p.

PAOLETTI, M.G. Using bioindicators based on biodiversity to assess landscape sustainability. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 74, p. 1-18, 1999.

PARISI, V. et al. Microarthropod communities as a tool to assess soil quality and biodiversity: a new approach in Italy. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 105, p. 323-333, 2005.

PESARO, M. WIDMER, F. NICOLLIER G. ZEYER, J. Effects of freeze-thaw stress during soil storage on microbial communities and methidathion degradation. *Soil Biology and Biochemistry*, n. 35, p. 1049-1061, 2003.

RÖMBKE, J.; KNACKER, T. Standardisation of terrestrial ecotoxicological effect methods: an example of successful international co-operation. *Journal of Soils and Sediments*, v. 3, n. 4, p. 237-238, 2003.

SILVA, C.M.M. de S.; FAY, E.F. Agrotóxicos: aspectos gerais. In: _____. (Eds. Téc.). **Agrotóxicos e ambiente**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004a. cap. 1, p. 17-73.

SILVA, C.M.M. de S.; FAY, E.F. Efeitos de agrotóxicos em organismos não-alvo do solo. In: _____. (Eds. Téc.). **Agrotóxicos e ambiente**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004b. cap. 7, p. 259-288.

SILVÉRIO, P.F. **Partição, biodisponibilidade e toxicidade de metais pesados a organismos bentônicos em sedimentos**. 1999. 78 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1999.

SILVÉRIO, P. F. **Bases técnico-científicas para a derivação de valores-guias de qualidade de sedimento para metais: experimentos de campo e laboratório**. 2003. 145 f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003.

SPURGEON, D. J.; WEEKS, J. M.; VAN GESTEL, C.A.M. A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology. **Pedobiologia**, v. 47, p. 588-606, 2003.

TIŠLER, T.; ERŽEN, N. K. Abamectin in the aquatic environment. *Ecotoxicology*, v. 15, p. 495-502, 2006.

TRINDADE, M. **Nutrientes em sedimentos da represa do Lobo (Brotas-Itirapina)**. 1980. 219 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1980.

XIONG, Y. et al. Selection of selective biocides on soil microarthropods. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 40, p. 2706-2709, 2008.

ZAR, J.M. **Bioestatistical analysis**. 2^a edição. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 1984. 718 p.

CAPÍTULO 7

CONSIDERAÇÕES FINAIS, RECOMENDAÇÕES E CONCLUSÃO

7.1 A SITUAÇÃO DO MUNICÍPIO DE BOM REPOUSO

Pelos resultados obtidos no decorrer da pesquisa, verifica-se que existe um potencial risco ambiental decorrente das atividades agrícolas desenvolvidas no município de Bom Repouso, MG, com utilização ampla e irrestrita de diversos produtos, com efeitos toxicológicos e de periculosidade ambiental com níveis diferenciados, o que, em conjunto com a adoção de práticas de produção inadequadas, torna a situação preocupante em termos de saúde ambiental e humana.

O baixo nível de escolaridade dos produtores, que em sua maioria também não possuem informação técnica sobre o uso e riscos dos agrotóxicos utilizados (apenas 7% relataram ter recebido alguma informação) se reflete nas ações inadequadas, que incluem a não utilização de receituário agrônômico para compra dos produtos; aplicações seguindo calendário pré-definido e não a necessidade real; utilização de dosagens ou número de aplicações maiores do que as recomendadas para as culturas; desrespeito aos períodos de carência dos agrotóxicos, aplicando-os inclusive durante a colheita; queima ou abandono no campo de embalagens vazias dos produtos, entre outras. Todas essas ações contribuem de forma significativa para os riscos ambientais.

Por outro lado, esses resultados também chamam a atenção para o aspecto social e de saúde pública. O município de Bom Repouso tem somente 11.000 habitantes, dos quais aproximadamente 50% residem na área rural ou desenvolvem atividades ligadas diretamente à

agricultura. Considerando apenas o risco relacionado à saúde de aplicadores, verificou-se que este é alto, uma vez que a maioria relatou não utilizar equipamentos de proteção individual (EPIs) durante o preparo das caldas e as aplicações de agrotóxicos. Além disso, os principais cultivos são conduzidos em áreas de acentuado declive, sendo que população utiliza as nascentes e riachos para abastecimento de água, o que aumenta o risco à saúde pública, conforme vem sendo percebido no local, com relatos de maior incidência de casos de câncer além de outras doenças mais comuns de veiculação hídrica.

Associados aos estudos que avaliaram a ecotoxicidade do principal produto utilizado, considerados a seguir, esses resultados podem ser utilizados como subsídios para a proposição de projetos, programas e políticas públicas voltados à produção agrícola local, tornando-a uma prática mais sustentável. São exemplos o incentivo à substituição do sistema de cultivo atual pelo orgânico ou ao estabelecimento de programas como o de Produção Integrada, estabelecido no Brasil pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, e que consiste em um conjunto de técnicas voltadas à produção de alimentos utilizando métodos de manejo que visam à mínima utilização de agrotóxicos.

