

LETICIA SCOPEL CAMARGO CARNIEL

**AVALIAÇÃO DO RISCO ECOLÓGICO DE MANCOZEBE E
CLORPIRIFÓS PARA REPRESENTANTES DA MACRO E
MESOFAUNA DO SOLO E EFICIÊNCIA DE LEITOS
BIOLÓGICOS DE DESCARTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência do Solo.

Orientador: Dr. Osmar Klauberg Filho

LAGES, SC

2015

Carniel, Letícia Scopel Camargo

Avaliação do risco ecológico de Mancozebe e Clorpirifós para representantes da macro e mesofauna do solo e eficiência de leitos biológicos de descarte. - Lages, 2015.

140 p. : il. ; 21 cm

Orientador: Osmar Klauberg Filho

Inclui bibliografia.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveteinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Lages, 2015.

1. Agrotóxicos. 2. Ecotoxicologia. 3. Biobeds. I. Carniel, Letícia Scopel Camargo. II. Filho, Osmar Klauberg. III. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo. IV. Título

Ficha catalográfica elaborada pela aluna.

LETÍCIA SCOPEL CAMARGO CARNIEL

**AVALIAÇÃO DO RISCO ECOLÓGICO DE MANCOZEBE E
CLORPIRIFÓS PARA REPRESENTANTES DA MACRO E
MESOFAUNA DO SOLO E EFICIÊNCIA DE LEITOS
BIOLÓGICOS DE DESCARTE.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência do Solo.

Banca Examinadora

Orientador/Presidente:

Dr. Osmar Klauberg Filho
(UDESC – Lages-SC)

Membro externo:

Dr^a. Julia Carina Niemeyer
(UFSC – Curitibanos-SC)

Membro externo:

Dr. Luciano Gebler
(EMBRAPA – Vacaria-RS)

Membro interno:

Dr. Marcelo Moreira
(UDESC – Lages-SC)

Lages, SC, 15/08/2015

À todos que lutam pelo
desenvolvimento sustentável da
agricultura brasileira,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para a elaboração deste trabalho.

A todos os autores que anteriormente discutiram e abordaram questões importantes sobre o risco dos agrotóxicos, e me fundamentaram na escrita desta dissertação.

Aquele que me deu a oportunidade de desenvolvê-la, Prof. Osmar, e por todas as horas de discussões saudáveis que tivemos até a finalização do projeto e apresentação dos resultados;

A toda minha família, que tive muita paciência e compreensão pela minha ausência, e especialmente ao meu marido, Tiago, não apenas pelo apoio para realização dos ensaios, mas também pela parceria em auxiliar em tudo que fosse possível – Esse trabalho não existiria sem seu apoio, dedicação e muita paciência;

Ao Dr. Luís Iuñes, por todo aporte técnico e científico durante todo o tempo do experimento, pelas horas ensinando estatística, pela paciência e compreensão, por todo conhecimento repassado e também pela sua grande amizade;

Ao Douglas Alexandre, muito mais que um bolsista voluntário dedicado e responsável, mas um grande amigo e parceiro que esteve presente em mais de 90% dos ensaios – também auxiliando na resolução de mais de 90% dos problemas;

A Prof^a Dra. Julia Niemeyer, que foi essencial na elaboração do projeto, na interpretação dos dados, nas correções e revisões, além de uma amiga sem igual;

Ao Dr. Luciano Gebler e a todos os colegas da Embrapa Uva e Vinho Vacaria, especialmente a Valéria, Maurício e Vanderlei, por apoio em todas as etapas do experimento;

A doutoranda Julia Segat, por todas as conversas francas, dicas e ensinamentos passados ao longo do último ano,

pela sua amizade, além da sua disposição a sempre ouvir e incentivar;

A todos os amigos do laboratório de Ecologia do Solo que contribuíram para que todas as horas trabalhadas fossem muito mais prazerosas: Priscila, Júlia Machado, Gilvani, Rafaela, Geovana, Josieli, Márcio, Amanda, Janaína.

A UDESC, especialmente ao CAV e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pela formação científica e oportunidade de realizar o curso de Pós-Graduação. Aos professores do Departamento de Solos pelos ensinamentos nas disciplinas cursadas e a CAPES pela bolsa de Mestrado.

“(...) Com o correr do tempo - do tempo não em anos, e sim em milênios - a vida ajustou-se, e um equilíbrio foi conseguido. Porquanto o tempo é ingrediente essencial; mas, no mundo moderno, não há tempo. A rapidez da mudança e a velocidade com que novas situações se criam acompanham o ritmo impetuoso e insensato do Homem, ao invés de acompanhar o passo deliberado da Natureza.”

Rachel Carson, Primavera Silenciosa,
1962.

RESUMO

O cultivo de maçã tem grande representatividade na economia da região Sul do Brasil e uma série de agrotóxicos é utilizada, destacando-se o fungicida Mancozebe e o inseticida Clorpirifós. Apesar de essas substâncias serem desenvolvidas para atuar em um conjunto de organismos alvo, são potencialmente danosas para todos os organismos vivos expostos aos produtos. Dependendo de sua persistência e toxicidade, os agrotóxicos podem interferir em processos básicos do solo, tais como a respiração e a atividade da fauna edáfica que reflete diretamente na ciclagem de nutrientes, decomposição da matéria orgânica e melhoria de atributos químicos e físicos, representando estes compostos um risco para o solo. O manuseio e limpeza de maquinário com resíduos o produto também são potencialmente perigosas ao ambiente, podendo causar contaminações pontuais. Em alguns países para a completa degradação deste resíduo, são utilizados leitos biológicos de descarte (*Biobeds*). A ecotoxicologia é uma ferramenta que pode ser utilizada para mensurar o risco dos agrotóxicos e seus resíduos a receptores ambientais. O objetivo desta dissertação foi avaliar a toxicidade causada pelos ingredientes ativos Mancozebe e Clorpirifós em dois solos representativos para a cultura da maçã no Sul do Brasil – Latossolo e Nitossolo, e do efluente do tanque pulverizador com resíduos destes produtos, a fim de estabelecer dosagens de risco a três organismos representantes da fauna edáfica – *Folsomia candida* (Colembolla), *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae) e *Eisenia andrei* (Lumbricidae), e analisar *Biobeds* quanto a sua toxicidade aos organismos após sua contaminação, quando comparado aos solos analisados, observando a possibilidade de uso dos *Biobeds* para descarte de efluentes de agrotóxicos e como contenção em caso de derrame acidental. Foram realizados ensaios laboratoriais utilizando

protocolos ISO para ensaios letais (14 dias) e subletais (28 dias para colêmbolos e enquitreídeos e 56 dias para minhocas) de ecotoxicidade com os organismos indicados em câmara a 20°C e fotoperíodo com 8/16 horas de luz/escuro. O Clorpirifós mostrou-se mais tóxico que o Mancozebe, principalmente aos colêmbolos, que são afetados em ensaios letais e subletais por doses $< 1 \text{ mg kg}^{-1}$. As minhocas, únicos organismos utilizados na legislação brasileira para credenciamento de agrotóxicos no mercado mostraram-se menos sensíveis que os colêmbolos e enquitreídeos aos dois produtos testados para ensaios letais (CL_{50}), e subletais de reprodução (CE_{50}), que apresentaram doses de risco distintas, e o Latossolo apresentando maior toxicidade quando contaminado pelos agrotóxicos testados. Os *Biobeds* reduziram a toxicidade dos agrotóxicos ao longo do tempo para os organismos edáficos, o que não foi observado no Latossolo, mostrando que mesmo um resíduo muito diluído, como o da lavagem do equipamento de aplicação, pode oferecer risco a fauna do solo ao longo do tempo. Na simulação de derrame acidental, os *Biobeds* foram eficientes em eliminar a toxicidade para minhocas e enquitreídeos, mas não para os colêmbolos, sendo necessários ensaios a longo prazo para determinar a possibilidade de redução da toxicidade do Clorpirifós aos organismos nesta situação. Devido ao grande número de ingredientes ativos utilizados na agricultura atualmente, são necessários estudos mais profundos do impacto destes agentes químicos à fauna edáfica, e também das alternativas de descarte dos resíduos oriundos dessa atividade.

Palavras-chave: agrotóxicos, ecotoxicologia, *Biobeds*.

ABSTRACT

Apple crops have huge importance to South Brazil economic, which concentrate more than 95% production in country. There are use of many pesticides in apples, with emphasis to fungicide Mancozeb and insecticide Chlorpyrifos. Although these substances have been developed to acting in a specific group of organisms, they are potentially dangerous to all alive organisms direct or indirectly exposed. Depending on persistence and toxicity, pesticides could interfering in soil basics process, how respiration and fauna soils activity, that directly influence nutrients cycling, organic matter decomposition and improvement physical chemical characteristics, being this products a risk to soil. Not application only, but handle and cleaning of machines with residues are dangerous to environmental too, and could induce punctual contamination. In some countries, to complete degradation of this waste, there is a *bed* for biological degradation, called *Biobeds*. Ecotoxicology is a tool that could be used to measure pesticide risks and from their wastes to environmental receptor – since microorganisms until superiors vertebrates, having international protocols to application of assays. The aim of this study, was investigate toxicity caused by Mancozeb and Chlorpyrifos in two different Oxisols, representatives to apple crops, and effluent of pulverizer tank with wastes, to establish risks doses to three organisms from soil - *Folsomia candida* (Colembolla), *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae) e *Eisenia andrei* (Lumbricidae), using ISO protocols, and analyses *Biobeds* about its toxicity to organisms after contamination, comparing to natural soils, observing use possibility in handle of pesticides with spill simulation. Chlorpyrifos show higher toxic than Mancozeb, especially to Collembola ($LC < 1 \text{ mg kg}^{-1}$). Earthworm, organism used in Brazil's law to approve pesticides was less sensible than other

for both products. Lethal and reproduction assays showed different risk doses in soils. *Biobeds* reduced waste pesticide risks during time and this not happen in one natural soil, that indicate dissolving products its not enough to reduce or eliminate the risks for soil organisms. In spill simulation, *Biobeds* was efficient in eliminate toxicity to earthworms and enchytraeids, although, not to Collembola and long time assays are necessary to reduce Chlorpyrifos toxicity to this organism. Due to large number of active ingredients using in agriculture actually, deep impact pesticide studies in soil organisms are necessary and alternatives of this wastes discharge.

Keywords: pesticide, ecotoxicology, *Biobeds*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Representação esquemática da interação entre processos de retenção, transporte e transformação de um herbicida aplicado ao solo.....35
- Figura 2 - Sistemas de *Biobeds* em alguns países47
- Figura 3 - Número de colêmbolos (*Folsomia candida*) vivos após exposição ao Mancozebe em Latossolo Bruno Distrófico por 14 dias em diferentes doses.....79
- Figura 4 - Número de juvenis de colêmbolos após exposição ao Mancozebe em Latossolo Bruno Distrófico por 28 dias em diferentes doses.79
- Figura 5 - Número de juvenis de colêmbolos após exposição ao Mancozebe em Nitossolo Bruno por 28 dias em diferentes doses..80
- Figura 6 - Número de enquitreídeos vivos após exposição ao Mancozebe em Latossolo Bruno por 14 dias em diferentes doses..82

Figura 7 - Número de juvenis de enquitreídeos após exposição ao Mancozebe em Latossolo Bruno por 28 dias em diferentes doses.....82

Figura 8 - Número de enquitreídeos vivos após exposição ao Mancozebe em Nitossolo Bruno em diferentes doses.....83

Figura 9 - Número de juvenis de enquitreídeos após exposição ao Mancozebe em Nitossolo Bruno em diferentes doses.....83

Figura 10 - Número de juvenis de Minhocas após exposição ao Mancozebe em Latossolo Bruno por 56 dias em diferentes doses.....85

Figura 11 - Número de juvenis de Minhocas após exposição ao Mancozebe em Nitossolo Bruno por 56 dias em diferentes doses.....85

Figura 12 - Número de juvenis de colêmbolos após exposição ao Clorpirifós em Latossolo Bruno por 28 dias em diferentes doses.....88

Figura 13 - Número de juvenis de colêmbolos após exposição ao Clorpirifós em Nitossolo Bruno por 14 dias em diferentes doses.....89

Figura 14 - Número de enquitreídeos após exposição ao Clorpirifós em Latossolo Bruno por 14 dias em diferentes doses.....90

Figura 15 - Número de juvenis de enquitreídeos após exposição ao Clorpirifós em Latossolo Bruno por 28 dias em diferentes doses91

Figura 16 - Número de enquitreídeos após exposição ao Clorpirifós em Nitossolo Bruno por 14 dias em diferentes doses91

Figura 17 - Número de juvenis de enquitreídeos após exposição ao Clorpirifós em Latossolo Bruno por 28 dias em diferentes doses92

Figura 18 - Número de juvenis de enquitreídeos após exposição ao Clorpirifós em Latossolo Bruno por 28 dias em diferentes doses93

Figura 19 - Número de juvenis de Minhocas após exposição ao Clorpirifós em Latossolo Bruno por 56 dias em diferentes doses93

Figura 20 - Número de Minhocas após exposição ao Clorpirifós em Nitossolo Bruno em diferentes doses..... 94

Figura 21 - Número de juvenis de Minhocas após exposição ao Clorpirifós em Nitossolo Bruno por 56 dias em diferentes doses94

Figura 22 - *Biobeds* pilotos no Brasil 115

Figura 23 - Resultado do ensaio de reprodução com Minhocas (*Eisenia andrei*) quando expostas ao Biomix com adição continuada de Clorpirifós e Mancozebe ao longo da safra de maçã.....119

Figura 24 - Resultado do ensaio de reprodução com Colêmbolos (*Folsomia candida*) quando expostos ao Biomix com adição continuada de Clorpirifós e Mancozebe ao longo da safra de maçã 120

Figura 25 - Resultado do ensaio de reprodução com Enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*) quando expostos ao Biomix com adição continuada de Clorpirifós e Mancozebe ao longo da safra de maçã 121

Figura 26 - Resultado do ensaio de reprodução com Colêmbolos (*Folsomia candida*) quando expostos ao Nitossolo com adição continuada de Clorpirifós e Mancozebe ao longo da safra de maçã 123

Figura 27 - Resultado do ensaio de reprodução com Enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*) quando expostos ao Nitossolo com adição continuada de Clorpirifós e Mancozebe ao longo da safra de maçã.....124

Figura 28 - Resultado do ensaio de reprodução com Minhocas (*Eisenia andrei*) quando expostas ao Latossolo com adição continuada de Clorpirifós e Mancozebe ao longo da safra de maçã.....125

Figura 29 - Resultado do ensaio de reprodução com Colêmbolos (*Folsomia candida*) quando expostos ao Latossolo com adição continuada de Clorpirifós e Mancozebe ao longo da safra de maçã125

Figura 30 - Resultado do ensaio de reprodução com Enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*) quando expostos ao Latossolo com adição continuada de Clorpirifós e Mancozebe ao longo da safra de maçã.....126

Figura 31 - Resultado do ensaio de reprodução com Enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*) quando expostos ao Latossolo com adição continuada de Clorpirifós e Mancozebe ao longo da safra de maçã.....127

Figura 32 - Reprodução de Minhocas ao longo do tempo em Biomix contaminado e controle, após adição de 500mL do produto formulado Lorsban. 128

Figura 33 - Letalidade de Minhocas ao longo do tempo em Biomix contaminado e controle, após adição de 500mL do produto formulado Lorsban129

Figura 34 - Reprodução de Colêmbolos ao longo do tempo em Biomix contaminado e controle, após adição de 500mL do produto formulado Lorsban129

LISTA DE TABELAS

- Tabela 2 - Características químicas e físicas dos solos utilizados para os ensaios de ecotoxicidade.74
- Tabela 2 - Organismos, tipos de ensaio, protocolos e dosagens utilizados para ensaios em Latossolo e Nitossolo com Mancozebe.74
- Tabela 3 - Resultados compilados dos ensaios letais e subletais em Latossolo e Nitossolo com adição de diferentes doses de Mancozebe para três organismos da fauna edáfica.87
- Tabela 4 - Resultados compilados dos ensaios letais e subletais em Latossolo e Nitossolo com adição de diferentes doses de Clorpirifós para três organismos da fauna edáfica.96
- Tabela 5 - Data de aplicação dos agrotóxicos e concentração.....116

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1INTRODUÇÃO..... | 30 |
| 2REVISÃO DE LITERATURA | 33 |
| 2.1 Ecotoxicologia..... | 33 |
| 2.2 Uso de agrotóxicos no brasil e no mundo | 34 |
| 2.3 Produção de maçã no brasil..... | 39 |
| 2.4 Uso de mancozebe e clorpirifós | 40 |
| 2.5 O sistema <i>Biobed</i> | 45 |
| 3HIPÓTESES..... | 64 |
| 4OBJETIVO GERAL..... | 65 |
| 5OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 66 |
| 6 CAPÍTULO I..... | 67 |
| 6.1 INTRODUÇÃO..... | 67 |
| 6.2 MATERIAL E MÉTODOS | 71 |
| 6.2.1 Solos..... | 71 |
| 6.2.2 Agrotóxicos | 72 |
| 6.2.3 Organismos teste e condições dos ensaios | 75 |
| 6.2.3.1 Colêmbolos (<i>Folsomia candida</i>) | 75 |
| 6.2.3.2 Enquiteídeos (<i>Enchytraeus crypticus</i>) | 76 |
| 6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 78 |

| | |
|--|-----|
| 6.3.1 Mancozebe | 78 |
| 6.3.2 Clorpirifós | 87 |
| 6.4 CONCLUSÃO..... | 97 |
| REFERÊNCIAS | 99 |
| 7 CAPÍTULO II | 111 |
| 7.1 INTRODUÇÃO..... | 111 |
| 7.2 MATERIAL E MÉTODOS | 114 |
| 7.2.1 Desenho experimental..... | 114 |
| 7.2.2 Solos naturais..... | 115 |
| 7.2.3 Contaminação | 116 |
| 7.2.4 Organismos e condições dos ensaios | 117 |
| 7.2.5 Análise dos dados | 118 |
| 7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 118 |
| 7.3.1 <i>Biobeds</i> x Solos naturais | 118 |
| 7.3.1.1 Validação dos ensaios | 118 |
| 7.3.1.2 Biomix..... | 119 |
| 7.3.1.3 Nitossolo..... | 122 |
| 7.3.1.4 Latossolo | 124 |
| 7.3.2 <i>Biobeds</i> contaminação única | 127 |
| 7.4 CONCLUSÃO..... | 130 |
| REFERÊNCIAS | 132 |
| 8.0 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 140 |

INTRODUÇÃO

Na região Sul do Brasil existem diversos tipos de cultivo, como soja, milho, trigo e aveia, todos responsáveis por uma grande parte do total produzido e exportado no país (IBGE, 2015). Pelas temperaturas mais amenas, a região Sul destaca-se ainda pelo cultivo da maçã, que tem mais de 95% da produção concentrada nos Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina (BNDES, 2013) e que mesmo sendo uma atividade relativamente recente no Brasil, nos últimos dez anos apresentou um crescimento na produção e aumento da área plantada, resultando no aumento do uso de agrotóxicos e outros insumos agrícolas.

Na cultura da maçã é utilizada uma série de agrotóxicos como fungicidas, inseticidas e acaricidas, feromônios, herbicidas e ainda agrotóxicos de pós-colheita. Dentre estes grupos, destacam-se como dois dos mais utilizados o fungicida Mancozebe e o inseticida Clorpirifós. O princípio ativo Mancozebe, incluso em 34 diferentes formulações comerciais, é aplicado para combate de fungos e ácaros durante toda a safra de maçã. O inseticida Clorpirifós, incluso em 18 produtos comerciais, é utilizado em dosagens que podem variar de 100 a 150 ml ha⁻¹, sendo aplicado principalmente para o combate da lagarta-enroladeira (*Bonagota salubricola*) (MAPA, 2013).

Não se pode negar que os aumentos na produtividade agrícola estão relacionados, entre outras coisas, ao uso de agrotóxicos (PERES et al., 2005). Todavia, apesar dessas substâncias terem sido desenvolvidas para atuar em um conjunto de organismos alvo, são potencialmente danosas para todos os que estão expostos aos produtos. Dependendo de sua persistência e toxicidade, os agrotóxicos podem interferir em processos básicos do ecossistema, tais como a respiração do solo e a atividade da fauna edáfica, que reflete diretamente na ciclagem de nutrientes, decomposição da matéria orgânica e melhoria de atributos químicos e físicos (BARETTA et al.,

2003; IBAMA, 2010), representando estes compostos um risco para o solo.

No Brasil, os agrotóxicos são aprovados via Ministério da Saúde (ANVISA), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Ministério do Meio Ambiente (IBAMA), este último precisa mensurar o risco dos agrotóxicos ao ambiente. No que tange o solo, existem testes para verificar o risco dos produtos somente para microrganismos, e quanto à fauna, de letalidade de minhocas (IBAMA, 1996). Isso é pouco representativo, se levarmos em consideração que desde 2002 o comitê Europeu realiza ensaios ecotoxicológicos subletais de reprodução não somente com minhocas, mas também com colêmbolos ou ácaros, por exemplo (EFSA, 2002), devido a diferença de sensibilidade entre os organismos e também à grande diversidade funcional do solo, que não pode ser ignorada, justamente por prestar uma série de serviços essenciais para a produtividade agrícola.

Os processos de perda, envolvendo a lixiviação, o escoamento superficial, a volatilização, entre outros, podem difundir esses compostos no ambiente, tanto na água quanto no solo, que tem recebido não somente a deposição de agrotóxicos para controle de ervas daninha (herbicidas), mas também resíduos da pulverização agrícola de todos os químicos, e até mesmo os oriundos da lavagem do maquinário, muitas vezes não mensurado como tóxico e/ou perigoso.

O tanque pulverizador contém, embora já parcialmente diluídos, os mesmos produtos químicos das embalagens, que recebem atenção na legislação. Embora alguns estudos apontem para a contaminação pelo efluente da lavagem dos equipamentos agrícolas, mostrando que este pode vir a ser tão ou mais danoso que a contaminação difusa da área pela aplicação do agrotóxico, há carência de informações acerca dos efeitos do descarte final do efluente do tanque pulverizador no solo. Os processos de perda e de deposição residual dos agrotóxicos podem acabar afetando os organismos do solo e

seus processos. Inúmeros problemas foram relatados na literatura, por exemplo, com hidrocarbonetos clorados, como o DDT, que embora aplicado para acabar com espécies ‘pragas’, eliminou definitivamente populações inteiras de aves predadoras (ODUM & BARRETT, 2011). Desta forma, é necessário averiguar as doses seguras dos agrotóxicos para a fauna não alvo, especialmente, a edáfica, já que o solo é um dos grandes receptores dos agrotóxicos.

A legislação brasileira não aponta os meios para descarte de efluentes com resíduos de agrotóxicos, provenientes da limpeza de equipamentos de aplicação agrícola. Em alguns países, entretanto, para a completa degradação deste resíduo, são utilizados leitos biológicos de descarte (*Biobeds*). O sistema consiste numa matriz biológica que retém os pesticidas na matéria orgânica ou partículas do solo, até que sejam completamente degradados naturalmente (SPLIID et al., 2006; VISCHETTI et al., 2008; KARANASIOS et al., 2013) No Brasil, ainda não existem estudos que indiquem a eficiência deste sistema. Os primeiros estudos neste sentido estão sendo realizado na Embrapa Uva e Vinho, Vacaria, RS, e constituem parte desta dissertação.

As avaliações de ecotoxicidade constituem ferramenta indispensável na estimativa do perigo potencial de substâncias como os agrotóxicos, sendo parte fundamental da análise de risco ambiental. Tal abordagem é utilizada em diversos países para a utilização e também descarte de uma variedade de substâncias. A ecotoxicologia terrestre, por sua vez, faz uso de organismos do solo como receptores e indicadores de risco. Além das plantas e de toda a microbiota, esta área da ecotoxicologia abrange a fauna edáfica, que tem como representantes diversos organismos, sendo os mais utilizados para ensaios os colêmbolos, os enquitreídeos, as minhocas e os ácaros.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 ECOTOXICOLOGIA

Oriunda da toxicologia, a ecotoxicologia é uma ciência relativamente nova, definida por René Truhaut em 1969 como "o ramo da toxicologia preocupada com o estudo de efeitos tóxicos causados por poluentes naturais ou sintéticos para os componentes dos ecossistemas, animal (incluindo humanos), vegetal e microbiano, em um contexto integral" (BARD, 2008; TARAZONA & RAMOS-PERALONSO, 2014). Seu marco inicial foi a publicação do livro "Primavera Silenciosa" por Rachel Carson em 1962, onde a autora descreveu principalmente os problemas ambientais decorrentes do uso indiscriminado do organoclorado DDT, levando a sua proibição nos EUA.

