



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
TROPICAL

**TOXICIDADE AGUDA E REJEIÇÃO AO FUNGICIDA
OXICLORETO DE COBRE PARA *Eisenia fetida* E
Pontosclex corethrurus (OLIGOCHAETA).**

CAMILA CORREIA MESTRINHO

Manaus
2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA
TROPICAL

CAMILA CORREIA MESTRINHO

**TOXICIDADE AGUDA E REJEIÇÃO AO FUNGICIDA
OXICLORETO DE COBRE PARA *Eisenia fetida* E
Pontosclex corethrurus (OLIGOCHAETA).**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Agronomia Tropical da
Universidade Federal do Amazonas
como requisito para a obtenção do
Título de Mestre em Agronomia
Tropical, área de concentração
Produção vegetal.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Vinícius Bastos Garcia.

Manaus
2009

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Mestrinho, Camila Correia

M586t Toxicidade aguda e rejeição ao fungicida oxicloreto de cobre para *Eisenia fetida* e *Pontoscolex corethrurus* (Oligochaeta) / Camila Correia Mestrinho. - Manaus: UFAM, 2009.
76 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical) – Universidade Federal do Amazonas, 2009.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Vinícius Bastos Garcia

1. Fungicidas 2. Agrotóxicos 3. Minhocas I. Garcia, Marcos Vinícius Bastos II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 635.95.024(043.3)

CAMILA CORREIA MESTRINHO

**TOXICIDADE AGUDA E REJEIÇÃO AO FUNGICIDA
OXICLORETO DE COBRE PARA *Eisenia fetida* E
Pontosclex corethrurus (OLIGOCHAETA).**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Agronomia Tropical da
Universidade Federal do Amazonas
como requisito para a obtenção do
Título de Mestre em Agronomia
Tropical, área de concentração
Produção vegetal.

Aprovada em 14 de agosto de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. Marcos Vinícius Bastos Garcia – Presidente
EMBRAPA Amazônia Ocidental

Prof. Dr. José Ferreira da Silva - Membro
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Luiz Joaquim Bacelar de Souza – Membro
Universidade Federal do Amazonas

*Aos meus pais, Klícia e
Cainã, irmãos, companheiro
Caio, filho Miguel, tia Clécia
e avós César (in memorian)
e Cleide. Dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter-me dado força e saúde, permitindo-me em chegar até aqui;

Aos meus pais Cainã e Klícia pela vida;

Ao meu marido Caio e ao meu filho Miguel pela compreensão e paciência em todos os momentos desta caminhada;

Aos meus familiares e amigos pelo constante apoio e por acreditarem na minha capacidade;

A Universidade Federal do Amazonas, pela oportunidade de inserção ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Tecnologia (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos;

Aos professores pelos ensinamentos transmitidos;

A todos os colegas de pós-graduação por compartilhar comigo esta fase de nossas vidas;

Ao pesquisador e orientador Dr. Marcos Garcia pelo acompanhamento e orientação nas diversas fases deste trabalho;

A Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária da Amazônia Ocidental (EMBRAPA), por todo o apoio (transporte, alimentação, pessoal, equipamentos, matérias, enfim) tudo que foi necessário para a realização dos experimentos;

Aos colegas Manoel Alvino, Susy Pinheiro, Tatiana Senra e Marcos Vinícius Brito pela ajuda e contribuição no desenvolvimento dos experimentos;

E a todos que direta ou indiretamente depositaram em mim sua confiança e que de alguma forma contribuíram para eu chegar até o fim.

RESUMO

Com o avanço da tecnologia na agricultura, diversas substâncias têm sido utilizadas para o controle de pragas. Como os fungicidas à base de cobre (metal pesado), estes se acumulam no ambiente comprometendo a atividade dos organismos, sobretudo as minhocas, essenciais à manutenção dos processos químicos e biológicos. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do fungicida oxiclureto de cobre em minhocas considerando características de mortalidade e rejeição ao solo contaminado. Foram selecionadas duas espécies, *Eisenia fetida* (espécie-teste padrão) e *Pontoscolex corethrurus* (espécie nativa) como indicadores de contaminação do solo. *E. fetida* criadas em laboratório, a partir de amostras adquiridas em Manaus e, *P. corethrurus* coletadas em solo natural. Para exposição ao contaminante foram usados dois tipos de solo, Gleissolo e Argissolo. A substância teste usada foi um fungicida cúprico, que contém 588 g/kg do ingrediente ativo oxiclureto de cobre (35% de cobre metálico). A metodologia para determinação da toxicidade aguda e do efeito comportamental de rejeição ao substrato contaminado baseou-se em protocolos internacionais OECD e ISO. Os testes de toxicidade consistiram na exposição das minhocas em solo contaminado em concentrações crescentes com oxiclureto de cobre. A toxicidade aguda foi avaliada pela estimativa da concentração letal mediana (CL₅₀) utilizando análise de Probit, seguido da geração da curva dose resposta. Diferenças entre o controle e tratamentos avaliadas através da análise de variância (ANOVA) e para comparação de médias utilizado o teste de Dunnett, a 5 % de significância. Para os dados de rejeição utilizou-se o Teste t-Student para comparação das médias do número de indivíduos entre as seções contaminadas e de controle. O valor estimado da CL₅₀ após 14 dias de exposição em Gleissolo para *E. fetida*, foi de 1162,3 mg Cu/kg (IC 95% de 975-1385,2), mostrando baixa letalidade para esta espécie. Entretanto, a nativa mostrou maior sensibilidade ao cobre, estimando a CL₅₀ em 154,6 mg Cu/kg (58,9-405,7). Ao contrário de *E. fetida* a redução de biomassa em *P. corethrurus*, não foi significativa em teste agudo em Gleissolo. Entretanto, em Argissolo foi observada redução significativa apenas na concentração de 56 mg Cu/kg. Devido a grande variabilidade da resposta de cobre para *P. corethrurus* em Argissolo, os dados não foram ajustados em uma típica curva dose-resposta, estimando a CL₅₀ em 84,3 mg Cu/kg (35-202,8). A rejeição ao Gleissolo contaminado foi observada para ambas as espécies, sendo que *P. corethrurus* mostrou maior sensibilidade ao cobre que *E. fetida* (respostas significativas a 14 e 28mg Cu/kg, respectivamente), e em Argissolo as respostas de rejeição de *P. corethrurus* não foram significantes conforme o aumento de concentração. Os testes de rejeição mostraram que, mesmo em baixas concentrações do fungicida, as minhocas evitaram solos contaminados, confirmando a sensibilidade destes organismos em detectar baixas concentrações. Em Argissolo as respostas de rejeição de *P. corethrurus* não foram significantes conforme o aumento de concentração. Para avaliação do risco de pesticidas para solos tropicais, os ensaios de toxicidade devem ser realizados também com uma espécie nativa, para verificar a sensibilidade desta em relação à espécie teste padrão.

Palavras-chave: ecotoxicologia, agrotóxicos, ambiente

ABSTRACT

With the advance of the technology in agriculture, diverse substances have been used for the control of pests. As the fungicides to the copper base (metal heavy), these if accumulate in the environment compromising the activity of the organisms, over all the earthworms, essentials to the maintenance of the chemical and biological processes. The objective of this study was to evaluate the effect of the fungicide cooper oxychloride on earthworms considering parameters mortality and rejection to the contaminate the soil. Two species, *Eisenia fetida* (standard test species) and *Pontoscolex corethrurus* (Amazonian native species) have been selected as indicators of soil contamination of. *E. fetida* created in laboratory, from samples acquired in Manaus and, *P. corethrurus* collected in ground natural. For exposition to the contaminante two types of soil had been used, Gleissolo and Argissolo. The tested substance contained 588 g/kg of the active ingredient cooper oxychloride - 35% of metallic copper. The methodology for determination of the acute toxicity and the effect on the behavior of rejection was based on OECD and ISO international protocols. The toxicity tests consisted on a contaminated soil with increased concentrations of cooper oxychloride. The acute toxicity was evaluated by the medium lethal concentration (CL50) using a Probit analysis, followed by the generation of the dose-response curve. Differences between the control and treatments had been evaluated through the analysis of variance (ANOVA) and for comparison of averages used the Dunnett test was used with a 5% of significance. For the data of rejection to the substratum the t-Student test for comparison of the averages of the number of individuals between the contaminated sections and control. The esteem value of the CL50 after 14 days of exposition in the contaminated Gleissolo for *E. fetida*, was of 1162.3 mg Cu/kg (IC 95% of 975-1385.2), showing low lethality for this species. However, the native showed to greater sensitivity to copper, being the estimated value of CL50: 154.6 mg Cu/kg (58.9-405.7). In contrast to *E. fetida* the reduction of biomass in *P. corethrurus* was not significant in the Gleissolo acute test. However, for the Argissolo test it was observed a significant reduction for the concentration of 56. Due to the great variability of response for *P. corethrurus* in Argissolo, the data had not been adjusted in a typical dose-response curve, however the estimated CL50 in 84.3 mg Cu/kg (35-202.8). The rejection for the contaminated Gleissolo was observed for both the species, being that *P. corethrurus* showed to greater sensitivity to the copper that *E. fetida* with significant results at 14 and 28mg Cu/kg, respectively, and in Argissolo the responses of *P. corethrurus* did not show a significant correlation for the increase of concentrations. The rejection tests had shown that, for low concentrations of the fungicide, the earthworms had prevented contaminated ground, confirming the high sensitivity of these organisms in detecting a decrease of concentrations in the ground. In Argissolo the responses of rejection of *P. corethrurus* had not been significant according to the increase of concentrations of cooper. For a further evaluation of the risks of pesticides for tropical soils toxicity assays must be also carried out with a native species in order to verify its sensitivity in relation to the standard test species.

Word-key: ecotoxicology, agrochemicals, environment

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Imagem de satélite da área de estudo.....	46
Figura 2.	Espécie teste padrão: <i>Eisenia fetida</i>	49
Figura 3.	Caixas de madeira com esterco bovino para criação das espécies de <i>E. fetida</i>	49
Figura 4.	Espécie nativa: <i>Pontoscolex corethrurus</i>	49
Figura 5.	Aclimação de <i>P. corethrurus</i> em solo teste.....	49
Figura 6.	Solução estoque em agitador magnético.....	51
Figura 7.	Alíquotas das respectivas concentrações.....	51
Figura 8.	Contaminação do substrato teste.....	52
Figura 9.	Mistura do fungicida ao substrato teste.....	52
Figura 10.	Frascos de vidro contendo substrato teste contaminado.....	52
Figura 11.	Amostras do substrato teste contaminado para posterior determinação de umidade e pH.....	52
Figura 12.	Pesagem individual dos indivíduos.....	53
Figura 13.	Distribuição dos indivíduos sobre a superfície do substrato teste contaminado.....	53
Figura 14.	Incubação dos indivíduos.....	53
Figura 15.	Caixa de plástico dividida em solo contaminado e não contaminado.....	55

Figura 16.	Distribuição dos indivíduos no centro do recipiente.....	55
Figura 17.	Curva dose-resposta de toxicidade aguda de cobre para <i>Eisenia fetida</i> em Gleissolo.....	57
Figura 18.	Curva dose-resposta de toxicidade aguda de cobre para <i>Pontoscolex corethrurus</i> em Gleissolo.....	58
Figura 19.	Curva dose-resposta de toxicidade aguda de cobre para <i>Pontoscolex corethrurus</i> em Argissolo.....	61
Figura 20.	Resposta de rejeição de <i>Eisenia fetida</i> a diferentes concentrações de cobre em Gleissolo.....	62
Figura 21.	Resposta de rejeição de <i>Pontoscolex corethrurus</i> a diferentes concentrações de cobre em Gleissolo.....	62
Figura 22.	Resposta de rejeição de <i>Pontoscolex corethrurus</i> a diferentes concentrações de cobre em Argissolo.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Estimativa (em milhões R\$) do Mercado de Defensivos Agrícolas.....	19
Tabela 2.	Quantidade de cobre encontrada naturalmente no ambiente e no corpo humano.....	44
Tabela 3.	Caracterização química dos solos utilizados nos testes de toxicidade.....	47
Tabela 4.	Caracterização física dos solos utilizados nos testes de toxicidade.....	47
Tabela 5.	Concentrações nominais (mg Cu/kg) utilizadas nos testes de toxicidade aguda.....	50
Tabela 6.	Exemplo de preparo das soluções de oxiclreto de cobre.....	51
Tabela 7.	Toxicidade aguda de cobre para <i>Eisenia fetida</i> em Gleissolo.....	58
Tabela 8.	Toxicidade aguda de cobre para <i>Pontoscolex corethrurus</i> em Gleissolo.....	59
Tabela 9.	Toxicidade aguda de cobre para <i>Pontoscolex corethrurus</i> em Argissolo.....	60
Tabela 10.	Concentrações nominais e reais de cobre utilizadas nos ensaios com <i>Eisenia fetida</i> em Gleissolo.....	66
Tabela 11.	Valores das concentrações nominais e reais de cobre utilizadas nos ensaios com <i>Pontoscolex corethrurus</i> em Argissolo e Gleissolo.....	66

LISTA DE SIGLAS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASTM - *American Society for Testing and Materials*

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – SP

CNPTIA - Embrapa Informática Agropecuária

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária da Amazônia Ocidental

EPA - *Environmental Protection Agency – USA*

FEAM - Fundação Estadual do Meio Ambiente - MG

FEEMA – Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente – RJ

IBAMA - Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IHDC - Instituto Hórus de Desenvolvimento e Conservação Ambiental

ISO - *International Organization for Standardization*

OECD - *Organization for Economic Co-operation and Development*

SINDAG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola

SUMÁRIO

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE SIGLAS	x
INTRODUÇÃO	13
REVISÃO DE LITERATURA	16
1. Pesticidas	16
1.1 Definições	16
1.2 Evolução do uso	17
1.3 Efeitos no ambiente	19
2. Ecotoxicologia	21
2.1 Definições	21
2.2 Finalidades	23
2.3 Aspectos ambientais	24
2.4 Testes de toxicidade	26
2.5 Procedimentos para execução dos testes ecotoxicológicos	27
3. Solo	28
3.1 Importância do solo	28
3.2 Qualidade do solo	29
3.3 Contaminação do solo	30
3.4 Indicadores biológicos	32
4. Minhocas – organismos representativos do solo	33
4.1 Diversidade	33
4.2 Características	34
4.3 Importância para a agricultura	34
4.4 Organismos-teste	35
4.5 Seleção de espécies indicadoras	36
4.6 <i>Eisenia fetida</i> - espécie teste-padrão	37
4.7 <i>Pontoscolex corethrurus</i> – nativa	37
5. Cobre – um metal pesado	38

5.1 Características	38
5.2 Metal pesado no solo	39
5.3 Contaminação por cobre	42
5.4 Fungicidas cúpricos	44
6. MATERIAL E MÉTODOS	46
6.1. Área de estudo	46
6.2. Seleção dos substratos	46
6.2.1 Preparação dos substratos	46
6.3 Seleção das espécies indicadoras e procedimentos de cultivo	47
6.4. Substância teste	49
6.5. Determinação da toxicidade aguda	50
6.5.1 Preparo da solução teste	50
6.5.2 Preparo do substrato teste	51
6.5.3 Exposição das minhocas ao substrato teste	52
6.6 Teste de rejeição (efeito sobre o comportamento)	53
6.7 Determinação do pH do substrato	55
6.8 Determinação da umidade do substrato	55
6.9 Determinação da concentração real de cobre no substrato	55
6.10 Desenho experimental e análises estatísticas	56
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
7.1 Toxicidade aguda para <i>Eisenia fetida</i>	57
7.2 Toxicidade aguda para <i>Pontoscolex corethrurus</i>	58
7.3 Resposta de rejeição: <i>E. fetida</i> e <i>P. corethrurus</i>	61
7.4 Testes de toxicidade na avaliação de risco ambiental	63
7.5 Concentração de cobre no solo	65
CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS	68

INTRODUÇÃO

O aumento da população humana e o rápido desenvolvimento industrial provocaram a necessidade de aumentar a produção de alimentos, e consequentemente, ocorreu o avanço da tecnologia na agricultura, incluindo o uso dos agrotóxicos. Apesar do Estado do Amazonas ser, predominantemente, baseado na agricultura familiar, os agricultores da região não estavam preparados para o uso adequado desta tecnologia, desconhecendo os riscos dos agrotóxicos para a saúde humana e para o ambiente (WAICHMAN, 2008).

Bittencourt (2009) reporta que ao longo dos anos estas atividades resultam em um acúmulo de resíduos nocivos à água, ao solo e ao ar. Tal situação tem gerado diversos problemas relacionados à contaminação ambiental, à saúde pública e aos respectivos custos sociais decorrentes. Sendo que, os de contaminação ambiental provenientes do uso inadequado, fazendo com que precauções devam ser tomadas quanto à sua aplicação, bem como, à disposição final adequada dos resíduos, sem comprometimento do meio ambiente (LUCHINI e ANDRÉA, 2000). E problemas de saúde pública destacam-se as contaminações dos alimentos e, principalmente, as intoxicações entre os que trabalham com esses produtos.