Um trabalho neste sentido foi desenvolvido por ocasião do Projeto Mogi-Guaçu (Fipai/Programa Petrobras Ambiental), pelo Núcleo de Agrotóxicos e Agricultura Alternativa, do qual a autora da presente tese foi coordenadora, originando, a partir de então, as hipóteses da pesquisa. Palestras sobre uso correto e seguro de agrotóxicos e um curso de agricultura orgânica foram oferecidos aos produtores, bem como foi implantada no município uma estação experimental de produção de morango orgânico. No entanto, problemas relacionados principalmente ao escoamento da produção, dificultado pela má qualidade das estradas de terra, bem como a dificuldade em conseguir a certificação de seus produtos por não estarem totalmente isentos de agrotóxicos, uma vez que não havia isolamento total de áreas vizinhas onde os mesmos continuavam a ser aplicados, levaram a maior parte do grupo de produtores

envolvidos com o cultivo orgânico a desistirem. Atualmente, em visita ao local por pós-graduandos que ainda desenvolvem suas pesquisas no município, verificou-se que o cultivo orgânico foi reiniciado por antigos produtores vinculados ao Projeto Mogi-Guaçu, o que pode ser uma alternativa viável em substituição à forma atual de produção, embora esta seja uma grande utopia em relação aos interesses diversos existentes no gerenciamento político e econômico em diferentes níveis de organização social.

Por outro lado, também verificou-se a ampliação da área de plantio, com o estabelecimento de novas fronteiras agrícolas em áreas de interesse ambiental para conservação, bem como da adoção de novas relações de trabalho, contribuindo para o êxodo rural por meio da magnificação do setor produtivo, amparado pela formação de grupos e/ou aquisição de pequenas propriedades e sua transformação em grandes redes produtivas. Se por um lado aumenta-se a produção, por outro se verificou o início da perda das relações familiares na produção e, conjuntamente, o aumento da exploração do trabalho rural, o que não foi acompanhado pelo incentivo a adoção de medidas mais preventivas em relação ao uso de agrotóxico e de seus efeitos ambientais e sociais.

No entanto, acredita-se que, apesar das forças contrárias, os dados obtidos no presente estudo poderão ser utilizados para sensibilizar e esclarecer a população local e os gestores, dando suporte a uma melhor reflexão e discussão entre eles, possibilitando tomadas de decisões mais conscientes e adequadas à realidade da comunidade e às suas percepções. Assim, poderiam favorecer a maior participação de todos nos projetos, programas e planos como os citados, garantindo sua continuidade e, conseqüentemente, a sustentabilidade da atividade agrícola do município.

7.2 OS ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS COM ORGANISMOS DE SOLO

Conforme salientado em diferentes capítulos desta tese, por meio da revisão bibliográfica efetuada, pouco se conhece ainda sobre a toxicidade dos agrotóxicos, bem como as diferentes respostas que podem ocorrer em relação aos diferentes organismos do solo, quando se consideram regiões de clima tropical.

Testes de toxicidade com organismos de solo ainda são pouco desenvolvidos no Brasil, conforme observado nas reuniões científicas promovidas pela Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia, representando menos de 15% dos trabalhos apresentados, conforme observado nos últimos três Congressos Brasileiros de Ecotoxicologia, realizados em São Pedro/SP e São Bento/RS e Bombinhas/SC, em 2006, 2008 e 2010, respectivamente, embora outros fóruns de discussão talvez venham sendo utilizados para debater o assunto.

Além disso, os protocolos internacionais existentes para os mesmos somente recentemente passaram a ser discutidos, com intuito de sua adoção no Brasil, pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). Isso ressalta a necessidade de ampliar os estudos nesta área, buscando-se a adequação e padronização dos protocolos para nossas condições. O presente estudo também trouxe, dessa forma, uma contribuição ao acima exposto.

Ressalta-se, no entanto, a necessidade de se dar continuidade aos estudos, para melhor avaliação e adequação dos métodos atualmente disponíveis e busca por novos, que sejam mais rápidos e eficientes na obtenção de respostas ecotoxicológicas, como o uso de alterações morfológicas e enzimáticas nos organismos. Por outro lado, há a necessidade de se obter maior relevância ecológica com os métodos ecotoxicológicos empregados e, neste sentido, o estudo realizado com uma comunidade natural do solo, para verificar os efeitos do agrotóxico mais utilizado pelos produtores de Bom Repouso, também se mostrou interessante. Existe a

necessidade de mais estudos nesta linha de pesquisa, bem como de mais estudos sobre os efeitos de agrotóxicos sobre o ecossistema solo, realizados em condições de campo.