Sendo definida atualmente como a avaliação da toxicidade de substâncias para ecossistemas (SISINNO & OLIVEIRA-FILHO, 2013), a ecotoxicologia é utilizada na observação do risco ambiental oferecido por diferentes agentes, como os metais pesados (NURSITA et al., 2005; RATHNAYAKE et al., 2012; AMUNO, 2013; D'EMILIO et al., 2013), poluentes orgânicos como óleo (SCHAEFER et al, 2005; WANG et al, 2010), fármacos (SCHMIDT & REDSHAW, 2015), poluentes domésticos, como o lodo (CARBONELL et al, 2009; PEREZ & FONTANETTI, 2010; DOMENE et al, 2011;), agrotóxicos (GARCIA, 2004; FANG et al, 2009; FAWOLE et al, 2009; SILVA et al, 2010; SANTOS et al, 2012; WANG et al, 2012), entre outros. A vantagem é o conhecimento prévio da segurança daquilo que vai ser disposto no ambiente.

O primeiro ramo da ecotoxicologia a se desenvolver, ainda na década de 30, foi a aquática, que mensura efeitos de contaminantes ou poluentes em organismos aquáticos (ZAGATTO, 2006), sendo a terrestre mais recente. No solo, a

ecotoxicologia é também um método eficiente para estimar o perigo potencial de substâncias (TEREKHOVA, 2011), e seu impacto geralmente é mensurado através de *endpoints*, parâmetros que indicam os ensaios utilizados, como reprodução, através das concentrações de efeito, ou letalidade, através das concentrações letais, utilizando diversos organismos, dentre os quais estão os colêmbolos (AMORIM et al, 2012) , as minhocas (PELOSI et al, 2013), os enquitreídeos (CHELINHO et al., 2013a) além de ácaros (CHELINHO et al, 2013b) e plantas.

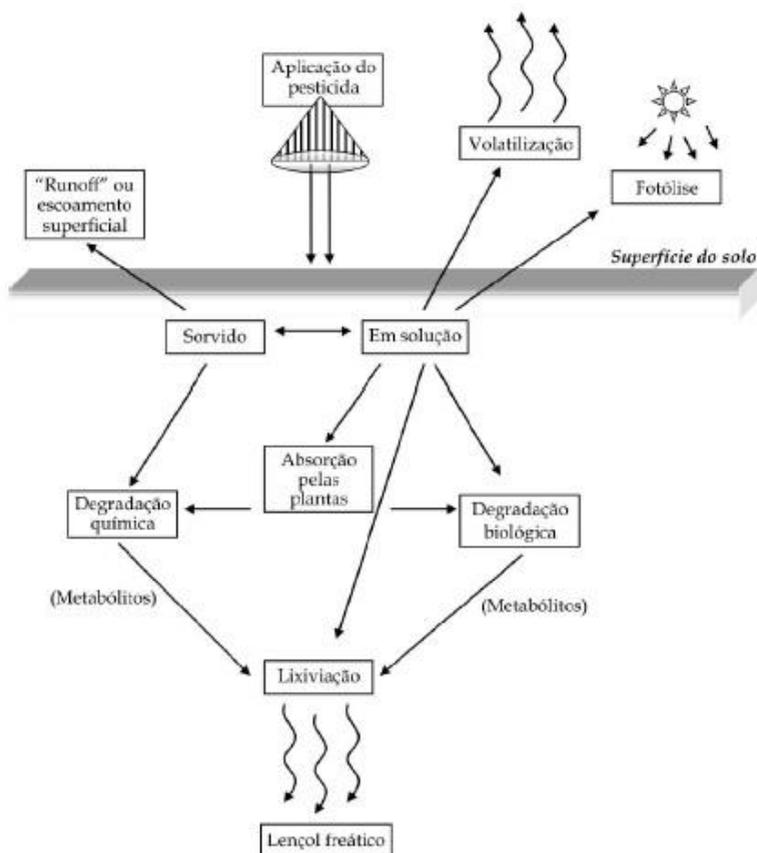
O conhecimento ecotoxicológico permite avaliar a extensão do risco ambiental, estipular metodologias de vigilância e rastreamento da presença de tóxicos no ambiente e ainda orientar na medidas de remediação (AZEVEDO & CHASIN, 2004), sendo por isso utilizado, por exemplo, no credenciamento e aprovação de agrotóxicos em vários lugares do mundo (EPA, 2015; EFSA, 2015).

1.2 USO DE AGROTÓXICOS NO BRASIL E NO MUNDO

Os agrotóxicos são definidos como os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas, e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (BRASIL, 1989).

Sendo aplicados no campo, os agrotóxicos acabam sendo difundidos ao ambiente, por processos de retenção (sorção), de transformação (degradação biológica e decomposição química), de transporte (deriva, volatilização, lixiviação e carreamento superficial), e por interações desses processos conforme exemplificado na Figura 1.

Figura 1 - Representação esquemática da interação entre processos de retenção, transporte e transformação de um herbicida aplicado ao solo.



Fonte: Oliveira Jr. & Regitano, 2009.

Sendo assim, existe uma perda associada à pulverização de agrotóxicos, que varia de acordo com o ingrediente ativo, condições climáticas e etc. Chaim et al. (2004), perceberam num estudo com calda de Rondonina B, que dependendo do equipamento utilizado na aplicação, mais de 1/3 do produto

aplicado, que deveria ficar retirado nas folhas, acabou indo para o solo.

Reinecke & Reinecke (2007) observaram num estudo sobre o impacto dos organofosforados em minhocas de áreas não pulverizadas, que por meio das perdas durante as aplicações e dispersão dos agrotóxicos, a contaminação se estende a muitos metros do local da aplicação.

Sabe-se então, que uma parte dos agrotóxicos acaba no solo (HUBER et al., 2000; REICHENBERGER et al., 2007). No Reino Unido, acredita-se que cerca de 40% dos resíduos de agrotóxicos detectados são oriundos das atividades de manuseio, enquanto que os outros 60% são provenientes do escoamento superficial e drenagem no solo (*Biobed.uk*, 2015). Assim como a perda, o tempo de vida dos agrotóxicos no solo após sua absorção pode variar de acordo com o grupo químico, condições climáticas, temperatura, microbiota e etc. (OLIVEIRA JR. & REGITANO, 2009).

Apesar da iminente possibilidade de tornar-se um contaminante perigoso, não se pode negar o crescimento, em termos de produtividade, proporcionado pelo uso de agrotóxicos no campo (PERES et al, 2005). Essas substâncias são desenvolvidas para atuar em um conjunto de organismos alvo, entretanto, são potencialmente danosas para todos os organismos vivos expostos direta ou indiretamente aos produtos. Dependendo de sua persistência e toxicidade, os agrotóxicos podem interferir em processos básicos do ecossistema, tais como a respiração do solo e a atividade da fauna edáfica que reflete diretamente na ciclagem de nutrientes, decomposição da matéria orgânica e melhoria de atributos químicos e físicos (BARETTA et al., 2003; IBAMA, 2010), representando estes compostos um risco para o solo.

Há diversos estudos apontando problemas pelo uso inadequado de agrotóxicos como em Long Island, Nova Iorque, onde o DDT foi pulverizado durante anos sob um pântano para controlar os mosquitos. As doses utilizadas não eram letais aos

peixes e outros seres silvestres, mas ao invés de ser levado para o mar, o produto foi absorvido pelos detritos e pequenos peixes, sendo cada vez mais concentrado nos predadores de topo, como as aves piscívoras. A magnificação deste composto ocorre porque ele é absorvido por lipídeos. O DDT eliminou populações inteiras de aves predadoras e comedores de detritos e foi banido nos EUA em 1972 e atualmente não é mais comercializado em praticamente todo o mundo (ODUM & BARRETT, 2011).

Em longo prazo, a dependência exclusiva dos agrotóxicos falhou em obter o controle das pragas. Com a ressurgência e resistência de pragas antigas e o surgimento de novas pragas devido ao uso inadequado destes produtos químicos, o homem parece estar sempre um passo atrás, criando não somente novos produtos, mas auxiliando na transformação daquilo que era estável em inseguro às plantações. A resiliência e a adaptabilidade da natureza são as causas básicas do insucesso de muitos agrotóxicos (TOWNSEND et al., 2010; ODUM & BARRETT, 2011).

No Brasil, o uso dessas substâncias é fiscalizado, e seu registro e comercialização só são possíveis após análise do Ministério da Agricultura, da Saúde e do Meio Ambiente. A legislação dos agrotóxicos no Brasil é um assunto recente em comparação ao cenário mundial, sendo o referencial legal mais importante a Lei nº 7802/89 (BRASIL, 1989), que rege o processo de registro de um produto agrotóxico, regulamentada pelo Decreto nº 4074/02 (BRASIL, 2002). Apesar de ser assunto relativamente novo no país, podemos considerar a legislação atrasada se considerarmos o avanço técnico e científico das últimas décadas. Alguns decretos e resoluções foram elaborados nos últimos anos, mas o Brasil permanece atrasado se compararmos a Legislação Europeia ou Norte Americana, onde diversos produtos ainda utilizados no Brasil já foram vetados.

De acordo com a Lei 7.802/89, artigo 3º, parágrafo 6º é proibido o registro de agrotóxicos:

- a) Para os quais o Brasil não disponha de métodos para desativação de seus componentes, de modo a impedir que os seus resíduos remanescentes provoquem riscos ao meio ambiente e à saúde pública;
- b) para os quais não haja antídoto ou tratamento eficaz no Brasil;
- c) que revelem características teratogênicas, carcinogênicas ou mutagênicas, de acordo com os resultados atualizados de experiências da comunidade científica;
- d) que provoquem distúrbios hormonais, danos ao aparelho reprodutor, de acordo com procedimentos e experiências atualizadas na comunidade científica;
- e) que se revelem mais perigosos para o homem do que os ensaios de laboratório, com animais, tenham podido demonstrar, segundo critérios técnicos e científicos atualizados;
- f) cujas características causem danos ao meio ambiente.

Levando em conta os agrotóxicos ainda em uso no Brasil e no mundo, é sabido que esta lei abrange pouco além da saúde humana, e generaliza os danos ao meio ambiente, de forma que poderia restringir todos os agrotóxicos ou nenhum deles. Ainda, o caráter descrito pela letra 'e' subentende-se um processo de revalidação, o qual só ocorre por pressões sociais e/ou via Ministério Público, quando deveria partir do próprio órgão fiscalizador e regulador, como acontece para a União Europeia, Estados Unidos, e outros países.

Atualmente, no que tange os cuidados ambientais, o Ibama solicita alguns ensaios para averiguar a toxicidade em organismos não alvo do produto, como as abelhas, ratos, coelhos, algas, microcrustáceos, entre outros. Para organismos do solo, o Ibama solicita ao requerente que seja feito um ensaio de letalidade com minhocas.

As agências Norte Americana e Europeia, bem como de outros países, já solicitam ao requerente que busca o registro de um novo produto, que sejam realizados ensaios com outros organismos terrestres, como ácaros, colêmbolos e enquitreídeos (EPA, 2015; EFSA, 2015). Trabalhos de pesquisa já apresentam as diferenças de sensibilidade entre organismos do solo, comprovando que não há como considerar as minhocas como único indicador de toxicidade (LEITÃO et. al, 2014; DAAM et. al, 2011), assim como essa diferença de sensibilidade já é considerada para organismos aquáticos (SPADOTTO et. al, 2004).

Quanto maior o conhecimento acerca dos produtos utilizados e seu risco aos organismos de diversos compartimentos, não apenas para vertebrados superiores, poderemos continuar garantindo a proteção da biodiversidade e dos serviços ecológicos disponibilizados.

1.3 PRODUÇÃO DE MAÇÃ NO BRASIL

O cultivo da macieira é uma atividade relativamente recente no Brasil (EMBRAPA, 2013), sendo consolidada sua produção no país na década de 90 (PEREIRA et al., 2006), e nos últimos dez anos, teve um crescimento na área colhida, na produção, na quantidade exportada e também no valor exportado (Fachinello et al., 2011). O aumento da produtividade dos pomares de maçã é o principal responsável pelo incremento da produção desde 2001. Enquanto a área plantada aumentou 29%, a produtividade cresceu 50% (MAPA, 2013). A produção de maçã e de seus derivados no país envolve aproximadamente 39.000 hectares, sendo responsável no ano de 2009 por um valor bruto da produção de 943 milhões de reais (IBGE, 2011).

No Brasil, mais de 95% da produção de maçã está concentrada nos Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina (BNDES, 2013). Das 1.279 toneladas de maçã

produzidas no país em 2010, 1.217 foram produzidas entres os dois Estados (IBGE, 2013).

Os polos produtores de maçã são Fraiburgo e municípios próximos (Monte Carlo, Lebon Régis, Tangará, Água Doce e Santa Cecília), a mesorregião serrana, em São Joaquim e cidades do entorno (Bom Jardim da Serra, Urubici, Urupema, Bom Retiro e Lages); enquanto que no Rio Grande do Sul, a produção de maçã se concentra na mesorregião nordeste, sobretudo em Vacaria e Caxias do Sul (BNDES, 2013).

O cultivo de maçãs no país é expressivo, apesar de relativamente recente, representando um setor em crescimento e de grande importância, sobretudo no Sul do país (JARDIM & ANDRADE, 2009; MAPA, 2013).

São utilizados uma série de agrotóxicos nessa cultura, mesmo em sistemas monitorados, como a produção integrada de maçãs – PIM, que busca minimizar o uso e o risco destas substâncias. Destes, é possível destacar o fungicida Mancozebe e o inseticida Clorpirifós como dois dos mais utilizados.

2.4 USO DE MANCOZEBE E CLORPIRIFÓS

No Brasil, o uso dos ingredientes ativos Mancozebe, e Clorpirifós é autorizado pelos Ministérios da Saúde, do Meio Ambiente e da Agricultura, sendo utilizados em 34 e 18 formulações, respectivamente (MAPA, 2013a).

O Mancozebe é um fungicida do grupo dos ditiocarbamatos, empregado nas culturas de abacate, abóbora, alho, amendoim, arroz, banana, batata, berinjela, beterraba, brócolis, café, cebola, cenoura, cevada, citros, couve, couve-flor, cravo, crisântemo, dália, ervilha, feijão, feijão-vagem, figo, fumo, gladiolo, hortênsia, maçã, mamão, manga, melancia, melão, orquídeas, pepino, pêra, pêssego, pimentão, repolho, rosa, seringueira, tomate, trigo, uva e vagem, por aplicação foliar (MAPA, 2013). Comercializado em quase todo

o Brasil, devido a abrangência de culturas que o utilizam, o Mancozebe foi o 5º ingrediente ativo mais vendido no Brasil no ano de 2009 (IBAMA, 2010).

Derivados do ácido carbâmico, inexistente livremente na natureza, o grupo dos ditiocarbamatos foi sintetizado pela primeira vez em 1920, tendo uso como acelerador do enxofre na vulcanização da borracha. Em 1934, no Reino Unido, verificou-se que derivados desse ácido tem efeito fungicida próprio. Podem ser classificados em cinco grupos, sendo o mancozebe parte dos etilenobisditiocarbamatos metálicos.

Os fungicidas ditiocarbamatos, de um modo geral, são compostos que interferem na produção de energia, podendo ser considerados inibidores específicos, caso do thiram, ou não específicos de ação múltipla, como o mancozebe (AZEVEDO, 2003). Os etilenobisditiocarbamatos reagem com enzimas sulfidrílicas e outros compostos sulfidrílicos (-SH) envolvidos na respiração. Estando estes radicais presentes em muitas estruturas dos fungos, estes fungicidas podem inibir um grande número de enzimas e, portanto, interferir em muitos processos metabólicos além dos específicos (RODRIGUES, 2006).

Estudos mostram que o Mancozebe afeta de forma direta a germinação de esporos de *P. viticola* (WONG e WILCOX, 2001). O mecanismo de ação conhecido como multissítio, inibitório de vários processos metabólicos, faz com que seja difícil que as pragas combatidas adquiriram resistência (DOW AGRO, 2015), mas essa característica torna difícil conhecer os efeitos específicos a outros organismos. Pode agir contra diversos grupos como ascomicetos, oomicetos, basidiomicetos e fungos imperfeitos.

Petz & Foissner (1989) investigaram os efeitos do Mancozebe para diferentes tipos de protozoários, observando que não houve efeitos letais para as populações nos primeiros dias de contato, porém, após 90 dias, a população de ciliados foi reduzida. Ainda sobre microrganismos, Fawole et al. (2009) avaliaram populações microbianas e a atividade enzimática

quando expostas ao mancozebe. As populações de actinomicetos, bactérias e fungos foram significativamente reduzidas pela aplicação do fungicida, e a atividade das enzimas celulase e pectinase também sofreram redução nas doses testadas, voltando a atividade normal 90 dias depois da aplicação, sendo observado um reestabelecimento das populações microbianas do solo 21 dias após a aplicação.

Reinecke et al. (2002) fizeram ensaios de fuga com três diferentes espécies de minhocas utilizando esterco contaminado, e observaram que *E. fetida* teve preferência pelo controle em concentrações de ingrediente ativo muito menores que aquelas encontradas no campo, ao contrário do comprovado por García-Santos & Keller-Forrer (2011), que testando diferentes concentrações em teste de fuga com a mesma espécie de minhoca não observaram fuga mesmo na dose mais alta testada (1000 mg i.a. kg⁻¹). Ambos salientam a relevância de testes comportamentais, como o de fuga, e a variação das respostas com diferentes espécies e agrotóxicos. Silva et al. (2010), avaliaram os efeitos de agrotóxicos em forma de ingrediente ativo puro e formulado, à minhocas da espécie *Perionyx excavatus* quanto a sua sobrevivência, crescimento e reprodução em solo artificial OECD e observaram que os efeitos letais com produtos formulados para as minhocas (CL₅₀: 500 mg kg⁻¹) foram muito menores que os efeitos na reprodução (CE₅₀: 22 mg kg⁻¹), mostrando diferenças significativas entre estes ensaios e salientando a importância de testes com outros tipos de solos.

O Clorpirifós é um inseticida de aplicação foliar para as culturas de algodão, batata, café, cevada, citros, feijão, maçã, milho, pastagens, soja, sorgo, tomate e trigo. Pode ser utilizado na cultura da banana (saco para proteção do cacho), para aplicação no solo para as culturas de batata e milho e, ainda, para o controle de formigas na forma de isca granulada sem indicação de cultura (MAPA, 2013). É o segundo ingrediente

ativo mais presente entre as marcas comerciais de inseticidas (IBAMA, 2010).

O Clorpirifós pertence ao grupo dos organofosforados, agrotóxicos de amplo espectro que são utilizados na substituição dos organoclorados na agricultura por diversos motivos, como baixo custo, facilidade da síntese da molécula e também por serem muito menos persistentes no ambiente, porém apresentam alta toxicidade para humanos (SANTOS et al., 2007; ODUM & BARETT, 2011; RICKLEFS, 2013). Esse agrotóxico atua no sistema nervoso, inibindo a síntese da colinesterase (DOW AGRO, 2015). Os tipos de colinesterase diferem pelas preferências nos substratos: a acetilcolinesterase hidroliza acetilcolina mais rapidamente, enquanto a pseudocolinesterase hidroliza butirilcolina mais rapidamente.

Quando o neurotransmissor denominado acetilcolina é liberado, há um estímulo das células motoras, e há um desligamento rápido pela ação da acetilcolinesterase. O Clorpirifós inibe a ação desta enzima, que quebraria a acetilcolina em ácido acético e outros metabólitos inativos. A inibição da acetilcolinesterase gera um excesso de acetilcolina, provocando paralisia dos músculos necessários à respiração e parada dos batimentos cardíacos em mamíferos, por exemplo. (SAVOLAINEN, 2001; EFSA, 2005).

No solo, a meia-vida do Clorpirifós pode variar de 14 dias a mais de um ano, dependendo das condições climáticas, características do solo, etc. Um dos produtos da hidrólise do clorpirifós é o 3,5,6,-triclouro-2-piridíol (TCP), que é mais solúvel em água que a molécula original, podendo mais facilmente sofrer lixiviação e ainda, se no solo, pode prejudicar o processo de degradação pela alta atividade antimicrobiana, sendo persistente à degradação por microrganismos (ANWAR et al., 2009). Em geral, os organofosforados em condições mais específicas, podem oxidar a oxon, molécula mais tóxica e geralmente mais potente na inibição de acetilcolinesterase que

os compostos percussores (WU & LINDEN, 2003; KRALJ et al., 2007).

Pablo et al. (2008) avaliaram a toxicidade de clorpirifós a invertebrados comuns de água doce em mesocosmos observando uma alta toxicidade, principalmente nas espécies da ordem Cladocera (LC50: 0,07–0,10 mg uL⁻¹).

Fang et al. (2009) avaliaram o índice de diversidade da comunidade microbiana do solo depois do tratamento com Clorpirifós, indicando um efeito inibitório da atividade microbiana durante duas semanas depois da aplicação do inseticida, destacando a necessidade de estudos futuros sobre a resistência e resiliência de comunidades microbianas expostas a este produto.

Ma & Bodt (1993) verificaram a toxicidade do Clorpirifós 99% puro na letalidade e reprodução de seis diferentes espécies de minhocas, observando diferenças expressivas de sensibilidade para cada espécie testada, sendo as espécie do gênero *Eisenia* menos sensíveis que os gêneros *Aporrectodea* e *Lumbricus* ao produto. Mesmo dentro do mesmo gênero, houve diferenças expressivas entre as espécies (*Lumbricus terrestris* CL₅₀:458 e *Lumbricus rubellus* CL₅₀:129), sendo salientada a importância da escolha do organismos teste e também do substrato utilizado.

Piola et al. (2009) demonstraram que apenas ensaios de fuga não foram suficientes para mensurar os efeitos de Clorpirifós às minhocas da espécie *Eisenia andrei*, e que o ensaio cometa é um biomarcador sensível para os efeitos do ingrediente ativo. García-Santos & Keller-Forrer (2011), salientaram que pela inibição da acetilcolinesterase, o Clorpirifós pode interferir na capacidade das minhocas de escolher o substrato durante o teste de fuga dependendo da dose. O valor da concentração onde houve fuga de 50% da população (AC50) calculado foi 34,16 mg kg⁻¹.

Silva et al., (2009) avaliaram a toxicidade de clorpirifós à *Eisenia andrei* em solo artificial OECD em

diferentes temperaturas, bem como em solo natural, observando diferenças significativas para maiores ou menores temperaturas (20 e 26°C), o produto sendo tóxico em ambas situações (CE50 em solo natural: 1,79 a 20°C e a 26°C CE50: 5.87; CE50 em solo artificial: 7,49 a 20°C e a 26° CE50: 3.86), porém, seus efeitos em solos artificiais sendo mais drásticos em temperaturas maiores. Silva et al. (2009)b também testaram essas variáveis para a espécie *Perionix excavatus*, mostrando que esta espécie tem sensibilidade maior ao clorpirifós do que *Eisenia andrei* e *Eisenia fetida*, salientando que o uso de espécies tropicais deve ser incentivado na análise do risco de agrotóxicos.

Apesar deste e de outros agrotóxicos passarem por uma série de ensaios com a finalidade de habilitá-los para a comercialização com o mínimo de risco, tanto para a saúde da população como para o ambiente, a legislação brasileira é clara quanto à disposição das embalagens vazias, mas as leis de resíduos de agrotóxico sem adição de outros produtos químicos determina que a bula de fabricação deve ser seguida no que tange a destinação adequada (BRASIL, 1989; BRASIL 2002). Logo, o resíduo do tanque pulverizador não possui uma legislação específica, mesmo contendo, embora parcialmente diluídos, os mesmos produtos das embalagens.