Um exemplo deste uso destaca-se os fungicidas à base de cobre (metal pesado), que estão sendo amplamente utilizados nas várzeas próximas a Manaus (Manacapuru, Iranduba e Careiro da Várzea) para o controle de doenças em plantas cultivadas (WAICHMAN *et al.*, 2002), com 38,2% de uso, mais usado entre os citados. Estes agrotóxicos possuem ação de se acumular no ambiente, comprometendo a atividade biológica do solo, causando toxicidade aos organismos presentes nele, isto é, resultando em efeitos adversos sobre organismos não-alvo, bioconcentração e biomagnificação nas

cadeias biológicas (MURTY, 1988), e isto pode ser apontado como sendo um risco potencial de contaminação ambiental.

Apesar de já se fazer avaliações de risco ambiental, ecológico e à saúde humana em áreas contaminadas, existem poucos estudos que tratam da toxicidade dessas substâncias (KULA, 1994), e no Brasil o efeito de poluentes químicos sobre a fauna do solo ainda é considerado em desenvolvimento e pouco aplicado (SISINNO, 2003), isto é, os ensaios para avaliação da ecotoxicidade com organismos de solo não estão bem estabelecidos no nosso país por não existirem ainda normas da ABNT.

Os fatos das minhocas serem um elemento representativo da fauna de solo, elas têm sido utilizados extensivamente em estudos sobre os efeitos dos metais pesados em solos (HELLING *et al.*, 2000).

Os efeitos destes metais podem então ser estimados e monitorados por meio de testes de toxicidade conduzidos em laboratório (RAND e PETROCELLI, 1985), com ensaios ecotoxicológicos onde são verificadas as variáveis ambientais capazes de afetar a toxicidade das substâncias aos componentes vivos de um ecossistema, como de toxicidade aguda e crônica (KOKTA, 1992; VAN GESTEL e VAN STRAALLEN, 1994), bem como os de rejeição, que é uma alternativa para uma rápida avaliação da toxicidade, isto é, estes testes têm sido recomendados na avaliação de solos contaminados que estejam em processo de remediação (YEARDLEY *et al.*, 1996 e HUND-RINKE *et al.*, 2003).

Dessa forma, quando há necessidade de avaliar a contaminação de amostras de solos, normalmente são utilizados métodos internacionalmente reconhecidos como os da ISO, OECD e EPA - USA (SISINNO *et al.*, 2004).

Eisenia fetida, Oligochaeta, Lumbricidae, Savigny, 1826, foi escolhida para este estudo pois, é comum em criações para produção de húmus e compostagem.

Atualmente, é o organismo recomendado em protocolos internacionais para ser usado em testes padronizados de toxicidade de substâncias químicas para o solo, em regiões temperadas (OECD, 1984 e ISO, 1993). Esta espécie não vive no solo, mas se desenvolve em substratos ricos em matéria orgânica como em esterco de ruminantes.

E uma espécie nativa *Pontoscolex corethrurus*, Oligochaeta, Glossoscolecidae, Müller, 1857, amplamente distribuída em regiões tropicais, é muito comum em solos sob ação antrópica. É abundante na região Amazônica e é encontrada principalmente em áreas de vegetação secundária, pastagem, áreas cultivadas, mas raramente em floresta primária. Esta espécie se alimenta diretamente do solo.

Tentativas têm sido elaboradas para padronizar as condições de testes, permitindo assim que os resultados de diferentes laboratórios possam ser comparados (HELLING *et al.*, 2000).

Analisar a relação dose-resposta é uma das etapas mais críticas na avaliação de risco ambiental, principalmente no Estado do Amazonas, pois não temos dados desta relação para organismos da região, pois a maior parte dos testes em laboratório para este fim foi desenvolvida em organismos de regiões temperadas (WAICHMAN, 2008), ou seja, obtendo dados sobre o efeito de substâncias contaminantes em espécies nativas é de grande relevância ecológica, pois servirá de base para elaboração de uma análise de risco ambiental.

Eisenia fetida (espécie teste-padrão) por apresentar biologia muito diferente da nativa *Pontoscolex corethrurus* (abundante na região Amazônica), desafia-se adaptar esses métodos para as nossas condições de clima tropical. Objetivando-se, então, com este estudo avaliar o risco ecotoxicológico da contaminação por oxicloreto de cobre considerando as características de mortalidade e de rejeição ao solo contaminado sobre estas duas espécies de minhoca.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Pesticidas

1.1 Definições

Diversas definições têm sido utilizadas para estas substâncias.

Agrotóxicos são os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento dos produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, e substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento. (Lei Federal 7.802 de 11.07.89).

De acordo com Amaro (2003), “os pesticidas são substâncias químicas naturais ou de síntese utilizadas em proteção das plantas para reduzir ou eventualmente eliminar as populações de inimigos das culturas”.

Para Stützer e Guimarães (2003), “os agroquímicos pesticidas são produtos desenvolvidos para serem utilizados no ambiente como uma ferramenta de que dispõe o agricultor para minimizar o prejuízo causado pela ação danosa de insetos, fungos, plantas invasoras, etc”.

De acordo com as informações dadas por Areaseg (2009), “agrotóxico é a designação genérica dos compostos químicos usados na agricultura para tratamento de culturas ou na pecuária para tratamento de criações. Os inseticidas, carrapaticidas, sarnicidas, exterminadores de ácaros, fungicidas, herbicidas, os hormônios vegetais são os exemplos mais comuns de agrotóxicos”.

Ainda sobre os diversos conceitos dados a respeito dos agrotóxicos, para Embrapa - CNPTIA (2009), estes são produtos químicos, com diferentes níveis de toxidez, utilizados na agricultura convencional para combater o ataque de fungos, bactérias, ervas daninhas, insetos e outras pragas.

1.2 Evolução do uso

Em uma perspectiva histórica, o desenvolvimento da agricultura pode ser apresentado como uma sequência de três estágios: o primeiro ocorreu a cerca de dez mil anos, quando se passou a utilizar práticas de cultivo e variedades melhoradas de plantas, o segundo momento ocorreu na década de 60, devido ao aumento populacional humano acarretando a uma crise de alimentos, implementou-se a Revolução Verde, que compreendia no emprego de novas tecnologias, tais como, o uso de herbicidas, fertilizantes e variedades de plantas com maior resposta à aplicação de fertilizantes, acreditava-se em promessas de acabar com a fome através do emprego de “sementes milagrosas”. A assimilação dessa nova tecnologia resultou em uma expansão na produção de alimentos e em um rápido aumento na utilização de fertilizantes químicos. E recentemente, a agricultura mundial vem se defrontando com um processo denominado de “biorrevolução”, onde os principais fatores relacionados a este, são as agrobiotecnologias emergentes, além dos sistemas de comunicação e a troca de informação de forma mais eficiente. De maneira geral, os objetivos dessa biorrevolução envolvem um aumento da quantidade e da qualidade na produção de alimentos, incluindo-se elevação da taxa de produto por unidade de insumo.

Os pesticidas tem sido usados para impedir danos às colheitas desde aproximadamente 500 a.C, sendo o enxofre o primeiro pesticida utilizado. Por volta do século XV, começaram a ser utilizados elementos químicos tóxicos como o arsênio e o mercúrio no combate a pragas em colheitas. No Século XVII, o sulfato de nicotina foi

extraído das folhas de tabaco para ser usado como pesticida. Já no Século XIX, viu-se a introdução de dois novos pesticidas: um derivado do *Chrysanthemum cinerariaefolium* da família asteraceae, e o *rotenone* que é derivado de raízes de legumes tropicais.

O uso de pesticidas dobrou desde a década de 50, e cerca de 2,5 milhões de toneladas de pesticidas industriais são usadas agora todos os anos.

Publicado em 1962, Primavera Silenciosa (*Silent Spring*) de Rachel Carson, foi a primeira obra a detalhar os efeitos adversos da utilização dos pesticidas e inseticidas químicos sintéticos, iniciando o debate acerca das implicações da atividade humana sobre o ambiente e o custo ambiental dessa contaminação para a sociedade humana. A autora advertia para o fato de que a utilização de produtos químicos para controlar pragas e doenças estava interferindo com as defesas naturais do próprio ambiente natural e acrescentava: "*nós permitimos que esses produtos químicos fossem utilizados com pouca ou nenhuma pesquisa prévia sobre seu efeito no solo, na água, animais selvagens e sobre o próprio homem*".

Kotaka e Zambrone (2001); Nimmo (1985) informaram que até a II Guerra Mundial o desenvolvimento e uso efetivo de compostos orgânicos foi lento, porém com a descoberta da propriedade inseticida do dicloro-difenil-tricloroetano, o DDT, iniciou-se a expansão e desenvolvimento de uso característicos dos últimos 40 anos. E em função do modelo de agricultura adotado que se baseia no uso de agrotóxicos estas substâncias passaram, então, a ser amplamente utilizadas (RUEGG *et al.*, 1987).

SINDAG (2009) informa uma estimativa (em milhões R\$) do Mercado de Defensivos Agrícolas em um período de janeiro a dezembro comparando as vendas de 2007 e 2008 (Tabela1), onde, este período apresentou um crescimento acumulado de 24%, totalizando um mercado de R\$12.706 milhões.

Tabela 1. Estimativa (em milhões R\$) do Mercado de Defensivos Agrícolas.

Segmentos	Mercado (estimativa)		
	2007	2008	% VAR
Herbicidas	4.380	5.764	32
Fungicidas	2.387	2.779	16
Inseticidas	2.934	3.608	23
Acaricidas	177	186	5
Outros	335	368	10
TOTAL	10.123	12.706	24

No Estado do Amazonas, a proporção de agricultores dos diversos municípios do Estado que cultivam frutas e legumes com uso de agrotóxicos varia entre 64% e 96,7% (IBGE, 1998). Os agricultores da região não estão preparados para o uso adequado desta “tecnologia”, ignoram o risco do uso de agrotóxicos para saúde e o ambiente e não recebem ajuda técnica de serviços de extensão oficiais (WAICHMAN *et al.*, 2002, 2003 e 2007).

1.3 Efeitos no ambiente

A utilização de agrotóxicos indiscutivelmente tem contribuído para o aumento da produção agropecuária mundial. Entretanto, seu uso indiscriminado, principalmente após a segunda guerra, tem causado grande impacto negativo ao meio ambiente (RAND e PETROCELLI, 1985), isto é, um poluidor ambiental em potencial.

Bittencourt (2009) reporta que o uso indiscriminado destes implica ao longo dos anos em um acúmulo de resíduos de compostos químicos nocivos na água, no solo e no ar. Tal situação tem implicado diversos problemas relacionados com a contaminação ambiental, a saúde pública e com os respectivos custos sociais decorrentes, destacando-se os de contaminação de alimentos e, principalmente, as intoxicações entre os que trabalham com esses produtos. Segundo Luchini e Andréa (2000) confirmam ao dizer que, a contaminação ambiental decorrente do uso de agrotóxicos tem gerado preocupações quanto ao uso inadequado destes compostos, devendo ser tomadas

precauções quanto à sua aplicação, resíduos provenientes das mais diversas fontes e à disposição final adequada desses resíduos, sem comprometimento do meio ambiente.

Segundo Murty (1988), dentre os principais problemas ocasionados pelo uso intensivo de agrotóxicos destacam-se os efeitos adversos sobre organismos não-alvo, bioconcentração e biomagnificação nas cadeias biológicas.

Silva *et al.* (2005), informam que as práticas agrícolas podem afetar o equilíbrio do ecossistema do solo, como, por exemplo, o uso de agrotóxicos. Esses compostos orgânicos exercem papel benéfico na produtividade agrícola, no entanto, são potenciais poluidores ambientais. Os agrotóxicos chegam ao solo por meio da aplicação direta e também como resultados de atividades indiretas. Uma vez no solo, normalmente afetam os processos bioquímicos e microbiológicos. Apesar do uso dos fungicidas constituir prática comum no controle de doenças de plantas, ainda são poucas as informações sobre o prejuízo de tais compostos.

Dentre os efeitos nocivos ao ambiente, pode-se citar a presença de resíduos no solo, na água, no ar, nas plantas e animais. Além da contaminação do meio ambiente, estes resíduos podem chegar ao homem através da cadeia alimentar e ocasionar, danos à saúde (EDWARDS, 1973).

Younes e Galal-Gorchev (2000) ressaltam que a capacidade dos agrotóxicos persistirem e produzirem efeitos tóxicos sobre a saúde humana e sobre o meio ambiente é muito variada em função das inúmeras classes químicas existentes.

Andrea (2009), diz ainda que a contaminação ambiental causada pelo uso crescente e, algumas vezes, indiscriminado de agrotóxicos ou pesticidas tem gerado preocupações quanto ao lançamento inadequado desses compostos no ambiente. Sendo os agrotóxicos nocivos aos organismos vivos, deve-ser tomar precauções quanto à sua aplicação, formação de resíduos provenientes das mais diversas fontes e descarte final

adequado, de forma que não haja comprometimento do meio ambiente como um todo. Além disso, em alguns casos, os produtos de degradação desses compostos podem ser até mais tóxicos que os produtos originais. O comportamento de agrotóxicos no ambiente pode ser influenciado por diversos fatores como: volatilidade, método de aplicação, tipo de formulação e solubilidade do composto em água; características do solo e plantas; adsorção das moléculas às partículas de solo; persistência e mobilidade dos compostos e condições climáticas do ambiente. E Tomita e Beyruth (2002), informam ainda que os efeitos tóxicos podem incluir tanto a letalidade (mortalidade) e efeitos sub-letais, como alterações no crescimento, desenvolvimento, reprodução, respostas farmacocinéticas, patologia, bioquímica, fisiologia e comportamento, estes efeitos podem ser expressos através de critérios mensuráveis como o número de organismos mortos, porcentagem de ovos chocados, alterações no tamanho e peso, porcentagem de inibição de enzima, incidência de tumor, dentre outros.

2. Ecotoxicologia

2.1 Definições

A Ecologia é a disciplina que se ocupa das relações entre os seres vivos e o ambiente. Pode ser também conceituada como o estudo do aproveitamento e da distribuição da energia no sistema. Por outro lado, a Toxicologia estuda os efeitos adversos de determinada substância num dado organismo e procura clarear o mecanismo de ação tóxica no mesmo. Embora sejam duas ciências com estruturas e direcionamentos distintos, ambas estão ligadas aos problemas de poluição ambiental.

O termo ecotoxicologia foi sugerido pela primeira vez em junho de 1969, durante uma reunião do *Committee of the International Council of Scientific Unions* (ICSU) em Estocolmo, por René Truhaut. Em 1976 a sua definição foi publicada como “Ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os

organismos vivos, populações e comunidades, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio nos quais os organismos vivem num contexto integrado” (PLAA, 1982). Foram definidos também os direcionamentos dos estudos ecotoxicológicos, os quais compreendem:

- Estudo das emissões e entradas de poluentes no ambiente abiótico, distribuição e destino nos diferentes compartimentos;
- Estudo da entrada e destino dos poluentes nas cadeias biológicas e suas formas de transferência como alimento via cadeia trófica;
- Estudo qualitativo e quantitativo dos efeitos tóxicos dos poluentes ao ecossistema com consequências ao homem (TRUHAUT, 1977).

A ecotoxicologia também foi definida por Ramade (1977), como a ciência que tem por objetivo estudar as modalidades de contaminação do ambiente pelos poluentes naturais ou sintéticos, produzidos por atividades humanas, seus mecanismos de ação e seus efeitos sobre o conjunto de seres vivos que habitam a biosfera.

Stützer e Guimarães (2003) descrevem ainda sobre a ecotoxicologia como sendo “a relação entre os poluentes químicos, o ambiente em que são liberados e a biota naquele ambiente. Por isso, essas substâncias devem ser bem estudadas, para que seus riscos potenciais possam ser muito bem definidos, e medidas para atenuar seus prováveis impactos devem ser muito bem determinadas por meio de ações regulatórias e técnicas”.

Segundo Bertoletti e Zagatto (2006), para a avaliação ecotoxicológica de um determinado ambiente é fundamental ter conhecimento das fontes de emissão dos poluentes, bem como suas transformações, difusões e destinos no ambiente, e os riscos potenciais desses poluentes à biota.

2.2 Finalidades

A toxicidade de um composto químico depende da exposição, da suscetibilidade do organismo, das características químicas do agente e de fatores ambientais (TOMITA e BEYRUTH, 2002). As espécies possuem suscetibilidades diferentes de acordo com seu aparato metabólico, seus hábitos alimentares, comportamento, fase de desenvolvimento, dentre outros aspectos, podendo estar sujeitas às exposições aguda e/ou crônica.

Na exposição aguda, os organismos entram em contato com o composto químico num evento único ou em eventos múltiplos que ocorrem num pequeno período de tempo, geralmente variando de horas a dias. Os efeitos são imediatos, embora seja possível a produção de efeitos retardados similares àqueles resultantes de exposição crônica (RAND e PETROCELLI, 1985).

Já na exposição crônica, segundo os autores citados acima, normalmente os organismos são expostos a baixas concentrações do agente tóxico que é liberado continuamente ou com alguma periodicidade num longo período de tempo (semanas, meses ou anos), mas pode também induzir a efeitos rápidos e imediatos, como os efeitos agudos, em adição aos efeitos que se desenvolvem lentamente.