Nos estudos ecotoxicológicos, tradicionalmente tem-se utilizado os testes laboratoriais, desenvolvendo ensaios em situações controladas, os quais, em sua maioria, simulam condições muito específicas e controladas. Se por um lado facilitam as análises comparativas e geram respostas mais rápidas, por outro minimizam as relações existentes e as possíveis variações decorrentes de processos naturais, aumentando as diferenças entre os resultados dos ensaios e a compreensão dos reais efeitos tóxicos. Nesse sentido, maior esforço deve ser alocado no desenvolvimento de pesquisas em unidades experimentais *in situ*, destacando-se, de forma bem evidente, que essa abordagem ainda é limitada, como pode ser avaliada pela reduzida contribuição dos mesmos nos eventos científicos realizados no Brasil, a despeito de sua importância.

7.3 OS ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS COM VERTIMEC® 18 EC

O presente estudo também teve como contribuição a identificação da toxicidade do agrotóxico Vertimec® 18EC em organismos do solo, com a obtenção de dados que poderão subsidiar a avaliação de risco do agrotóxico, em condições tropicais.

Os dados de toxicidade obtidos para o produto, tendo como base a dose de seu ingrediente ativo (abamectina), mostraram maiores respostas de toxicidade aguda, crônica e comportamental do produto, em relação a dados de literatura, obtidos em sua maioria para condições de clima temperado. No entanto, são necessários mais estudos para melhor elucidar as causas, aqui atribuídas ao uso do produto em sua formulação comercial e,

consequentemente, à possível toxicidade decorrente de substâncias consideradas inertes presentes na formulação.

Com relação ao risco ecológico da utilização do produto, com base no ecossistema solo, os dados obtidos no presente estudo mostram que ele existe. A Tabela 7.1 traz um resumo dos resultados, evidenciando os efeitos agudos, crônicos e comportamentais para um teste uniespecífico, e efeitos na densidade e composição em testes multiespecíficos, com organismos da fauna edáfica.

Tabela 7.1 Observação de efeitos na função habitat do solo, por meio de diferentes respostas dos organismos à presença de Vertimec® 18 EC.

Solo/concentrações de abamectina	Testes agudos com <i>Eisenia andrei</i>	Testes de reprodução com <i>Eisenia andrei</i>	Testes de rejeição com <i>Eisenia andrei</i>	Testes com comunidade natural
Solo natural (SN) com concentração correspondente à DR*	-	-	-	+
Solo artificial (SAT), com concentrações superiores à DR	+	+	+	nd

*DR = dosagem máxima recomendada no Brasil para a cultura do morango.

nd = não determinado

Embora os resultados dos testes com *Eisenia andrei* tenham sido negativos para as respostas de mortalidade, reprodução e rejeição, na presença de abamectina na concentração correspondente à DR, houve alteração na estrutura da comunidade natural, nesta concentração.

Além disso, deve-se salientar que em todos os ensaios efetuou-se apenas uma aplicação ou incorporação do produto. Desta forma, o risco considerando a condição de culturas de morango em Bom Repouso, por exemplo, onde o número de aplicações relatadas pelos produtores chega até 20 por ciclo, também pode ser alto, mesmo que sejam feitas com a

dose recomendada do produto. Estudos objetivando avaliar o efeito cumulativo de diferentes aplicações do produto são recomendados.

Além dos efeitos sobre os organismos de solo, na avaliação de risco do produto, ou da contaminação potencial em Bom Repouso, devem ser considerados efeitos sobre organismos aquáticos. Nesse sentido, resultados de pesquisas realizadas no Núcleo de Estudos em Ecossistemas Aquáticos (NEEA/CRHEA/EESC/USP) também demonstram os efeitos negativos do Vertimec® 18 EC. Resultados obtidos em laboratório com a abamectina demonstraram alta toxicidade em concentrações muito baixas, sendo os valores de CE50; 48h para *Daphnia similis* de 0,016 µg/L; a CL50; 96h para *Chironomus. xanthus* de 3,12 µg/L e CL50; 48h para *Danio rerio* de 33,7 µg/L. Resultados obtidos com o produto comercial, em experimentos de *runoff*, também revelaram alta toxicidade. As espécies mais sensíveis foram os organismos zooplanctônicos, com valores de CE50; 48h para *D. similis* de 13,87%, o que representa cerca de 4µg/L de abamectina e para *C. dubia* de 3,12% (0,9 µg/L de abamectina). Os valores de CL50; 96h para o *C. xanthus* foi de 16,24 (5,0 µg/L de abamectina). Experimentos realizados em mesocosmos também demonstraram efeitos ambientais significativos do Vertimec® 18 EC sobre a comunidade fitoplanctônica e perifítica (composição, riqueza e abundância), macrófitas aquáticas (aspectos biométricos, biomassa e necrose foliar) e fauna associada às macrófitas (composição, riqueza e abundância).