2.5 O SISTEMA *BIOBED*

Em muitos países, com objetivo de prevenção e de mitigação, foi planejado e executado um conjunto de processos denominados Boas Práticas Ambientais ou Agrícolas, baseados em atenuação natural ou biorremediação (DIEZ, 2010, GREGOIRE et. al, 2009; MONACI, et. al, 2009). Esta se mostrou uma técnica alternativa, ambiental e economicamente viável, reduzindo custos e diminuindo ou eliminando a utilização de processos industriais para resolução destes

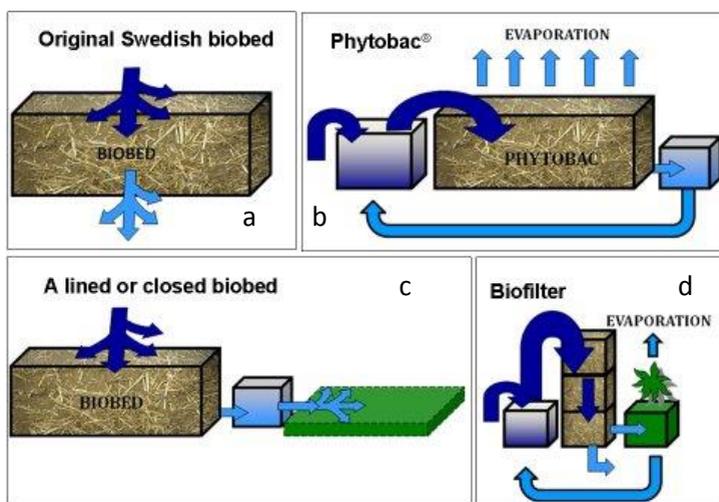
problemas (FOGG et. al, 2003; COPPOLA et. al, 2011; SPLIID et. al, 2006).

Dentre as práticas propostas está a disposição em leitos biológicos denominados *Biobeds*, onde os resíduos de agrotóxicos são descartados após seu manuseio, ou ainda, aqueles oriundos da lavagem de máquinas. Ele foi planejado originalmente como um fosso no solo, impermeabilizado ou não, preenchido com uma mistura de palha, turfa e solo agrícola na proporção de 2:1:1, sobre a qual é plantada uma cobertura vegetal.

O resíduo é depositado pela lavagem dos equipamentos sobre rampas construídas sobre o fosso, ou então derivados de um local com piso impermeável feito de concreto, onde são executadas as atividades com o agrotóxico e o manejo do pulverizador (FOGG et. al, 2003; FAIT, 2007; CASTILLO et. al, 2008; ROFFIGNAC et al, 2008).

Com o passar dos anos, a difusão desta eficiente forma de degradação de resíduos de agrotóxicos (SPLIID et. al, 2006; VISCHETTI et al, 2008; KARANASIOS et. al, 2013) foi sendo aprimorada para diferentes sistemas, sendo que algumas variações têm sido aplicadas, como o Phytobac na França e alguns outros países, biofilter na Bélgica, biomassbed na Itália, etc. O conceito desses sistemas é bastante similar, pois todos consistem numa matriz biológica que retém os pesticidas na matéria orgânica ou partículas do solo, conforme a Figura 2.

Figura 2 - Sistemas de *Biobeds* em alguns países: (a) o *Biobed* original Sueco, onde o resíduo é colocado para degradação e sofre lixiviação gradual; (b) *Phytobac*, que inclui um sistema de mais de um ciclo acrescido no mesmo *Biomix*, que sofre evaporação; (c) sistema de *Biobed* fechado, onde o resíduo é adicionado e a seguir transferido para área com cobertura vegetal; (d) sistema com biofiltros.



Tineke De Wilde 2011.02.25

Fonte: <http://www.Biobeds.org/what>, 2014

Os *Biobeds* são aperfeiçoados conforme variações climáticas e de temperatura, possuindo sistemas de drenagem aberta, implantados onde o regime de chuvas não é alto e a degradação do agrotóxico ocorre de forma mais rápida. Os sistemas de drenagem fechada, onde o resíduo permanece mais tempo sendo degradado, normalmente é adotado devido a uma probabilidade mais alta do resíduo sofrer lixiviação antes de ser decomposto (TORSTENSSON, 2000; FOGG et al, 2003;

VISCHETTI et al, 2008; SPLIID et al, 2006; FAIT, 2007; CASTILLO et al, 2008; ROFFIGNAC et al, 2008; WENNEKER et al, 2008; DIEZ, 2010; KARANASIOS et al, 2010; SNIEGOWSKI et al, 2011).

Dessa forma, pode-se perceber a necessidade de maiores estudos no Brasil para o descarte de efluentes, visto que em muitos países já é comprovado o alto risco ambiental que envolve esta atividade. Torna-se necessário conhecer e aperfeiçoar o sistema de *Biobeds* para a realidade brasileira, não sendo possível uma simples importação desta técnica, devido às variações climáticas e os tipos de solos brasileiros.

REFERÊNCIAS

AMORIM, M.J.B.; PEREIRA, C.; MENEZES-OLIVEIRA, V.B.; CAMPOS B.; SOARES A.M.V.M.; LOUREIRO, S. **Assessing single and joint effects of chemicals on the survival and reproduction of *Folsomia candida* (Collembola) in soil.** Environmental pollution, 160:145-52, 2012.

AMUNO, S. A. **Potential Ecological Risk of Heavy Metal Distribution in Cemetery Soils.** Water Air Soil Pollut, 224:1435, 2013.

ANWAR, S.; LIAQUAT, F.; KHAN, Q.M.; KHALID, Z.M.; IQBAL, S. **Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1.** Journal of Hazardous Materials, 168:400–405, 2009.

AZEVEDO, F.A. de. & CHASIN A.A.M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia.** São Carlos, São Paulo: RiMa, 2003. 322 p.

AZEVEDO, L.A.S. **Fungicidas protetores – fundamentos para uso racional.** Campinas: Ed. Graf, 2003. 320 p.

Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social – BNDES. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br> Acesso em: 12 de Outubro de 2013.

BARD, S. **Ecotoxicology: The Focal Topics**. Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences. p.1194-95, 2008;

BARETTA, D.; SANTOS, J.C.P.; MAFRA, A.L.; WILDNER, L.P.; MIQUELLUTI, D.J. **Fauna Edáfica Avaliada por Armadilhas e Catação Manual Afetada pelo Manejo do Solo na Região Oeste Catarinense**. Revista de Ciências Agroveterinárias, 2:97-106, 2003.

Biobeds.org - the international *Biobed* site. **Biological discard**. Disponível em: <http://www.Biobeds.org/velkommen> Acesso em 12/2013.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de Janeiro de 2002. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm. Acesso em: 10/2013.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de Julho de 1989. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/17802.htm. Acesso em: 10/2013.

CARBONELL, G.; GÓMEZ, J.P.N.; BABÍN, M.M.; FERNÁNDEZ, C.; ALONSO, E.; TARAZONA, J.V. **Sewages ludge applied to agricultural soil: Ecotoxicological effects on representative soil organisms**. Ecotoxicology and Environmental Safety. 72:1309–1319, 2009.

CASTILLO, M. D. P.; TORSTENSSON, L.; STENSTRÖM, J. **Biobeds for environmental protection from pesticide use – a review.** Journal of Agriculture and Food Chemistry, 56: 6206-6219, 2008.

CHAIM A.; PESSOA, M. C. P. Y.; FERRACINI, V. L. **Eficiência de Deposição de Pulverização Em Videira, Comparando Bicos e Pulverizadores.** Ecotoxicologia e Meio Ambiente, 14:34-46, 2004.

CHELINHO, S.; DOMENE, X.; ANDRÉS, P.; NATAL-DALUZ, T.; NORTE, C.; RUFINO, C.; LOPES, I.; CACHADA, A.; ESPÍNDOLA, E.; RIBEIRO, R.; DUARTE, A.C.; SOUSA, J.P. **Soil microarthropod community testing: A new approach to increase the ecological relevance of effect data for pesticide risk assessment.** Applied Soil Ecology, 83:200–209, 2013b.

CHELINHO, S.; DOMENE, X.; CAMPANA, P.; ANDRÉS, P.; RÖMBKE, J.; SOUSA, J.P. **Toxicity of phenmedipham and carbendazim to *Enchytraeus crypticus* and *Eisenia andrei* (Oligochaeta) in Mediterranean soils.** Journal of Soils and Sediments, 14:584-599, 2013a.

COPPOLA, L.; CASTILLO, M. D. P.; VISCHETTI, C. **Degradation of isopropuron and bentazone in peat- and compost based biomixtures.** Pest Management Science, 67:107-113, 2011.

D'EMILIO, M.; CAGGIANO, R.; MACCHIATO, M.; RAGOSTA, M.; SABIA, S. **Soil heavy metal contamination in an industrial area: analysis of the data collected during a decade.** *Environmental Monitoring Assess*, 185:5951–5964, 2013.

DAAM, M.; LEITÃO, S.; CEREJEIRA, M.J.; SOUSA, J.P. **Comparing the sensitivity of soil invertebrates to pesticides with that of *Eisenia fetida*.** *Chemosphere*, 85: 1040-7, 2011.

DIEZ, M. C. **Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants.** *Journal of soil science and plant nutrition*, 10:244-267, 2010.

DOMENE, X.; CHELINHO, S.; CAMPANA, P.; NATAL-DA-LUZ, T.; ALCAÑIZ, J.M.; ANDRÉS, P.; RÖMBKE, J.; SOUSA, J.P. **Influence of soil properties on the performance of *Folsomia candida*: implications for its use in soil ecotoxicology testing.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30:1497-505, 2011.

DOW AGROSCIENCES. **Clorpirifós e Mancozebe.**

Disponível em:

http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDAS/dh_092a/0901b8038092a7ea.pdf?filepath=br/pdfs/noreg/013-05100.pdf&fromPage=GetDoc. Acesso em 01/2015.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Agrotóxicos no Brasil. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_40_210200792814.html. Acesso em: 09/2013.

European Food Safety Authority – EFSA. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/>. Acesso em 01/2015

EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL. Directorate E - Food Safety: plant health, animal health and welfare, international questions – EFSA. **Guidance Document on Terrestrial Ecotoxicology Under Council Directive 91/414/EEC. E1 - Plant health.** 17 October 2002.

FACHINELLO J.C.; PASA, M.S.; SCHMITZ, J.D.; BETEMPS D.L. **Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil.** Revista Brasileira de Fruticultura, Volume Especial:109-120, Outubro 2011.

FAIT, G.; NICELLI, M.; FRAGOULIS, G.; TREVISAN, M.; CAPRI, E. **Reduction of point contamination sources of pesticide from a vineyard farm.** Environmental Science & Technology, 41:302-3308, 2007.

FANG H.; YU Y.; CHU X.; WANG X.; YANG X.; YU J. **Degradation of chlorpyrifos in laboratory soil and its impact on soil microbial functional diversity.** Journal of Environmental Sciences, 21:380–386, 2009.

FAWOLE, O. B.; ALUKO, M.; OLOWONIHI, T. E. **Effects of a Carbendazim-Mancozeb Fungicidal Mixture on soil Microbial Populations and Some Enzyme Activities in Soil.** *Agrosearch*, 10;65-74. 2009.

FOGG, P.; BOXALL, A. B. A.; WALKER, A.; JUKES, A. **Pesticide degradation in a *Biobed* composting substrate.** *Pest Management Science*, 59:527-537, 2003.

GARCIA, M.V. **Effects of pesticides on soil fauna: development of ecotoxicological test methods for tropical regions.** *Ecology and Development Series*. No. 19. Zentrum für Entwicklungsforschung. University of Bonn, Germany, 281 pp, 2004.

GARCÍA-SANTOS, G.; Keller-Forrer, K. **Avoidance behaviour of *Eisenia fetida* to carbofuran, chlorpyrifos, mancozeb and metamidophos in natural soils from the highlands of Colombia.** *Chemosphere*, 84:651-6, 2011.

GREGOIRE, C.; ELSAESSER, D.; HUGUENOT, D.; LANGE, J.; LEBEAU, T.; MERLI, A.; MOSE, R.; PASSEPORT, E.; PAYRAUDEAU, S.; SHÜTZ, T.; SCHULZ, R.; TAPIA-HELWEG, A.; BAY, H.; HANSEN, H. P. B.; RABOLLE, M.; SONNENBORG, A.; STENVANG, L. **Pollution at and below sites used for mixing and loading of pesticides.** *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 82:583-590, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E
ESTATÍSTICA – IBGE. Disponível em: www.ibge.gov.br.
Acesso em 09/2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS
RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. Portaria
Normativa Ibama nº 84, 15 de Outubro de 1996. Disponível em:
www.ibama.gov.br. Acesso em: 10/2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS
RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA.
Disponível em: www.ibama.gov.br Acesso em: 10/2013

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS
RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA.
**Produtos Agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no
Brasil**. Brasília: Ibama, 2010, 84p.

JARDIM, I.C.S.F.; ANDRADE, J. A. **Resíduos de
agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental
global – um enfoque às maçãs**. Quim. Nova, 32:996-1012,
2009.

KADIAN N.; MALIK A.; SATYA, S.; DUREJA, P. **Effect of
organic amendments on microbial activity in chlorpyrifos
contaminated soil**. Journal of Environmental Management,
95:199-202, 2012.

KARANASIOS, E. C.; TSIROPOULOS N. G.; KARPOUZAS, D. G.. **Quantitative and qualitative differences in the metabolism of pesticides in *Biobed* substrates and soil.** Chemosphere, 93:20–28, 2013.

KARANASIOS, E.; TSIROPOULOS, N. G.; KARPOUZAS, D. G.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U. **Novel biomixtures based on local Mediterranean lignocellulosic materials:evaluation for in *Biobed* systems.** Chemosphere, 80:914-921, 2010.

LEITÃO, S.; CEREJEIRA, M.J.; VAN DEN BRINK, P. J.; SOUSA, J.P.. **Effects of azoxystrobin, chlorothalonil, and ethoprophos on the reproduction of three terrestrial invertebrates using a natural Mediterranean soil.** Applied Soil Ecology, 76:124-131, 2014.

MA, W. C.; BODT, J. **Differences in Toxicity of the Insecticide Chlorpyrifos to Six Species of Earthworms (*Oligochaeta, Lumbricidae*) in Standardized Soil Tests.** Environmental Contamination and Toxicology, 50: 864—870, 1993.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. Lista de agrotóxicos cadastrados autorizados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 10/2013.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA. Disponível em:
<http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso: 10/2013.

MONACI, E.; COPPOLA, L.; CASUCCI, C.; PERUCCI, P.; VISCHETTI, C. **Retention capacity of an organic bio-mixture against different mixtures of fungicides used in vineyards.** Journal of environmental Science and Health Part B, 44:724-729, 2009.

NURSITA, A.; SINGH, B.; LEES, E. **The effects of cadmium, copper, lead, and zinc on the growth and reproduction of *Proisotoma minuta* Tullberg (Collembola).** Ecotoxicology and environmental safety, 60: 306-14, 2005.

ODUM, Eugene P.; BARRET, Gary W. Fundamentos de Ecologia. Cengage Learning: São Paulo, 2011.

OECD – ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Earthworm, acute toxicity tests. Guidelines for testing of chemicals, 207. Paris, 1984.

OLIVEIRA-JÚNIOR, R.S.; REGITANO, J.B.. **Dinâmica de Pesticidas no Solo.** Química e Mineralogia do Solo. SBCS, Viçosa, 2009.

PABLO F.; KRASSOIA F.R.; JONES P.R.F.; COLVILLE A.E.; HOSEA G.C.; LIM R.P. **Comparison of the fate and toxicity of chlorpyrifos—Laboratory versus a coastal mesocosm system.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 7:219–229, 2008.

PELOSI, C.; BAROT, S.; CAPOWIEZ, Y.; HEDDE, M.; VANDENBULCKE, F.; **Pesticides and earthworms. A review.** *Agronomy for Sustainable Development*, 34:199-228, 2013.

PERES, F.; ROZEMBERG, B.; LUCCA, S. R. **Percepção de riscos no trabalho rural em uma região agrícola do estado do Rio de Janeiro, Brasil.** *Agrotóxicos, saúde e meio ambiente*, Rio de Janeiro: Caderno de Saúde Pública, 21:1836-1844, 2005.

PEREZ, D. G.; FONTANETTI C. S. **Assessment of the Toxic Potential of Sewage Sludge in the Midgut of the Diplopod *Rhinocricus padbergi*.** *Water Air Soil Pollut*, 2010.

PETZ W.; FOISSNER, W. **The effects of mancozeb and lindane on the soil microfauna of a spruce forest: A field study using a completely randomized block design.** *Biology Fertil Soils*, 7:225-231, 1989.

PIOLA, L.; FUCHS, J.; ONETO M. L. BASACK, S.; GIMÉNEZ, R., MASSARO, R.; PAPA, J. C.; KESTEN E.; CASABÉ N. **Biomarkers for the assessment of chlorpyrifos effects on earthworms and on soil functional parameters.** Pesquisa agropecuária brasileira, 44:874-880, 2009.

RATHNAYAKE, I.V.N.; MEGHARAJ, M.; KRISHNAMURTI, G.S.R.; BOLAN, N. S.; NAIDU R. **Heavy metal toxicity to bacteria – Are the existing growth media accurate enough to determine heavy metal toxicity?** Chemosphere, 90:1195-200, 2012.

REINECKE, A. J.; MABOETA, M. S.; VERMEULEN, L. A.; REINECKE, S. A. **Assessment of Lead Nitrate and Mancozeb Toxicity in Earthworms Using the Avoidance Response.** Environmental Contamination and Toxicology, 68:779–786, 2002.

REINECKE, S.A.; REINECKE, A.J. **The impact of organophosphate pesticides in orchards on earthworms in the Western Cape, South Africa.** Ecotoxicology and environmental safety, 66:244-51, 2007.

RICKLEFS, R.E. A economia da natureza. Rio de Janeiro: Guanabara. Koogan, 2013.

ROFFIGNAC, L.; CATTAN, P.; MAILLOUX, J.; HERZOG, D.; BELLEC, F.L. **Efficiency of a bagasse substrate in a biological bed system for the degradation of glyphosate, malathion and lambda-cyhalotrin under tropical climate conditions.** Pest Management Science, 64:1303-1313, 2008.

SANTOS, G. G.; FORRER, K. K. **Avoidance behaviour of *Eisenia fetida* to carbofuran, chlorpyrifos, mancozeb and metamidophos in natural soils from the highlands of Colombia.** Chemosphere, 84:651–656, 2011.

SANTOS, M. J. G.; FERREIRA, M. F. L.; CACHADA, A.; DUARTE, A. C.; SOUSA, J. P. **Pesticide application to agricultural fields: effects the reproduction and avoidance behaviour of *Folsomia candida* and *Eisenia andrei*.** Ecotoxicology, 21:2113–2122, 2012.

SAVOLAINEN, K. **Understanding the toxic actions of organophosphorus.** In: Krieger R. Handbook of pesticide toxicology: agents. Academic Press, San Diego, p. 1013–1041, 2001.

SCHAEFER, M.; PETERSEN O. S.; FILSER, J. **Effects of *Lumbricus terrestris*, *Allolobophora chlorotica* and *Eisenia fetida* on microbial community dynamics in oil-contaminated soil.** Soil Biology & Biochemistry, 37:2065–2076, 2005.

SCHMIDT, W.; REDSHAW, C.H. **Evaluation of biological endpoints in crop plants after exposure to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): Implications for phytotoxicological assessment of novel contaminants.** Ecotoxicology and Environmental Safety, 112:212–222, 2015.

SILVA, P. M. C. S.; PATHIRATNE, A.; GESTEL, C. A. M. **Toxicity of chlorpyrifos, carbofuran, mancozeb and their formulations to the tropical earthworm** *Perionyx excavatus* . *Applied Soil Ecology*, 44:56–60, 2010 a.

SILVA, P. M. C. S.; PATHIRATNE, A.; GESTEL, C. A. M. **Chlorpyrifos causes decreased organic matter decomposition by suppressing earthworm and termite communities in tropical soil.** *Environmental Pollution*, 158:3041-3047, 2010 b.

SISINNO, C.L.S.; OLIVEIRA-FILHO, E.C. *Princípios de toxicologia ambiental: conceitos e aplicações.* Rio de Janeiro: Interciência, 2013.

SNIEGOWSKI, K.; BERS, K.; VAN GOETEM, K.; RYCKEBOER, J.; JAEKEN, P.; SPANOGHE, P.; SPRINGAEL, D. **Improvement of pesticide mineralization in on-farm biopurification system by bioaugmentation with pesticide-primed soil.** *FEMS Microbiology Ecology*, 76:64-73, 2011.

SPLIID, N. H.; HELWEG, A.; HEINRICHSON, K. **Leaching and degradation of 21 pesticides in a full-scale model** *Biobed*. *Chemosphere*, 65:2223-2232, 2006.

TARAZONA J.V.; RAMOS-PERALONSO, M.J. **Ecotoxicology.** *Encyclopedia of Toxicology*, 3:276–280, 2014.

TEREKHOVA, V.A. **Soil Bioassay: Problems and Approaches**. Eurasian Soil Science, 44:173-179, 2011.

TORSTENSSON, L. **Experiences of Biobeds in practical use in Sweden**. Pesticide Outlook, 11:206-211, 2000.

TOWNSEND, C.R.; BEGON, M.; HARPER, J.L. **Fundamentos em Ecologia**. Porto Alegre: Artmed, 2010.

United States Environmental Protection Agency – EPA.
Disponível em: <http://www.epa.gov/> Acesso em 08/2013.

VISCHETTI, C.; MONACI, E.; CARDINALI, A.; PERUCCI, P. **The effect of initial concentration, co-application and repeated applications on pesticide degradation in a Biobed mixture**. Chemosphere, 72:1739-1743, 2008.

WANG S.J.; YAN, Z. G.; GUO, G. L.; LU G. L.; WANG, Q. H.; LI, F. S. **Ecotoxicity assessment of aged petroleum sludge using a suite of effects-based end points in earthworm *Eisenia fetida***. Environmental Monitoring Assessment, 169:417–428, 2010.

WANG, T. T.; CHENG J.; LIU J.X.; JIANG, W.; ZHANG C. L.; YU, X. Y. **Effect of biochar amendment on the bioavailability of pesticide chlorantraniliprole in soil to earthworm**. Ecotoxicology and Environmental Safety, 83:96–101, 2012.

WENNEKER, M.; BELTMAN, W. H.; DE WERD, H. A. E.; VAN DE ZANDE, J. C. **Identification and quantification of point sources of surface water contamination in fruit culture in the Netherlands**. Aspects of Applied Biology, 84:369-375, 2008.

WONG, F. P.; WILCOX, W.F. **Comparative physical modes of action of azoxystrobin, mancozeb, and metalaxyl against *Plasmopara viticola* (grapevine downy mildew)**. Plant Disease, 85:649-656, 2001.

ZAGATTO, P.A. Ecotoxicologia. In: Zagatto, P.A.; Bertoletti, E. **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. São Carlos, RiMa, p. 1-12, 2006.

2 HIPÓTESES

Os pesticidas Clorpirifós e Mancozebe oferecem risco a sobrevivência e à reprodução da fauna edáfica e que os seus efluentes, oriundos da lavagem do tanque pulverizador também oferecem risco quando descartados diretamente no solo, diferentemente do descarte em *Biobeds*, que pode ser eficiente na redução/eliminação da toxicidade em caso de derrames pelo manuseio de produtos

3 OBJETIVO GERAL

Verificar a toxicidade do inseticida Clorpirifós e do fungicida Mancozebe para a fauna do solo, bem como de seus resíduos, avaliando a segurança de um reator *Biobed* para fins de descarte e em caso de derrame acidental, por ensaios ecotoxicológicos com três organismos representativos da fauna edáfica – *Folsomia candida* (Colembolla), *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae) e *Eisenia andrei* (Lumbricidae).

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1 - Definir as doses de risco de Mancozebe e Clorpirifós para a sobrevivência e a reprodução de colêmbolos (*Folsomia candida*), enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*) e minhocas (*Eisenia andrei*) por meio de ensaios de ecotoxicidade padronizados ISO em Latossolo e Nitossolo;

2 - Avaliar a toxicidade do solo e de leito de descarte biológico (*Biobed*) sob disposição continuada de efluentes de Clorpirifós e Mancozebe ao longo da safra de maçã (420 dias), e do *Biobed* após simulação de derrame acidental de Clorpirifós, avaliando a toxicidade na reprodução de colêmbolos (*Folsomia candida*), enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*) e minhocas (*Eisenia andrei*) por meio de ensaios de ecotoxicidade.

6 CAPÍTULO I

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO FUNGICIDA MANCOZEBE E DO INSETICIDA CLORPIRIFÓS NA SOBREVIVÊNCIA E REPRODUÇÃO DE COLÊMBOLOS (*FOLSOMIA CANDIDA*), ENQUITREÍDEOS (*ENCHYTRAEUS CRYPTICUS*) E MINHOCAS (*EISENIA ANDREI*) EM LATOSSOLO E NITOSSOLO.