A frequência da exposição também afeta a toxicidade dos compostos químicos. Uma exposição aguda a uma única concentração pode resultar num efeito adverso imediato num organismo, enquanto duas exposições sucessivas cumulativas iguais à exposição aguda única podem ter efeito pequeno ou nenhum efeito, devido ao metabolismo (detoxificação) do organismo entre as exposições ou à aclimação do organismo ao composto (RAND e PETROCELLI, 1985).

2.3 Aspectos Ambientais

Waichman (2008), explica que para determinar o grau de contaminação e o risco do uso dos agrotóxicos tanto para as populações humanas quanto para o ambiente é necessária a realização de uma avaliação de risco. Sendo que esta consiste em duas fases distintas: a identificação da periculosidade, onde dados da literatura são compilados de forma a determinar se existe a chance do agrotóxico entrar no ecossistema e em quais compartimentos, podendo causar danos tanto nos seres humanos quanto no ambiente e; a análise da dose resposta a partir de dados na literatura sobre testes em diferentes organismos. Então, estudos ecotoxicológicos vêm permitir a Avaliação Ambiental de Substâncias nocivas ao ambiente, como por exemplo, os agrotóxicos.

O Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA) estabelece-se para todos os produtos técnicos e formulações existentes no mercado, que é determinado pelo IBAMA. Para a elaboração do PPA, a legislação ambiental requer estudos e testes que são divididos em quatro grupos segundo Stützer e Guimarães (2003):

- Propriedades físico-químicas.
- Toxicidade a organismos não-alvo (microrganismos, minhocas, microcrustáceos, algas, peixes, aves, abelhas e mamíferos).
- Comportamento ambiental do produto: biodegradabilidade no solo, sorção (adsorção/desorção), e mobilidade.
- Os potenciais mutagênicos, carcinogênicos, genotóxicos.

Após serem avaliados todos os estudos solicitados, o IBAMA faz a Classificação Ambiental do produto:

- Classe I > altamente perigoso ao meio ambiente
- Classe II > muito perigoso ao meio ambiente

- Classe III> perigoso ao meio ambiente
- Classe IV> pouco perigoso ao meio ambiente
- Produto impeditivo de obtenção de registro> produtos cujas características sejam altamente perigosas ao ambiente para vários parâmetros.

Esta classificação não leva em consideração a exposição, mas somente a toxicidade do produto para os organismos dos diferentes ecossistemas e o seu destino ambiental.

No Brasil a avaliação de Risco Ambiental tem início com a avaliação das características do produto (coeficiente de partição, solubilidade, pressão de vapor, meia-vida, mobilidade e outros), do ecossistema potencialmente em risco (local onde o produto será utilizado) e dos efeitos ecológicos esperados ou observados.

A análise da relação dose-resposta é uma das etapas mais críticas na avaliação de risco, principalmente no Estado do Amazonas, pois não temos dados desta relação para os organismos da região, pois a maior parte dos testes laboratoriais para estes fins, foi desenvolvida em organismos de região temperada. Alguns parâmetros podem ser estimados a partir de uma curva dose-resposta:

- DL_{50} > dose estimada que causa 50% de mortalidade dos organismos testados
- CL_{50} > concentração estimada que causa 50% de mortalidade aos organismos testados
- CE_{50} > concentração estimada que causa um efeito (redução da produção, crescimento, etc.), em 50% dos organismos testados
- IC_{50} > concentração de inibição estimada que reduz a resposta normal em 50%.

Estudos de avaliação de risco ambiental, ecológico e à saúde humana, podem ser realizados em áreas contaminadas, mas ainda são considerados em desenvolvimento e pouco aplicados no Brasil (SISINNO, 2003).

Sisinno *et al.* (2006), informam que algumas áreas contaminadas por substâncias químicas de importância para a saúde humana e ambiental, tem sido frequentemente estudadas e cresce o interesse por órgãos de saúde e ambiente no controle do impacto causado por esses locais, uma vez que a identificação e o cadastramento dessas áreas permitem que ações preventivas ou corretivas relacionadas à possível contaminação do solo, ar, águas superficiais e subterrâneas e biota sejam estabelecidas, e os riscos minimizados.

2.4 Testes de toxicidade

Plaa (1982) nos informa que o uso dos testes ecotoxicológicos integra os conceitos da Ecologia, no que diz respeito à diversidade e representatividade dos organismos e seu significado ecológico nos ecossistemas, e da Toxicologia, em relação aos efeitos adversos dos poluentes sobre as comunidades biológicas.

A inserção dos ensaios na ecotoxicologia como ferramenta de avaliação ambiental é de fundamental importância, pois alguns fatores não são avaliados pelas variáveis abióticas, a exemplo da integração da ação de poluentes. Como os seres vivos respondem a estímulos ante a qualidade ambiental, nestes ensaios são usados organismos pertencentes a diferentes níveis tróficos (algas, crustáceos, peixes, minhocas) para avaliação da toxicidade de várias matrizes, por exemplo, águas e efluentes.

Sisinno *et al.* (2006), comentam que a avaliação da contaminação em áreas contaminadas tem sido realizada apenas com o auxílio de parâmetros químicos, sem a inserção da avaliação ecotoxicológica. Entretanto, por meio dos testes ecotoxicológicos são verificados os efeitos das variáveis ambientais que são capazes de afetar a toxicidade das substâncias aos componentes vivos de um ecossistema. Dessa forma, esses testes podem indicar uma resposta mais precisa da toxicidade dos contaminantes

presentes nas amostras para os organismos vivos, o que apenas a análise química de cada composto, separadamente, não é capaz de avaliar.

Em CETESB (2005), informa que estes testes avaliam potenciais efeitos tóxicos de substâncias químicas sobre organismos, possibilitando o estabelecimento de limites permissíveis de várias substâncias e seus impactos nos organismos. Testes de toxicidade crônica permitem avaliar efeitos adversos por um longo período e avalia diversos efeitos sobre a reprodução dos organismos, testes simples de curto prazo são utilizados para avaliação de toxicologia aguda e, na maioria das vezes, são os primeiros a serem realizados como testes preliminares (KOKTA, 1992; VAN GESTEL e VAN STRAALLEN, 1994), bem como os de rejeição, que é uma alternativa para uma rápida avaliação da toxicidade, isto é, estes testes têm sido recomendados na avaliação de solos contaminados que estejam em processo de remediação (YEARDLEY *et al.*, 1996 e HUND-RINKE *et al.*, 2003).

2.5 Procedimentos para execução de testes ecotoxicológicos

Atualmente, vários ensaios de toxicidade estão padronizados nacional e internacionalmente por associações ou organizações tais como ABNT, ISO, EPA, ASTM, OECD. Ressalta-se que os ensaios ecotoxicológicos fazem parte de exigências legais, como a Resolução CONAMA nº 357/2005 (TASQA, 2008).

Sisinno *et al.* (2004), descrevem que os procedimentos para execução de ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos são bem estabelecidos e descritos em normas técnicas brasileiras da ABNT, métodos de alguns órgãos de fiscalização ambiental, como a FEEMA e a CETESB, e métodos descritos no Manual de Testes para Avaliação da Ecotoxicidade de Agentes Químicos, organizado pelo IBAMA.

Entretanto, os ensaios para avaliação da ecotoxicidade com organismos de solo não estão bem estabelecidos no Brasil por não existirem ainda normas da ABNT e pelo

fato de os métodos descritos no Manual do IBAMA estarem desatualizados (SISINNO *et al.*, 2006). Dessa forma, quando há necessidade de avaliação da contaminação de amostras de solos, normalmente são utilizados métodos internacionalmente reconhecidos, como os da ISO, OECD e EPA (SISINNO *et al.*, 2004).

Esses métodos, entretanto, são desenvolvidos para determinar a toxicidade de substâncias adicionadas a um solo artificial, a fim de que vários interferentes sejam eliminados. O grande desafio na adaptação desses métodos para a complementação da avaliação de áreas contaminadas é a substituição do substrato artificial pelas amostras de solos trazidas dessas áreas, a avaliação dos possíveis interferentes nos resultados, bem como, a escolha dos organismos-teste para amostras com determinadas características.

3. Solo

3.1. Importância do solo

Para Araújo e Monteiro (2007), o solo é um recurso natural vital para o funcionamento do ecossistema terrestre, e representa um balanço entre os fatores físicos, químicos e biológicos. Os principais componentes do solo incluem minerais inorgânicos e partículas de areia, silte e argila, formas estáveis da matéria orgânica derivadas da decomposição pela biota do solo, a própria biota, composta de minhocas, insetos, bactérias, fungos, algas e nematóides e gases como O₂, CO₂, N₂, NO_x (DORAN *et al.*, 1996). Segundo estes autores, o solo, como um sistema natural vivo e dinâmico, regula a produção de alimentos e fibras e o balanço global do ecossistema, além de servir como meio para o crescimento vegetal, através do suporte físico, disponibilidade da água, nutrientes e oxigênio para as raízes. Pode atuar na regulação hídrica do ambiente, transformação e degradação de compostos poluentes.

Segundo Blum e Santelises (1994) o solo possui seis funções principais, sendo três ecológicas e três ligadas à atividade humana. As funções ecológicas incluem: a) produção de biomassa (alimentos, fibras e energia); b) filtração, tamponamento e transformação da matéria para proteger o ambiente da poluição das águas subterrâneas e dos alimentos; c) habitat biológico e reserva genética de plantas, animais e organismos, que devem ser protegidos da extinção. As funções ligadas à atividade humana incluem: a) meio físico que serve de base para estruturas industriais e atividades sócio-econômicas, habitação, sistema de transportes e disposição de resíduos; b) fonte de material particulado (areia, argila e minerais); c) parte da herança cultural, paleontológica e arqueológica, importante para a preservação da história da humanidade.

No caso de atividades relacionadas à agricultura e meio ambiente, as principais funções do solo são: a) prover um meio para o crescimento vegetal e habitat para animais e microrganismos; b) regulação do fluxo de água no ambiente; e c) servir como um “tampão ambiental” na atenuação e degradação de compostos químicos prejudiciais ao meio ambiente (LARSON e PIERCE, 1994).

Para Luna e Coutinho (2008), em seu estado natural o solo constitui-se em um conjunto de condições ecológicas sob as quais micro, meso e macrorganismos podem explorar uma fonte de energia.

3.2 Qualidade do solo

A qualidade do solo é definida como a capacidade em funcionar dentro do ecossistema para sustentar a produtividade biológica, manter a qualidade ambiental e promover a saúde das plantas e animais (DORAN e PARKIN, 1994)

3.3 Contaminação do solo

Andrea (1992), diz que o solo é o compartimento do agroecossistema considerado mais complexo e cuja probabilidade de contaminação por agrotóxicos é a maior. Atualmente, considera-se que a contaminação dos solos é um dos principais problemas ambientais, podendo ser contaminado por agrotóxicos após aplicações diretas ou, indiretamente, através de aplicações nas culturas, queda de folhagem tratada e movimento de águas contaminadas na superfície e no seu perfil.

De acordo com Carvalho (2000) a avaliação do grau de contaminação do solo por agrotóxicos é de particular importância devido a transferência destes contaminantes aos alimentos.

No ambiente edáfico, os compostos podem sofrer alguns processos de dissipação, tais como: volatilização, lixiviação, degradação física, química e/ou biológica, escoamento superficial, absorção pelas plantas e adsorção nos constituintes edáficos (LUCHINI, 1987).

Andrea (1998) nos explica que os resíduos podem interagir com as fases sólida, líquida e gasosa, e com a porção viva do solo, isto é, com a microbiota. Estas interações determinarão a ocorrência de diferentes processos que envolvem transformações químicas, físicas, biológicas ou a combinações dessas transformações. Como consequência, pode-se detectar ou desaparecimento do composto, ou aparecimento de metabólitos mais ou menos tóxicos que o produto original, ou persistência aumentada, que irão determinar a utilidade do composto ou efeitos prejudiciais causados pela persistência mais longa do que seria necessário para o controle ou, ainda, o transporte maior ou menor no próprio solo.

Como efeito de transformação química, cita-se o pH, que determina, muitas vezes, a prevalência de degradação da molécula por processo puramente químico

(ANDRÉA *et al.*, 1997). Mas o pH do solo também tem efeito bioquímico, pois influencia a atividade microbiana e, desta forma, conforme o pH do meio haverá ou não a predominância de atividade microbiana atuando sobre a degradação de agrotóxicos.

Segundo Luchini e Andrea (2000), os processos de transformação e desaparecimento dos agrotóxicos no solo dependem tanto das características do próprio solo, como das características físico-químicas das substâncias, pois moléculas de peso molecular muito alto ou elementos halogênios e/ou anéis aromáticos altamente condensados, por exemplo, são mais persistentes. De qualquer forma, a degradação dos compostos aplicados e sua conversão em outros produtos não significam, necessariamente, perda da atividade biológica e, muitas vezes, essa conversão pode resultar em produtos ainda mais tóxicos ou ativos. Somente a conversão total ou mineralização da substância em elementos ou compostos amplamente distribuídos na natureza e que podem entrar nos ciclos biogeoquímicos é que representa descontaminação.

Segundo Andréa (1998) a grande variedade de microrganismos presentes no solo é potencialmente capaz de biodegradar agrotóxicos até produtos mais simples, que podem entrar nos ciclos biogeoquímicos da natureza, pois já se sabe que a biodegradação representa o principal processo de degradação de agrotóxicos. Fatores ambientais, tais como temperatura, conteúdo de matéria orgânica, acidez, umidade e tipo de solo, que influenciam a atividade microbiana, influenciam também as taxas de degradação dos agrotóxicos. Entretanto, reações químicas como hidrólise, por exemplo, podem ser pré-requisitos para o ataque microbiano. Desta forma, em muitas situações, a distinção entre processos puramente bióticos ou abióticos é difícil.

Assim, Luchini e Andrea (2000) percebem que pode haver uma conjugação dos agentes físicos, químicos e biológicos de transformação e os processos decorrentes da

ação desses agentes, e que resultam em degradação dos agrotóxicos, podem ocorrer simultaneamente. Mas a compreensão do comportamento de substâncias tóxicas sob diferentes condições tem sido considerada essencial para se estar consciente dos possíveis efeitos adversos e de como eles podem ser.

3.4 Indicadores biológicos

Um indicador é definido como um índice ou uma medida final para avaliar a saúde de um sistema, seja ele econômico, físico ou biológico, e bioindicador é como a biota ou o componente biótico de um ecossistema que é utilizado como indicador da qualidade do ambiente (ANDREA, 2009). O estudo dos efeitos de substâncias químicas tóxicas nas comunidades naturais é um dos objetivos fundamentais da ecotoxicologia. Segundo a Agência Americana de Proteção Ambiental, os efeitos de alteração ou de saúde do ambiente são chamados de indicadores ecológicos. Entretanto, há pelo menos uma década tem-se notado que alguns organismos - peixes, insetos, algas, plantas, etc - são resistentes a alguns níveis de contaminação, não morrem quando expostos a agentes tóxicos e fornecem informações precisas sobre a saúde dos ambientes respectivos de cada um desses organismos. Esses tipos de plantas e animais são chamados de indicadores biológicos ou bioindicadores da presença de contaminantes no ambiente.

Segundo Doran e Parkin (1994), bioindicadores são propriedades ou processos biológicos dentro do solo que indicam o estado deste ecossistema, podendo ser utilizados no biomonitoramento da qualidade do solo. Biomonitoramento é a medida da resposta de organismos vivos a mudanças no seu ambiente (WITTIG, 1993).

As medidas de bioindicadores têm sido usadas para apontar a probabilidade de um agente estressor (contaminante, alterações das condições físicas, etc.) causar efeito adverso no ambiente e nas populações. São também feitas para caracterizar a saúde do ambiente; indicar o grau de perigo e dar suporte às determinações dos possíveis riscos

ecológicos de mudanças na saúde do ambiente. Na agricultura, o uso de agrotóxicos ou pesticidas pode representar um desses riscos porque pode provocar alterações indesejáveis nos ecossistemas por alterações nas funções, atividades, número e abundância de indivíduos de diferentes populações, assim como em características do próprio ambiente. Assim, além dos efeitos desejáveis de controle dos organismos fitófagos, organismos fitopatogênicos e competidores, o uso de agrotóxicos pode representar perigo potencial para o ambiente e para as redes ou teias alimentares.

Entre os efeitos ecológicos de bioindicação, a bioacumulação e a bioconcentração traduzem o acúmulo do poluente nos organismos em relação à quantidade do poluente presente, respectivamente, no solo e na água (ANDREA, 2009). Portanto, os bioindicadores devem ter uma relevância biológica para informar sobre a possível contaminação do respectivo ecossistema. Entre os fatores que caracterizam esta relevância, um dos mais importantes é a sua posição trófica, isto é, quanto mais baixo for seu nível trófico e quanto mais ele servir de alimento para os níveis superiores da cadeia trófica, maior é a relevância biológica do organismo como bioindicador porque através de sua contaminação toda a cadeia trófica pode se contaminar.