Recomenda-se, portanto, a determinação de concentrações do agrotóxico em amostras de água e do solo do município de Bom Repouso e posterior análise de risco ecológico englobando todos os organismos para o qual a toxicidade do produto foi avaliada. Tendo em vista a exposição da população humana local ao agrotóxico, por exemplo, como aplicadores ou consumidores de produtos agrícolas ou água com potencial ter resíduos do agrotóxico em questão, uma análise integrada, incluindo efeitos sobre a saúde humana, seria recomendável.

7.4 CONCLUSÃO

A hipótese inicial desta pesquisa foi *Agrotóxicos atualmente utilizados nos cultivos de batata e morango no município de Bom Repouso afetam negativamente a comunidade edáfica, podendo levar à instabilidade do solo como ecossistema.*

Após o desenvolvimento da pesquisa e considerando:

- a) os resultados obtidos nos levantamentos em Bom Repouso, incluindo a detecção de resíduos de abamectina em amostras de solo, inclusive de área de mata.
- b) a forma intensiva e até abusiva com que os produtores aplicam os agrotóxicos, chegando a relatar até 20 aplicações por ciclo da cultura do morango para o produto mais citado (Vertimec[®] 18 EC).
- c) que, além de Vertimec[®] 18 EC, outros 83 produtos foram citados pelos produtores locais como sendo aplicados regularmente e concomitantemente.
- d) os resultados obtidos nos ensaios ecotoxicológicos com Vertimec[®] 18 EC realizados com a espécie de minhoca *Eisenia andrei*.
- e) as alterações na estrutura da comunidade de organismos do solo expostos a solo com Vertimec[®] 18 EC, na concentração recomendada para a cultura do morango,

a hipótese da pesquisa foi aceita, ou seja, a prática agrícola adotada no município, com o uso intensivo de agrotóxico, com destaque para Vertimec[®]18 EC, é prejudicial a comunidade edáfica.

APÊNDICE A

QUESTIONÁRIO UTILIZADO PARA LEVANTAMENTO DE INFORMAÇÕES SOBRE ATIVIDADES AGRÍCOLAS EM BOM REPOUSO, MG

1. INFORMAÇÕES GERAIS

1.1 Proprietário:	
1.2 Entrevistado:	
1.3 Entrevistadores:	
1.4 Nome da Propriedade:	
1.5 Localização (Bairro):	1.6 Coord. Geográficas:
1.7 Tamanho da Propriedade (estimativa):	1.8 Data:
1.9 Profissão/Ocupação do proprietário: <input type="checkbox"/> Doméstica <input type="checkbox"/> Pedreiro <input type="checkbox"/> Trabalhador <input type="checkbox"/> Aposentado <input type="checkbox"/> Agricultor <input type="checkbox"/> Funcionário Público <input type="checkbox"/> Comerciante <input type="checkbox"/> Outros - especificar	
1.10 Nível de escolaridade do proprietário: <input type="checkbox"/> nenhum <input type="checkbox"/> 1ª a 4ª séries (antigo primário) incompleto <input type="checkbox"/> 1ª a 4ª séries (antigo primário) completo <input type="checkbox"/> 5ª a 8ª séries (antigo ginásial) incompleto <input type="checkbox"/> 5ª a 8ª séries (antigo ginásial) completo <input type="checkbox"/> 2º grau incompleto <input type="checkbox"/> 2º grau completo <input type="checkbox"/> Superior <input type="checkbox"/> Curso Técnico	
1.11 Nº de agregados na família:	
1.12 Renda familiar: <input type="checkbox"/> Sem Renda fixa Estimativa mensal:	

2. INFORMAÇÕES AGRÍCOLAS E FITOSSANITÁRIAS

2.1 Qual (ais) a(s) cultura(s) presente(s) na propriedade? Há quantos anos?
2.2 Qual a área plantada?
2.3 Quais entes da família trabalham na lavoura? <input type="checkbox"/> todos <input type="checkbox"/> pai e mãe <input type="checkbox"/> filhos adultos <input type="checkbox"/> outros – Especificar
2.4 A cultura é afetada por pragas e doenças? <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N Quais as mais comuns?