6.1 INTRODUÇÃO

Na região Sul do Brasil, há diversos tipos de cultivo, como soja, milho, trigo e aveia, responsáveis por uma grande parte do total produzido e exportado no país (IBGE, 2015). Pelas temperaturas mais amenas, a região Sul possui ainda outros cultivares, como a maçã, que tem mais de 95% da produção concentrada nos Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina (BNDES, 2013) e que, mesmo sendo uma atividade relativamente recente no Brasil (EMBRAPA, 2013), consolidada na década de 90 (PEREIRA & SIMONI, 2011), nos últimos dez anos cresceu na área colhida, produção, quantidade exportada e também no valor de exportação (FACHINELLO et al., 2011), com aumento da área plantada em 29% desde 2001 (MAPA, 2013).

Para esse cultivo são utilizados diversos agrotóxicos para prevenção e combate as pragas. O risco oferecido por agrotóxicos aos organismos do solo é estudado através de ensaios de ecotoxicidade (SANTOS et al., 2012; WANG et al., 2012; SILVA et al., 2010; FANG et al., 2009; FAWOLE et al., 2009; GARCIA, 2004). A Ecotoxicologia, definida como a avaliação da toxicidade de substâncias para ecossistemas (SISINNO & OLIVEIRA-FILHO, 2013) tem a vantagem do conhecimento prévio da segurança daquilo que vai ser disposto no ambiente, visto que uma vez utilizados, as diversas formas

de dissipação de potenciais poluentes como os agrotóxicos, não podem ser controladas (FLORES et al., 2014), contaminando não somente águas mas também o solo (OLIVEIRA JR. & REGITANO, 2009).

No Brasil, para a aprovação de agrotóxicos são necessários, no que tange a fauna edáfica, apenas ensaios de ecotoxicidade aguda com minhocas (IBAMA, 1989). No entanto, já é comprovada a diferença de sensibilidade entre distintos organismos (LEITÃO et al., 2014; DAAM et al., 2011) e a necessidade de ensaios com outros organismos já é exigida em vários lugares do mundo (EFSA, 2015; EPA, 2015).

Os fungicidas, utilizados na prevenção de doenças causadas por fungos em vários tipos de culturas, tem sua toxicidade conhecida para organismos através dos ensaios de ecotoxicidade (VERMEULEN et al., 2001; VAN ZWIETEN et al., 2004; WHITE et al., 2010). Os ensaios utilizados em laboratório são padronizados e o impacto das substâncias no solo geralmente é mensurado através de *endpoints* utilizando diversos organismos, dentre os quais estão os colêmbolos (AMORIM et al., 2012), as minhocas (PELOSI et al., 2013), os enquitreídeos (CHELINHO et al., 2013a) além de ácaros (CHELINHO et al., 2013b) e plantas.

Pertencente ao grupo dos Ditiocarbamatos, estudos mostram que o Mancozebe afeta de forma direta a germinação de esporos de *P. viticola* (WONG e WILCOX, 2001). O mecanismo de ação conhecido como multissítio, inibitório de vários processos metabólicos, faz com que seja difícil que as pragas combatidas adquiriram resistência (DOW AGRO, 2015), mas essa característica torna difícil conhecer os efeitos específicos a outros organismos. Pode agir contra diversos grupos de fungos como ascomicetos, oomicetos, basidiomicetos e fungos imperfeitos.

Petz & Foissner (1989) investigaram os efeitos do Mancozebe para diferentes tipos de protozoários, observando

que não houve efeitos letais para as populações nos primeiros dias de contato, porém, após 90 dias, a população de ciliados foi muito reduzida. Ainda sobre microrganismos, Fawole et al. (2009) avaliaram populações microbianas e a atividade enzimática quando expostas ao mancozebe. As populações de actinomicetos, bactérias e fungos foram significativamente reduzidas pela aplicação do fungicida, e a atividade das enzimas celulase e pectinase também sofreram redução nas doses testadas, voltando a atividade normal 90 dias depois da aplicação, sendo observado um reestabelecimento das populações microbianas do solo 21 dias após a aplicação.

García-Santos & Keller-Forrer (2011), testando diferentes concentrações em teste de fuga com a espécie de minhoca *E. fetida*, não observaram fuga mesmo na dose mais alta testada (1000 mg kg^{-1}) e salientam a relevância de variação das respostas com diferentes espécies e agrotóxicos. Ainda com minhocas, Silva et al. (2010), avaliaram os efeitos de agrotóxicos em forma de ingrediente ativo puro e formulado, à minhocas da espécie *Perionyx excavatus* quanto a sua sobrevivência, crescimento e reprodução em solo artificial OECD e observaram que os efeitos letais com produtos formulados para as minhocas (LC_{50} : 500 mg kg^{-1}) foram muito menores que os efeitos na reprodução (EC_{50} : 22 mg kg^{-1}), mostrando diferenças significativas entre estes ensaios e salientando a importância de testes com outros tipos de solos.

O clorpirifós pertencente ao grupo dos organofosforados, utilizado na substituição dos organoclorados na agricultura por diversos motivos, como baixo custo, facilidade da síntese da molécula e também por ser menos persistente no ambiente (SANTOS et al., 2007; ODUM, 2011; RICKLEFS, 2013), é um inseticida de amplo espectro de controle e tem seu modo de ação por contato e ingestão possuindo também efeito fumigante. Pode ser utilizado em aplicações aérea, tratorizada e via pivô central. Atua no sistema

nervoso, inibindo a síntese da colinesterase. (DOW AGRO, 2015).

Todavia, os organismos alvo não são os únicos que utilizam a colinesterase. A acetilcolina é um neurotransmissor. Quando liberada, estimula as células motoras e se desliga rapidamente pela ação da acetilcolinesterase. O Clorpirifós inibe a ação desta enzima que quebraria a acetilcolina em ácido acético e outros metabólitos inativos. A inibição da acetilcolinesterase gera um excesso de acetilcolina, provocando paralisia dos músculos necessários à respiração e parada dos batimentos cardíacos em mamíferos por exemplo. (SAVOLAINEN, 2001).

Alguns trabalhos já avaliaram a toxicidade deste produto a estes organismos não alvo que podem sofrer efeitos indiretos. Pablo et al. (2008) avaliaram a toxicidade de clorpirifós a invertebrados de água doce, observando alta toxicidade nas espécies da ordem Cladocera (LC50: 0.07–0.10 mg uL⁻¹). Fang et al. (2009) avaliaram o índice de diversidade da comunidade microbiana do solo depois do tratamento com Clorpirifós, indicando um efeito inibitório durante duas semanas depois da aplicação do inseticida, destacando a necessidade de estudos futuros sobre a resistência e resiliência de comunidades microbianas expostas a este produto.

Ma & Bodt (1993) verificaram a toxicidade do Clorpirifós na letalidade e reprodução de seis diferentes espécies de minhocas, observando diferenças expressivas de sensibilidade para cada espécie testada. Piola et al. (2009) demonstraram que apenas ensaios de fuga não foram suficientes para mensurar os efeitos do produto às minhocas da espécie *E. andrei*, sendo isso explicado por García-Santos & Keller-Forrer (2011), que salientaram que pela inibição da acetilcolinesterase, o Clorpirifós pode interferir na capacidade das minhocas de escolher o substrato durante o teste de fuga dependendo da dose utilizada. O valor de AC50 calculado foi 34,16 mg kg⁻¹.

Silva et al., (2009) testaram a toxicidade de clorpirifós à *Eisenia andrei* e também a *Perionix escavatus* (SILVA et al., 2009b) em solo artificial OECD e em solo natural, observando diferenças significativas em temperaturas distintas (20 e 26°C), e que o produto teve efeito tóxico em todos os casos, sendo porém, em solos artificiais e em temperaturas maiores mais drásticos. A espécie *Perionix escavatus* teve sensibilidade maior ao clorpirifós do que *E. andrei* e *E. fetida*, salientando que o uso de espécies e solos tropicais deve ser incentivado na análise do risco de agrotóxicos.

Desta forma, o objetivo deste capítulo foi definir as dosagens de risco do Mancozebe pela adição de Dithane NT e de Clorpirifós pela adição de Lorsban no solo aos colêmbolos (*Folsomia candida*), enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*) e minhocas (*Eisenia andrei*) por meio de ensaios de ecotoxicidade padronizados ISO em Latossolo Bruno e Nitossolo Bruno.

6.2 MATERIAL E MÉTODOS

6.2.1 SOLOS

Os solos utilizados neste estudo foram um Latossolo Bruno, coletado em área antiga de pomar de maçã no município de Vacaria-RS, e um Nitossolo Bruno, coletado em área de pastagem nativa, sem histórico de aplicação de insumos ou rejeitos, no município de Campo Belo do Sul, SC.

Após a coleta, os solos foram peneirados em malha de 2mm, e desfaunados por três ciclos de congelamentos a -20°C durante 24 horas para posterior contaminação. A umidade foi ajustada entre 40 e 60% da capacidade de retenção de água, conforme protocolos ISO utilizados, descritos posteriormente para cada organismo. Os pHs e demais características químicas e físicas de cada solo encontram-se na Tabela 2.

O substrato utilizado para validar os ensaios foi um solo

artificial no qual a formulação original segue normas da OECD (1984), que foi modificada, com utilização da fibra de coco no lugar da turfa, diminuindo seu conteúdo para 5%, denominado de solo artificial tropical (SAT) (GARCIA, 2004; KUPERMAN et al, 2009).

Tabela 1 - Características químicas e físicas dos solos utilizados para os ensaios de ecotoxicidade.

| Parâmetros | Latossolo | Nitossolo |
|--|------------------|------------------|
| pH (água) | 4,9 | 4,8 |
| SMP | 5,9 | 5,3 |
| CTC efetiva (cmolc/dm ³) | 10,01 | 8,65 |
| Matéria Orgânica (mg/dm ³) | 0,8 | 0,5 |
| Carbono Orgânico Total (mg/dm ³) | 7,7 | 6,3 |
| Ca (cmolc/dm ³) | 6,88 | 3,99 |
| Mg (cmolc/dm ³) | 2,13 | 1,40 |
| P (mg/dm ³) | 13,9 | 2,1 |
| Cu (mg/dm ³) | 10,6 | 18,3 |
| Fe (mg/dm ³) | 77,7 | 55,3 |
| K (mg/dm ³) | 272 | 141 |
| Teor de Argila (%) | 30 | 47 |
| Teor de Areia (%) | 24 | 18 |
| Teor de Silte (%) | 46 | 35 |
| Classe textural | Franco Argiloso | Argila |

Fonte: Laboratório de Análise de Solos – LAS, UDESC/CAV, 2015.

6.2.2 AGROTÓXICOS

Os produtos comerciais utilizados foram o Dithane NT da Dow Agro para avaliação da toxicidade do ingrediente ativo Mancozebe (800g de ingrediente ativo/kg de produto) (CAS: 8018-01-7, Log KoW:1.33, solubilidade 6,2 ppm 25°C.), que pertence ao grupo dos Ditiocarbamatos e possui ação fúngica, e o Lorsban 480BR também da Dow Agro para avaliação da toxicidade do ingrediente ativo Clorpirifós (480mg de ingrediente ativo /L de produto) (CAS: 2921-88-2, Log KoW:

5,0 (4,7-5,3) solubilidade 1.18 ppm 25°C.), que pertence ao grupo dos organofosforados e age como inseticida/acaricida.

Para os ensaios de letalidade foram determinadas doses de varredura conforme as normas ISO 11267 (colêmbolos), ISO 16387 (enquitreídeos) e ISO 11268⁻¹ (minhocas). De acordo com os resultados dos ensaios de letalidade, foram elaboradas as doses para os ensaios subletais de reprodução que diferiram para cada organismo e também para cada tipo de solo. As doses utilizadas para cada caso estão dispostas na Tabela 2.

Tabela 2 - Organismos, tipos de ensaio, protocolos e dosagens utilizados para ensaios em Latossolo e Nitossolo com Mancozebe.

| Organismo | Ensaio | Protocolo | Adição de Mancozebe (mg kg ⁻¹) | | Adição de Clorpirifós (mg kg ⁻¹) | |
|---|------------------|---------------------------|--|---------------------------------|--|-----------------------------------|
| | | | Latossolo | Nitossolo | Latossolo | Nitossolo |
| Colêmbolos (<i>Folsomia candida</i>) | CL ₅₀ | ISO 11267 (1999) | 0, 1, 10, 100, 1000 | 0, 1, 10, 100, 1000 | 0, 1, 10, 100, 1000 | 0, 1, 10, 100, 1000 |
| | CE ₅₀ | | 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 | 0, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005 | 0, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005 | 0, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005 |
| Enquitreídeos (<i>Enchytraeus crypticus</i>) | CL ₅₀ | ISO 16387 (2004) | 0, 0,1, 1, 10, 100, 1000 | 0, 0,1, 1, 10, 100, 1000 | 0, 0,1, 1, 10, 100, 1000 | 0, 1, 10, 100, 1000 |
| | CE ₅₀ | | 0, 0.2, 0.4, 0.8, 1.5, 3, 6, 10 | 0; 0,1; 0,2; 0,8; 1,5; 3; 6, 10 | 0; 0,1; 0,2; 0,8; 1,5; 3, 6, 10 | 0, 10, 25, 50, 100, 150, 200, 300 |
| Minhocas (<i>Eisenia andrei</i>) | CL ₅₀ | ISO 11268- e -2 (1998) | 0, 1, 10, 100, 1000 | 0, 1, 10, 100, 1000 | 0, 1, 10, 100, 1000 | 0, 1, 10, 100, 1000 |
| | CE ₅₀ | | 0, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 | 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 | 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 | 0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 |

CL₅₀: Referente ao ensaio de letalidade. Concentração letal para 50% da população;

CE₅₀: Referente ao ensaio de reprodução. Concentração de efeito para 50% da população.

Fonte: Própria autora, 2015.

6.2.3 ORGANISMOS TESTE E CONDIÇÕES DOS ENSAIOS

Os ensaios foram conduzidos no laboratório de Ecologia do Solo na UDESC/CAV. Para os ensaios foram utilizados organismos terrestres mantidos neste laboratório de três diferentes espécies: *Folsomia candida* (Colembolla) *Enchytraeus crypticus* (Enchytraedae) e *Eisenia andrei* (Lubricidae), cultivados em câmara fechada com fotoperíodo de 08/16 horas de luz/escuro e temperatura de $20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}$, conforme protocolos ISO. Os solos foram levados à umidade entre 40 e 60% da sua capacidade de retenção, sendo corrigida de dois em dois dias com a finalidade de mantê-la até o fim dos ensaios.

6.2.3.1 Colêmbolos (*Folsomia candida*)

Os colêmbolos da espécie *Folsomia candida* foram mantidos em recipientes com capacidade de um litro, em meio de cultura composto por gesso (1.100 g) e carvão ativado (100 g) misturados com aproximadamente 900ml de água destilada. Os colêmbolos foram alimentados três vezes por semana com fermento biológico seco.

Os adultos foram trocados de meio para estimular sua reprodução. Após cinco a sete dias, os ovos depositados eram coletados e colocados em novo recipiente. Os ovos foram depositados sob pequenos pedaços de gesso. Após a eclosão dos primeiros ovos, esperaram-se mais dois dias para retirar o restante dos ovos não eclodidos, de forma que o recipiente possuía organismos com diferença de idade entre um e dois dias.

Para os ensaios de letalidade (14 dias) e reprodução (28 dias), seguiu-se protocolo ISO 11267 (1999). Utilizaram-se

colêmbolos que possuíssem de dez a doze dias de idade. Os organismos foram mantidos em recipientes com capacidade para 120ml, preenchidos com 30 gramas de solo contaminado ou controle. Realizaram-se seis repetições, sendo cinco delas com dez organismos e uma sem a adição de colêmbolos para verificação da umidade e pH ao final do ensaio. Alimento foi adicionado uma vez por semana, consistindo em dois mg de fermento biológico seco. Ao final do ensaio, adicionou-se água para que os colêmbolos sobreviventes boiassem. Tinta de carimbo foi adicionada para melhor visualização dos organismos, fazendo-se a contagem dos sobreviventes no ensaio de letalidade e fotografando para posterior contagem com o programa ImageJ no ensaio de reprodução.

6.2.3.2 Enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*)

Os enquitreídeos foram mantidos em recipientes com capacidade de um litro preenchidos com solo artificial tropical - SAT, sendo alimentados três vezes por semana com aveia fina moída em liquidificador. Para os ensaios, foram utilizados organismos adultos, sendo essa característica confirmada devido a estrutura reprodutiva perceptível (clitelo).

Para os ensaios de letalidade (14 dias) e reprodução (28 dias), seguiu-se protocolo ISO 16387(2004). Foram utilizados enquitreídeos clitelados, indicando sua fase adulta, mantidos em recipientes de 125 mL, preenchidos com 25 gramas de solo contaminado ou controle. Realizaram-se seis repetições, sendo cinco delas com dez organismos e uma sem, para verificação da umidade e pH ao final do ensaio. Foram alimentados uma vez por semana com duas mg de aveia moída. Ao final do ensaio, adicionou-se cinco mL de álcool absoluto para preservação dos enquitreídeos ainda vivos, dez gotas de solução corante rosa bengala e aproximadamente 80mL de água para evitar seu ressecamento. Após 48 horas, as amostras foram lavadas sob peneira de malha 150mm. Os organismos da

amostra limpa foram contabilizados.

6.2.3.3 Minhocas (*Eisenia andrei*)

As minhocas foram mantidas em esterco de equino livre de contaminantes conforme as especificações do protocolo ISO 11268⁻¹ (1998), sendo realizada uma modificação: ao esterco, foram adicionados fibra de coco e areia, na proporção de 7:2:1 respectivamente, incrementando a matéria orgânica e textura do material. A alimentação baseou-se em mistura de aveia fervida em micro-ondas por cerca de 10 minutos com água destilada, de uma a duas vezes por semana.

Para os ensaios, foram utilizadas minhocas cliteladas, com peso entre 250 e 600mg. Os organismos foram mantidos em recipientes de 1000 mL, preenchidos com 250 gramas de solo, correspondendo a altura entre cinco e seis centímetros. Realizaram-se quatro repetições, sendo verificada ao final do ensaio a umidade e o pH.

Nos ensaios de letalidade (14 dias), seguiu-se protocolo ISO 11268⁻¹(1998) e não houve alimentação das minhocas. Ao final do ensaio, as minhocas sobreviventes foram pesadas e contadas. Nos ensaios de reprodução (56 dias), seguiu-se Protocolo ISO 11268-2 (1998). A alimentação foi esterco de equino sem contaminantes, desfaunado com três ciclos de congelamento a -20°C por 24 horas. Ao final de 28 dias as minhocas adultas foram retiradas, contadas e pesadas, sendo deixados no ensaio apenas seus casulos. Após os 56 dias de ensaio os recipientes foram colocados em banho-maria a 60°C fazendo com que os juvenis subissem à superfície e pudessem ser contabilizados.

6.2.3 ANÁLISE DOS DADOS

Para os ensaios letais e subletais, diferenças entre o solo contaminado e o controle foram avaliadas através de análise de

variância (ANOVA One-way) seguida pelo ensaio de Dunnett ($M < \text{controle}$, $p < 0,05$), utilizando o Software Statistica 7.0 (STATSOFT, 2004).

Para estabelecer os valores de CL50 (Concentração letal para 50% da população) do ensaio de letalidade, foi utilizado o Software PriProbit® 1.63 (SAKUMA, 1998). Para os ensaios de reprodução, realizou-se uma análise de regressão não linear, com o Software Statistica 7.0 (STATSOFT, 2004), usando o modelo que melhor se ajustou aos dados para determinar os valores de CE50 (Concentração de efeito em 50% da população).

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

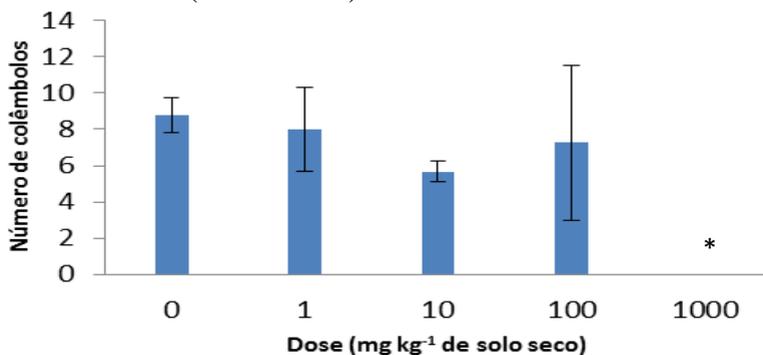
6.3.1 MANCOZEBE

Colêmbolos

Os ensaios com colêmbolos cumpriram o critério de validação da norma ISO 11267 (1999), onde a mortalidade dos adultos no solo controle (SAT) não pode ser superior a 20%; a taxa de reprodução mínima de 100 colêmbolos por amostra deve ser considerada; e o coeficiente de variação não pode exceder 30%.

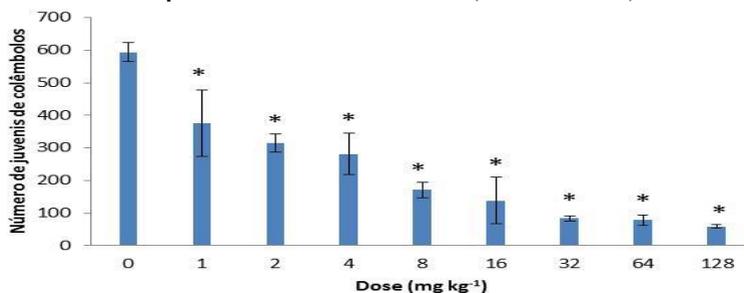
Na avaliação do efeito letal sobre os colêmbolos (Figura 3) observou-se que a dose de Mancozebe capaz de eliminar 50% da população (CL₅₀), foi de 49,76 mg kg⁻¹ solo seco no Latossolo. Para a reprodução dos colêmbolos (Figura 4), observou-se, entretanto, que a dose que afetou 50% da população (CE₅₀) foi de 3,03 mg kg⁻¹ (IC: 2,05 ± 4,02 mg kg⁻¹). Este *endpoint* foi 16 vezes menor que o observado no teste de letalidade. Esses resultados apontaram para diferenças expressivas entre ensaios letais e subletais com os colêmbolos

Figura 3 - Número de colêmbolos (*Folsomia candida*) vivos após exposição ao Mancozebe em Latossolo Bruno Distrófico por 14 dias em diferentes doses. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle pelo ensaio de Dunnett ($M < \text{controle}$).



Fonte: Produção da autora, 2015.

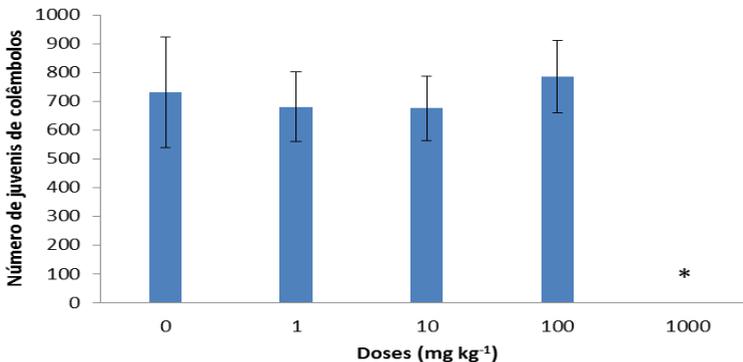
Figura 4 - Número de juvenis de colêmbolos após exposição ao Mancozebe em Latossolo Bruno Distrófico por 28 dias em diferentes doses. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle pelo ensaio de Dunnett ($M < \text{controle}$).



Fonte: Produção da autora, 2015.

No Nitossolo, a letalidade de Mancozebe apresentou-se muito menor que a observada no Latossolo, sendo a $CL_{50} > 1000 \text{ mg kg}^{-1}$. Para a reprodução de colêmbolos em Nitossolo a CE_{50} foi $> 100 \text{ mg kg}^{-1}$ de solo seco, conforme indicado pela Figura 5. Além disso, neste último ensaio na dose de 1000 mg kg^{-1} não foi observada sobrevivência. É possível que tal diferença esteja relacionada ao tempo de exposição que é maior no ensaio de reprodução (28 dias) que no de letalidade (14 dias).