4. Minhocas – organismos importantes para o solo

4.1 Diversidade

Atualmente são conhecidas em todo mundo cerca de 3500 a 4000 espécies de Oligochaeta, reunidas em 36 famílias de 3 ordens. Na região Neotropical são conhecidas 22 famílias englobando aproximadamente 800 espécies de Oligochaeta nativas ou peregrinas, isto é, introduzidas por ação do homem ou outro meio. No Brasil foram assinaladas 18 famílias, só no Estado de São Paulo 13 famílias, sendo quatro predominantemente aquáticas (água doce e mar) e 9 predominantemente terrestres. Oito das famílias terrestres, todas são da Subordem Lumbricina, são conhecidas

popularmente como “minhocas” ou como “minhocoços”, quando maiores do que 15 a 20cm. Das nove famílias de minhocas brasileiras, destaca-se Glossoscolecidae, que é nativa e endêmica na Região Neotropical, ocorrendo desde o México até o norte da Argentina e da costa Atlântica à Pacífica.

4.2 Características

Righi (2008), diz que as minhocas caracterizam-se pelo corpo segmentado, com cerdas saindo de folículos diretamente na superfície do corpo, e por serem hermafroditas. Vivem em todos os ambientes aquáticos (mar e água doce) e terrestres que tenham um pouco de umidade. São lucífagas e dotadas de tigmotactismo positivo, daí viverem no interior do substrato ou escondidas sob folhas, galhos, etc. É demonstrada a plasticidade das minhocas para poder explorar os diversos ambientes e a sua conseqüente diversidade e importância para a ciência pura em suas mais diversas abordagens. É também evidenciada a influência das minhocas sobre os solos e sua importância para a prática agrícola e as ciências correlatas.

4.3 Importância para a agricultura

Extremamente útil para a agricultura, as minhocas passam sua vida perfurando o solo, descompactando-o e tornando-o mais arejado. Além disto, “adubam o solo”, ingerindo terra e matéria orgânica e defecando o húmus, produto rico em nutrientes (LAVELLE, 2008). Lavelle as define como “engenheiras do ecossistema” graças à capacidade de escarificar os terrenos mais duros e contribuir tanto físico, química e biologicamente com o terreno onde o homem cultiva as plantas. Na questão física, as minhocas são responsáveis pela construção e manutenção da porosidade no solo, evitando sua compactação, melhorando o crescimento das plantas devido à aeração do solo e a retenção de água. Na questão química, estimula a existência de microrganismos e na parte biológica, ela exerce controle sobre as pragas, como os nematóides também

“atrapalham” o vegetal durante a captura de água e transporte de nutrientes disponíveis no solo.

As minhocas participam ativamente na formação e desenvolvimento da maior parte dos solos, atuando na constituição e conservação de sua fertilidade natural. Isso é feito através da ingestão e mistura de partículas minerais e orgânicas com microrganismos associados e produtos de excreção, formação de agregados e construção de túneis (EDWARDS, 1983; EDWARDS e BOHLEN, 1996). Elas promovem uma fragmentação e redistribuição da matéria orgânica no solo, contribuindo na ciclagem e liberação de nutrientes contidos nesse material (KENNETTE *et al.*, 2002). Assim sendo, como a possível reestruturação do solo, pode existir uma correlação positiva entre o período de urbanização e o número de minhocas (SMETAK *et al.*, 2005).

Segundo Lavelle (1983), devido as adaptações e função no ambiente, as categorias de minhocas podem ser: detritívoras ou formadoras de substâncias húmicas, que se alimentam de matéria orgânica não humificada, ou geófagas que se nutrem de partículas minerais e das reservas húmicas do solo.

De modo geral, nos trópicos as comunidades de minhocas são dominadas por espécies geófagas, devido ao tipo de matéria orgânica, predominante no solo (EDWARDS, 1983; GRISI *et al.*, 1998). Entretanto, ao se fazer a substituição da vegetação natural, as comunidades originais de minhocas são modificadas. Tais modificações podem fazer com que as espécies nativas sejam substituídas por exóticas, estas melhor adaptadas a condições edáficas menos favoráveis.

4.4 Organismos-testes

Vários estudos têm demonstrado que pela ação das minhocas podem formar macroporos (BEVEN e GERMANN, 1982; PIVETZ e STEENHUIS, 1995) e galerias

orientadas verticalmente (ZACHAMAN *et al.*, 1987). Dessa forma os macroporos e as galerias promovem a ocorrência do fluxo preferencial dos solutos, conduzindo agroquímicos para horizontes mais profundos do solo (SADEGHI e ISENSEE, 1994). Após a ingestão, esses materiais promovem através do trato digestivo e são depositados como coprólitos nos horizontes mais profundos do solo (LEE, 1985). Os efeitos disto sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, influenciam a persistência, a biodisponibilidade e transporte de agrotóxicos no solo (STEHOUWER *et al.*, 1994; PIVETZ e STEENHUIS, 1995; FARENHORST *et al.*, 2000).

As minhocas possuem vários quimio-receptores em seu tegumento, especialmente nos segmentos anteriores do corpo, o que as tornam bastantes sensíveis às mudanças químicas no ambiente. Esta sensibilidade, aliada à sua capacidade de locomoção, permite que elas possam evitar áreas contaminadas. Portanto, o teste de rejeição, como uma alternativa para rápida avaliação da toxicidade, baseada na resposta comportamental destes organismos, tem sido proposto por vários autores (YEARDLEY *et al.*, 1996 e HUND-RINKE *et al.*, 2003).

4.5 Seleção de espécies indicadoras

De acordo com Römbke *et al.* (1996), alguns critérios devem ser levados em consideração na seleção de organismos para testes toxicológicos, como: espécies presentes em regiões tropicais; espécies que têm contato intenso com o solo para garantir a sua exposição com os produtos químicos; espécies que possuem alta taxa de reprodução em curto período de tempo, permitindo manter culturas padronizadas em laboratório; espécies pertencentes a diferentes grupos funcionais, por exemplo, que atuam de modo diferente no processo de decomposição.

4.6 *Eisenia fetida* - espécie teste padrão

Levando em conta os critérios de Römcke *et al.* (1996), a espécie *Eisenia fetida* (SAVIGNY, 1826) (Oligochaeta, Lumbricidae) é a mais adequada e amplamente utilizada em testes toxicológicos para solo.

Esta espécie é atualmente recomendada em protocolos internacionais para ser usada em testes padronizados de toxicidade de substâncias químicas para o solo, em regiões temperadas (OECD, 1984) e tropicais (IBAMA, 1990). Alimentam-se de matéria orgânica em decomposição, raramente consumindo solo mineral. Vivem no máximo de 4 - 5 anos, sendo que normalmente atingem apenas dois anos de vida. Quando é ameaçada, a minhoca secreta pelos póros na superfície superior do corpo uma substância fétida amarela que age em defesa do animal, o odor afasta possíveis predadores (IHDC, 2007). *E. fetida* vive em habitats ricos em matéria orgânica como em materiais em compostagem e esterco de animais, mas não sobrevive em solos tropicais como as espécies nativas. Embora *E. fetida* possa ser considerada pouco relevante para estudos toxicológicos por não representar a fauna de minhocas de solos tropicais, esta tem sido a espécie-teste padrão, já que ainda não foi encontrada uma espécie de solos tropicais adequada para testes toxicológicos (por exemplo, criação em laboratório). Por isto, tem sido sugerido que, em paralelo aos estudos toxicológicos com *E. fetida*, seja avaliada a sensibilidade de espécies nativas aos contaminantes de solo (GARCIA, 2004).

4.7 *Pontoscolex corethrurus* - nativa

A espécie peregrina *Pontoscolex corethrurus* (MÜLLER, 1857) (Oligochaeta, Glossoscolecidae) é amplamente distribuída em regiões tropicais, onde é muito comum em solos sob ação antrópica (RÖMBKE e VERHAAGH, 1992). Originada provavelmente do platô das Guianas (RIGHI, 1984). *P. corethrurus* é abundante na

região Amazônica e encontrada principalmente em áreas de vegetação secundária, pastagens, áreas cultivadas, mas raramente em floresta primária. Tem estratégia ecológica tipo endogêica, vivendo no solo, geralmente na camada superior de 20 cm. *P. corethrurus* é muito tolerante aos diferentes tipos de solo com variadas condições físico-químicas bem como às alterações de temperatura e umidade. Adultos coletados no campo podem facilmente produzir casulos em condições de laboratório quando mantidos em solo natural com esterco de gado na proporção de 2% (BERNARDES e KIEHL, 1997). Segundo Hamoi (1991), em temperaturas entre 20 e 23 °C, o período de desenvolvimento da eclosão à maturação sexual é aparentemente longo (14 - 19 meses). Entretanto, temperaturas e umidade mais altas podem resultar em aumento do crescimento dos juvenis (LAVELLE *et al.*, 1987). Apesar do pouco conhecimento de técnicas de cultivo para *P. corethrurus* em laboratório, esta espécie pode ser adequada para testes de toxicidade aguda e estudos em microcosmos devido a sua importância ecológica e dominância em solos tropicais.

5. Cobre – um metal pesado

5.1 Características

O cobre é um metal de transição avermelhado, que apresenta alta condutibilidade elétrica e térmica, só superada pela da prata. É possível que o cobre tenha sido o metal mais antigo a ser utilizado, pois se têm encontrado objetos de cobre de 8.700 a.C. Pode ser encontrado em diversos minerais e pode ser encontrado nativo, na forma metálica, em alguns lugares.

A condutividade elétrica do cobre merece especial menção por ter sido adotada pela *Comissão Eletrotécnica Internacional* em 1913 como base da norma IACS.

Na maioria de seus compostos apresenta estados de oxidação baixos, sendo o mais comum o +2, ainda que existam alguns com estado de oxidação +1. Exposto ao ar,

a coloração vermelho salmão inicial torna-se vermelho violeta devido à formação do óxido cuproso (Cu_2O) para enegrecer-se posteriormente devido à formação do óxido cúprico (CuO). Exposto longamente ao ar úmido forma uma capa aderente e impermeável de carbonato básico de coloração verde, característica de seus sais, que é venenosa. Quando se utilizam caçarolas de cobre para a cocção de alimentos não são infrequentes as intoxicações, devido à ação dos ácidos da comida que originam óxidos, contaminando os alimentos.

Os halogênios atacam com facilidade o cobre, especialmente em presença de umidade; no seco o cloro e o bromo não produzem efeito e o flúor só o ataca a temperaturas superiores a $500\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os oxiácidos atacam o cobre. Conhecido desde a antiguidade é utilizado, atualmente, para a produção de materiais condutores de eletricidade (fios e cabos), e em ligas metálicas como latão e bronze. Com o enxofre forma um sulfeto (CuS) de coloração branca. Entre as suas propriedades mecânicas destacam-se sua excepcional capacidade de deformação e ductibilidade. Em geral, suas propriedades melhoram em baixas temperaturas, o que permite utilizá-lo em aplicações criogênicas.

5.2 Metal pesado no solo

Os metais pesados têm origem natural como componentes de rochas, sendo que, nessa situação, apresentam menores riscos aos seres vivos (COSTA *et al.*, 2004).

Para Tiller (1989), a ocorrência natural de metais pesados em solos depende, principalmente, do material de origem sobre o qual o solo se formou e dos seus processos de formação. Consequentemente, os teores de metais pesados em solos e sedimentos dependem, basicamente, da composição e proporção dos componentes de sua fase sólida. A relação do solo com o material de origem é bastante evidenciada

quando o primeiro é formado “in situ” sobre a rocha, tornando-se menos expressiva nos solos originados sobre materiais previamente intemperizados.

Tiller (1989) cita ainda que os solos originados diretamente sobre rochas básicas, apresentam-se mais ricos em metais pesados do que aqueles formados sobre rochas ácidas ou sedimentares.

À medida que o intemperismo atua, os solos guardam menos características de suas rochas de origem, dessa forma, solos muito intemperizados tendem a apresentar teores menores de metais pesados que aqueles com intemperismo incipiente.

Stevenson e Cole (1999) destacam que o ferro é o principal metal pesado associado às rochas ígneas. Isso, por motivos óbvios de riqueza em minerais ferromagnesianos nessas rochas. Os sulfetos também são constituintes importantes de tais rochas. Como os minerais sulfetados apresentam-se geoquimicamente afins de alguns metais como zinco, cobre e molibidênio, esses podem ser encontrados em teores significativos. Zinco, manganês e cobre também ocorrem em minerais ferromagnesianos, onde eles substituem isomorficamente o ferro e o magnésio na estrutura do mineral. Já o boro é encontrado largamente na turmalina, que é um borossilicato. Ferro, zinco, manganês e cobre são, sobretudo, mais abundantes no basalto, enquanto que boro e molibidênio são mais concentrados nos granitos. Esses autores também citam que é possível conter metais pesados em rochas sedimentares, isso acontece porque elas são compostas por sedimentos provenientes de várias fontes cujos metais podem estar presentes, por exemplo, adsorvidos às argilas. Elas podem conter todos os metais existentes nas rochas primárias, embora não necessariamente nas mesmas proporções. De modo geral rochas compostas por sedimentos finos apresentam-se enriquecidas com zinco, cobre, cobalto, boro e molibidênio. Rochas

metassedimentares como alguns xistos com elevados teores de matéria orgânica podem conter cobre e molibidênio.

Alloway (1990), Costa *et al.* (2004), Penkov (1991) citam que aumentos nos teores naturais de metais pesados podem ocorrer em áreas próximas de complexos industriais, urbanos e, também, nas áreas rurais de agricultura altamente tecnificada. É constatado em tais áreas aumento nos teores de Zn, Pb, Ni, Cd, Cu, Hg, As, entre outros. Feam (2003) e Penkov (1991) ainda revelam que as principais fontes de contaminação por metais pesados são indústrias, transportes e agricultura (irrigação e inundação com águas poluídas, tratamento de solos com pesticidas, herbicidas, corretivos e fertilizantes contendo metais pesados), deposição atmosférica, entre outras. A atividade mineradora também pode ser considerada como um importante mecanismo de disponibilização destes elementos. Isto acontece uma vez que estes metais, outrora numa situação estável, acabam expostos a fatores externos muitas vezes suficientes para torná-los biodisponíveis. Um exemplo de tal liberação de metais pesados é citado por Nilsson (1991), segundo esse autor, algumas minas de carvão mineral podem gerar a chamada drenagem ácida graças à oxidação de materiais sulfetados, especialmente da Pirita e da Arsenopirita. A acidificação da solução em contato com as rochas gera a solubilização de metais pesados, tornando-os disponíveis.

Nilsson (1991) ainda afirma que os teores geralmente encontrados em solos contaminados, principalmente por atividades agropecuárias, são baixos. Porém, tomando-se uma perspectiva a longo prazo podem ser encontrados teores elevados provenientes de um acúmulo ao longo de anos de utilização desse compartimento ambiental. Esse mesmo autor também cita a possibilidade de contaminação de solos e aquíferos por meio de aterros industriais e sanitários. A massa de resíduos sólidos pode conter metais pesados que, por sua vez, podem ser lixiviados graças à acidificação

provocada pela decomposição da matéria orgânica combinado com a existência de materiais metálicos aterrados. Refletindo-se agora a respeito da disposição de resíduos diretamente no solo, pode-se concluir que o contato direto de sua massa, através dos métodos de disposição final, permite antever a existência de um potencial de contaminação desse compartimento ambiental. Esse potencial é maior quando a massa de resíduos é disposta de forma inadequada ou quando em sua composição estão presentes substâncias nocivas ao ambiente ou à saúde dos seres vivos.

Além disso, a disposição inadequada também representa riscos de emissão de gases tóxicos ou contaminação de corpos d'água em função da degradação desses resíduos, que geram ácidos orgânicos na fase da acidogênese e que, quando lixiviados pela massa de resíduos, podem solubilizar elementos tais como metais pesados presentes carreando-os para o solo ou para as água (subterrâneas ou superficiais) (PEREIRA NETO, 1996 e BIDONE e POVINELLI, 1999).

Ramalho *et al.* (2000) e Penkov (1991) descrevem a contaminação do solo por uma larga gama de metais pesados presentes como contaminantes ou como princípio ativo de uma série de agroquímicos. Além disso, metais pesados também podem chegar ao solo por meio de irrigação com águas contaminadas ou da fertirrigação. Feam (2003) cita que tais metais ocorrem como contaminantes de fertilizantes e corretivos e como princípio ativo de pesticidas e herbicidas. Costa *et al.* (2004) mostra que resíduos sólidos urbanos são fontes potenciais de Cd, Cu, Pb e Zn. Já os resíduos industriais, ainda segundo esses autores, podem ser fontes de Cr, Cd, Ni, e Ba.

5.3 Contaminação por cobre

O cobre (Cu) é um elemento que ocorre naturalmente em praticamente todo ambiente, bem como nos organismos (Tabela 3). Embora seja essencial ao nosso organismo, quando aumentado causa intoxicação. A intoxicação por cobre pode ocorrer

devido a contaminação de cobre na água, absorção através da pele e níveis insuficientes de elementos que competem com o cobre nos locais de absorção intestinal como o zinco e o molibdênio. Na deficiência de zinco, geralmente o cobre encontra-se aumentado. O cobre pode estar aumentado devido ao uso de contraceptivos orais ou ao uso de Dispositivo Intra Uterino com fio de cobre.