<p>2.5 a) Usa algum tipo de agrotóxico para prevenir ou tratar as pragas ou doenças que aparecem nas culturas? <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N b) Se SIM, quais?</p>	<p>2.6 a) Associa agrotóxicos diferentes? <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N b) Se SIM, quais?</p>
<p>2.7 Qual o tempo (meses) do ciclo da cultura?</p>	<p>2.8 Qual a época do ano em que é (são) utilizado(s) o(s) agrotóxico(s)?</p>
<p>2.9 Utiliza o agrotóxico em que fase do ciclo da cultura? <input type="checkbox"/> Total (contínuo) <input type="checkbox"/> parcial <input type="checkbox"/> durante a “ação da praga ou doença” <input type="checkbox"/> antes do plantio (preparo da terra) <input type="checkbox"/> Outros – Especificar:</p>	<p>2.10 Com que frequência é feita a aplicação do agrotóxico? <input type="checkbox"/> diária <input type="checkbox"/> semanal <input type="checkbox"/> quinzenal <input type="checkbox"/> mensal</p>
<p>2.11 Em que momento(s) tem contato com o agrotóxico? <input type="checkbox"/> preparo da calda <input type="checkbox"/> aplicação <input type="checkbox"/> retorno ao local da cultura após aplicação <input type="checkbox"/> outro(s)</p>	
<p>2.12 Qual o tempo de trabalho diário na lavoura?</p>	
<p>2.13 Por quanto tempo, durante o trabalho diário, tem contato com o(s) agrotóxico(s)?</p>	
<p>2.14 Que tipo de proteção utiliza no preparo da calda e na aplicação de agrotóxicos? <input type="checkbox"/> Nenhum <input type="checkbox"/> Luvas impermeáveis <input type="checkbox"/> Camisa de manga curta <input type="checkbox"/> Camisa de manga longa <input type="checkbox"/> Máscara descartável para poeira <input type="checkbox"/> Máscara com filtro químico <input type="checkbox"/> Avental impermeável <input type="checkbox"/> Botas impermeáveis <input type="checkbox"/> Chapéu/boné <input type="checkbox"/> Macacão <input type="checkbox"/> Calça comprida <input type="checkbox"/> Kit completo de equipamento de proteção individual – EPI</p>	
<p>2.15 Onde armazena os agrotóxicos? <input type="checkbox"/> Dentro de casa <input type="checkbox"/> Em um depósito específico <input type="checkbox"/> Junto às máquinas e equipamentos <input type="checkbox"/> Na garagem <input type="checkbox"/> Outro – Especificar:</p>	<p>2.16 O que faz com as embalagens vazias? <input type="checkbox"/> Guarda <input type="checkbox"/> Deixa na lavoura <input type="checkbox"/> Enterra <input type="checkbox"/> Reutiliza <input type="checkbox"/> Queima <input type="checkbox"/> Destina ao lixo comunitário <input type="checkbox"/> Devolve para o vendedor</p>
<p>2.17 Onde compra os produtos?</p>	
<p>2.18 Tríplice lavagem? <input type="checkbox"/> Não conhece <input type="checkbox"/> Conhece e faz <input type="checkbox"/> Conhece, mas não faz</p>	<p>2.19 Que tipo de pulverizador utiliza? <input type="checkbox"/> costal <input type="checkbox"/> tratorizado</p>
<p>2.20 Utiliza receituário agrônomo? <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N</p>	<p>2.21 Qual a quantidade de agrotóxico (s) aplicado (s) em relação à área da lavoura?</p>
<p>2.22 Quais os demais insumos agrícolas utilizados (fertilizantes, corretivos do solo)?</p>	
<p>2.23 Com quem aprendeu a trabalhar com agrotóxicos? <input type="checkbox"/> Empregador <input type="checkbox"/> Extensionista <input type="checkbox"/> Outro agricultor <input type="checkbox"/> Familiar <input type="checkbox"/> Outros Especificar:</p>	

<p>2.24 Recebe assistência técnica ou treinamento antes, durante e após a utilização de agrotóxicos? <input type="checkbox"/> Não recebe <input type="checkbox"/> Extensionista <input type="checkbox"/> Cooperativa <input type="checkbox"/> Técnico de revenda <input type="checkbox"/> Outro agricultor <input type="checkbox"/> Empregador <input type="checkbox"/> Outros Especificar:</p>	
<p>2.25 a) Já ouviu falar de período de carência? <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N b) Se SIM, onde obtém informações sobre período de carência? <input type="checkbox"/> Rótulo do produto <input type="checkbox"/> Fornecida pelo técnico <input type="checkbox"/> Outros Especificar:</p>	
<p>2.26 Qual a cor da faixa do rótulo que indica maior perigo do(s) agrotóxico(s)? <input type="checkbox"/> Não sabe <input type="checkbox"/> Azul <input type="checkbox"/> Amarelo <input type="checkbox"/> Vermelho <input type="checkbox"/> Verde</p>	
<p>2.27 a) Sente ou já sentiu algum mal-estar durante ou após a aplicação do(s) agrotóxico(s)? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não b) Se SIM, qual(is) tipo(s): <input type="checkbox"/> náuseas <input type="checkbox"/> dor de cabeça <input type="checkbox"/> vômito <input type="checkbox"/> insônia ou sono perturbado <input type="checkbox"/> apatia <input type="checkbox"/> depressão <input type="checkbox"/> falhas da memória <input type="checkbox"/> dificuldade de raciocínio e concentração <input type="checkbox"/> Outros – Especificar: c) Faz quanto tempo?</p>	
<p>2.28 Precisou ser hospitalizado? <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N a) Qual produto utilizava? b) Qual atividade exercia? <input type="checkbox"/> preparo da calda <input type="checkbox"/> aplicação <input type="checkbox"/> retorno à cultura <input type="checkbox"/> outra. Especificar:</p>	
<p>2.29 a) Precisou ficar afastado da atividade na lavoura? <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N b) Se SIM, por quanto tempo? c) Houve registro? <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N d) Se SIM, onde foi efetuado o registro?</p>	
<p>2.30 Quais as doenças mais comuns na sua família e/ou na comunidade?</p>	
<p>2.31 Já ouviu falar de experiências com produção orgânica? <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N</p>	<p>2.32 Há interesse em experimentar? <input type="checkbox"/> S <input type="checkbox"/> N</p>