Figura 5 - Número de juvenis de colêmbolos após exposição ao Mancozebe em Nitossolo Bruno por 28 dias em diferentes doses. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle pelo ensaio de Dunnett ($M < \text{controle}$).



Fonte: Produção da autora, 2015.

Alguns estudos apontaram uma baixa ou mesmo inexistente toxicidade do Mancozebe para certos organismos (VERMEULEN et al., 2001). Salienta-se que muitos dos estudos foram realizados em condições de solos representativos para a Europa, como o LUFA, ou artificiais como o OECD (1984) e posteriormente, para regiões tropicais o SAT (GARCIA, 2004), que tem diferenças expressivas em relação

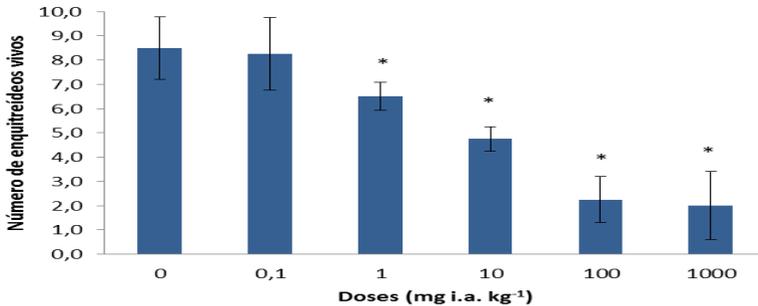
aos solos naturais – seu teor de areia é 70% e possui 10% de matéria orgânica, o que vai ser refletido nos resultados dos ensaios (GARCIA et. al, 2012), já que as características dos solos podem influenciar diretamente a toxicidade de produtos a vários organismos (AMORIM et. al 2002, CAETANO et. al 2011). Como observado para colêmbolos por Domene et al., (2011), que perceberam que solos com textura mais fina tiveram uma menor reprodução de colêmbolos, além de verificarem que diferentes teores de umidade podem afetar a reprodução e também o comportamento de fuga destes organismos.

Enquitreídeos

Para os enquitreídeos, os critérios de validação foram cumpridos conforme a norma ISO 16387 (2004), onde para o controle (SAT), a mortalidade dos adultos no solo não pode ser superior a 20%; a média de juvenis no ensaio de reprodução deve ser maior que 25 indivíduos; e o coeficiente de variação não pode exceder 50%.

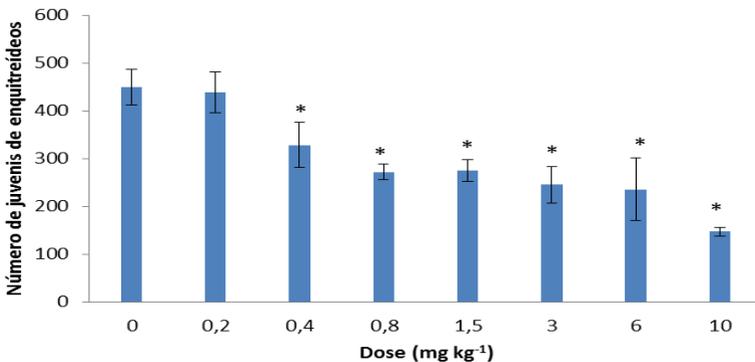
Os testes de letalidade com enquitreídeos no Latossolo (Figura 6), apresentaram CL_{50} de $6,97 \text{ mg kg}^{-1}$ (IC: $2,58 \pm 17,82 \text{ mg kg}^{-1}$). Para os ensaios de reprodução (Figura 7) neste mesmo solo o valor da CE_{50} foi $3,93 \text{ mg kg}^{-1}$ (IC: $1,79 \pm 6,07 \text{ mg kg}^{-1}$), quase duas vezes menor que o valor de CL_{50} . No Nitossolo observou-se menor efeito letal (Figura 8), sendo a CL_{50} : $232,95 \text{ mg kg}^{-1}$. A CE_{50} foi $23,77 \text{ mg kg}^{-1}$ (IC: $6,30 \pm 41,24 \text{ mg kg}^{-1}$) (Figura 9) sendo este valor quatro vezes maior que o observado no Latossolo.

Figura 6 - Número de enquitreídeos vivos após exposição ao Mancozebe em Latossolo Bruno por 14 dias em diferentes doses. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle pelo ensaio de Dunnett ($M < \text{controle}$).



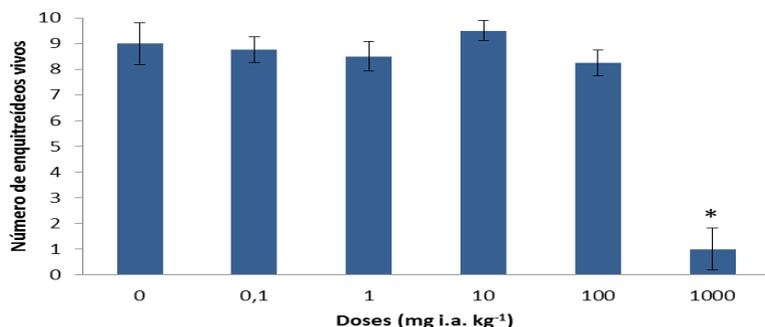
Fonte: Produção da autora, 2015.

Figura 7 - Número de juvenis de enquitreídeos após exposição ao Mancozebe em Latossolo Bruno por 28 dias em diferentes doses. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle pelo ensaio de Dunnett ($M < \text{controle}$).



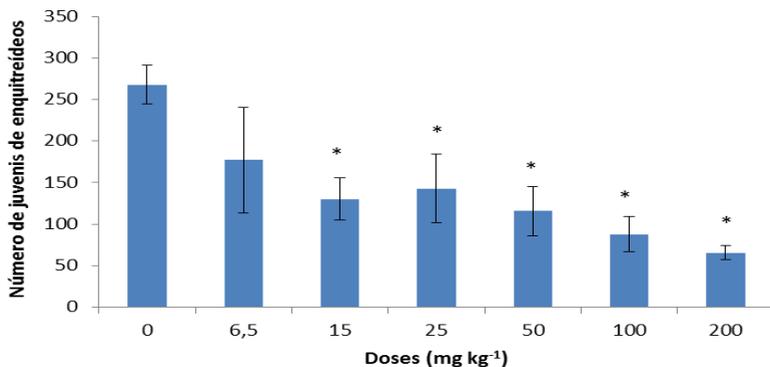
Fonte: Produção da autora, 2015.

Figura 8 - Número de enquitreídeos vivos após exposição ao Mancozebe em Nitossolo Bruno em diferentes doses. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle pelo teste de Dunnett ($M < \text{controle}$).



Fonte: Produção da autora, 2015.

Figura 9 - Número de juvenis de enquitreídeos após exposição ao Mancozebe em Nitossolo Bruno em diferentes doses. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle pelo ensaio de Dunnett ($M < \text{controle}$).



Fonte: Produção da autora, 2015.

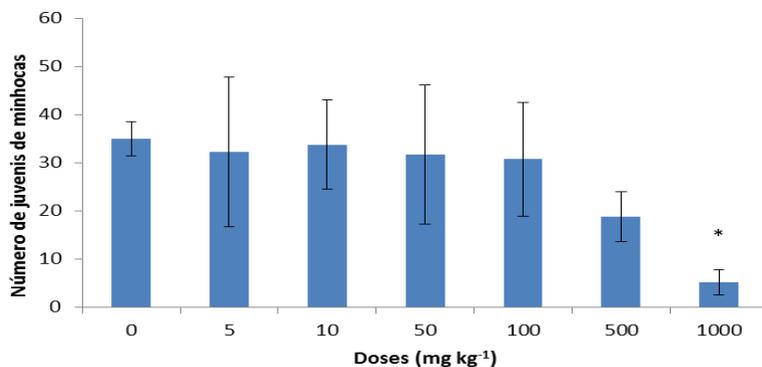
Até o presente, são escassos os trabalhos na literatura de estudos envolvendo o efeito de pesticidas do grupo dos ditiocarbamatos (como o Mancozebe) sobre os enquitreídeos e os colêmbolos. Entretanto, Kuperman et al. (2004), apontam para maior sensibilidade dos enquitreídeos ao manganês, componente da molécula do princípio ativo, em comparação aos colêmbolos e minhocas, o que poderia explicar os resultados observados.

Minhocas

Os ensaios com as minhocas atenderam o critério de validação do protocolo 11268-1 e 2 (1998), sendo no controle (SAT) a taxa de reprodução mínima de 30 juvenis; o coeficiente de variação menor que 30%; e a porcentagem de mortalidade dos adultos deve ser $\leq 10\%$.

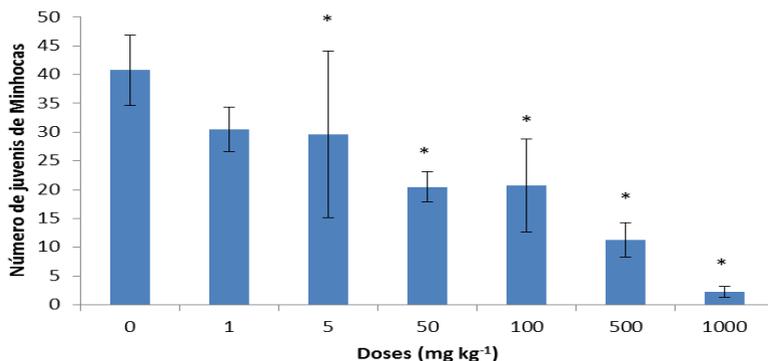
Para as minhocas, os resultados letais pela adição de Mancozebe em Latossolo não apresentaram nenhuma toxicidade mesmo na dose de 1000 mg kg^{-1} . No ensaio subletal de reprodução o Mancozebe também não apresentou alta toxicidade, sendo a CE_{50} de $550,26 \text{ mg kg}^{-1}$ (IC: $317,68 \pm 782,83 \text{ mg kg}^{-1}$) (Figura 10). Para o Nitossolo, não foi observada qualquer letalidade do Mancozebe para as minhocas, não sendo possível o cálculo do CL_{50} , pois nenhuma dose eliminou 50% da população. O ensaio subletal de reprodução em Nitossolo apresentou a mesma tendência observada para o Latossolo (Figura 11) sendo a CE_{50} : $495,57 \text{ mg kg}^{-1}$ (IC: $364,59 \pm 626,56 \text{ mg kg}^{-1}$).

Figura 10 - Número de juvenis de Minhocas após exposição ao Mancozebe em Latossolo Bruno por 56 dias em diferentes doses. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle pelo ensaio de Dunnett ($M < \text{Controle}$).



Fonte: Produção da autora, 2015.

Figura 11 - Número de juvenis de Minhocas após exposição ao Mancozebe em Nitossolo Bruno por 56 dias em diferentes doses. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle pelo ensaio de Dunnett ($M < \text{Controle}$).



Fonte: Produção da autora, 2015.

Há muito que minhocas são utilizadas como organismos indicadores em ensaios de ecotoxicidade (KULA & KOKTA, 1991; PESOLI et al., 2013). De Silva et al., (2010) já apontavam para baixa toxicidade do Mancozebe com minhocas da espécie *Perionyx excavatus* em solo artificial OECD, o que corrobora com este estudo. García-Santos et al. (2011), em trabalho de toxicidade subletal por meio de ensaio de fuga em solo natural com minhocas da espécie *Eisenia fetida* não observaram diferenças significativas mesmo na dose mais alta testada (1000 mg kg⁻¹) em solo artificial, tal como já apontado por Reinecke et al. (2002) com outro tipo de substrato. Corroborando com os resultados de CL₅₀ observado para minhoca nos dois solos (>1000), Vermuelen et al. (2001) observaram CL₅₀ da ordem de 1262 mg kg⁻¹, e concluíram, considerando inclusive a avaliação de outras variáveis, como crescimento e número de casulos, que o Mancozebe apresentava baixa toxicidade para as minhocas da espécie *Eisenia fetida*.

A ordem crescente de sensibilidade à exposição de Mancozebe com base nos ensaios de reprodução foi *Colêmbolos* ≥ *Enquitreídeos* > *Minhocas* no Latossolo e *Enquitreídeos* > *Colêmbolos* > *Minhocas* para o Nitossolo, sendo que a toxicidade dos produtos aos organismos testados foi maior quando adicionados ao Latossolo, conforme resumido na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados compilados dos ensaios letais e subletais em Latossolo e Nitossolo com adição de diferentes doses de Mancozebe para três organismos da fauna edáfica.

| Organismo | Latossolo | | Nitossolo | |
|---|--|--|--|--|
| | CL ₅₀ (mg kg ⁻¹) | CE ₅₀ (mg kg ⁻¹) | CL ₅₀ (mg kg ⁻¹) | CE ₅₀ (mg kg ⁻¹) |
| Colêmbolos (<i>Folsomia candida</i>) | 9,76 | 3,03 | >1000 | >100 |
| Enquitreídeos (<i>Enchytraeus crypticus</i>) | 6,97 | 3,93 | 32,95 | 23,77 |
| Minhocas (<i>Eisenia andrei</i>) | >1000 | 50,26 | >1000 | 95,57 |

Fonte: Própria autora, 2015.

Este estudo mostra que, embora minhocas de diferentes espécies já tenham apontado para a baixa toxicidade do fungicida Mancozebe, há uma evidente necessidade de avaliar sua toxicidade para outros organismos da fauna edáfica, já que os enquitreídeos, pertencentes a mesma classe que as minhocas (*Oligochaeta*) são sensíveis a doses muito menores do produto.

6.3.2 CLORPIRIFÓS

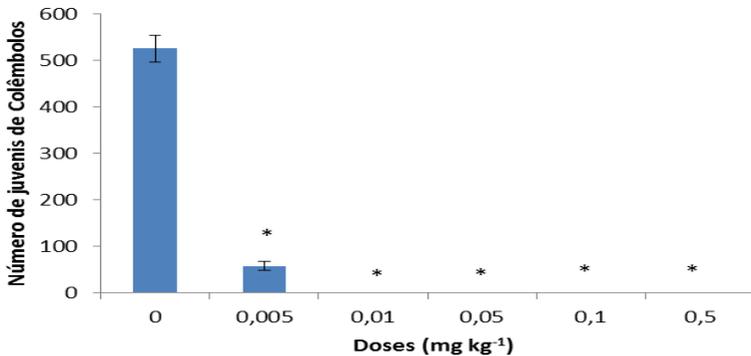
Os critérios de validação para todos os organismos foram seguidos, conforme Protocolos ISO descritos nos ensaios com Mancozebe.

Os resultados para os ensaios de letalidade e reprodução, mostraram diferenças quanto aos organismos testados, o tipo de ensaio realizado – letal ou subletal, e também quanto aos tipos de solos contaminados com Clorpirifós.

Colêmbolos

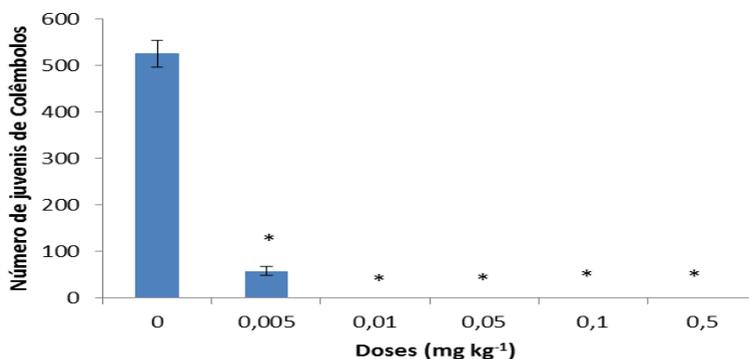
Para os colêmbolos, a toxicidade do Clorpirifós foi extremamente alta. Nos ensaios de letalidade não houve sobrevivência nem na dose mais baixa testada ($CL_{50} < 1 \text{ mg kg}^{-1}$), e para os ensaios de reprodução, apenas uma dose testada apresentou organismos ao final do ensaio (Figuras 12 e 13). Para o Latossolo, a CE_{50} : $0,004 \text{ mg kg}^{-1}$ (IC: $0,003 \pm 0,005 \text{ mg kg}^{-1}$) enquanto o Nitossolo teve uma CE_{50} : $0,005 \text{ mg kg}^{-1}$ (IC: $0,004 \pm 0,006 \text{ mg kg}^{-1}$).

Figura 12 - Número de juvenis de colêmbolos após exposição ao Clorpirifós em Latossolo Bruno por 28 dias em diferentes doses. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle pelo ensaio de Dunnett ($M < \text{Controle}$).



Fonte: Produção da autora, 2015.

Figura 13 - Número de juvenis de colêmbolos após exposição ao Clorpirifós em Nitossolo Bruno por 14 dias em diferentes doses. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle pelo ensaio de Dunnett ($M < \text{Controle}$).



Fonte: Produção da autora, 2015.

Os colêmbolos pertenciam a Classe Insecta, do Filo Arthropoda. Essa classificação foi recentemente substituída devido à morfologia de suas peças bucais para a classe Entognatha, do mesmo Filo (RUPPERT & BARNES, 1996; LUAN et al., 2015). Todavia, outras características morfofisiológicas são semelhantes aos integrantes do grupo ao qual pertenciam. Desta forma, os colêmbolos podem ser afetados diretamente pela adição de agrotóxicos – principalmente dos inseticidas, como já demonstrado por Endlweber (2006) para diversos gêneros.

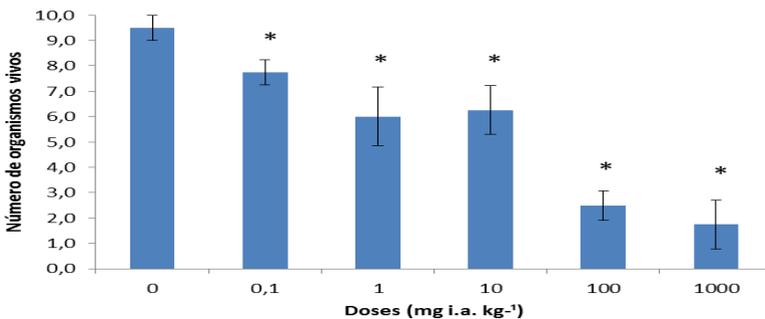
A alta sensibilidade dos colêmbolos quando expostos ao Clorpirifós já foi observada por Santos et al. (2012), em ensaios de fuga, onde 82% dos colêmbolos migraram para o solo não contaminado e a CE_{50} calculada foi igual a $0,045 \text{ mg kg}^{-1}$ em um solo natural português. A CL_{50} calculada para os colêmbolos neste mesmo trabalho foi de $0,13 \text{ mg kg}^{-1}$. Talvez esse maior índice de sobrevivência encontrado por estes

autores, possa estar associado às características do solo, como por exemplo, um pH mais neutro (7,48) ao passo que este trabalho utilizou solos mais ácidos (4,4 – 4,9), representativos para o Sul do Brasil. Alta sensibilidade também já foi demonstrada por Natal-da-Luz et al. (2012), pela aplicação do inseticida Diazinon, sendo a CE_{50} calculado em $0,288 \text{ mg kg}^{-1}$ ($0,143\text{--}0,432$) em solo arenoso, com aplicações diretamente no campo, seguido de coleta após 30 minutos da mesma.

Enquitreídeos

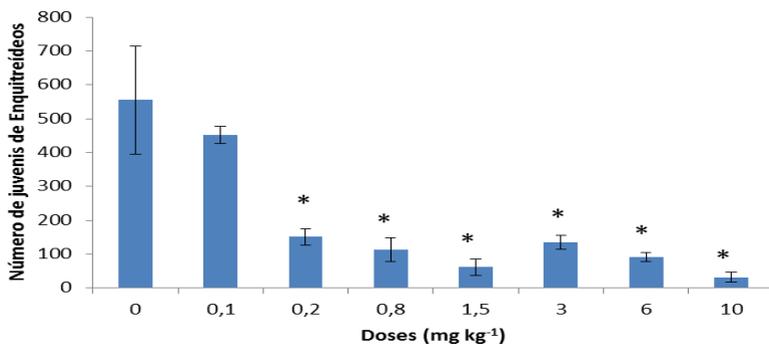
Os enquitreídeos foram sensíveis ao Clorpirifós adicionado ao Latossolo nos ensaios de letalidade (CL_{50} : $7,73 \text{ mg kg}^{-1}$ (IC: $2,65 \pm 21,73 \text{ mg kg}^{-1}$)) e de reprodução (CE_{50} : $0,14 \text{ mg kg}^{-1}$ (IC: $0,08 \pm 0,21 \text{ mg kg}^{-1}$)) (Figuras 14 e 15) e a toxicidade oferecida pelo produto quando os organismos foram expostos sob Nitossolo diminuíram ($CL_{50} > 100 \text{ mg kg}^{-1}$; CE_{50} : $87,81 \text{ mg kg}^{-1}$ (IC: $46,99 \pm 128,63 \text{ mg kg}^{-1}$)) (Figuras 16 e 17).

Figura 14 - Número de enquitreídeos após exposição ao Clorpirifós em Latossolo Bruno por 14 dias em diferentes doses. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle pelo ensaio de Dunnett ($M < \text{Controle}$).



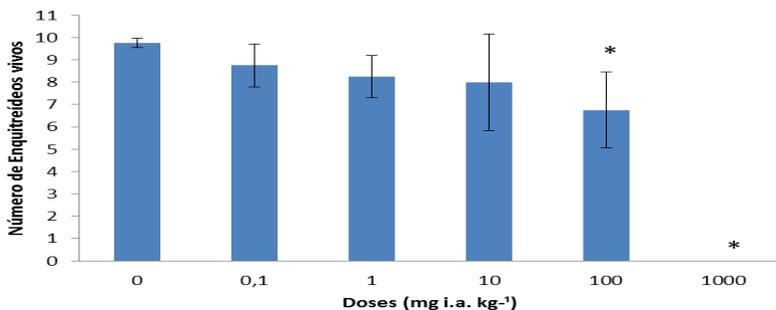
Fonte: Produção da autora, 2015.

Figura 15 - Número de juvenis de enquitreídeos após exposição ao Clorpirifós em Latossolo Bruno por 28 dias em diferentes doses. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle pelo ensaio de Dunnett ($M < \text{Controle}$).



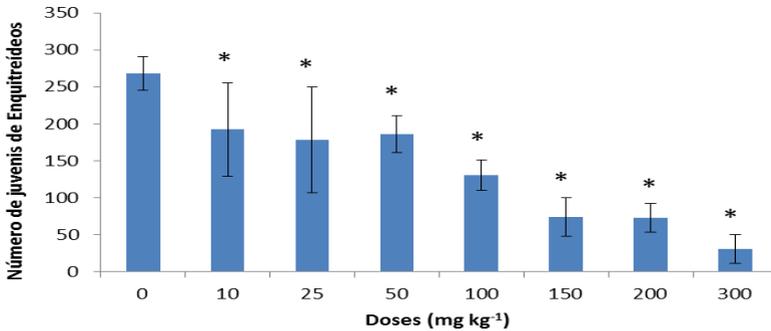
Fonte: Produção da autora, 2015.

Figura 16 - Número de enquitreídeos após exposição ao Clorpirifós em Nitossolo Bruno por 14 dias em diferentes doses. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle pelo ensaio de Dunnett ($M < \text{Controle}$).



Fonte: Produção da autora, 2015.

Figura 17 - Número de juvenis de enquitreídeos após exposição ao Clorpirifós em Latossolo Bruno por 28 dias em diferentes doses. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle pelo ensaio de Dunnett ($M < \text{Controle}$).



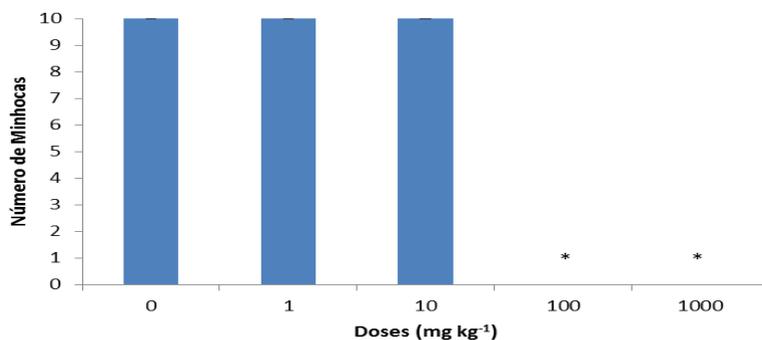
Fonte: Produção da autora, 2015.