Como o cobre deposita-se preferencialmente no cérebro e no fígado os sintomas encontrados são inicialmente decorrentes do comprometimento destes dois órgãos. Sintomas do excesso de cobre ligados as alterações cerebrais incluem: distúrbios emocionais, depressão, nervosismo e irritabilidade, sintomas semelhantes aos do mal de Parkinson e alterações semelhantes a esquizofrenia e a outros distúrbios psiquiátricos. Outras alterações ligadas ao excesso de cobre: fadiga, dores musculares e nas juntas, anemia hemolítica, queda de vitamina A, necrose hepática, icterícia e lesão renal. Além disso, o aumento de cobre está associado ao aumento de radicais livres. No corpo humano participa no metabolismo celular, transporte de ferro e constituinte de diversas enzimas: i) Amino oxidases (responsáveis pela oxidação de aminas), ii) Ascorbato oxidases (oxidação do ácido ascórbico); iii) citocromo oxidase (atual juntamente com grupos heme na etapa final de oxidação), e iv) galactose oxidase (oxidação de um grupo -OH a -CHO no monossacarídeo galactose). O cobre também é importante na i) Lisina oxidase, que controla a elasticidade das paredes da aorta, ii) Dopamina hidroxilase, que atua sobre as funções cerebrais, iii) Tirosinase, que influencia a pigmentação da pele, iv) Ceruloplasmina, que atua no metabolismo do ferro.

Tabela 2. Quantidade de cobre encontrada naturalmente no ambiente e no corpo humano.

Localização	Concentração
Crosta terrestre	50ppm
Água do mar	
Superfície	0,008ppb
Fundo	0,02ppb
Água natural	1-10ppb
Solos	
Média	30ppm
Contaminado	100 - 10.000ppm
Corpo humano	1ppm

Além disso, esse elemento é amplamente usado pelo homem tanto na indústria quanto na agricultura. Por isso, o uso desse elemento representa para o ambiente problema de contaminação.

A contaminação por cobre causa uma disfunção genética fatal conhecida como Doença de Wilson. O processo de contaminação geralmente ocorre em feto cuja mãe apresenta altas concentrações de cobre no organismo. A Doença de Wilson provoca um acúmulo excessivo desse elemento essencial no organismo. Em pessoas saudáveis o excesso de cobre presente em alimentos é eliminado, mas nos doentes de Wilson ocorre uma bioacumulação. Infelizmente, o excesso de cobre ataca o fígado e o cérebro, provocando hepatite e sintomas neurológicos e psiquiátricos.

5.4 Fungicidas cúpricos

Book e Machado Neto (2000) relatam que dentre os diversos agrotóxicos, os fungicidas cúpricos são amplamente utilizados, representando risco potencial de contaminação ambiental.

Andrei (1993) informa que “o fungicida oxicleto de cobre é recomendado para o controle de antracnose, requeima, ferrugem, míldio entre outras doenças de diversas culturas, tais como, o algodão, a batata, o café, a cana, os citrus, o feijão e o tomate”.

Os fungicidas cúpricos podem ser recomendados, de forma geral, contra os seguintes gêneros e espécies de patógenos: *Cercospora*, *Sphaceloma*, *Alternaria*, *Phytophthora*, *Mycosphaerella*, *Albugo candida*, *Colletotrichum*, *Puccinia allii*, *Puccinia psiidi*, *Entomosporium maculatum*, *Hemileia vastatrix*, *Glomerella cingulata*, *Plasmopara viticola*, *Cerotelium fici*, *Septoria*, *Stemphylium* (BERGAMIN *et al.*, 1995).

O problema gerado aos organismos pela contaminação por essas substâncias é agravado devido a tendência dos metais pesados, como o cobre, acumularem-se e serem translocados através dos diversos elos da cadeia biológica, ocasionando o processo de bioconcentração (BOOCK e MACHADO NETO, 2000).

Os resíduos de cobre em suas diferentes formas (sulfato, oxiclreto) oriundos da aplicação de fungicidas causam danos ao solo: reduz a atividade de microorganismos do solo (MERRINGTON *et al.*, 2002); reduz a degradação de outros pesticidas (piretróides) no solo (LIU *et al.*, 2007); efeito negativo em populações naturais de minhocas (MABOETA *et al.*, 2003, 2004); efeito negativo no crescimento e reprodução de minhocas (HELLING *et al.*, 2000); efeito sobre a atividade de minhocas em solos contaminados (VAN ZWIETEN *et al.*, 2004); entre outros.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Área de estudo

O estudo foi desenvolvido na área da Embrapa, localizada no km30 da AM-010, norte da cidade de Manaus, cujas coordenadas geográficas são 02°53'sul e 59°59'oeste (Figura 1).

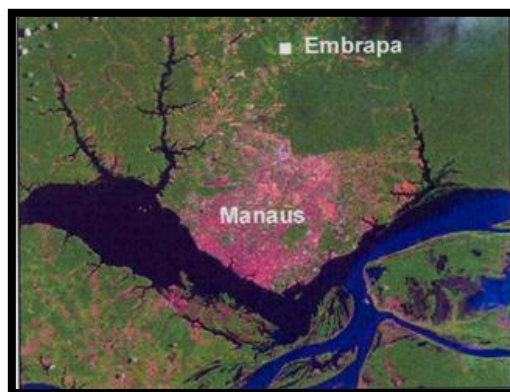


Figura 1. Imagem de satélite da área de estudo (EMBRAPA, 2003)

6.2. Seleção dos substratos

Para permitir a extrapolação dos resultados obtidos em testes laboratoriais, os testes foram realizados em dois tipos de solos comuns na região Amazônica: Gleissolo, coletado em ambiente de várzea, na estação experimental da Embrapa -Iranduba e um Argissolo, coletado em ambiente de terra firme, na área experimental da Embrapa - Manaus.

6.2.1 Preparação dos substratos

Para preparação dos substratos de teste os dois tipos de solo, foram secados ao ar, retiradas as raízes e peneirados em malha de 5 mm. A mistura da solução aquosa do fungicida no substrato Gleissolo mostrou-se impraticável devido a formação de uma massa compacta. Por isto, para conferir maior friabilidade ao Gleissolo e permitir a adição da solução, foi adicionado areia fina (25% dos grãos com até 200 micra) na proporção de 1:1 (m/m). Características químicas e físicas dos substratos são apresentadas nas Tabelas 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3. Caracterização química dos solos utilizados nos testes de toxicidade.

Variável	Argissolo	Gleissolo
pH (H ₂ O)	4	5,6
P (mg/dm ³)	6	94
K (mg/dm ³)	21	72
Ca (c.molc /dm ³)	0,1	9,5
Mg (c.molc /dm ³)	0,2	2,1
CTC	1,8	11,9
N total (%)	0,8	0,7
C org (%)	14,5	5,8
Matéria Orgânica (%)	24,9	9,9
Relação CN	18	8,3

Tabela 4. Caracterização física dos solos utilizados nos testes de toxicidade.

Variável	Argissolo	Gleissolo
Argila (%)	17,5	15,4
Silte (%)	4,5	58,6
Areia (%)	80,1	23,9
Tipo de Argila Predominante	1:1	2:1
Classe Textural	Franco Arenoso	Franco Siltoso
Capacidade Máxima de Retenção de Água (%)	18	36,2

Devido à preferência de *E. fetida* por substratos menos ácidos (pH entre 5,5 e 6,5) os testes com esta espécie foram feitos apenas no tipo Gleissolo, cujo pH varia em torno de 5 e 6.

6.3 Seleção das espécies indicadoras e procedimentos de cultivo

Eisenia fetida (Savigny, 1826) (Oligochaeta, Lumbricidae), ver Figura 2, é uma espécie de minhoca de origem européia e amplamente disseminada em várias regiões do mundo incluindo os países de clima tropical, é cultivada para produção de húmus e no processo de compostagem. Atualmente é o organismo recomendado em protocolos internacionais para uso em testes padronizados de toxicidade de substâncias químicas para o solo em regiões temperadas (OECD, 1984) e tropicais (IBAMA, 1990).

Esta se desenvolve bem em substratos com pH entre 5,5 a 6,5 e não sobrevive em ambientes ácidos (pH inferior a 5,0). Neste trabalho foram utilizadas culturas de *E. fetida* previamente estabelecidas no laboratório de Entomologia da Embrapa Amazônia Ocidental, as quais foram originalmente adquiridas de criadores de minhocas nos arredores de Manaus. Foram mantidas em caixas de madeira (150L) com esterco bovino (Figura 3), mantidas à temperatura ambiente (25 a 30 °C; média = 28 °C), e expostas a um ciclo luminoso natural (12h luz /12h escuro). As minhocas foram alimentadas uma a duas vezes por semana com esterco bovino seco, triturado e livre de qualquer contaminação por substâncias químicas.

Pontoscolex corethrurus (Müller, 1857) (Oligochaeta, Glossoscolecidae), é uma espécie peregrina (Figura 4), amplamente distribuída em regiões tropicais, onde é muito comum em solos sob ação antrópica (RÖMBKE e VERHAAGH, 1992). *P. corethrurus* é tolerante aos solos ácidos com pH entre 3,5 e 5,0. Apesar do pouco conhecimento de técnicas de cultivo para *P. corethrurus* em laboratório, esta espécie foi considerada adequada para testes de toxicidade aguda e em testes de rejeição devido a sua importância ecológica e dominância em solos tropicais. Para os ensaios de toxicidade, os indivíduos desta espécie não foram criados em laboratório, mas coletados em seu habitat natural e aclimatados no substrato de teste (Figura 5) à temperatura ambiente (25 a 30 °C; média = 28 °C) por no mínimo 24 horas antes do teste e expostos a um ciclo luminoso natural (12h luz /12h escuro). Para os testes de toxicidade, a criação de *P. corethrurus* não foi estabelecida devido ao seu longo ciclo de desenvolvimento.



Figura 2. Espécie teste padrão: *Eisenia fetida*
(Foto: Marcos Garcia)



Figura 4. Espécie nativa: *Pontoscolex corethrurus*
(Foto: Marcos Garcia)

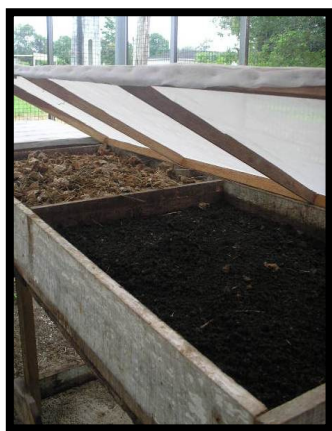


Figura 3. Caixas de madeira com esterco bovino para criação de *E. fetida*.
(Foto: Camila Mestrinho)



Figura 5. Aclimação de *P. corethrurus* em solo teste. (Foto: Camila Mestrinho)

6.4 Substância teste

Os testes de toxicidade foram feitos com uma substância usada como ingrediente ativo na formulação comercial denominada Fungitol Azul®, o oxiclureto de cobre, um fungicida de ação de contato, do grupo químico cúprico, que contém 588 g/kg do ingrediente ativo oxiclureto de cobre (equivalente em cobre metálico 350g/kg), na formulação pó molhável. Possui amplo espectro de controle das doenças fúngicas em várias culturas, principalmente em horticultura e fruticultura, de classificação ambiental Classe III (Perigoso ao Meio Ambiente) e classificação toxicológica Classe IV (Pouco Tóxico).

6.5 Determinação da Toxicidade Aguda

O sistema para determinação da toxicidade aguda de fungicidas para ambas as espécies foi baseado nos protocolos internacionais OECD nº. 207 e ISO 11268-1 (OECD, 1984; ISO, 1993a). Estes descrevem um método para a determinação de toxicidade aguda para *E. fetida*, via cutânea e por ingestão, o parâmetro avaliado neste teste é a mortalidade. Para se obter uma faixa de concentrações do fungicida onde haveria resposta a contaminação, testes preliminares foram feitos em 5 concentrações (e.g. 0,1 / 1 / 10 /100 /1000 mg/kg) e controle em apenas uma réplica. Com base nos resultados destes testes, foram definidas as concentrações (Tabela 5). Para evitar mortalidade devido a mudanças das condições de cultivo, antes do teste definitivo, as minhocas foram expostas para aclimação por 24 h no substrato de teste, livre de contaminação.

Tabela 5. Concentrações nominais (mg Cu/kg) utilizadas nos testes de toxicidade aguda.

Espécie	<i>Eisenia fetida</i>		<i>Pontoscolex corethrurus</i>	
Substrato	Gleissolo		Argissolo e Gleissolo	
Teste	Agudo	Rejeição	Agudo	Rejeição
Concentrações	100	7	7	
	200	14	14	
	400	28	28	
	800	56	56	
	1200	112	112	

6.5.1 Preparo da solução teste

As concentrações de oxicloreto de cobre foram obtidas a partir da dissolução deste em 1000mL de água destilada e preparada uma solução estoque (SE). Em seguida a solução foi transferida para um Becker e mantida sobre um agitador magnético (Figura 6) durante a retirada de alíquotas para o preparo das soluções (Figura 7). Para

cada concentração, uma alíquota da SE (Figura 7) foi transferida para uma proveta e completada com água destilada para obter o volume de solução necessário para ajustar a umidade do substrato teste (Tabela 6).



Figura 6. Solução estoque em agitador magnético. (Foto: Camila Mestrinho)



Figura 7. Alíquotas das respectivas concentrações. (Foto: Camila Mestrinho)

Tabela 6. Exemplo de preparo das soluções de oxicloreto de cobre.

Concentração desejada (mg i.a./ Kg)	* Alíquota da solução estoque (mL)	Quantidade de ingrediente ativo (mg)	** Volume de solução (mL)	Massa seca de substrato (Kg)
Controle	0	0	360	2
7	1,25	14	360	2
14	2,5	28	360	2
28	5	56	360	2
56	10	112	360	2
112	20	224	360	2

* Dissolução de 32g do fungicida (= 11,2 g de cobre) em 1L de água destilada (= 11,2 mg de cobre /mL).

** Volume de solução necessário para ajustar a umidade do substrato.

6.5.2 Preparo do substrato teste

As diferentes concentrações de oxicloreto de cobre no substrato foram obtidas com base na massa seca (ms), i.e., cada concentração representando a quantidade do ingrediente ativo (cobre) em mg por kg do substrato seco.

Uma vez que o ingrediente ativo foi diluído em água destilada, é promovida a contaminação em 2000g (ms) de substrato (Figura 8) e posteriormente a mistura (Figura

9), e desta distribui-se (500g ms) em frascos de vidro com tampa de plástico, perfurada (Figura 10). A umidade do substrato foi ajustada pela adição da solução que variou conforme a capacidade de retenção de água de cada tipo de solo. Após a contaminação do substrato em diferentes concentrações, amostras foram retiradas para cálculo da umidade e pH, em uma réplica de cada tratamento (Figura 11).



Figura 8. Contaminação do substrato teste. (Foto: Camila Mestrinho)



Figura 9. Mistura do fungicida ao substrato teste. (Foto: Camila Mestrinho)



Figura 10. Frascos de vidro contendo substrato teste contaminado. (Foto: Camila Mestrinho)



Figura 11. Amostras do substrato teste contaminado para posterior determinação de umidade e pH. (Foto: Camila Mestrinho)

6.5.3 Exposição das minhocas ao substrato teste

Após a contaminação do substrato e sua distribuição em frascos, as minhocas foram adicionadas aos recipientes. Dez indivíduos de *E. fetida* pesando entre 300 a 600 mg ou cinco indivíduos de *P. corethrurus* pesando entre 300 a 1100 mg foram colocados sobre a superfície do substrato e incubados a temperatura de $28 \pm 2^\circ\text{C}$, na ausência de luz (Figuras 12, 13 e 14). Após 7 dias foi avaliada a mortalidade e pesagem dos indivíduos (juntos) para medição da alteração da biomassa das minhocas e

devolvidos aos recipientes. Aos 14 dias de incubação foi feita a avaliação final com procedimento similar, mas pesando os indivíduos separadamente.

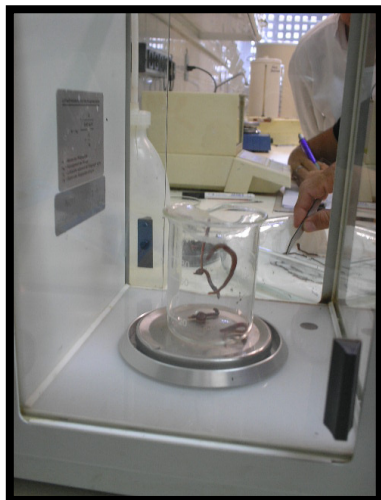


Figura 12. Pesagem individual dos indivíduos. (Foto: Camila Mestrinho)



Figura 13. Distribuição dos indivíduos sobre a superfície do substrato teste contaminado. (Foto: Camila Mestrinho)



Figura 14. Incubação dos indivíduos. (Foto: Camila Mestrinho)

6.6. Teste de rejeição (efeito sobre o comportamento)

O princípio deste teste é a exposição simultânea das minhocas ao solo que se quer avaliar (contaminado) e ao solo controle, permitindo a migração entre ambos. Após o período de 2 dias a localização dos indivíduos é determinada. O sistema para determinação do teste de rejeição de fungicidas para ambas as espécies foi baseado no protocolo internacional ISO -17512 (ISO, 2006). Foram feitos testes de rejeição para *E.*

fetida em Gleissolo , e para *P. corethrurus* em Gleissolo e Argissolo. A escolha das concentrações utilizadas nos testes definitivos foi baseada nos resultados de testes preliminares. Estas foram 7, 14, 28, 56 e 112 mg Cu /Kg para ambas espécies e substratos.