2.33 a) Já ouviu falar de produtos ou métodos naturais para combater as pragas e doenças de plantas?

S N

b) Se SIM, quais?

APÊNDICE B

DETALHES SOBRE A ESPÉCIE DO ORGANISMO-TESTE, SUA MANUTENÇÃO EM LABORATÓRIO E A CONDUÇÃO DOS TESTES DE TOXICIDADE

1. *EISENIA FETIDA* E *EISENIA ANDREI*

Historicamente, *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) e *Eisenia andrei* (Bouche, 1972) eram tidas como uma única espécie devido a terem aparência e requerimentos ecológicos semelhantes, além de estarem frequentemente associadas. Após sugestões de classificação como duas raças fisiológicas ou subespécies, métodos bioquímicos revelaram ser espécies distintas, além do fato de o cruzamento entre ambas não resultaram em descendentes viáveis (DOMINGUES; VELANDO; FERREIRO, 2005; JÄNSCH; AMORIM; RÖMBKE, 2005).

Embora se assemelhem morfológicamente, as duas espécies possuem caracteres externos diferentes: *E. fetida* apresenta listras evidentes ao longo do corpo e despigmentação na área em volta dos segmentos, mostrando-se amarela ou pálida, enquanto *Eisenia andrei* é uniformemente avermelhada, com listras pouco aparentes (Figura ApB.1). O comportamento das duas espécies também se difere: a espécie *Eisenia fetida* se desloca com mais velocidade à procura de um refúgio quando é retirada do substrato onde se encontra, possivelmente devido a maior aversão à luz (GUIMARÃES, 2006).

Considerando ensaios ecotóxicológicos, esta diferenciação é importante, uma vez que os efeitos dos contaminantes sobre cada espécie podem ser diferentes (DOMINGUEZ; VELANDO; FERREIRO, 2005)



a)



b)

Figura ApB.1 a) *Eisenia fetida* (acima) e *Eisenia andrei* (abaixo); b) *Eisenia fetida* (esquerda) e *Eisenia andrei* (direita). Fotos: Maria Edna T. Nunes.

2. MANUTENÇÃO DOS ORGANISMOS EM LABORATÓRIO

Com relação ao substrato, os protocolos OECD (1984, 2004), ISO (1993; 1998; 2008) indicam uma mistura com 50% de esterco animal (bovino ou eqüino) e 50% de turfa. A CETESB (1990) recomenda partes iguais de esterco fresco de cavalo e terra vegetal. A ABNT (2007) sugere a utilização de 50% de esterco de cavalo ou bovino com 50% de outro material (turfa, ou esfagno, ou pó de fibra de coco). Já GARCIA (2004) sugere uma mistura (70:30 v/v) de esterco bovino e Solo Artificial Tropical, constituído de 10% de fibra de coco, 20% de caolim e 70% de areia.

No laboratório do Núcleo de Estudos em Ecossistemas Aquáticos (NEEA/CRHEA/SHS/EESC/USP) verificou-se que os organismos se desenvolvem e reproduzem bem em um substrato constituído de fibra de coco e esterco bovino seco (50:50 v/v). Assim, este foi adotado para a manutenção das culturas, que foi feita em caixas de material plástico resistente, com capacidade para 1000g do substrato seco (500g de esterco bovino seco + 500g de fibra de coco), acrescido de quantidade suficiente de água destilada. De acordo com os protocolos citados anteriormente, essa verificação da umidade do substrato pode ser apenas visual, não devendo o mesmo estar demasiadamente seco, nem úmido a ponto de escorrer líquido quando uma quantidade de substrato é pressionada na mão. Em cada caixa de cultivo foram colocadas cerca de 100 minhocas adultas (pesando individualmente de 400 mg a 600 mg). A cada dois a três meses o substrato foi totalmente substituído, passando-se os organismos para caixas com substrato novo.