Embora não tenham sido encontrados na literatura até o momento trabalhos sobre a sensibilidade de enquitreídeos ao Clorpirifós, Natal-da-Luz et al. (2012), apontaram para inexistência de toxicidade do Diazinon, também pertencente ao grupo dos organofosforados aos enquitreídeos.

Minhocas

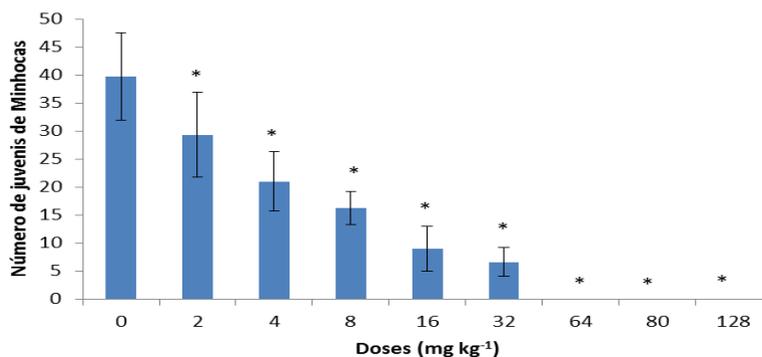
As minhocas, assim como os outros organismos, foram sensíveis ao Clorpirifós quando expostas em Latossolo com a $CL_{50} > 10 \text{ mg kg}^{-1}$ e a CE_{50} : $5,29 \text{ mg kg}^{-1}$ ($IC: 2,96 \pm 7,63 \text{ mg kg}^{-1}$) (Figuras 18 e 19). A toxicidade do ensaio letal foi reduzida em comparação com o Nitossolo onde a $CL_{50} > 100 \text{ mg kg}^{-1}$. Contudo, o ensaio de reprodução não apresentou diferenças, sendo a CE_{50} : $5,99 \text{ mg kg}^{-1}$ ($IC: 3,29 \pm 8,69 \text{ mg kg}^{-1}$) (Figuras 20 e 21).

Figura 18 - Número de Minhocas após exposição ao Clorpirifós em Latossolo Bruno por 28 dias em diferentes doses. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle pelo ensaio de Dunnett ($M < \text{Controle}$).



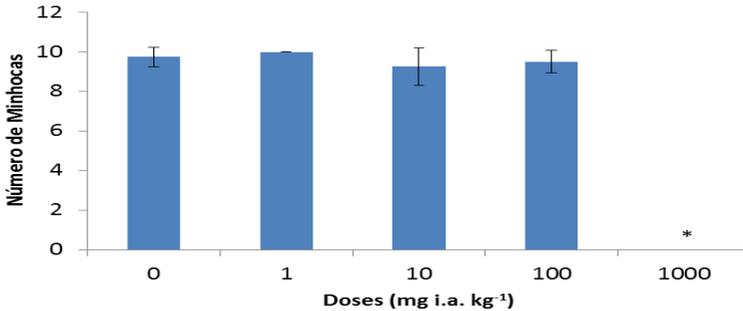
Fonte: Produção da autora, 2015.

Figura 19 - Número de juvenis de Minhocas após exposição ao Clorpirifós em Latossolo Bruno por 56 dias em diferentes doses. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle pelo ensaio de Dunnett ($M < \text{Controle}$).



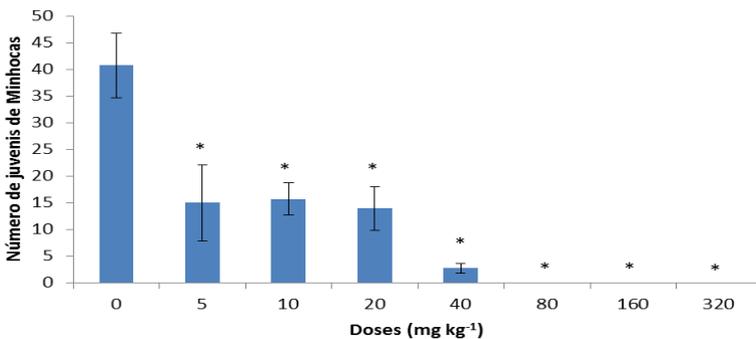
Fonte: Produção da autora, 2015.

Figura 20 - Número de Minhocas após exposição ao Clorpirifós em Nitossolo Bruno em diferentes doses. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle pelo ensaio de Dunnett ($M < \text{Controle}$).



Fonte: Produção da autora, 2015.

Figura 21 - Número de juvenis de Minhocas após exposição ao Clorpirifós em Nitossolo Bruno por 56 dias em diferentes doses. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle pelo ensaio de Dunnett ($M < \text{Controle}$).



Fonte: Produção da autora, 2015.

Muitos são os estudos que avaliaram a toxicidade de agrotóxicos às minhocas com ensaios letais e subletais de reprodução e fuga. Garcia et al. (2008) destacaram os diferentes tipos de ensaios – letalidade, fuga e reprodução; demonstrando a importância dos testes de reprodução e a facilidade dos testes de fuga com agrotóxicos, ressaltando que não deve-se substituir um ensaio por outro.

Römbke & Garcia (2000) foram os primeiros a apresentar um projeto de ensaios com solos tropicais, na Amazônia, utilizando Terrestrial Model Ecosystem (TMEs) para averiguar o risco de diferentes agrotóxicos. Casabé et al. (2007) demonstraram o risco de agrotóxicos para as minhocas das espécies *Eisenia andrei* e *Eisenia fetida* para glifosato e clorpirifós, demonstrando sensibilidade dos ensaios de fuga e de reprodução em solos naturais.

Além desses ensaios demonstrando crescimento, reprodução e fuga, Jordaan et al. (2012) observaram biomarcadores selecionados em minhocas da espécie *Eisenia andrei* (atividade da colinesterase) e mostraram que o organofosforado azinphos-methyl comprometeu os casulos das minhocas e afetou a atividade da colinesterase.

Alves et al. (2013) mensuraram os efeitos de vários agrotóxicos à *Eisenia andrei*, demonstrando que os produtos apresentam diferentes doses de risco para essa espécie, e lembrando que são necessários mais ensaios utilizando agrotóxicos em misturas.

Santos et al. (2012), encontraram, utilizando um solo natural de Portugal uma CE_{50} menor que a desse estudo para as minhocas *Eisenia andrei* expostas ao Clorpirifós ($0.38 (\pm 0.13)$ mg kg^{-1}) pela adição do produto formulado Dursban. No entanto, Morcillo et al. (2013), utilizando a espécie *Lumbricus terrestris* não observou fuga do solo contaminado com Clorpirifós mesmo na dose mais alta testada (15 mg kg^{-1}), como também já fora descrito anteriormente por Hodge et al (2000) para *Aporrectodea caliginosa*. De Silva et al. (2009),

testaram a toxicidade deste ingrediente ativo à *Eisenia andrei* em solo artificial (CL₅₀: 492 (456–531); CE₅₀: 7,49 (5.14–9.84) mg kg⁻¹) e solo natural (CL₅₀: 481 (395–586); CE₅₀: 1,79 (1.23–2.36) mg kg⁻¹), corroborando com este trabalho quanto as diferenças entre os dois *endpoints* e diferindo quanto ao solo natural.

A sensibilidade dos organismos à exposição de Clorpirifós por meios de ensaios de letalidade e reprodução está resumida na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados compilados dos ensaios letais e subletais em Latossolo e Nitossolo com adição de diferentes doses de Clorpirifós para três organismos da fauna edáfica.

| Organismo | Latossolo | | Nitossolo | |
|---|---|---|---|---|
| | CL ₅₀ (mg kg ⁻¹) | CE ₅₀ (mg kg ⁻¹) | CL ₅₀ (mg kg ⁻¹) | CE ₅₀ (mg kg ⁻¹) |
| Colêmbolos (<i>Folsomia candida</i>) | < 1 | 0,004 | < 1 | 0,005 |
| Enquitreídeos (<i>Enchytraeus crypticus</i>) | 7,73 | 0,14 | > 100 | 87,81 |
| Minhocas (<i>Eisenia andrei</i>) | > 10 | 5,29 | > 100 | 5,99 |

Fonte: Própria autora, 2015

Diferentes tipos de solo, expostos a processos pedogenênicos possuem características intrínsecas que são parte fundamental no processo de disponibilidade de poluentes, tal como os agrotóxicos (AZEVEDO & CHASIN, 2004; MOREIRA & SIQUEIRA, 2002). Tratando-se de solos tropicais, as diferenças quanto aos solos artificiais e aos solos naturais europeus são de importante ressalva, inclusive para elaboração de ensaios de ecotoxicidade (CESAR et al., 2014).

Além disso, a textura do solo pode interferir na capacidade do solo reter poluentes (KRAEMER et al., 2009) então outra hipótese levantada é que a diferença de textura

entre os solos pode ter interferido na disponibilidade dos produtos, já que solos mais argilosos normalmente possuem maior capacidade de retenção de pesticidas dificultando ou retardando sua degradação no solo (HILLEL, 1998).

Os resultados obtidos por este trabalho, salientam a necessidade de inserir ensaios de ecotoxicidade subletais com minhocas e com outros organismos da fauna edáfica, como colêmbolos, não considerados ainda na legislação brasileira de regulação de agrotóxicos, muito embora já sejam utilizados por diversos órgãos internacionais para o registro e credenciamento destes e de outros produtos.

Garantir a sobrevivência dos diversos grupos de organismos do solo tem reflexos diretos na prestação de serviços oferecidos pela comunidade edáfica pela preservação da diversidade de grupos funcionais, que promove por sua vez a manutenção da qualidade dos solos e de processos fundamentais como a decomposição e regulação biológica (MOREIRA & SIQUEIRA, 2006; TOWNSEND et al., 2010; ODUM & BARRETT, 2011). Para tal, é necessário maior cuidado com o manuseio e aplicação de agrotóxicos no campo, independente do tipo de solo sob o qual a atividade acontece, já que existem riscos de exposição para a fauna e também o risco de lixiviação para as águas subterrâneas (PLIMMER, 1992; OLIVEIRA JÚNIOR & REGITANO, 2009).

6.4 CONCLUSÃO

O Mancozebe e o Clorpirifós afetaram a sobrevivência (CL_{50}) e reprodução (CE_{50}) das populações de colêmbolos (*Folsomia candida*), enqtreídeos, (*Enchytraeus crypticus*) e minhocas (*Eisenia andrei*) de forma diferenciada, sendo as doses de risco menores no Latossolo em comparação com o Nitossolo, indicando a maior sensibilidade dos organismos aos agrotóxicos no Latossolo, talvez devido as diferenças de

textura entre estes.

As minhocas, único organismo utilizado no credenciamento de agrotóxicos no Brasil, mostraram-se menos sensíveis que os outros organismos testados aos efeitos do Mancozebe, e os colêmbolos foram extremamente sensíveis ao clorpirifós em doses inferiores a 1 mg de ingrediente ativo kg^{-1} , o que demonstra uma necessidade de inclusão de ensaios com outros grupos de invertebrados para verificação da toxicidade de agrotóxicos aos organismos do solo.

Os resultados demonstram necessidade de maiores e mais profundas investigações dos efeitos de agrotóxicos para a fauna edáfica nos solos brasileiros, visto que se pequenas diferenças estruturais e químicas podem interferir nos resultados em áreas de influência de clima semelhante, a toxicidade pode ser ainda muito mais distinta quando esses compostos entram em contato com solos mais arenosos ou siltosos, ou mesmo em temperaturas mais altas, não sendo possível determinar uma dose única de risco de um possível poluente para todo o território nacional.

REFERÊNCIAS

AMORIM, M.J.B.; PEREIRA, C.; MENEZES-OLIVEIRA, V.B.; CAMPOS B.; SOARES A.M.V.M.; LOUREIRO, S. **Assessing single and joint effects of chemicals on the survival and reproduction of *Folsomia candida* (Collembola) in soil.** Environmental pollution, 160:145-52, 2012.

AMORIM, M.J.B.; SOUSA, J. P.; NOGUEIRA, A.J.; SOARES A.M.V.M. **Bioaccumulation and elimination of 14C-lindane by *Enchytraeus albidus* in artificial (OECD) and a natural soil.** Chemosphere, 49:323-329, 2002.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. da M. **As bases toxicológicas da Ecotoxicologia.** São Paulo: Rima; Intertox, 2004.

Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social – BNDES. Disponível em: <http://www.bndes.gov.br>. Acesso em: 10/2013.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de Julho de 1989. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/17802.htm. Acesso em: 10/2013.

CAETANO, A.L.; GONÇALVES, F.; SOUSA, J.P.; CACHADA, A.; PEREIRA, E.; DUARTE, A.C.; FERREIRA DA SILVA, E.; PEREIRA, R. **Characterization and validation of a Portuguese natural reference soil to be used as substrate for ecotoxicological purposes.** Journal of environmental monitoring, 14:925-36, 2012.

CASABÉ, N.P.; FUCHS, L.J.; ONETO, M.L.; PAMPARATO, L.; BASACK, S.; GIMÉNEZ, R.; MASSARO, R.; PAPA, J.C.; KESTEN, E. **Ecotoxicological Assessment of the Effects of Glyphosate and Chlorpyrifos in an Argentine Soya Field.** Journal of Soils and Sediments, 4:232-239, 2007.

CESAR, R.; NATAL-DA-LUZ, T.; SOUSA, J.P.; COLONESE, J.; BIDONE, E.; CASTILHOS, Z.; EGLER, S.; POLIVANOV, H. **Disposal of dredged sediments in tropical soils: ecotoxicological effects on earthworms.** Environmental monitoring and assessment, 186:1487-97, 2014.

CHELINHO, S.; DOMENE, X.; ANDRÉS, P.; NATAL-DA-LUZ, T.; NORTE, C.; RUFINO, C.; LOPES, I.; CACHADA, A.; ESPÍNDOLA, E.; RIBEIRO, R.; DUARTE, A.C.; SOUSA, J.P. **Soil microarthropod community testing: A new approach to increase the ecological relevance of effect data for pesticide risk assessment.** Applied Soil Ecology, 83:200–209, 2013b.

CHELINHO, S.; DOMENE, X.; CAMPANA, P.; ANDRÉS, P.; RÖMBKE, J.; SOUSA, J.P. **Toxicity of phenmedipham and carbendazim to *Enchytraeus crypticus* and *Eisenia andrei* (Oligochaeta) in Mediterranean soils.** Journal of Soils and Sediments, 14:584-599, 2013a.

DAAM, M.; LEITÃO, S.; CEREJEIRA, M.J.; SOUSA, J.P. **Comparing the sensitivity of soil invertebrates to pesticides with that of *Eisenia fetida***. *Chemosphere*, 85:1040-7, 2011.

DE SILVA, P.M.C.S.; PATHIRATNE, A.; VAN GESTEL, C.A.M. **Influence of temperature and soil type on the toxicity of three pesticides to *Eisenia andrei***. *Chemosphere*, 76:10, 2009.

DE SILVA, P.M.C.S.; PATHIRATNE, A.; VAN GESTEL, C.A.M. **Toxicity of chlorpyrifos, carbofuran, mancozeb and their formulations to the tropical earthworm *Perionyx excavatus***. *Applied Soil Ecology*, 44:56-60, 2010.

DOMENE, X.; CHELINHO, S.; CAMPANA, P.; NATAL-DA-LUZ, T.; ALCAÑIZ, J.M.; ANDRÉS, P.; RÖMBKE, J.; SOUSA, J.P. **Influence of soil properties on the performance of *Folsomia candida*: implications for its use in soil ecotoxicology testing**. 30:1497-505, 2011.

DOW AGROSCIENCES. Disponível em:
http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDAS/dh_092a/0901b8038092a7ea.pdf?filepath=br/pdfs/noreg/013-05100.pdf&fromPage=GetDoc. Acesso em 2015.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Agrotóxicos no Brasil**. Disponível em:
http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_40_210200792814.html. Acesso em: 09/2013.

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

EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL. Directorate D - Food Safety: Production and distribution chain Unit D.3 - **Chemicals, contaminants and pesticides: Chlorpyrifos.** SANCO/3059/99 - rev. 1.5, 2005.

European Food Safety Authority – EFSA. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/> Acesso em 08/2013.

FACHINELLO J.C.; PASA, M.S.; SCHMTIZ, J.D.; BETEMPS D.L. **Situação e perspectivas da fruticultura de clima temperado no Brasil.** Revista Brasileira de Fruticultura, Volume Especial:109-120, Outubro 2011.

FANG H.; YU Y.; CHU X.; WANG X.; YANG X.; YU J. **Degradation of chlorpyrifos in laboratory soil and its impact on soil microbial functional diversity.** Journal of Environmental Sciences, 21:380–386, 2009.

FAWOLE, O. B.; ALUKO, M.; OLOWONIHI, T. E. **Effects of a Carbendazim-Mancozeb Fungicidal Mixture on soil Microbial Populations and Some Enzyme Activities in Soil.** Agrosearch, 10:65-74. 2009.

FLORES, L.; BANJAC, Z.; FARRÉ, M.; LARRAÑAGA, A.; MAS-MARTÍ, E.; MUÑOZ, I.; BARCELÓ, D.; ELOSEGI, A. **Effects of a fungicide (imazalil) and an insecticide (diazinon) on stream fungi and invertebrates associated with litter breakdown.** *The Science of the total environment*, 476-477:532-41, 2014.

GARCIA, M.V. **Effects of pesticides on soil fauna: development of ecotoxicological test methods for tropical regions.** *Ecology and Development Series*. No. 19. Zentrum für Entwicklungsforschung. University of Bonn, Germany, 281 pp, 2004.

GARCÍA-SANTOS, G.; KELLER-FORRER, K. **Avoidance behaviour of *Eisenia fetida* to carbofuran, chlorpyrifos, mancozeb and metamidophos in natural soils from the highlands of Colombia.** *Chemosphere*, 84:651-6, 2011.

HODGE S.; WEBSTER, K.M.; BOOTH, L.; HEPPLETHWAITE, V.; O'HALLORAN, K. **Non-avoidance of organophosphate insecticides by the earthworm *Aporrectodea caliginosa* (lumbricidae).** *Soil Biology Biochem*, 32:425–428, 2000.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em 09/2013.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, ISO - Soil quality - **Effects of pollutants on earthworms** (*Eisenia fetida*) 11268-2.1, Geneva, 1998.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, ISO - Soil quality — **Inhibition of reproduction of Collembola**. 11267, Geneva, 1999

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, ISO - Soil quality – **Effects of pollutants on Enchytraeidae** (*Enchytraeus sp.*) – Determination of Effects on Reproduction and Survival. 16387. Geneva, 2004.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO - Soil quality - **Effects of pollutants on earthworms** (*Eisenia fetida*) 11268-2.2, Geneva, 1998.

KADIAN N.; MALIK A.; SATYA, S.; DUREJA, P. **Effect of organic amendments on microbial activity in chlorpyrifos contaminated soil**. Journal of Environmental Management, 95:199-202, 2012.

KESTEN E.; CASABÉ N. **Biomarkers for the assessment of chlorpyrifos effects on earthworms and on soil functional parameters**. Pesquisa agropecuária brasileira, v 44:874-880, 2009.

KULA, H.; KOKTA, C. **Side effects of selected pesticides earthworms under laboratory.** Soil Biology and Biochemistry, 24:1711-1714, 1992.

KUPERMAN, R.G.; CHECKAI, R.T.; SIMINI, M.; PHILLIPS, C.T. **Manganese toxicity in soil for *Eisenia fetida*, *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta), and *Folsomia candida* (Collembola).** Ecotoxicology and Environmental Safety, 57:48-53, 2004.

KUPERMAN, R.G.; CHECKAI, R.T.; VINICIUS, M.; GARCIA, B.; RÖMBKE, J. **State of the science and the way forward for the ecotoxicological assessment of contaminated land.** Revista Agropecuária Brasileira, 44:811-824, 2009.

LEITÃO, S.; CEREJEIRA, M.J.; VAN DEN BRINK, P. J.; SOUSA, J.P. **Effects of azoxystrobin, chlorothalonil, and ethoprophos on the reproduction of three terrestrial invertebrates using a natural Mediterranean soil.** Applied Soil Ecology, 76:124-131, 2014.

LUAN, Y.X.; MALLATT, J.M.; XIE, R.D.; YANG, Y.M.; YIN, W.Y. **The phylogenetic positions of three Basal-hexapod groups (protura, diplura, and collembola) based on ribosomal RNA gene sequences.** Molecular biology and evolution, 22:1579-92, 2015.

MA, W. C.; BODT, J. **Differences in Toxicity of the Insecticide Chlorpyrifos to Six Species of Earthworms (Oligochaeta, Lumbricidae) in Standardized Soil Tests.** *Environmental Contamination and Toxicology*, 50:864—870, 1993.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO – MAPA. **Lista de agrotóxicos cadastrados autorizados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 10/2013.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Secretaria de Política Agrícola – **Informativo 54**. v. 54, n 6, 2013.

MORCILLO, M.S.; YELA, J.L.; CAPOWIEZ, Y.; MAZZIA, C.; RAULT, M.; SANCHEZ-HERNANDEZ, J.C. **Avoidance behaviour response and esterase inhibition in the earthworm, *Lumbricus terrestris*, after exposure to chlorpyrifos.** *Ecotoxicology*, 22:597-607, 2013.

MOREIRA, F.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo.** UFLA: Lavras, 2002.

NATAL-DA-LUZ, T.; MOREIRA-SANTOS, M.; RUEPERT, C.; CASTILLO, L.E.; RIBEIRO, R.; SOUSA, J.P. **Ecotoxicological characterization of a tropical soil after diazinon spraying.** *Ecotoxicology*, 21:2163-76, 2012.

ODUM, Eugene P.; BARRET, Gary W. **Fundamentos de ecologia**. Cengage Learning: São Paulo, 2011.

OECD – ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Earthworm, acute toxicity tests**. Guidelines for testing of chemicals, 207. Paris, 1984.

OLIVEIRA JÚNIOR, R.S.; REGITANO, J.B. **Dinâmica de Pesticidas no Solo**. Química e Mineralogia do Solo. SBCS, Viçosa, 2009.

PABLO F.; KRASSOIA F.R.; JONES P.R.F.; COLVILLE A.E.; HOSEA G.C.; LIM R.P. **Comparison of the fate and toxicity of chlorpyrifos—Laboratory versus a coastal mesocosm system**. Ecotoxicology and Environmental Safety, 7:219–229, 2008.

PELOSI, C.; BAROT, S.; CAPOWIEZ, Y.; HEDDE, M.; VANDENBULCKE, F. **Pesticides and earthworms. A review**. Agronomy for Sustainable Development, 34:199-228, 2013.

PEREIRA, L.B.; SIMIONI, F.J. **Cadeia produtiva da maçã**, 2011. Disponível em:
http://www.mte.gov.br/pdet/o_pdet/produtos/evol_empreg_caged.asp. Acesso em: 05/2014.

PIOLA, L.; FUCHS, J.; ONETO M. L. BASACK, S.; GIMÉNEZ, R., MASSARO, R.; PAPA, J. C.; REINECKE, A. J.; MABOETA, M. S.; VERMEULEN, L. A.; REINECKE, S. A. **Assessment of Lead Nitrate and Mancozeb Toxicity in Earthworms Using the Avoidance Response.** *Environmental Contamination and Toxicology*, 68:779–786, 2002.

RICKLEFS, R.E. **A economia da natureza.** Rio de Janeiro: Guanabara. Koogan, 2013

RUPPERT E.E.; BARNER R.D. **Zoologia dos invertebrados.** 6 ed. São Paulo: Roca. 1029 p. 1996.

SAKUMA, M. **Probit analysis of preference data.** *Appl. Entomol. Zool*, 33:339-347, 1998.

SANTOS, G.G.; FORRER, K.K. **Avoidance behaviour of Eisenia fetida to carbofuran, chlorpyrifos, mancozeb and metamidophos in natural soils from the highlands of Colombia.** *Chemosphere*, 84:651–656, 2011.

SANTOS, M. J. G.; FERREIRA, M. F. L.; CACHADA, A.; DUARTE, A. C.; SOUSA, J. P. **Pesticide application to agricultural fields: effects the reproduction and avoidance behaviour of *Folsomia candida* and *Eisenia andrei*.** *Ecotoxicology*, 21:2113–2122, 2012.

SAVOLAINEN, K. **Understanding the toxic actions of organophosphorus.** In: Krieger R. Handbook of pesticide toxicology: agents. Academic Press, San Diego, p. 1013–1041, 2001.