Para os testes de rejeição, seguiu-se o mesmo procedimento de preparo da solução estoque e contaminação do substrato-teste, usados para os testes de toxicidade aguda. Os testes foram feitos em cinco concentrações e quatro réplicas para os substratos Argissolo e Gleissolo.

Caixas de plástico (área 11 cm x 15.5 cm, 6 cm de altura) foram preenchidas com 250g (ms) de solo em cada metade, uma com substrato contaminado e outra não contaminado (Figura 15). Durante o preenchimento foi usada uma lâmina divisória para evitar a mistura dos substratos. Em seguida, a lâmina foi retirada e 10 indivíduos de *E. fetida* pesando entre 300 a 600 mg, ou de *P. corethrurus* pesando entre 300 e 1100 mg foram colocados na região central de cada recipiente e aguardado o tempo necessário para as minhocas imergirem no substrato (Figura 16). Em seguida estas foram incubadas por 48h a 28 ± 2 °C, na ausência de luminosidade. Ao término da incubação cada recipiente foi cuidadosamente examinado e, separando-se as seções (controle e tratamento), foi registrado o número de indivíduos que migraram para o controle. A resposta de rejeição foi quantificada pela diferença entre as proporções de indivíduos em cada uma das seções. Em cada réplica, a rejeição (R) (expressa em percentagem) foi calculada pela fórmula: $R = [(C - T) / 10] \times 100$; onde (C) é o total de indivíduos observados no solo controle; (T) é o total de indivíduos observados no solo contaminado e, “10” representa o número de indivíduos por réplica.



Figura 15. Caixa de plástico dividida em solo contaminado e não contaminado. (Foto: Marcos Garcia)



Figura 16. Distribuição dos indivíduos no centro do recipiente. (Foto: Marcos Garcia)

6.7 Determinação do pH do substrato

A determinação da acidez do substrato foi feita segundo o protocolo ISO-10390 (ISO, 1994). Em uma réplica de cada tratamento foi retirada amostra do substrato contaminado, e secado ao ar. Em seguida, 25mL de solução de CaCl_2 0,01M foi adicionado a 10g (ms) da amostra e misturado por meio de agitador magnético por no mínimo cinco minutos e após 1 hora em repouso foi feita a medição de pH.

6.8. Determinação da umidade do substrato

A determinação da umidade do substrato foi feita segundo o protocolo ISO-11465 (ISO, 1993b). Nas mesmas réplicas escolhidas para determinação do pH foram tomadas amostras para determinação da umidade. Pesavam-se os respectivos recipientes (tara), em seguida tomavam-se uma pequena quantidade do substrato úmido contaminado (tara + solo úmido) de aproximadamente 18g, onde posteriormente foram secadas em estufa a 105°C até peso constante (solo seco).

6.9. Determinação da concentração real de cobre no substrato.

A “concentração nominal”, isto é, a quantidade do ingrediente ativo esperada no substrato de teste após sua contaminação intencional no laboratório, foi considerada

para cálculo da toxicidade (CL_{50}). Entretanto, para confirmação das doses crescentes de cobre nos ensaios, foi determinado o conteúdo de cobre total do substrato teste para os diferentes tratamentos. Ao final da aplicação da solução de oxicloreto de cobre no substrato, amostras foram tomadas em cada tratamento (concentração nominal) para análise de cobre total (concentração real). A análise do cobre total foi realizada pelo método de digestão nítrico-perclórica (EMBRAPA, 1997).

6.10 Desenho experimental e análises estatísticas

Os experimentos foram em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e controle, com quatro repetições. Para avaliação da toxicidade aguda dos fungicidas foi estimada a concentração letal mediana (CL_{50}) por meio do método de Probit (FINNEY, 1971). O valor da CL_{50} foi apresentado em massa do ingrediente ativo (mg) por massa de solo (kg). O programa de análise de Probit foi obtido em U.S.EPA (2002). As curvas de dose-resposta geradas após análise de Probit foram feitas no programa ToxRat®. Diferenças entre o controle e tratamentos foram avaliadas por meio de análise de variância (ANOVA) e para comparação de médias foi utilizado o teste de Dunnett, a 5 % de significância. Nos testes de rejeição foi utilizado o Teste t-Student para comparação das médias do número de indivíduos entre as seções contaminadas e de controle. Para a análise de variância, teste t-Student e regressão linear foi utilizado o programa SigmaStat®. Os gráficos referentes aos testes de rejeição foram feitos utilizando o programa SigmaPlot®.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Toxicidade aguda para *Eisenia fetida*

Segundo Neuhauser *et al.* (1985); Spurgeon *et al.* (1994) e Kula e Larink, (1998), os valores da CL_{50} de cobre para *Eisenia fetida* dependem do tipo de substrato utilizado variando entre 100 e 1002 mg Cu/kg de solo.

No presente estudo, o valor da CL_{50} estimado para a espécie *E. fetida*, após 14 dias de exposição, em solo Gleissolo contaminado foi de 1162,3 mg Cu/kg (975 - 1385,2). A baixa toxicidade aguda de oxicloreto de cobre para *E. fetida* pode ser observada pelo típico formato da curva dose-resposta, isto é, pequeno incremento da mortalidade para grande aumento da dose (Figura 17).

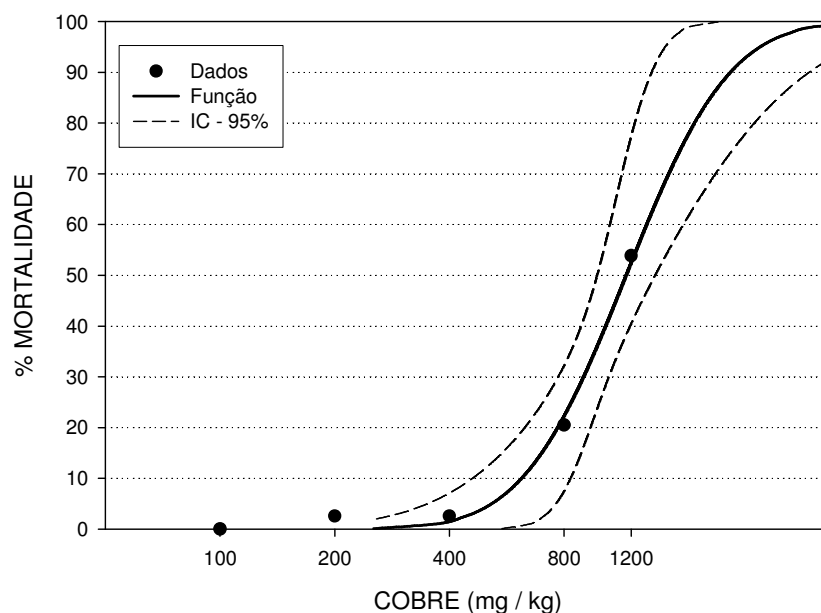


Figura 17. Curva dose-resposta de toxicidade aguda de cobre para *Eisenia fetida* em Gleissolo (Manaus/2009).

Neste estudo, testes de toxicidade aguda mostraram que o fungicida oxicloreto de cobre tem baixa letalidade para a minhoca *E. fetida* (Tabela 8). Pesticidas com valores

de concentração letal mediana (CL₅₀) maior que 1000 mg ingrediente ativo/kg são consideradas não tóxicos para minhocas no campo (KOKTA, 1992).

Tabela 7. Toxicidade aguda de cobre para *Eisenia fetida* em Gleissolo (Manaus/2009).

Tratamento (mg Cu/kg)	Biomassa (mg)	Mortalidade [%]	Biomassa (mg)	% do peso inicial
	1º Dia		14º Dia	
Controle	403	2,5	256,6	63,7
100	412,3	2,5	264,3	64,1
200	398,9	5	229,1	57,4 *
400	402,7	5	210,8	52,3 *
800	408,7	22,5	n.d.	n.d.
1200	411	55	n.d.	n.d.

* Estatisticamente diferente do controle (ANOVA, Teste Dunnett, P<0,01); n.d. = não determinado

7.2 Toxicidade aguda para *Pontoscolex corethrurus*

Ensaio de toxicidade aguda para *P. corethrurus* mostrou que esta espécie tem maior sensibilidade ao oxiclreto de cobre que a espécie teste-padrão, *E. fetida*, ambas testadas em Gleissolo. O valor da CL₅₀, para *P. corethrurus* foi estimado em 154,6 mg Cu/kg (58,9 - 405,7), ver figura 18, e para *E. fetida* foi 1162,3 mg Cu/kg (975 - 1385,2).

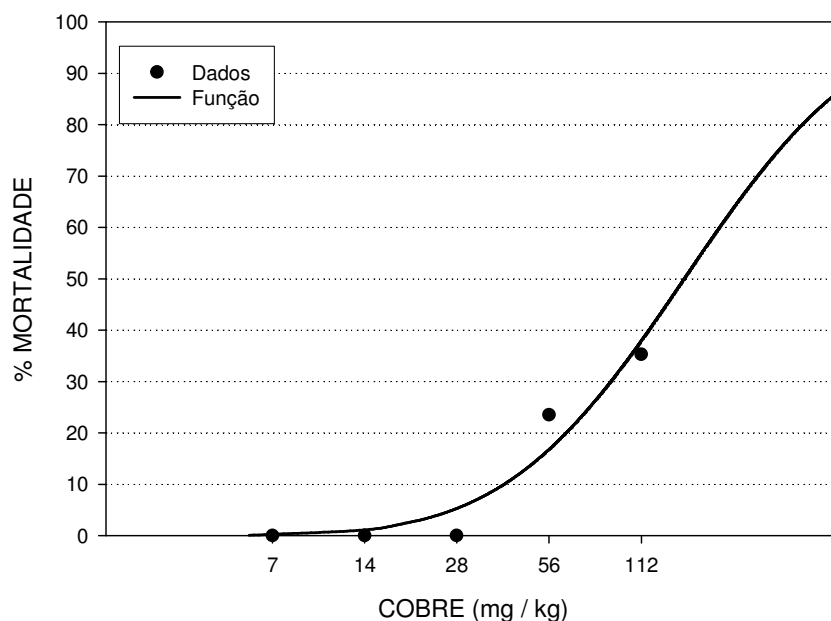


Figura 18. Curva dose-resposta de toxicidade aguda de cobre para *Pontoscolex corethrurus* em Gleissolo (Manaus/2009).

Para a avaliação de risco ambiental de substâncias químicas em regiões tropicais é importante verificar se espécies de minhocas nativas podem apresentar diferente sensibilidade quando comparada a espécie teste padrão *E. fetida*. Para a espécie nativa, *Pontoscolex corethrurus*, não existem dados disponíveis na literatura sobre a sensibilidade ao cobre. Garcia (2004) observou que *P. corethrurus* é mais sensível ao fungicida carbendazim ($CL_{50} = 45.6$ mg ingrediente ativo./kg) que *E. fetida* ($CL_{50} > 1000$ mg a.i./kg). Em parte a diferença de sensibilidade pode ser explicada pela distinta estratégia ecológica de *P. corethrurus* que, vive em estreito contato com o substrato alimentando-se diretamente do solo mineral. Até o momento esta espécie foi raramente usada em testes toxicológicos (KALE e KRISHNAMOORTHY, 1979).

Ao contrário de *E. fetida* a redução de biomassa em *P. corethrurus*, não foi significativa para teste agudo em Gleissolo (Tabela 9). Entretanto, em Argissolo foi observada redução significativa apenas na concentração de 56 mg Cu/kg (Tabela 10).

Tabela 8. Toxicidade aguda de cobre para *Pontoscolex corethrurus* em Gleissolo (Manaus/2009).

Tratamento (mg Cu/kg)	Biomassa (mg)	Mortalidade [%]	Biomassa (mg)	% do peso inicial
	1º Dia		14º Dia	
Controle	679,0	15	660,5	97,3
7	599,8	5	529,1	88,2
14	672,9	15	674,1	100,2
28	691,6	15	596,5	86,3
56	665,4	35	500,2	75,2
112	689,0	45	450,5	65,4

Tabela 9. Toxicidade aguda de cobre para *Pontoscolex corethrurus* em Argissolo (Manaus/2009).

Tratamento (mg Cu/kg)	Biomassa (mg)	Mortalidade [%]	Biomassa (mg)	% do peso inicial
	1º Dia		14º Dia	
Controle	396,5	10	530,3	133,8
7	443,9	40	552,67	124,5
14	428,5	15	508,65	118,7
28	419,8	30	463,81	110,5
56	419,5	35	385,21	91,8 *
112	385,4	75	n.d.	n.d.

* Estatisticamente diferente do controle (ANOVA, Teste Dunnett, $P < 0,01$); n.d. = não determinado

Devido a grande variabilidade da resposta de cobre para *P. corethrurus* em Argissolo, os dados não foram ajustados em uma típica curva dose-resposta, estimando a CL_{50} em 84,3 mg Cu/kg (35-202,8) (Figura 19). O amplo intervalo demonstra a pouca confiabilidade da estimativa da CL_{50} , o que provavelmente foi resultado da variabilidade de idade e maturação reprodutiva da população de *P. corethrurus* obtida no campo. O cultivo desta espécie em laboratório precisa ser estudado a fim de obter indivíduos de idade e fase reprodutiva mais homogênea.

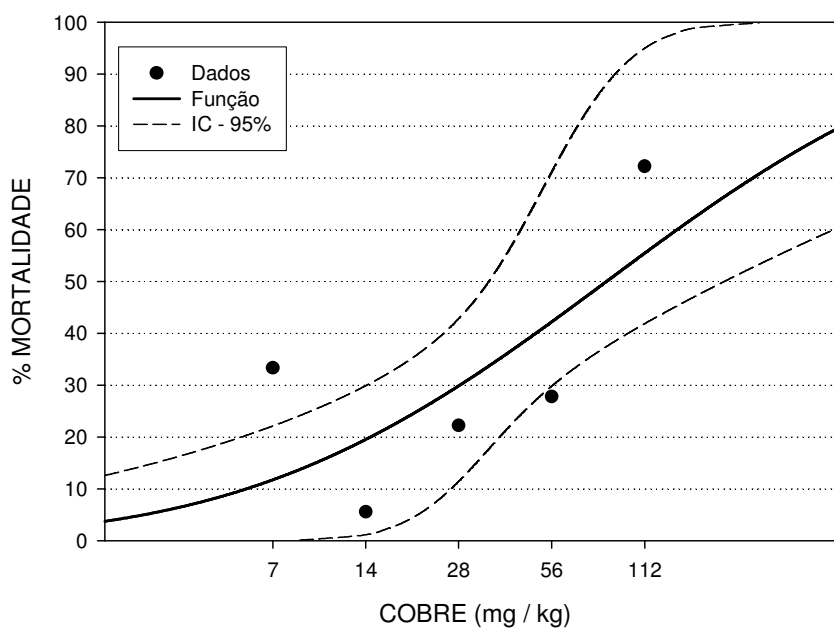


Figura 19. Curva dose-resposta de toxicidade aguda de cobre para *Pontoscolex corethrurus* em Argissolo (Manaus/2009).

7.3 Resposta de rejeição: *Eisenia fetida* e *Pontoscolex corethrurus*

A rejeição ao substrato contaminado com oxicloreto de cobre foi observada para ambas as espécies de minhocas. Conforme já havia sido demonstrado para *E. fetida* (YEARDLEY *et al.*, 1996; SLIMAK, 1997; STEPHENSON *et al.*, 1998), neste estudo foi confirmada a capacidade de *P. corethrurus* de evitar substratos contaminados. Maior sensibilidade ao cobre foi observada para *P. corethrurus* que para *E. fetida* (respostas significativas a 14 e 28mg Cu/kg, respectivamente), (Figuras 20 e 21).

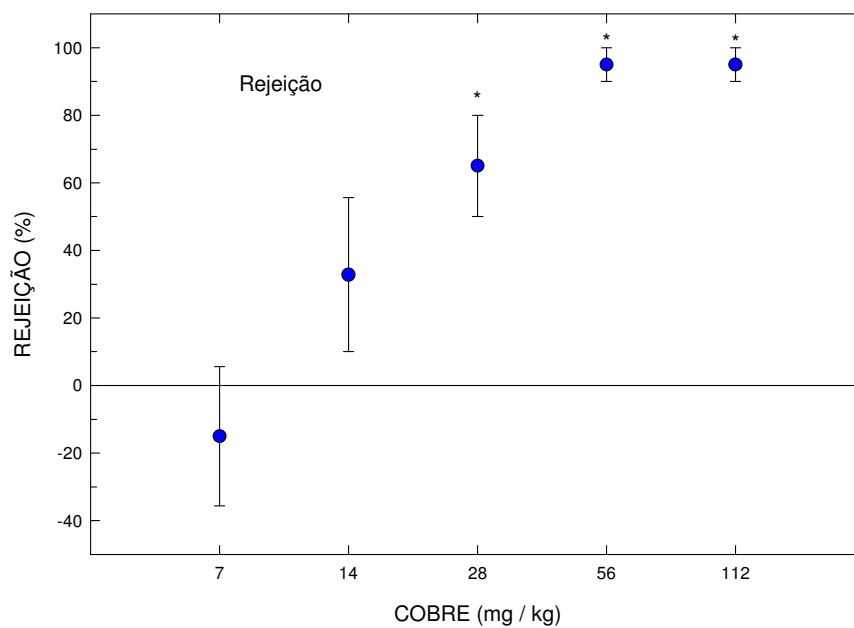


Figura 20. Resposta de rejeição de *Eisenia fetida* a diferentes concentrações de cobre em Gleissolo (média e erro padrão, * estatisticamente significativa, teste-t, $p \leq 0,05$).