As espécies *Eisenia fetida* e *Eisenia andrei* preferem pH neutro a ligeiramente ácido (JÄNSCH; AMORIM; RÖMBKE, 2005). A fim de ajustar o pH do substrato para 6,5 a 7,0, ideal para o desenvolvimento dos organismos, quantidades suficientes de CaCO_3 foram adicionadas ao mesmo. Para tanto, foram retiradas amostras de 10g do substrato, secas ao ar, à temperatura ambiente, por pelo menos 12 horas, às quais eram adicionadas quantidades conhecidas de CaCO_3 (por exemplo, 0,01; 0,02; e 0,03 g). Após, eram adicionados 25 mL de uma solução em água de 1mol/L de KCl. As suspensões eram, então, agitadas por 5 minutos e deixadas descansar por pelo menos 2 horas. O pH foi medido com auxílio de um potenciômetro Micronal B374. Verificava-se, assim, a quantidade de CaCO_3 necessária para que o pH da amostra ficasse entre 6,5 e 7,0, posteriormente extrapolando-se para a quantidade total de substrato utilizada nas caixas de cultivo.

Semanalmente era verificada a umidade do substrato, adicionando-se água destilada em quantidade suficiente, quando necessário, sendo esta verificação apenas visual, conforme

descrito anteriormente. A alimentação das minhocas foi suplementada com fornecimento quinzenal de flocos de aveia, previamente cozidos em água destilada, colocando-se uma colher de sopa cheia deste alimento, preparado na proporção de 3-4 colheres de sopa de flocos para 100 ml de água, em cada caixa de cultivo.

Com relação à temperatura, os protocolos citados indicam que as culturas sejam mantidas a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e esta foi adotada no NEEA. As culturas ficaram sob regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, com uma intensidade de luz de 400-800 lux.

A Figura ApB.2 apresenta detalhe das minhocas no substrato de cultivo utilizado neste estudo.



Figura ApB.2 Detalhes da manutenção de minhocas de *Eisenia andrei* no laboratório do NEEA/CRHEA/SHS/EESC/USP. Fotos: Maria Edna T. Nunes.

3. CONDUÇÃO DOS TESTES DE TOXICIDADE AGUDA, CRÔNICA E DE REJEIÇÃO

A principal alteração incorporada no presente estudo, em relação aos testes de toxicidade aguda, crônica e de rejeição como recomendado pelos protocolos citados refere-se

à temperatura em que os mesmos foram conduzidos. Os protocolos internacionais (OECD e ISO), da CETESB e da ABNT indicam que os testes sejam conduzidos a $20 \pm 2^\circ\text{C}$. Garcia (2004) sugeriu a temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$ para testes em condições tropicais, sendo que esta temperatura foi definida para as condições da região amazônica.

No presente estudo utilizou-se a temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, considerada mais condizente com as condições do sudeste do Brasil, com base em informações de Ghini (comunicação pessoal)⁵ e em dados de temperatura do solo disponíveis no site do Centro de Previsão do Tempo e Estudos Climáticos – CPTEC.⁶ As temperaturas do laboratório em que os testes foram conduzidos foram monitoradas com o sensor Escort-Mini Logger.

As Figuras ApB.3, ApB e ApB5 apresentam aspectos da condução dos testes.



Figura ApB.3 Aspectos dos testes agudos e crônicos com *Eisenia andrei*: à esquerda, colocação das minhocas nos potes com o solo-teste; ao centro, potes dispostos nas prateleiras durante o período de condução dos testes; à direita, detalhe da suplementação alimentar com esterco, nos testes crônicos. Fotos: Maria Edna T. Nunes.

⁵. Raquel Ghini é pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente e forneceu dados sobre temperatura do solo na região de Campinas.

⁶. Dados de temperatura do solo em diferentes plataformas de coletas de dados (PCDs) foram obtidos em http://satelite.cptec.inpe.br/PCD/historico/consulta_pcda.jsp.



Figura ApB.4 Aspectos do aparato para extração de juvenis, aos 56 dias, nos testes crônicos. Fotos: Maria Edna T. Nunes.



Figura ApB.5 Aspectos da montagem e condução dos testes de rejeição: à esquerda, pesagem e colocação dos solos em cada um dos lados do recipiente; ao centro: colocação dos organismos na linha divisória entre os solos; à direita, disposição dos recipientes durante a condução do teste. Fotos: Maria Edna T. Nunes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. **Solo: teste de toxicidade com *Eisenia foetida* (minhoca): método de ensaio.** Norma Técnica L6.401. São Paulo: Cetesb. 13p. 1990.

DOMINGUEZ, J.; VELANDO, A.; FERREIRO, A. Are *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* (Bouché, 1972) (Oligochaeta, Lumbricidae) different biological species? **Pedobiologia**. n. 49, p. 81-87, 2005.

GARCIA, M. **Effects of pesticides on soil fauna: development of ecotoxicological test methods for tropical regions**. 2004. 291 f. Tese (Doutorado) – Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät, Universidade de Bonn.

GUIMARÃES, A.A. *Eisenia fetida* ou *andrei*? **Jornal da Minhoca**, v. 53, 2006.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11268-1. **Soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using soil substrate**. Genebra: ISO. 1993.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11268-2. **Soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction**. Genebra: ISO. 1998.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 17512-1. **Soil quality: avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals on behaviour. Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*)**. Genebra: ISO. 2008.