SILVA, P.M.C.S.; PATHIRATNE, A.; GESTEL, C.A.M. **Toxicity of chlorpyrifos, carbofuran, mancozeb and their formulations to the tropical earthworm *Perionyx excavatus*.** Applied Soil Ecology, 44:56–60, 2010a.

SILVA, P.M.C.S.; PATHIRATNE, A.; GESTEL, C.A.M. **Chlorpyrifos causes decreased organic matter decomposition by suppressing earthworm and termite communities in tropical soil.** Environmental Pollution, 158:3041-3047, 2010 b.

SISINNO, C.L.S.; OLIVEIRA-FILHO, E.C. **Princípios de toxicologia ambiental: conceitos e aplicações.** Rio de Janeiro: Interciência, 2013.

STATSOFT, Inc., STATISTICA (Data analysis software system). Version 7. Disponível em: www.statsoft.com, 2004.

TEREKHOVA, V.A. **Soil Bioassay: Problems and Approaches.** Eurasian Soil Science, 44:173-179, 2011.

TOWNSEND, C.R.; BEGON, M.; HARPER, J.L. **Fundamentos em Ecologia.** Porto Alegre: Artmed, 2010.

United States Environmental Protection Agency – EPA.
Disponível em <http://www.epa.gov/> Acesso em 08/2013.

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, 329:29-41, 2004.

VERMEULEN, L.A.; REINECKE, A.J.; REINECKE, S.A.
Evaluation of the fungicide manganese-zinc ethylene bis(dithiocarbamate) (mancozeb) for sublethal and acute toxicity to *Eisenia fetida* (Oligochaeta). Ecotoxicology and environmental safety, 48:183-9, 2001.

WANG, T.T.; CHENG J.; LIU J.X.; JIANG, W.; ZHANG C.L.; YU, X.Y. **Effect of biochar amendment on the bioavailability of pesticide chlorantraniliprole in soil to earthworm.** Ecotoxicology and Environmental Safety, 83:96–101, 2012.

WHITE, P.M.; POTTER, T.L.; CULBREATH, A.K.
Fungicide dissipation and impact on metolachlor aerobic soil degradation and soil microbial dynamics. The Science of the total environment, 408:1393-402, 2010.

WONG, F. P.; WILCOX, W.F. **Comparative physical modes of action of azoxystrobin, mancozeb, and metalaxyl against *Plasmopara viticola* (grapevine downy mildew).** Plant Disease, 85:649-656, 2001.

7 CAPÍTULO II

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE LEITOS BIOLÓGICOS (*BIOBEDS*), LATOSSOLO E NITOSSOLO PELA ADIÇÃO DE EFLUENTES DE MANCOZEBE E CLORPIRIFÓS A MACRO E MESOFAUNA E A EFICIÊNCIA DE *BIOBEDS* EM DERRAME ACIDENTAL DE CLORPIRIFÓS.

7.1 INTRODUÇÃO

Em muitos países, com objetivo de prevenção e de mitigação de impactos ambientais causados pelos agrotóxicos, foi planejado e executado um conjunto de processos denominados Boas Práticas Ambientais e Agrícolas, baseados em atenuação natural ou biorremediação (GREGOIRE et al., 2002; DIEZ, 2010; MONACI, et al., 2009). Esta se mostrou uma técnica alternativa, ambiental e economicamente viável, reduzindo custos e diminuindo ou eliminando a utilização de processos industriais para resolução destes problemas (FOGG et al., 2003; COPPOLA et al., 2011; SPLIID et al., 2006). Uma das ferramentas desta técnica é o uso de leitos biológicos para descarte de resíduos de agrotóxicos, denominados de *Biobeds*.

Os resíduos de agrotóxicos devido ao manuseio, ou oriundos da lavagem de máquinas são descartados nos sistemas de *Biobeds*, originalmente um fosso no solo, impermeabilizado ou não, preenchido com uma mistura denominada Biomix: palha, turfa e solo agrícola na proporção de 2:1:1, sobre a qual é plantada uma cobertura vegetal. O resíduo é depositado pela lavagem dos equipamentos em rampas construídas sobre o fosso, ou então derivados de um local com piso impermeável feito de concreto, onde são executadas as atividades com o agrotóxico e o manejo do pulverizador (FOGG et al., 2003;

FAIT, 2007; CASTILLO et al., 2008; ROFFIGNAC et al., 2008).

Com o passar dos anos, a difusão desta eficiente forma de degradação de resíduos de agrotóxicos (SPLIID et al., 2006; VISCHETTI et al., 2008; KARANASIOS et al., 2013) foi sendo aprimorada para diferentes sistemas, a exemplo do Reino Unido que usa para o descarte no *Biobed* um sistema de irrigação por gotejamento (REINO UNIDO, 2013).

No Brasil, a legislação quanto aos resíduos de agrotóxicos abrange atualmente apenas o descarte adequado das embalagens (BRASIL, 1989), no entanto não trata especificamente dos efluentes de lavação dos tanques pulverizadores, apesar de citar a necessidade de sua destinação adequada. Estes efluentes possuem, ainda que parcialmente diluídos, os mesmos princípios ativos existente nas embalagens. Além disso, a lavagem do tanque pulverizador, bem como o manuseio dos agrotóxicos, nem sempre são feitos em piso impermeável com sistema coletor. Os próprios manuais de limpeza dos tanques indicam que a lavagem pode ocorrer no solo desde que longe de rios e mananciais. (COUTINHO & CORDEIRO, 2015). Algumas empresas e propriedades fazem uso de lavagem dos equipamentos agrícolas sob rampa de lavação e coletam o resíduo da lavagem em caixas que são recolhidas por empresas especializadas. Esse processo gera um alto custo, além da degradação do resíduo não ser garantida.

Esse resíduo também pode passar por processo de decantação e ser reaproveitado, como proposto por Rufato et al., 2006. Apesar disso, não existem evidências sobre este resíduo não ser perigoso a fauna edáfica após passar pelo processo de decantação. Nos pontos de abastecimento de pulverizadores de agrotóxicos, onde ocorre manuseio dos produtos com muita frequência, usam-se produtos comerciais concentrados que são diluídos em água para formar a calda de aplicação.

O risco de derrames dos produtos aumenta com o número de cargas, constituindo um indicador ambiental importante que não pode ser descartado numa análise de risco ambiental (GEBLER & FIALHO, 2011), visto que essa atividade pode causar uma contaminação pontual, produzindo concentrações equivalentes a gramas ou decigramas por metro quadrado (RAMWELL et al., 2004), aumentando o risco do agrotóxico prejudicar a segurança ambiental (ANDRÉA et al., 2004; REICHENBERGER et. al., 2007).

Todo o processo de aplicação dos agrotóxicos e também da lavagem do equipamento utilizado pode apresentar riscos à fauna edáfica. Os riscos produzidos não existem apenas pela produção de resíduos, mas também devido ao manuseio indevido dos recipientes e de derrames acidentais (SILVA et al., 2005).

Pouco se conhece sobre os efeitos da disposição destes efluentes no solo e nos *Biobeds* em condições subtropicais. Possivelmente o processo de aplicação dos agrotóxicos e também da lavagem do equipamento utilizado pode apresentar riscos à fauna edáfica, entretanto, não se tem relatos de estudos ecotoxicológicos envolvendo a disposição de efluentes de pesticidas no solo ou em *Biobeds*.

Dessa maneira, o objetivo deste capítulo foi testar o uso de um sistema de *Biobeds* durante a safra da maçã, comparando a toxicidade oferecida por esse substrato e por dois solos (Latossolo e Nitossolo) após receberem adição continuada do resíduo de lavagem do tanque pulverizador contendo Clorpirifós e Mancozebe para minhocas (*Eisenia andrei*) colêmbolos (*Folsomia candida*) e enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*), e ainda, avaliar o uso de um *Biobed*, que recebeu a adição de 500 mL de Clorpirifós (Lorsban 480 BR) com um *Biobed* sem contaminação, observando se o substrato contaminado ofereceu risco a estes mesmos organismos.

7.2 MATERIAL E MÉTODOS

7.2.1 DESENHO EXPERIMENTAL

Na Estação Experimental Embrapa Uva e Vinho de Vacaria, RS foi realizada uma simulação dos *Biobeds* utilizando caixas d'água de 360 litros. Essas caixas receberam um cano com perfurações a cada dois cm pra o recolhimento do lixiviado, foram forradas com pedra brita para evitar a entrada de partículas sólidas no cano e as britas foram cobertas com uma fina camada de tecido tule. Sob esse tule foram adicionados Biomix, Latossolo ou Nitossolo. Para elaboração do Biomix foi realizada mistura de palha, turfa e latossolo na proporção de 2:1:1.

Após bem misturado, o Biomix foi acondicionado dentro das caixas, recebendo posteriormente uma cobertura de gramíneas, consistindo nos *Biobeds* pilotos. Os solos foram peneirados em peneira de 4mm e em seguida acondicionados nas caixas para posterior comparação com as caixas de Biomix (Figura 22).

Figura 22 - *Biobeds* pilotos no Brasil. A) Vista lateral do *Biobed* e cano de saída do lixiviado; B) Cano com pequenas perfurações para posterior saída do efluente; Após isso, é acrescida camada de brita fina, para preenchimento com Biomix e cobertura vegetal nativa como mostra a Figura C; ou pelo solo conforme Figura D.



Fonte: Produção da autora, 2015.

7.2.2 SOLOS NATURAIS

Os solos utilizados foram um Nitossolo Bruno, oriundo de Campo belo do Sul, SC, em área de pastagem nativa, enquanto que o Latossolo Bruno foi coletado no Município de Vacaria, RS, em área de antigo pomar de maçãs na Embrapa Uva e Vinho. Os solos foram passados em peneira de malha de

4mm. As características químicas e físicas foram descritas no Capítulo I desta dissertação na Tabela 1.

7.2.3 CONTAMINAÇÃO

Ao longo da safra 2014/2015 de Maçã na região de Vacaria-RS, os *Biobeds* receberam seis descartes de efluentes produzidos das sobras dos tanques dos pulverizadores e efluentes da lavagem externa das máquinas e equipamentos após aplicação de agrotóxicos comerciais no pomar (Lorsban (Clorpirifós) e Dithane NT (Mancozebe)), conforme a Tabela 5.

Tabela 5 - Data de aplicação dos agrotóxicos e concentração.

| Data da aplicação no pomar | Agrotóxico aplicado |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| 16/12/2013 | Lorsban (250 ml /100 Litros) |
| 06/03/2014 | Dithane NT (400g / 100 Litros) |
| 07/03/2014 | Lorsban (250 ml /100 Litros) |
| 10/03/2014 | Lorsban (250 ml /100 Litros) |
| 14/03/2014 | Dithane NT (400g / 100 Litros) |
| 17/03/2014 | Lorsban (250 ml /100 Litros) |

Fonte: Estação Experimental Embrapa Uva e Vinho, Vacaria, RS, 2014.

A sobra de calda do tanque se deve à deficiência de precisão dos equipamentos comerciais de pulverização, nos quais, mesmo após serem devidamente calibrados para aplicação de produto sobre uma área, é comum haver tal sobra. Essa calda e as lavagens dos equipamentos feitas após a execução do tratamento fitossanitário no campo compunham o efluente depositado nos reatores, sendo que cada um deles recebeu uma alíquota de 50 litros, distribuído homogeneamente sobre a superfície dos *Biobeds* e nas parcelas com os dois solos.

Para os ensaios ecotoxicológicos, foram realizadas

coletas ao longo do tempo, sendo uma coleta anterior à primeira aplicação de agrotóxicos (tempo 0), aos 90, 270 e 420 dias após o primeiro descarte de efluente. Os substratos foram encaminhados da Estação Experimental da Embrapa Uva e Vinho Vacaria, RS, para o Laboratório de Ecologia do Solo na Universidade do Estado de Santa Catarina, UDESC, Centro de Ciências Agroveterinárias CAV, Lages, SC, onde foram armazenadas em ultrafreezer, a -80°C para evitar degradação dos agrotóxicos até sua utilização para realização dos ensaios.

Nos *Biobeds* em que houve simulação do derrame acidental, foi utilizado o agrotóxico comercial Lorsban 480BR®, que tem como principal ingrediente ativo o Clorpirifós (480 g/L), sendo utilizado a dose de 500 mL de produto para cada caixa, com uma contaminação única do produto.

7.2.4 ORGANISMOS E CONDIÇÕES DOS ENSAIOS

Para os ensaios foram utilizados organismos do laboratório de Ecologia do Solo, UDESC/CAV de três diferentes espécies: *Folsomia candida* (Colembolla) *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae) e *Eisenia andrei* (Lubricidae), cultivados em sala fechada com fotoperíodo de 08/16 horas de luz/escuro e temperatura de $20^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}$, conforme protocolos ISO. Os solos foram levados à umidade entre 40 e 60% da sua capacidade de retenção, sendo corrigida de dois em dois dias com a finalidade de mantê-la até o fim dos ensaios.

O método de manutenção das culturas, bem como a condução dos ensaios seguiu a descrição anteriormente realizada no Capítulo I desta dissertação, sendo conduzidos ensaios de reprodução.

7.2.5 ANÁLISE DOS DADOS

Para os ensaios de reprodução, as diferenças entre os tratamentos com e sem descarte de efluente foram avaliadas através de análise de variância (ANOVA One-way) seguida pelo teste de médias de Duncan ($p < 0,05$) para verificar se houve redução da toxicidade do efluente no Biomix e nos solos, ao longo do tempo. Para isso foi utilizado o Software Statística 7.0 (STATSOFT, 2004).

Para a análise da diferença entre o controle e o Biomix contaminado uma única vez, realizou-se t-teste usando o Software Statística 7.0 (STATSOFT, 2004) e calculou-se a diferença entre os dois para cada coleta fazendo a média geométrica de cada tempo.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1 *Biobeds* x Solos naturais

7.3.1.1 Validação dos ensaios

Os ensaios com colêmbolos cumpriram o critério de validação da norma ISO 11267 (1999), onde no solo controle (SAT) a mortalidade dos adultos não pode ser superior a 20%; a taxa de reprodução mínima de 100 colêmbolos por amostra deve ser considerada; e o coeficiente de variação não pode exceder 30%.

Para os enquitreídeos, os critérios de validação que foram cumpridos são referentes a normatização ISO 16387 (2004), onde no solo controle (SAT), a mortalidade dos adultos não pode ser superior a 20%; a média de juvenis deve ser maior que 25 indivíduos; e o coeficiente de variação não pode exceder 50% no SAT.

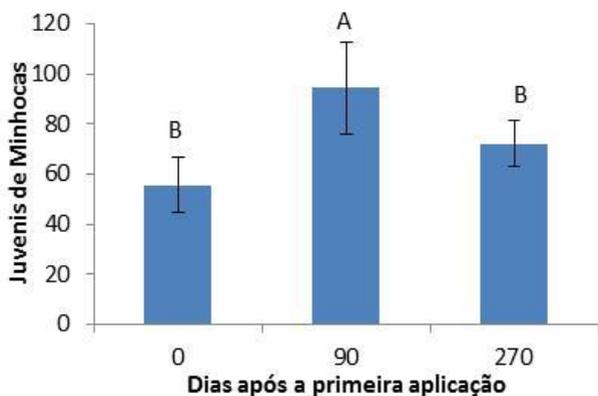
Os ensaios com as minhocas atenderam o critério de validação do protocolo 11268-2 (1996), sendo no controle

(SAT) a taxa de reprodução mínima de 30 juvenis; o coeficiente de variação não pode exceder 30%; e a porcentagem de mortalidade dos adultos não pode ser $\geq 10\%$

7.3.1.2 Biomix

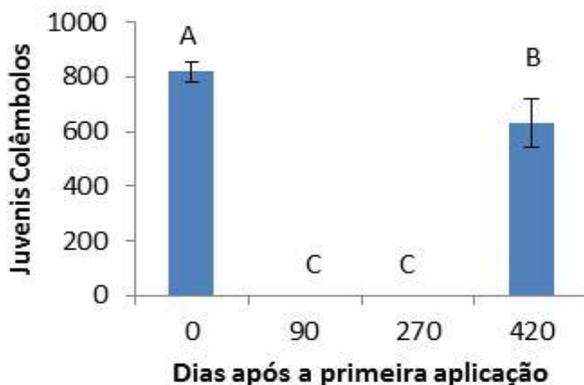
O resíduo testado não apresentou toxicidade às minhocas ao longo do tempo com exposição ao Biomix contaminado, sendo o último tempo de coleta não diferente estatisticamente do controle (Figura 23). Para os colêmbolos, no entanto, o efluente de Clorpirifós e Mancozebe foi extremamente tóxico nas primeiras coletas (Figura 24), mesmo sendo este efluente da lavagem um produto muito diluído da dosagem aplicada a campo.

Figura 23 - Resultado do ensaio de reprodução com Minhocas (*Eisenia andrei*) quando expostas ao Biomix com adição continuada de Clorpirifós e Mancozebe ao longo da safra de maçã. Letras iguais possuem médias que não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste de Duncan.



Fonte: Produção da autora, 2015.

Figura 24 - Resultado do ensaio de reprodução com Colêmbolos (*Folsomia candida*) quando expostos ao Biomix com adição continuada de Clorpirifós e Mancozebe ao longo da safra de maçã. Letras iguais possuem médias que não diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo ensaio de Duncan.



Fonte: Produção da autora, 2015.

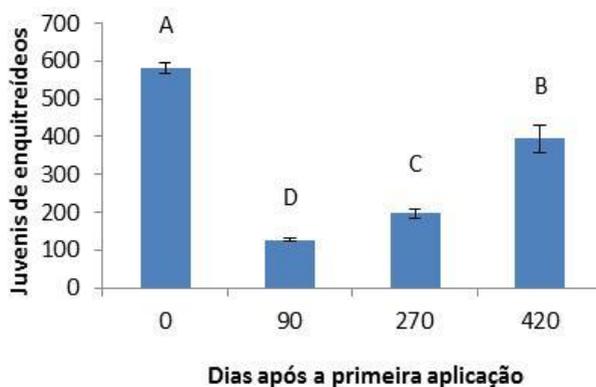
Estudos comprovam a elevada toxicidade de organofosforados aos colêmbolos (SANTOS et al., 2012; NATAL-DA-LUZ et al., 2012) com dosagens inferiores a 1 mg kg^{-1} de solo. Quanto a toxicidade de Mancozebe para colêmbolos, estudos restringem-se ao Capítulo I desta dissertação, que mostra em Latossolo uma $CL_{50} = 49,76 \text{ mg i.a. kg}^{-1}$, ou seja, foram necessários quase 50 mg do ingrediente ativo para reduzir 50% da população, ao passo que a $CE_{50} = 3,03 \text{ mg i.a. kg}^{-1}$, sendo necessárias apenas 3 mg do produto para afetar a reprodução dos colêmbolos. No entanto tratando-se do Nitossolo, essa sensibilidade foi muito menor ($CL_{50} > 1000$ e $CE_{50} > 100 \text{ mg i.a. kg}^{-1}$), sendo possível concluir que o tipo de solo utilizado nos ensaios pode ser determinante na toxicidade de produtos. Baixa toxicidade dos Ditiocarbamatos para testes letais e subletais aos colêmbolos foi comprovada em

mistura com outros fungicidas em solo artificial (SAT) (ALVES et al., 2014).

Mesmo no último tempo de coleta, período de menor toxicidade, ainda houve diferenças significativas do controle. No entanto, o aumento da taxa de reprodução em relação aos demais tempos aponta que, ao longo do tempo, o substrato contaminado perca sua toxicidade aos colêmbolos.

Para os enquitreídeos a toxicidade inicial foi menor que para os colêmbolos e maior em comparação com as minhocas (Figura 25).

Figura 25 - Resultado do ensaio de reprodução com Enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*) quando expostos ao Biomix com adição continuada de Clorpirifós e Mancozebe ao longo da safra de maçã. Letras iguais possuem médias que não diferem estatisticamente pelo ensaio de Duncan.



Fonte: Produção da autora, 2015.

Percebe-se que ao longo do tempo os enquitreídeos expostos ao Biomix contaminado foram aumentando sua taxa de reprodução, indicando para uma redução da toxicidade do substrato. Embora até o presente sejam escassos os trabalhos na literatura envolvendo enquitreídeos com ditiocarbamatos,

estudos apontam para sensibilidade ao manganês (KUPERMAN et al. 2004), principal elemento de agrotóxicos deste grupo químico. Para organofosforados, Natal-da-Luz et al., (2012) apontaram inexistência de toxicidade em enquitreídeos, embora o Capítulo II desta mesma dissertação mostre que em solos naturais, conforme a metodologia aplicada, o Clorpirifós pode ser tóxico aos enquitreídeos.

No entanto, mais estudos são necessários expondo estes organismos a agrotóxicos deste e de outros grupos e ainda, salienta-se a ausência de literatura expondo estes organismos a misturas de agrotóxicos, que por vezes ocorrem a campo.

Estes são os primeiros resultados envolvendo ensaios ecotoxicológicos com o biomix, sendo necessários mais testes para averiguar a eficiência deste composto em não disponibilizar os agrotóxicos para a fauna do solo.

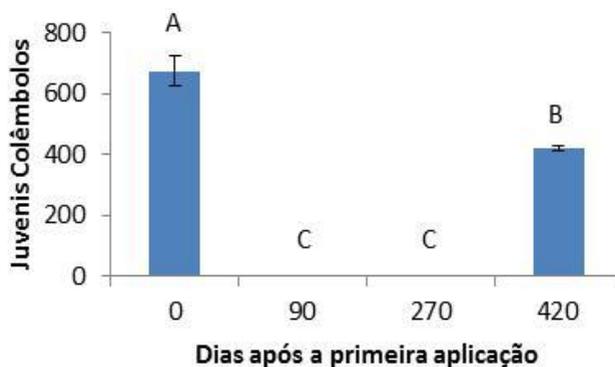
7.3.1.3 Nitossolo

O Nitossolo contaminado não apresentou toxicidade às minhocas em nenhum tempo de coleta, não sendo estatisticamente diferente do controle tanto os 90 quanto os 270 dias após a primeira aplicação.

A diluição dos agrotóxicos, aliada as características deste solo podem ter contribuído para o resultado apresentado, visto que as minhocas já apresentaram-se sensíveis aos organofosforados (DE SILVA et al., 2009; SANTOS et al., 2012), enquanto que no geral, não são tão sensíveis ao Mancozebe (VERMUELEN et al., 2001; REINECKE et al., 2002; DE SILVA et al., 2010; GARCÍA-SANTOS et al., 2011).

Para os colêmbolos, os resultados em Nitossolo assemelham-se àqueles observados no substrato Biomix, com alta toxicidade nos primeiros dias após a aplicação e o início da redução da toxicidade após 420 dias (Figura 26).

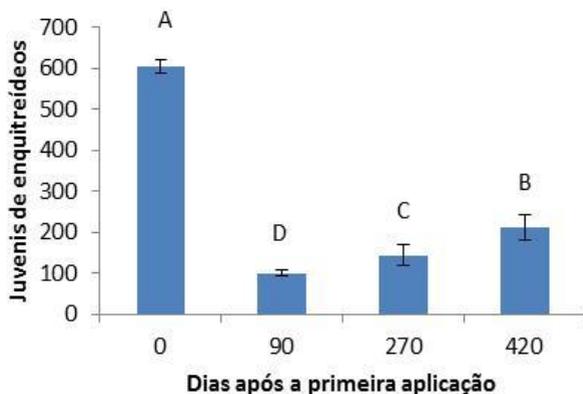
Figura 26 - Resultado do ensaio de reprodução com Colêmbolos (*Folsomia candida*) quando expostos ao Nitossolo com adição continuada de Clorpirifós e Mancozebe ao longo da safra de maçã. Letras iguais possuem médias que não diferem estatisticamente pelo ensaio de Duncan.



Fonte: Produção da autora, 2015.

Para os enquitreídeos os resultados apontam uma diferença de sensibilidade dos organismos ao efluente da lavagem do tanque pulverizador com resíduos de Clorpirifós e Mancozebe, bem como da redução da toxicidade oferecida pelo Nitossolo contaminado ao longo do tempo para todos os organismos testados, sendo semelhantes aos resultados do biomix (Figura 27).

Figura 27 - Resultado do ensaio de reprodução com Enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*) quando expostos ao Nitossolo com adição continuada de Clorpirifós e Mancozebe ao longo da safra de maçã. Letras iguais possuem médias que não diferem estatisticamente pelo ensaio de Duncan.