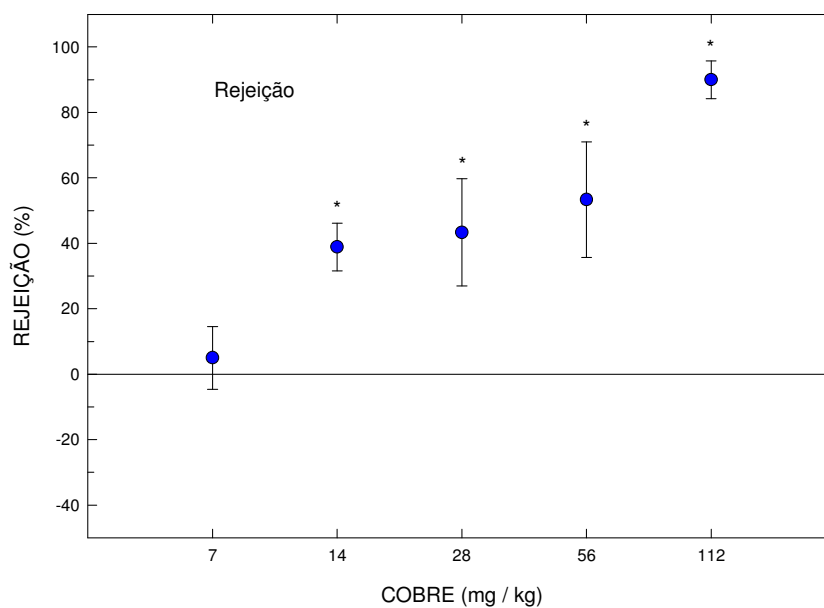


Figura 21. Resposta de rejeição de *Pontoscolex corethrurus* a diferentes concentrações de cobre em Gleissolo (média e erro padrão, * estatisticamente significativa, teste-t, $p \leq 0,05$).

Em Argissolo as respostas de rejeição de *P. corethurus* não foram significativas conforme o aumento de concentração (Figura 22). Este resultado pode ser explicado devido ao alto teor de matéria orgânica no argissolo, e com isso o cobre houve a maior adsorção, isto é, tornou-se disponível.

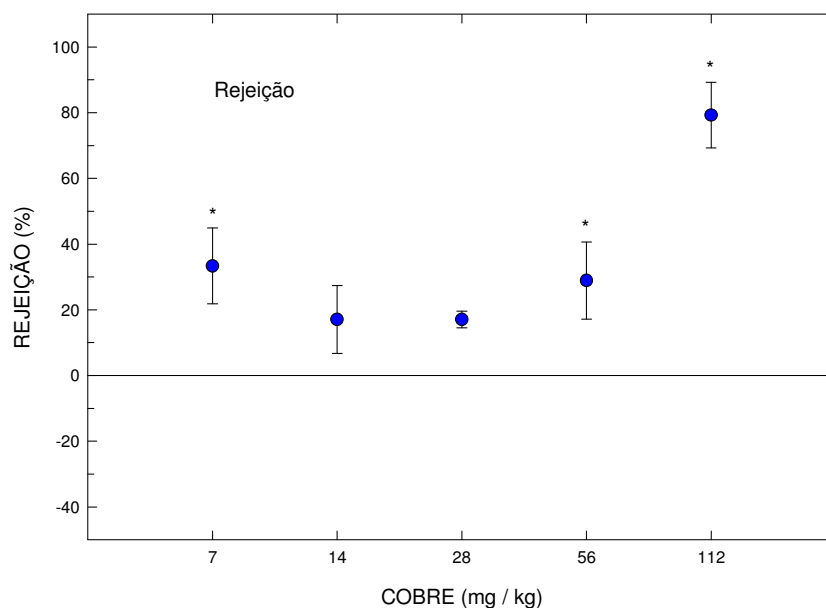


Figura 22. Resposta de rejeição de *Pontoscolex corethrurus* a diferentes concentrações de cobre em Argissolo (média e erro padrão, * estatisticamente significante, teste-t, $p \leq 0,05$).

7.4 Testes de toxicidade na avaliação de risco ambiental

Testes de toxicidade aguda foram baseados em metodologia de padrão internacional descritas em OECD 1984 e ISO 1993 e nos métodos modificados para região tropical sugeridos por Garcia (2004). Problemas metodológicos observados foram: Mortalidade acima de 10% em um teste agudo com a espécie nativa *P. corethrurus*, o que era esperado em indivíduos coletados em campo, isto é, população não homogênea; Redução da biomassa maior que 20% no controle no teste agudo com *E. fetida*. Entretanto, segundo Garcia (2004) a redução de biomassa no controle deve-se ao efeito do substrato (solo natural) e da temperatura (28 °C) utilizados neste ensaio.

O principal parâmetro avaliado em testes de toxicidade aguda é a mortalidade. Embora pouco importante neste tipo de ensaio, o efeito da substância química sobre a biomassa tem sido sugerido como parâmetro adicional para os casos de nenhum efeito agudo (KULA, 1998). Observou-se o efeito de redução da biomassa dos indivíduos de *E. fetida* quando expostos a concentrações subletais de oxicloreto de cobre (200-400mg Cu/kg) em Gleissolo (Tabela 8).

Estudos sobre o efeito do cobre revelaram que o crescimento das minhocas é afetado quando expostas em concentrações de 100mg Cu/Kg ou ainda superior a 320mg Cu/Kg de solo e ocorre efeito sobre a taxa de reprodução em concentrações entre 53,3 e 150 mg Cu/kg (MALECKI *et al.*, 1982; MA, 1984; SVENDSEN e WEEKS, 1997; KULA e LARINK, 1998). De acordo Helling *et al.* (2000), a presença de oxicloreto de cobre no esterco bovino teve um efeito negativo na taxa de crescimento de *E. fetida*, podendo este parâmetro ser considerado um indicador mais sensível dos efeitos de fungicidas cúpricos sobre minhocas.

Segundo Maboeta *et al.* (2004), os valores de CL₅₀ resultantes de testes de toxicidade aguda de oxicloreto de cobre para *E. fetida* pode conduzir a uma avaliação ecotoxicológica subestimada. Além disto, conforme observado no presente estudo, a menor sensibilidade de *E. fetida* ao oxicloreto de cobre, comparada a espécie nativa *P. corethrurus* deve ser considerada na avaliação de risco ambiental. Ambas as espécies mostraram comportamento de rejeição ao solo contaminado com oxicloreto de cobre em concentrações muito mais baixas que aquelas determinadas nos testes agudos (CL₅₀) refletindo a alta sensibilidade dos testes de rejeição (YEARDLEY *et al.*, 1996, GARCIA *et al.*, 2007).

7.5 Concentração de cobre no solo

O conhecimento das concentrações naturais de cobre total é necessário para definição dos padrões de referência no caso de avaliações da contaminação ambiental.

O levantamento dos teores naturais de cobre total em solos brasileiros é escasso. Fadigas *et al.* (2002), avaliaram o teor de cobre total em diferentes tipos de solos brasileiros, não contaminados, entre 3,1 a 14,3 mg/kg. Concentrações de cobre no solo acima de 150 mg/kg são consideradas tóxicas (efeitos crônicos) para a maioria das plantas cultivadas (WHO, 1998). O conteúdo natural de cobre nos solos testados foram de 10,5 a 11,6 mg/kg no solo tipo Gleissolo e de 1,3 a 1,6 mg/kg no Argissolo. Para estes solos freqüentes na Amazônia e, inclusive para Latossolo, não existem registros sobre a concentração de cobre total em áreas onde há intenso uso de fungicidas cúpricos.

Segundo Nachtigall *et al.* (2007), em áreas cultivadas onde há o uso de fungicidas cúpricos o teor de cobre total no solo varia de 1200 a 1380 mg/kg, excedendo a concentração máxima permitida de 140 mg/kg atualmente imposta pela comunidade européia. A correlação entre as concentrações nominais e reais foi alta e significativa em todos os ensaios (coeficientes $R^2 = 0,99$ e $P < 0,01$). Portanto, pode-se confirmar que as minhocas estiveram expostas a concentrações crescentes de cobre no substrato (Tabelas 11 e 12). Entretanto, a concentração do cobre ativo, isto é, biodisponível, não pode ser prevista com base na concentração do cobre total no solo (PIETRZAK e MCPHAIL, 2004).

Tabela 10. Concentrações nominais e reais de cobre utilizadas nos ensaios com *Eisenia fetida* em Gleissolo (valores em mg Cu / Kg).

Gleissolo			
Teste Agudo		Teste Rejeição	
Nominal	Real	Nominal	Real
0	11,1	0	10,5
100	94,4	7	18,5
200	173,1	14	26,3
400	349,8	28	40,2
800	610,5	56	63,0
1200	1009,2	112	119,5

Tabela 11. Valores das concentrações nominais e reais de cobre utilizadas nos ensaios com *Pontoscolex corethrurus* em Argissolo e Gleissolo (valores em mg Cu / Kg).

Argissolo				Gleissolo	
Teste Agudo		Teste Rejeição			
Nominal	Real	Nominal	Real	Nominal	Real
0	1,3	0	1,6	0	11,6
7	6,8	7	6,0	7	16,0
14	12,3	14	11,3	14	22,7
28	26,8	28	21,9	28	30,8
56	52,0	56	43,0	56	61,6
112	109,4	112	93,7	112	113,9

A biodisponibilidade do cobre no solo, isto é, a fração do metal que é absorvida pelos organismos expostos, é fortemente dependente do pH, conteúdo e tipo de argila e teor de matéria orgânica. Portanto, no presente estudo, a biodisponibilidade do cobre provavelmente foi influenciada pelas diferenças físico-químicas do solo, o que explica a diferença de toxicidade deste metal para minhocas entre os substratos.

CONCLUSÃO

Os testes de toxicidade aguda em Gleissolo mostraram que o fungicida oxiclureto de cobre tem baixa letalidade para a minhoca *E. fetida*, embora *P. corethrurus*, apresentou maior sensibilidade ao agrotóxico.

Quando expostos a concentrações subletais de oxiclureto de cobre, indivíduos de *E. fetida* são mais sensíveis à redução da biomassa.

Ambas as espécies de minhocas evitam solos contaminados com oxiclureto de cobre ainda que em baixas concentrações. Aparentemente *P. corethrurus* tem maior sensibilidade em Gleissolo.

Ensaio realizados com *P. corethrurus*, podem ser úteis para a avaliação de risco ambiental de oxiclureto de cobre, em regiões tropicais.

REFERÊNCIAS

ALLOWAY, B.J. The origins oh heavy metals in soils. In: ALLOWAY, B.J. Heavy metals in soils. Londres, Inglaterra: Blackie, 1990. pp.29-39.

ANDRÉA, M.M. de. Bioindicadores ecotoxicológicos de agrotóxicos. Artigo em Hypertexto disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2008_4/Bioindicadores/Index.htm. Acesso em Março de 2009.

ANDRÉA, M.M.de. Contaminação do solo por pesticidas. Vol.60(2). O Biológico, 1998. p.63-65.

ANDRÉA, M.M.de; MATALLO, M.B.; TOMITA, R.Y.; LUCHINI, L.C. Effect of temperature on dissipation of [14C]-atrazine in a brazilian soil. v.32(1). Pesquisa Agropecuária Brasileira, 1997. pp.95-100.

ANDREI, E. Compêndio de agrotóxicos agrícolas. 4. ed. São Paulo, 1993. p.130-131.

ARAÚJO, A. S. F. de; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores Biológicos de Qualidade de Solo. Vol.23 (3). Biosci.J., Uberlândia, 2007. p. 66-75.

AREASEG - Segurança do Trabalho e Ergonomia. Disponível em: <http://www.areaseg.com/eco/ema-pedia.html>. Acesso em Abril de 2009.

BERNARDES, F. F.; KIEHL, J. C. Reprodução da minhoca *Pontoscolex corethrurus* em dois solos e sob dois níveis de matéria orgânica. In: Anais do XXVI Congresso brasileiro de ciência do solo, Rio de Janeiro: Soc. Brasil de Ciência do Solo, 1997.

BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P.A. Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações. São Carlos:Rima, 2006. 478p.

BEVEN, K.; GERMANN, P.F. Macropores and water flow in soils. Water Resources Research. v.18. Washington, 1982. pp. 1311-1325.

BIDONI, F.R.A.; POVINELLI, J. Conceitos básicos de resíduos sólidos. EECS/USP: São Carlos, 1999. 120p.

BITTENCOURT, E. Embrapa comprova prejuízos aos recursos hídricos por defensivos e pesquisa opções de menor impacto no meio ambiente. Disponível em: http://www.agenciarrural.go.gov.br/not_agrotoxicos.htm. Acesso em Maio de 2009.

BLUM, W.E.H.; SANTELISES, A.A.A. A concept of sustainability and resiliense based in soil functions. In: GREENLAND, D.J.; SZABOLCS, I. Soil resilience and sustainable land use. Wallingford:CAB, 1994. pp. 535-542.

BOOK, M.V.; MACHADO NETO, J.G. Estudos toxicológicos do oxicleto de cobre para Tilápia vermelha (*Oreochromis* sp.). Vol.67(2). Arq. Inst.Biolog. São Paulo, 2000. p.215-221.

CARVALHO, I.S. Agrotóxicos: usos e implicações. Vol.2 (1). Mundo & Vida: Rio de Janeiro, 2000. p.29-31, 2000.

CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. Método de Avaliação da Toxicidade de Poluentes a Organismos Aquáticos. Vol.1.2005. 312p.

COSTA, C.N.; MEURER, E.J.; BISSANI, C.A.; SELBACH, P. Contaminantes e poluentes do solo e meio ambiente. In: MEURER, E.J. Fundamentos de química do solo. 2a. ed. Porto Alegre, 2004.

DORAN, J. W.; SARRANTONIO, M.; LIEBIG, M. Soil health and sustainability. In: SPARKS, D.L. Advances in Agronomy. San Diego: Academic Press, 1996. pp. 1-54.

DORAN, J.W.; PARKIN, T.B. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J.W.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F.; STEWART, B.A. Defining soil quality for a sustainable environment. Madison: SSSA, 1994. pp.3-21.

EDWARDS, C.A. Earthworm ecology in cultivated soils. London: Chapman and Hall, 1983. pp. 123-138.

EDWARDS, C.A. Persistent pesticides in the environment. 2.ed. U.S.A.: CRC Press, 1973, 170p

EDWARDS, C. A; BOHLEN, P. J. Role of earthworms in soil structure, fertility and productivity. In: Biology and ecology of earthworms. 3a. London: Chapman and Hall, 1996. pp. 196-217.

EMBRAPA - CNPTIA. Embrapa Informática Agropecuária. Disponível em: <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cebola/CultivoCebolaNordeste/glossario.htm>. Acesso em Abril de 2009.

EMBRAPA. Embrapa Satellite Monitoring - Brasil visto por satélite. Amazonas, Manaus Images SA-20 and SA21, 2002. Disponível em: <http://www.cdbrasil.cnpm.embrapa.br/>. Acesso em Junho de 2003.

EMBRAPA - CNPS. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Manual de métodos de análises de solo. 2ª. ed. Doc.1, Rio de Janeiro, 1997. 212p. il.

FADIGAS, F.S.; AMARAL-SOBRINHO, N. B.; MAZUR, N.; ANJOS, L. H. C.; FREIXO, A. A. Concentrações naturais de metais pesados em algumas classes de solos brasileiros. vol.61(2). Bragantia, 2002. pp.151-159.

FAREHORST, A.; TOPP, E.; BOWMAN, B.T.; TOMLIN, A.D. Earthworms and the dissipation and distribution of atrazine in soil profile. v.32. Soil Biology and Biochemistry, Amsterdam, 2000. pp. 23-33.

FEAM - Fundação Estadual do Meio Ambiente. Iniciação ao desenvolvimento sustentável. Belo Horizonte, 2003. 462p.

FINNEY, D.J. Probit analysis. Cambridge University Press, 1971. 333 p.

GARCIA, M.; RÖMBKE, J.; BRITO, M. T. de; SCHEFFCZYK, A. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. *Environmental Pollution*, 2007.

GARCIA, M. Effects of pesticides on soil fauna: Development of ecotoxicological test methods for tropical regions. Cuvillier Verlag, Gottingen, 2004. 281p.