JÄNSCH, S.; AMORIM, M.J.; RÖMBKE, J. Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. **Environmental Review**, v.13, p. 51-83, 2005.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT –. OECD. **Guideline for testing of chemicals n. 207: Earthworm acute toxicity test**. Paris: OECD. 1984.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT –. OECD. **Guideline for testing of chemicals n. 222: Earthworm reproduction test**. Paris: OECD. 2004.

APÊNDICE C

DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE MÁXIMA DE RETENÇÃO DE ÁGUA E AJUSTE DA UMIDADE DOS SOLOS-TESTE

Para determinação da capacidade de retenção de água (MONTEIRO; FRIGHETTO, 2000), foram pesados em balança analítica, em duplicata, 20 g de substrato, colocando-se sobre papel de filtro acondicionado em um funil e montado sobre um frasco coletor previamente pesado. Aos poucos, foram adicionados 100g de água destilada (pesada em balança analítica). Todo o aparato foi coberto com um filme plástico ou papel alumínio, para evitar a evaporação, e deixado descansar por uma noite. Após esse período, alguns procedimentos foram feitos, como uma pequena batida na haste do funil, para liberar as últimas gotas de água que pudessem estar presas nela. Posteriormente, novamente o frasco coletor foi pesado em balança analítica. Para os controles, também em duplicata, o procedimento foi o mesmo, porém sem colocar substrato sobre o papel de filtro. O cálculo da capacidade máxima de retenção de água foi feito de acordo com a fórmula:

$$\text{capacidade máxima de retenção de água (\%)} = [(100 - W_p) + W_i] / D_{wt} \times 100 \quad (1)$$

em que:

W_p = peso da água percolada (g)

W_i = conteúdo de água (g) existente inicialmente na amostra

D_{wt} = peso seco do solo

A umidade do substrato (SN ou SAT) foi ajustada para 50% de sua capacidade máxima de retenção de água (CMRA). Para tanto, inicialmente foi feita a determinação do teor de umidade do substrato. Foram pesados 5g do solo, em um recipiente (cadinho) de peso

conhecido e em balança analítica. Depois, o conjunto foi levado à estufa, a 105°C, por 24 horas. Após esse período, foi colocado para esfriar em dessecador, pesando-se posteriormente o recipiente com o solo seco. A umidade, dada em porcentagem de massa do substrato, foi calculada pela fórmula:

$$U (\%) = [(W2 - W3)/(W3-W1)]/100 \quad (2)$$

em que:

U (%) = porcentagem de umidade

W1 = peso do recipiente

W2 = peso do recipiente + substrato

W3 = peso do recipiente + substrato seco.

Depois de determinada a umidade inicial dos substratos, a mesma foi ajustada para 50% da CMRA, de acordo com os protocolos ISO 11268-1 (1993), ISO 11268-2 (1998), ISO 17512-1 (2007) e OECD 222 (2004), que recomendam ajuste para 40% a 60% da CMRA. O ajuste de umidade foi realizado no momento de montagem dos ensaios de toxicidade. No caso do SN pulverizado com Vertimec[®] 18 EC em campo, adicionou-se água destilada na quantidade necessária, em porcentagem do peso seco do solo. Para os ensaios com SAT e o ensaio com fauna de solo, em que produto foi incorporado aos substratos no momento da montagem dos testes, o volume de água destilada utilizado para preparar a solução do agrotóxico correspondeu ao necessário para ajustar o teor de umidade do substrato.

A Figura ApC.1 apresenta aspectos da metodologia para determinação da capacidade máxima de retenção de água.



Figura ApC.1 Detalhes do aparato para determinação da capacidade de retenção de água das amostras de solos. Fotos: Maria Edna T. Nunes/Luciana Massukado.

APÊNDICE D

DADOS RELATIVOS À REPRODUÇÃO DE *EISENIA ANDREI* EM ENSAIOS COM SOLO NATURAL (SN) PULVERIZADO COM VERTIMEC® 18 EC

Tratamentos	Concentração de abamectina (mg/kg de solo)*	Número de juvenis**	% em relação ao controle
Controle	nd	20,75±2,22	100
2DR 12,5%	0,0020	1,5 ± 2,38	7,23
2DR 25%	0,00376	6,75 ± 4,03	32,53
2DR 50%	0,00832	5,5 ± 0,57	26,50
2DR 75%	0,00974	3,75 ± 3,09	18,07
2DR 100%	0,0207	2,75 ± 1,71	13,25
DR	0,0195	3,5 ± 1,73	16,87

* Solo natural (SN) submetido à pulverização com Vertimec® 18 EC, nas dosagens de 0,9L/ha (DR) e 1,8 L/ha (2DR). Concentrações detectadas por cromatografia líquida. Limite de detecção do método = 0,012 mg/kg.

** média ± desvio-padrão