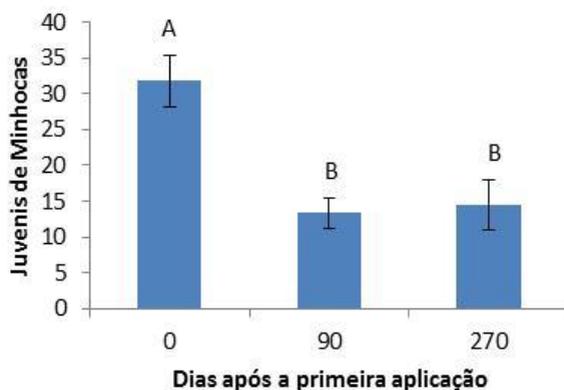


Fonte: Produção da autora, 2015.

7.3.1.4 Latossolo

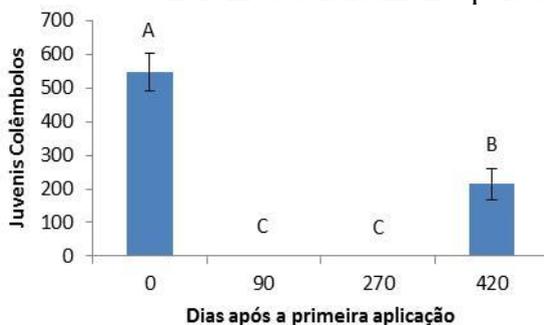
Diferente do que aconteceu no Biomix e também no Nitossolo, o Latossolo contaminado pelo efluente da lavagem ofereceu toxicidade às minhocas nos dois períodos de coleta (Figura 28). Para os colêmbolos, os resultados assemelharam-se aos encontrados para Biomix e também para Nitossolo, (Figura 29). Já para os enquitreídeos, não houve redução de toxicidade ao longo do tempo em Latossolo, diferente do que ocorreu no Biomix e também no Nitossolo (Figura 30).

Figura 28 - Resultado do ensaio de reprodução com Minhocas (*Eisenia andrei*) quando expostas ao Latossolo com adição continuada de Clorpirifós e Mancozebe ao longo da safra de maçã. Letras iguais possuem médias que não diferem estatisticamente pelo ensaio de Duncan.



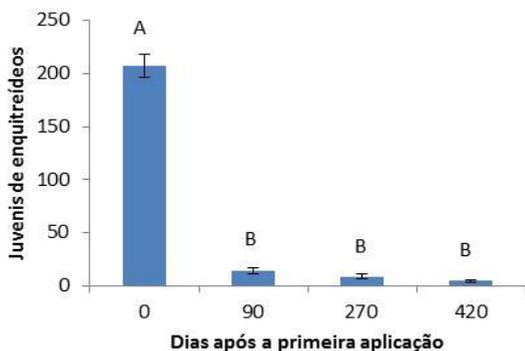
Fonte: Produção da autora, 2015.

Figura 29 - Resultado do ensaio de reprodução com Colêmbolos (*Folsomia candida*) quando expostos ao Latossolo com adição continuada de Clorpirifós e Mancozebe ao longo da safra de maçã. Letras iguais possuem médias que não diferem estatisticamente pelo ensaio de Duncan.



Fonte: Produção da autora, 2015.

Figura 30 - Resultado do ensaio de reprodução com Enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*) quando expostos ao Latossolo com adição continuada de Clorpirifós e Mancozebe ao longo da safra de maçã. Letras iguais possuem médias que não diferem estatisticamente pelo ensaio de Duncan.



Fonte: Produção da autora, 2015.

A textura do solo pode interferir na capacidade do solo reter poluentes (KRAEMER et al., 2009) então uma hipótese levantada é que a diferença de textura entre os solos pode ter interferido na disponibilidade dos agrotóxicos para Latossolo e Nitossolo, já que solos mais argilosos normalmente possuem maior capacidade de retenção (HILLEL, 1998).

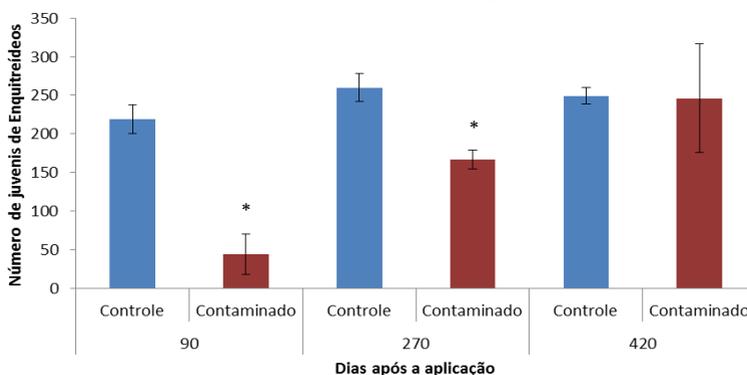
Algumas outras características são importantes na determinação da disponibilidade química e biológica de poluentes no solo, como o pH, o potencial de oxi-redução, concentração de ligantes orgânicos e inorgânicos aos quais um metal, por exemplo, pode se ligar ou adsorver (AZEVEDO & CHASIN, 2004), e também a presença de cátions (Ca^{2+} , Fe^{2+} e Mg^{2+}), pois sua presença na solução do solo proporciona a competição entre eles pelos sítios de adsorção (MARTINEZ et al., 2001). O Mancozebe, que é composto principalmente de Manganês e Zinco – 80% (DOW AGRO, 2015) poderia ser mais disponibilizado na presença cátions competidores. Essa

seria uma hipótese para a grande diferença na reprodução entre dois solos contaminados – Apesar de pH e matéria orgânica serem muito similares, a alta quantidade de cátions do Latossolo poderia influenciar numa baixa adsorção, e então maior disponibilidade desse agrotóxico.

7.3.2 *Biobeds* contaminação única: Simulação de derrame acidental.

Para os enquitreídeos, os resultados apontaram para redução da toxicidade do substrato contaminado ao longo do tempo (Figura 31), sendo a diferença entre biomix contaminado e controle totalmente eliminada de acordo com uma média da diferença negativa – o último tempo conseguiu sobressair-se ao controle.

Figura 31 - Resultado do ensaio de reprodução com Enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*) quando expostos ao Latossolo com adição continuada de Clorpirifós e Mancozebe ao longo da safra de maçã. Letras iguais possuem médias que não diferem estatisticamente pelo ensaio de Duncan.

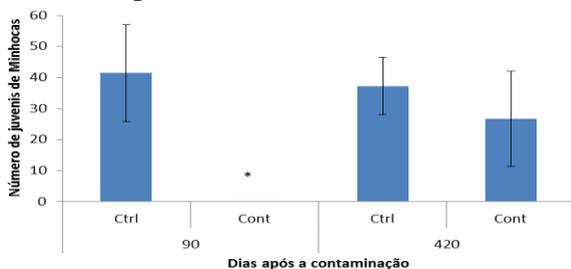


Fonte: Produção da autora, 2015.

O Biomix contaminado apresentou menor toxicidade aos organismos quando comparado aos solos no item anterior. Os efeitos do Clorpirifós aos enquitreídeos em solos naturais já foram medidos em laboratório pelo Capítulo I deste trabalho, e fica evidente que quando em contato com o sistema natural, a contaminação por agrotóxicos afeta de forma negativa a fauna edáfica, sendo que este resultado demonstra que o manuseio de agrotóxicos sob *Biobeds* pode ser uma alternativa na redução da contaminação pontual, podendo ao longo do tempo eliminar a toxicidade inicialmente oferecida.

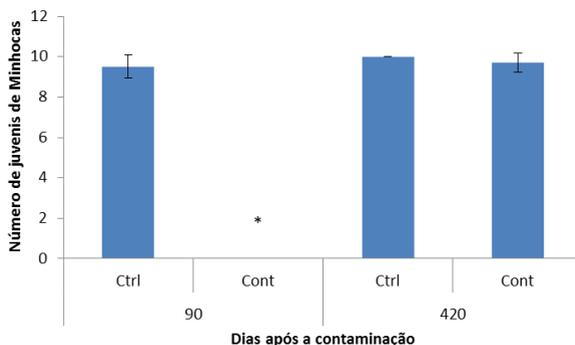
Para as minhocas, ocorreu redução da toxicidade, demonstrado pela redução da diferença entre o controle e o substrato contaminado ao longo do tempo. A toxicidade, no entanto, ainda não teria sido completamente eliminada ao longo dos 420 dias, diferentemente do que ocorreu com os enquitreídeos. Contudo, as minhocas mostraram um aumento da taxa de reprodução ao longo do tempo (Figura 32), e alta taxa de sobrevivência (Figura 33). Para os colêmbolos, a redução da toxicidade não ocorreu, mantendo-se elevada mesmo após os 420 dias da aplicação (Figura 35).

Figura 32 - Reprodução de Minhocas ao longo do tempo em Biomix contaminado e controle, após adição de 500mL do produto formulado Lorsban. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle pelo teste de Dunnett.



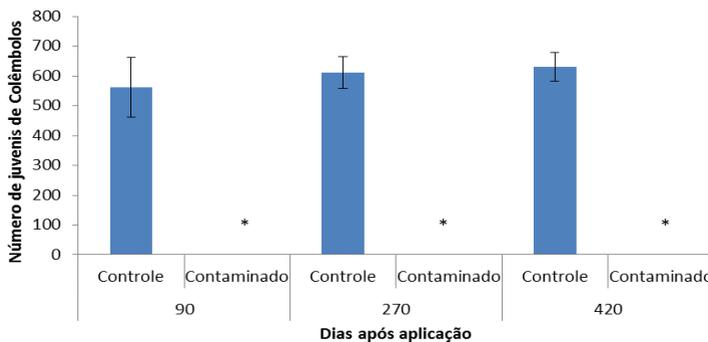
Fonte: Produção da autora, 2015.

Figura 33 - Letalidade de Minhocas ao longo do tempo em Biomix contaminado e controle, após adição de 500mL do produto formulado Lorsban. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle pelo teste de Dunnett.



Fonte: Produção da autora, 2015.

Figura 34 - Reprodução de Colêmbolos ao longo do tempo em Biomix contaminado e controle, após adição de 500mL do produto formulado Lorsban. Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle pelo teste de Dunnett.



Fonte: Produção da autora, 2015.

Já é conhecida a alta sensibilidade dos colêmbolos aos organofosforados, de forma que provavelmente a redução da toxicidade aos colêmbolos não foi atingida pela necessidade de maior tempo para biodegradação do produto, visto que um pequeno resíduo de Clorpirifós é capaz de causar alta toxicidade nesse grupo da fauna edáfica.

No solo, a meia-vida do Clorpirifós pode variar de 14 dias a mais de um ano, dependendo das condições climáticas, características do solo, etc. Um dos produtos da hidrólise do clorpirifós é o 3,5,6,-triclora-2-piridíol (TCP), que é mais solúvel em água que a molécula original, podendo mais facilmente sofrer lixiviação e ainda, se no solo, pode prejudicar o processo de degradação pela alta atividade antimicrobiana, sendo persistente à degradação por microrganismos (ANWAR et al., 2009). O Clorpirifós ainda pode oxidar a oxon, que são mais tóxicos e geralmente mais potentes na inibição de acetilcolinesterase que os compostos percursores (organofosforados) (WU & LINDEN, 2003; KRALJ et al., 2007), sendo outra hipótese levantada, que as características físico-químicas do solo podem ter permitido que a molécula permanecesse disponível no substrato numa forma cada vez mais tóxica ao longo do tempo.

7.4 CONCLUSÃO

As minhocas foram menos sensíveis a adição continuada de resíduos de Clorpirifós e Mancozebe que os outros organismos, sendo unicamente os resultados em Latossolo diferentes do controle. Por outro lado, os colêmbolos se mostraram extremamente sensíveis ao resíduo, só sobrevivendo no substrato após 420 dias da primeira aplicação. Os enquitreídeos mostraram uma boa recuperação ao longo do tempo para o Biomix e para o Nitossolo. No entanto, a toxicidade no Latossolo durante o tempo foi mantida, sendo

este solo aparentemente mais tóxico aos organismos quando na presença de resíduos da lavagem do tanque pulverizador.

Em geral, os resultados de exposição dos organismos ao Biomix demonstraram que, ao longo do tempo este substrato pode reduzir, ou mesmo eliminar a toxicidade que é oferecida pelo efluente da lavagem do tanque pulverizador com resíduos de Clorpirifós e de Mancozebe.

Embora possamos conhecer os efeitos dos agrotóxicos de forma isolada, no campo, essa realidade é bastante diferente, sendo necessária a integração dos agrotóxicos utilizados no *Biobed*, já que este receberá resíduos de todos os tipos de inseticidas, fungicidas, herbicidas, e todos os grupos que possam ser utilizados.

Embora o resíduo oriundo da lavagem do pulverizador não seja considerado na legislação brasileira vigente, este estudo apontou uma alta toxicidade deste resíduo, especialmente para o Latossolo, considerado empiricamente não tóxico devido a sua alta diluição (Dosagens de Clorpirifós podem ser 250mL para 100 L. Quando adicionada água para lavagem essa diluição é muito aumentada). Há de se considerar que ele possui os mesmos agrotóxicos já apontados na literatura por muitos pesquisadores como tóxicos para diversos organismos da fauna edáfica.

O Biomix pode ser uma alternativa de local para manuseio de agrotóxicos, visto que estes produtos oferecem toxicidade a fauna do solo. Ao longo do tempo, o biomix mostrou ser capaz de reduzir/eliminar a toxicidade dos agrotóxicos a alguns dos organismos testados, sendo necessário maior tempo do resíduo no *Biobed* para completa eliminação da toxicidade destes resíduos à fauna edáfica.

REFERÊNCIAS

ALVES, P.R.L.; CARDOSO, E.J.B.N.; MARTINES, A.M.; SOUSA, J.P.; PASINI, A. **Seed dressing pesticides on springtails in two ecotoxicological laboratory tests.** *Ecotoxicology and environmental safety*, 105:65-71. 2014.

ANDRÉA, M. M.; PAPINI, S.; PERES, T. B.; BAZARIN, S.; SAVOY, V. L. T.; MATALLO, M. B. **Glyphosate: influência na bioatividade do solo e ação de minhocas sobre sua dissipação em terra agrícola.** *Planta Daninha*, 22:95-100, 2004.

AZEVEDO F.A. de. & CHASIN A.A.M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia.** São Carlos. São Paulo: RiMa, 2003.

Banco Regional de Desenvolvimento do Extremo Sul – BRDE. **Cadeia produtiva da maçã: produção, armazenagem, comercialização, industrialização e financiamentos do BRDE na região sul do Brasil.** Porto Alegre: BRDE, 65 p., 2005.

BITTENCOURT, C.C.; MATTEI, L.F.; SANT'ANNA, P.R.; LONGO, O.C.; BARONE, F.M. **A cadeia produtiva da maçã em Santa Catarina: competitividade segundo produção e packing house.** Rio de Janeiro: RAP, 4:1199-222. 2011.

BNDES – INFORMATIVO TÉCNICO SEAGRI. Nº 2. **Fruticultura: A produção de maçã no Brasil.** 2010.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de Julho de 1989. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/17802.htm. Acesso em: 10/2013.

CASTILLO, M. D. P.; TORSTENSSON, L.; STENSTRÖM, J. **Biobeds for environmental protection from pesticide use – a review**. Journal of Agriculture and Food Chemistry. v 56, p. 6206-6219, 2008.

COPPOLA, L.; CASTILLO, M. D. P.; VISCHETTI, C. **Degradation of isopropuron and bentazone in peat- and compost based biomixtures**. Pest Management Science, 67:107-113, 2011.

CORDEIRO, C.A.M; COUTINHO P.O. **Descontaminação de pulverizadores agrícolas**. Disponível em: <http://www.setapulverizacao.com.br/artigos/DescontaminacaoDePulverizadoresAgricolas.pdf> Acesso em: 06/2015.

DE SILVA, P.M.C.S.; PATHIRATNE, A.; VAN GESTEL, C.A.M. **Toxicity of chlorpyrifos, carbofuran, mancozeb and their formulations to the tropical earthworm *Perionyx excavatus*** . Applied Soil Ecology, 44:56-60, 2010.

DIEZ, M. C. **Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants**. Journal of soil science and plant nutrition, 10:244-267, 2010.

DOW AGROSCIENCES. Disponível em: http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDAS/dh_092a/0901b8038092a7ea.pdf?filepath=br/pdfs/noreg/013-05100.pdf&fromPage=GetDoc. Acesso em 07/2014.

FAIT, G.; NICELLI, M.; FRAGOULIS, G.; TREVISAN, M.; CAPRI, E. **Reduction of point contamination sources of pesticide from a vineyard farm.** Environmental Science & Technology, 41:3302-3308, 2007.

FOGG, P.; BOXALL, A. B. A.; WALKER, A.; JUKES, A. **Pesticide degradation in a *Biobed* composting substrate.** Pest Management Science, 59:527-537, 2003.

GARCÍA-SANTOS, G.; Keller-Forrer, K. **Avoidance behaviour of *Eisenia fetida* to carbofuran, chlorpyrifos, mancozeb and metamidophos in natural soils from the highlands of Colombia.** Chemosphere, 84:651-6, 2011.

GEBLER, L.; FIALHO, F.B. **Introduzindo critérios de risco em modelos de contaminação pontual para locais de carga de agrotóxicos.** Pesticidas: ecotoxicologia e meio ambiente, 21:85-94, 2011.

GREGOIRE, C.; ELSAESSER, D.; HUGUENOT, D.; LANGE, J.; LEBEAU, T.; MERLI, A.; MOSE, R.; PASSEPORT, E.; PAYRAUDEAU, S.; SHÜTZ, T.; SCHULZ, R.; TAPIA-HELWEG, A.; BAY, H.; HANSEN, H. P. B.; RABOLLE, M.; SONNENBORG, A.; STENVANG, L. **Pollution at and below sites used for mixing and loading of pesticides.** International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 82:583-590, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. Disponível em: www.ibge.gov.br. Acesso em 09/2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção Agrícola Municipal: Culturas Temporárias e Permanentes.** Brasil. v 37, 2010.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, ISO - **Soil quality - Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) 11268-2.1,** Geneva, 1998.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, ISO - **Soil quality — Inhibition of reproduction of Collembola.** 11267, Geneva, 1999

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, ISO - **Soil quality – Effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus sp.*) –**

Determination of Effects on Reproduction and Survival. ISO 16387. Geneva, 2004.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, ISO - **Soil quality - Effects of pollutants on earthworms** (*Eisenia fetida*) 11268-2.2: 1998.

KARANASIOS, E. C.; TSIROPOULOS N. G.; KARPOUZAS, D. G. **Quantitative and qualitative differences in the metabolism of pesticides in *Biobed* substrates and soil.** Chemosphere, 93:20–28, 2013.

KUPERMAN, R.G.; CHECKAI, R.T.; SIMINI, M.; PHILLIPS, C.T. **Manganese toxicity in soil for *Eisenia fetida*, *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta), and *Folsomia candida* (Collembola).** Ecotoxicology and Environmental Safety, 57:48-53, 2004.

MONACI, E.; COPPOLA, L.; CASUCCI, C.; PERUCCI, P.; VISCHETTI, C. **Retention capacity of an organic bio-mixture against different mixtures of fungicides used in vineyards.** Journal of environmental Science and Health Part B., 44:724-729, 2009.

NATAL-DA-LUZ, T.; MOREIRA-SANTOS, M.; RUEPERT, C.; CASTILLO, L.E.; RIBEIRO, R.; SOUSA, J.P. **Ecotoxicological characterization of a tropical soil after diazinon spraying.** Ecotoxicology, 21:p. 2163-76, 2012.

RAMWELL, C.; JOHNSON, P. D.; BOXALL, A. B. A.; RIMMER, D. **Pesticide residues on the external surfaces of field crop sprayers: Environmental impact.** Pest Management Science, 60:795-802, 2004.

REICHENBERGER, S.; BACH, M.; SKITSCHAK, A.; FREDE, H. G. **Mitigation strategies to reduce inputs into ground - and surface water and their effectiveness; A review.** Science of the Total Environment, 384:1-35, 2007.

REINECKE, A. J.; MABOETA, M. S.; VERMEULEN, L. A.; REINECKE, S. A. **Assessment of Lead Nitrate and Mancozeb Toxicity in Earthworms Using the Avoidance Response.** Environmental Contamination and Toxicology, 68:779–786, 2002.

REINECKE, S.A.; REINECKE, A.J. **The impact of organophosphate pesticides in orchards on earthworms in the Western Cape, South Africa.** Ecotoxicology and environmental safety, 66:244-51, 2007.

ROFFIGNAC, L.; CATTAN, P.; MAILLOUX, J.; HERZOG, D.; BELLEC, F.L. **Efficiency of a bagasse substrate in a biological bed system for the degradation of glyphosate, malathion and lambda-cyhalotrin under tropical climate conditions.** Pest Management Science, 64:1303-1313, 2008.

RUFATO, L.; ROSSI, A. DE; LOECK, A.E. **Pátio de preparação de caldas de pulverização e eliminação de resíduos de agrotóxicos.** UFPel – UDESC – 2006. Disponível

em: www2.ufpel.edu.br/pif/wp.../01/Local-de-preparo-de-agrotóxicos.pdf

SANTOS, M. J. G.; FERREIRA, M. F. L.; CACHADA, A.; DUARTE, A. C.; SOUSA, J. P. **Pesticide application to agricultural fields: effects the reproduction and avoidance behaviour of *Folsomia candida* and *Eisenia andrei*.** *Ecotoxicology*, 21:2113–2122, 2012.

SPLIID, N. H.; HELWEG, A.; HEINRICHSON, K. **Leaching and degradation of 21 pesticides in a full-scale model *Biobed*.** *Chemosphere*, 65:2223-2232, 2006.

STATSOFT, Inc., STATISTICA (Data analysis software system). Version 7. www.statsoft.com. Software Statistica 7.0, 2004.

United Kingdom. System *Biobed*: The natural Solution. Disponível em: < <http://www.Biobed.co.uk>>. Acesso em: 09/2013.

VERMEULEN, L.A.; REINECKE, A.J.; REINECKE, S.A. **Evaluation of the fungicide manganese-zinc ethylene bis(dithiocarbamate) (mancozeb) for sublethal and acute toxicity to *Eisenia fetida* (*Oligochaeta*).** *Ecotoxicology and environmental safety*, 48:183-9, 2001.

VISCHETTI, C.; MONACI, E.; CARDINALI, A.; PERUCCI, P. **The effect of initial concentration, co-application and repeated applications on pesticide degradation in a *Biobed* mixture.** Chemosphere, 72:1739-1743, 2008.

WONG, F. P.; WILCOX, W.F. **Comparative physical modes of action of azoxystrobin, mancozeb, and metalaxyl against *Plasmopara viticola* (grapevine downy mildew).** Plant Disease. 85:649-656, 2001.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os pesticidas Clorpirifós e Mancozebe, bem como seus resíduos, oferecem risco à fauna edáfica, sendo que a toxicidade é relacionada com o solo utilizado e também o tempo de exposição do organismo, e por esta razão, ensaios de letalidade por vezes não demonstram toxicidade de agrotóxicos à fauna, todavia, quando em ensaios subletais de reprodução, a toxicidade pode ser extremamente alta, de forma que são necessários mais que ensaios letais para efetivamente fazer inferências corretas acerca do risco de um produto em contato com o solo.

As minhocas, único organismo utilizado no credenciamento de agrotóxicos no Brasil, mostraram-se menos sensíveis que os outros organismos, o que demonstra uma necessidade de inclusão de ensaios com outros grupos de invertebrados para verificação da toxicidade de agrotóxicos aos organismos do solo.

Os organismos testados apresentam claramente sensibilidades diferentes, de maneira que a utilização de mais de um organismo é necessária para uma visão mais adequada do risco dos produtos. Além dos organismos utilizados neste estudo, são interessantes outros grupos da fauna edáfica, como os ácaros, para um melhor entendimento dos impactos no ecossistema, e ainda organismos nativos de solos tropicais, que podem diferir quanto a sensibilidade de organismos utilizados nos protocolos ISO.

Os leitos biológicos (*Biobeds*) são uma alternativa viável e ecologicamente adequada para disposição de resíduos oriundos do manuseio e lavagem de equipamentos utilizados na aplicação de agrotóxicos, oferecendo, ao longo do tempo, menor toxicidade que um descarte direto em solo aos organismos da fauna edáfica.