GRISI, B.; GRACE, C.; BROOKES, P.C.; BENEDETTI, A.; DELL'ABATE, M.T. Temperature effects on organic matter and microbial biomass dynamics in temperate and tropical soils. v.30(10-11). *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, 1998. pp. 1309-1315.

HAMOUI, V. Life-cycle and growth of *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) (Oligochaeta, Glossoscolecidae) in the laboratory. v. 28(4). *Rev. Écol. Biol. Sol*, 1991. pp. 469-478.

HELLING, B.; REINECKE, S. A.; REINECKE, A. J. Effects of the fungicide cooper oxychloride on the growth and reproduction of *Eisenia fetida* (Oligochaeta). v.46. In *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2000. pp.108-116.

HUND-RINKE, K.; ACHAZI, R.; RÖMBKE, J.; WARNECKE, D. Avoidance test with *Eisenia fetida* as indicator for the habitat function of soils: Results of a laboratory comparison test. v.3(1). *Journal of Soils and Sediments*, 2003. pp. 7-12.

IBAMA - Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis. Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos. Brasília, 1990.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário (1995-1996), 1998.

IHDC - Instituto Hórus de Desenvolvimento e Conservação Ambiental . The Nature Conservancy. Disponível em: http://www.institutohorus.org.br/download/fichas/Eisenia_fetida.htm. Acesso em novembro de 2007.

ISO-17512. International Organization for Standardization. Draft: Soil Quality - Avoidance test for evaluating the quality of soils and the toxicity of chemicals. Test with Earthworms (*Eisenia fetida/andrei*). Geneve, Switzerland, 2006.

ISO - International Organization for Standardization. ISO-10390: Soil quality - Determination of pH. Geneve, Switzerland, 1994.

ISO-11268-1 International organization for standardization. Soil-quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) – Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate. Geneve, Switzerland, 1993a. 6p.

ISO -International Organization for Standardization. ISO-11465: Soil quality - Determination of dry matter and water content on a mass basis - Gravimetric method. Geneve, Switzerland, 1993b.

KALE, R.D.; KRISHNAMOORTHY, R.V. Pesticidal effects of Sevin (1-naphtyl-n-methyl carbamate) on the survivability and abundance of earthworm *Pontoscolex corethrurus*. v.88. Proc Indian Acad Sci, 1979. pp. 391-396.

KENNETTE, D.; HENDERSHOT, W.; TOMLIN, A.; SAUVÉ, S. Uptake of trace metals by the earthworm *Lumbricus terrestris* L. in urban contaminated soils. v.17. Applied soil ecology, Amsterdam, 2002. pp. 191-198.

KOKTA, C. A laboratory test on sub-lethal effects of pesticides on *Eisenia fetida*. In Ecotoxicology of earthworms, 1992. pp. 257-262.

KOTAKA, E.T.; ZAMBRONE, F.A.D. Contribuições para a construção de diretrizes de avaliação do risco toxicológico dos agrotóxicos. International Life Sciences Institute. Campinas, 2001. 160p.

KULA, C. Endpoints in laboratory testing with earthworms: experience with regard to regulatory decisions for plant protection products. In: Sheppard, S., Bembridge, J., Holmstrup, M. and Posthuma, L. (eds) Advances in Earthworm Ecotoxicology. Pensacola: SETAC Press, 1998. pp 3-14.

KULA, C. A prolonged laboratory test on sublethal effects of pesticides on *Eisenia fetida*. In Ecotoxicology of Soil Organisms. Lewis, Boca Ranton, FL, 1994. pp. 257-262.

KULA, H.; LARINK, O. Tests on the earthworms *Eisenia fetida* and *Aporrectodea caliginosa*. In Handboock of soil invertebrate Toxicity Tests. Willey, New York, 1998. pp. 95-112.

LARSON, W.E.; PIERCE, F.J. The dynamics of soil quality as a measure of sustainable management. In: DORAN, J.W.; COLEMAN, D.C.; BEZDICEK, D.F.; STEWART, B.A. Defining soil quality for a sustainable environment. Madisson: SSSA, 1994. pp. 37-51.

LAVELLE, P. Importância das minhocas para agricultura. Palestra apresentada na Embrapa Amazônia Ocidental. Manaus, 2008. Disponível em: www.cpaa.embrapa.br/aunidade/noticia.htm. Acesso em maio de 2008.

LAVELLE P; BAROIS, I; CRUZ, I; FRAGOSO C. HERNANDEZ, A.; PINEDA, A.; Rangel P. Adaptative strategies of *Pontoscolex corethrurus* (Glossoscolecidae, Oligochaeta), a peregrine geophagous earthworm of the humid tropics. v.5. Biol Fertil Soils, 1987. pp.188-194.

LAVELLE P. The structure of earthworm communities. London: Champman and Hall, 1983. pp. 449-466.

LEE, K.E. Earthworms: their ecology and relationships with soils and land use. London: Academic, 1985. 411p.

LIU, T.; SUN, C.; TA, N.; HONG, J.; YANG, S.; CHEN, C. Effect of copper on the degradation of pesticides cypermethrin and cyhalothrin. v.19(10). J. Env. Sci., 2007. pp.1235-1238.

LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. de. Comportamento ambiental de agrotóxicos. Horticultura Brasileira, Vol.18. Brasília, 2000, p.33-35.

LUCHINI, L.C. Adsorção-dessorção dos herbicidas paraquat, diuron e 2,4-D em seis solos brasileiros. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz: Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1987. 97p.

LUNA, R.G.; COUTINHO, H.D.M. Efeitos de bagaço de cana-de-açúcar e minhocas (*Pontoscolex corethrurus*) sobre a microbiota do solo (Paraíba, Brasil). Vol.21(1). Caatinga, 2008. p.156-161.

MA, W. Sublethal toxic effects of cooper on growth, reproduction and litter breakdown activity in the earthworm *Lumbricus rubellus*, with observations on the influence of temperature and soil ph. v. 33. Ser.A. Environ.Pollut., 1984. pp.207-219.

MABOETA, M.S.; REINECKE, S.A.; REINECKE, A.J. The relationship between lysosomal biomarker and organismal responses in an acute toxicity test with *Eisenia Fetida* (Oligochaeta) exposed to the fungicide copper oxychloride v.96(1). Environmental Research, 2004. pp. 95-101.

MABOETA, M.S.; REINECKE, S.A.; REINECKE, A.J. Linking lysosomal biomarker and population responses in a field population of *Aporrectodea caliginosa* (Oligochaeta) exposed to the fungicide copper oxychloride. v.56. Ecotox. Environ. Safe, 2003. pp. 411 –418.

MALECKI, M.R.; NEUHAUSER, E.F.; LOEHR, R.C. The effects of metals on the growth and reproduction of *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae). v. 24. Pedobiologia, 1982. pp.129–137.

MERRINGTON, G.; ROGERS, S.L.; VAN ZWIETEN, L. The potential impact of long-term copper fungicide usage on soil microbial biomass and microbial activity in an avocado orchard. v.40. Aust. J. Soil Res., 2002. pp. 749 –759.

MURTY, A. S. Toxicity of pesticide to fish. v. 1. CRC press, 1988. 129p.

NACHTIGALL, G. R.; NOGUEIROL, R. C.; ALLEONI, L. R. F.; CAMBRI, M. A. Copper concentration of vineyard soils as a function of pH variation and addition of poultry litter. v.50. Brazilian Archives of Biology and Technology, 2007. pp.941-948.

NEUHAUSER, E. F.; LOEHR, R. C.; MILLIGAN, D. L.; MALECKI, M. R. Toxicity of metals to the earthworm *Eisenia fetida*. Biol. Fertil. Soil (1), 1985. pp.149-152.

NILSSON, J. Soil vulnerability mapping in Sweden. In: Mapping of soil and terrain vulnerability to specified chemical compounds in Europe at scale of 1:5m. Wageningen, Holanda, 1991. pp.117-125.

NIMMO, D.R. Pesticides. In: Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications. Hemisphere, New York, 1985. 85p.

OECD - Organisation for economic cooperation and development: OECD-Guideline for testing of chemicals No. 207. Earthworm acute toxicity test. Paris, 1984.

PENKOV, M. Basic procedures for mapping the chemical contamination of Bulgarian soils. In: Mapping of soil and terrain vulnerability to specified chemical compounds in Europe at scale of 1:5m. Wageningen, Holanda, 1991. pp.57-60.

PEREIRA NETO, J.T. Manual de compostagem - processo de baixo custo. UNICEF: Belo Horizonte, 1996. 56p.

PIETRZAK, U.; MCPHAIL, D.C. Copper accumulation, distribution and fractionation in vineyard soils of Victoria, Australia. *Geoderma* 122, 2004. pp.151-166.

PIVETZ, B.E.; STEENHUIS, T.S. Soil matrix and macropore biodegradation of 2,4-D. v.24(4). *Journal of Environmental Quality*, Madison, 1995. pp. 564-570.

PLAA, G.L. Present status: toxic substances in the environment. v.60. *Can. J. Physiol. Pharmacol*, 1982. pp. 1010-1016.

RAMADE, F. *Ecotoxicologie*. Masson, Paris, 1977. 201p.

RAMALHO, J.F.G.P.; AMARAL SOBRINHO, N.M.B.; VELLOSO, A.C.X. Contaminação da microbacia de Caetés com metais pesados pelo uso de agroquímicos. Vol.35(7). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 2000. p.1289-1303.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S.R. *Fundamentals of aquatic toxicology*. Washington, D. C., 1985. 665p.

RIGHI, G. Oligochaeta (Annelida) -Diversidade e agro ecologia. Vol.5(2). São Paulo, 1974. pp.10-21. Disponível em: <http://www.biota.org.br/pdf/v5cap02.pdf> Acesso em setembro de 2008.

RIGHI, G. *Pontoscolex* (Oligochaeta, Glossoscolecidae) a new evaluation. v.19. *Stud Neotrop Fauna Environ*, 1984. pp.159-177.

RÖMBKE, J.; BAUER, C.; MARSCHNER, A. Hazard assessment of chemicals in soil - Proposed ecotoxicological test strategy. v.3. *ESPR - Environmental Science and Pollution Research*, 1996. pp. 78-82.

RÖMBKE, J.; VERHAAGH, M. About earthworm communities in a rain forest and an adjacent pasture in Peru. v.12. *Amazoniana*, 1992. pp. 29-49

RUEGG, E. F.; PUGA, F.R.; SOUZA, M.C.M. de; ÚNGARO, M.T.; Ferreira, M. da S.; Yokomizo, Y.; Almeida, W. F. Impactos dos agrotóxicos sobre o ambiente e a saúde. Caetés, São Paulo, 1987. 156p.

SADEGHI, A.M.; ISENSEE, A.R. Spatial distribution of atrazine residues in soil and shallow groundwater: effect. v.48(1). Agriculture, ecosystems and environment, Amsterdam, 1994. pp. 67-76.

SILVA, C.M.M. de S.; FAY, E.F.; VIEIRA, R.F. Efeitos do fungicida metalaxil e fenaromil na microbiota do solo. Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente. Vol.15. Curitiba, 2005. pp.93-104.

SINDAG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. Não está disponível em: www.sindag.com.br. (Enviado por Ivan Amâncio Sampaio – Diretor de Informação). Acesso em Fevereiro de 2009.

SISINNO, C., BULUS, M., RIZZO, A.; MOREIRA, J. Ensaio de comportamento com minhocas (*Eisenia fetida*) para avaliação de áreas contaminadas: resultados preliminares para contaminação por hidrocarbonetos. J. Braz. Soc. Ecotoxicol., 1(2), 2006. pp. 137-140.

SISINNO, C., BULUS, M., RIZZO, A., SÁFADI, R., FONTES, A.; MOREIRA, J. Ensaio ecotoxicológicos como um instrumento de complementação da avaliação de áreas contaminadas: resultados preliminares em áreas contaminadas por hidrocarbonetos, pp. 150-154. In: III Seminário Nacional de Saúde e Ambiente, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2004.164p.

SISINNO, C. Uso de ensaios ecotoxicológicos com organismos aquáticos e do solo para avaliar a toxicidade de amostras de solos contaminados e resíduos sólidos. Proposta de projeto de pesquisa da FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2003.

SLIMAK, K.M. Avoidance response as a sublethal effect of pesticides on *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). v.29. Soil Biol Biochem, 1997. pp. 713-715.

SMETAK, K.M.; MAYNARD, J.J.; LLOYD, J. Earthworm population density and carbon and nitrogen in different aged urban landscapes. In: The ASA-CSSA-SSSA International Annual Meetings, 2005. Salt Lake. Resumos. Disponível em: <http://crops.confex.com/crops/2005am/techprogram/P7864.HTM>. Acesso em novembro de 2008.

SPURGEON, D. J.; HOPKIN, S. P.; JONES, D. T. Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): Assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems. *Environ.Pollut* (84), 1994. pp. 123-130.

STEHOUWER, R.C.; DICK, W.A.; TRAINA, S.J. Sorption and retention of herbicides in vertically earthworm and artificial burrows. v.23(2). Journal of Environmental Quality, Madison, 1994. pp. 286-292.

STEPHENSON, G.L.; KAUSHIK, A.; KAUSHIK, N.K.; SOLOMON, K.R.; STEELE, T.; SCROGGINS, R.P. Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Sheppard, S., Bembridge, J., Holmstrup, M. and Posthuma, L. (eds) *Advances in Earthworm Ecotoxicology*. Pensacola: SETAC Press, 1998. pp 67-81.

STEVENSON, F.J.; COLE, M.A. Micronutrients and toxic metals. In: STEVENSON, F.J.; COLE, M.A. *Cycles of soil*. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1999. pp.371-414.

STÜTZER, G.; GUIMARÃES, G. Aspectos toxicológicos e ambientais relacionados com o uso de produtos fitossanitários. In: ZAMBOLIM, L. *O que os engenheiros agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários*. Viçosa: UFV, 2003. p.69-84.

SVENDSEN, C.; WEEKS, J. Relevance and availability of a simple earthworm biomarker of copper exposure. Links to ecological effects in a laboratory study with *Eisenia andrei*. v. 36. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 1997. pp. 72-79.

TASQA. Disponível em: http://www.tasqa.com.br/conteudo/tasqa_ecotoxicologia. Acesso em Novembro de 2008.

TILLER, K.G. Heavy metals in soils and their environmental significance. In: TILLER, K.G. v.9. *Advances in soil science*. New York: Springer, 1989. pp.113-114.

TOMITA, R.Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. *O Biológico*, São Paulo, 64(2), 2002. pp.135-142.

TOXRAT®. Software for the statistical analysis of biotests. Copyright: ToxRat Solutions GmbH. Alsdorf, Germany, 2003.

TRUHAUT, R. *Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives*. v.1. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1977. pp. 151-173.

USEPA - United States Environmental Protection Agency. Reregistration Eligibility Decision (RED): Benomyl. Washington, DC: Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, 2002. Disponível em: <http://www.epa.gov/nerleerd/stat2.htm>

VAN GESTEL, C. A. M.; VAN STRAALLEN, N. M. Ecotoxicological test methods using terrestrial invertebrates. In *Ecotoxicology of soil organisms*. Lewis, Boca Raton, FL, 1994. pp. 205-228.

VAN ZWIETEN, L.; RUST, J.; KINGSTON, T.; MERRINGTON, G.; MORRIS, S. Influence of copper fungicide residues on occurrence of earthworms in avocado orchard soils. *The Science of the Total Environment*, 2004. pp.29-41.

WAICHMAN, A.V. Uma proposta de avaliação integrada de risco do uso de agrotóxicos no estado do Amazonas, Brasil. Vol.38(1). *Acta Amazônica*, 2008. p. 45-51.

WAICHMAN, A.V.; EVE, E.; NINA, N.C.S. Do farmers understand the information displayed on pesticide product labels? A key question to reduce pesticides exposure and risk of poisoning in the Brazilian Amazon .v.26(4). Crop Protection, 2007. pp. 576-583.

WAICHMAN, A.V.; RÖMBKE, J.; RIBEIRO, M.O.A.; NINA, N.C.S. Agrotóxicos: Elemento novo na Amazônia. Vol.32(190). Ciência Hoje, 2003. p. 70-73

WAICHMAN, A.V.; RÖMBKE, J.; RIBEIRO, M.O.A.; NINA, N.C.S. Use and fate of pesticides in the Amazon state, Brazil: Risk to human health and the environment.v.9 (6). ESPR - Environmental Science and Pollution Research, 2002. pp. 423-428.

WHO - World Health Organization. Environmental Health Criteria 200 - Copper. Geneva, 1998.

WITTIG, R. General aspects of biomonitoring heavy metals by plants. In: Markert, B. (Ed.), Plants as Biomonitors. Indicators for Heavy Metals in the Terrestrial Environment, VCH, Weinheim, 1993. pp. 3-27.

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

YOUNES, M.; GALAL-GORCHEV, H. Pesticides in drinking water: A case study. Food and Chemical Toxicology 38(1), 2000. pp. S87-S90.

ZACHAMAN, J.E.; LINDEN, D.R.; CLAPP, C.E. Macroporous infiltration and redistribution as affected by earthworms, tillage and residue. v.51. Soil Science Society of America Journal, Madison, 1987. pp. 1580-1586.