

VANESSA MIGNON DALLA ROSA

**AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DO FUNGICIDA CLOROTALONIL E DO
INSETICIDA CLORPIRIFÓS EM SOLOS SUBTROPICAIS BRASILEIROS**

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

Orientador: Dr. Dilmar Baretta

**LAGES, SC
2018**

**Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC**

Mignon Dalla Rosa, Vanessa
Avaliação de toxicidade do fungicida clorotalonil
e do inseticida clorpirifós em solos subtropicais
brasileiros / Vanessa Mignon Dalla Rosa. - Lages ,
2018.
81 p.

Orientador: Dilmar Baretta
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências
Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em
Ciência Do Solo, Lages, 2018.

1. Agrotóxicos. 2. Ecotoxicologia terrestre. 3.
Fauna edáfica. 4. SSD. I. Baretta, Dilmar . II.
Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa
de Pós-Graduação. III. Título.

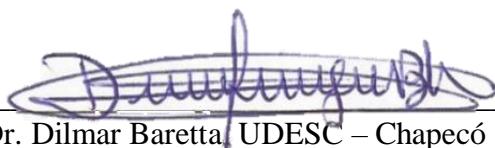
VANESSA MIGNON DALLA ROSA

**AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE DO FUNGICIDA CLOROTALONIL E DO
INSETICIDA CLORPIRIFÓS EM SOLOS SUBTROPICAIS BRASILEIROS**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo da Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC.

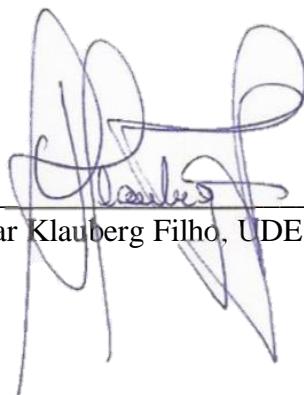
Banca Examinadora:

Orientador:



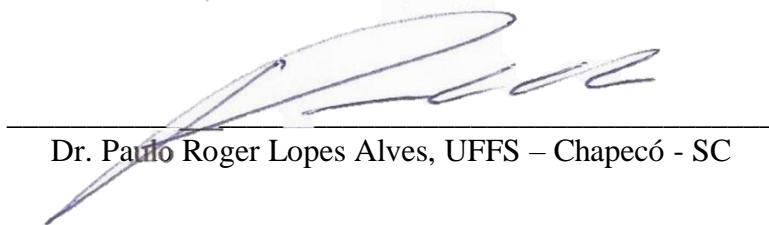
Dr. Dilmar Baretta, UDESC – Chapecó - SC

Membro interno:



Dr. Osmar Klauberg Filho, UDESC – Lages - SC

Membro externo:



Dr. Paulo Roger Lopes Alves, UFFS – Chapecó - SC

Lages, SC 20 de fevereiro de 2018.

Dedico,

Aos meus pais, meus pais Lino e Areonice e, aos meus pais italianos Maria Donata e Mauro que amo tanto, por acreditarem e sempre me incentivarem a realizar meus sonhos.

Aos meus irmãos de sangue e aos que eu escolhi, Daniela, Geronimo, Diego, Daiana, Heloisa e Ana, a distância nunca foi empecilho para me sentir perto de vocês meus queridos.

Em especial, aos meus seis avós que amarei eternamente.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu a vida e sempre colocou pessoas maravilhosas no meu caminho.

Aos meus amados pais e irmãos que sempre me proporcionaram uma vida cheia de felicidade, me permitiram fazer as minhas escolhas, me dão apoio, conselhos e estiveram comigo sempre! Enfim, por serem os melhores do MUNDO!

Ao meu Professor e orientador Dr. Dilmar Baretta, por ter me mostrado o mundo científico e a Ecotoxicologia, por ser um profissional e uma pessoa exemplar. Agradeço a oportunidade de ser sua orientada.

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo – CAV/UDESC pelos ensinamentos e, em especial ao Prof. Dr. Osmar Klauberg Filho, por todo apoio, orientação e assistência durante o desenvolvimento e a execução projeto.

A pesquisadora Dra. Cintia Carla Niva, da Embrapa Cerrados, por nos enviar as culturas de enquireídeos, possibilitando a realização deste experimento. Ao pesquisador Dr. Juliano Corulli Correa, da Embrapa Suínos e Aves, por nos conceder parte dos solos utilizados para esta pesquisa. Ao Prof. Dr. José Paulo Sousa, pelo auxílio nas tomadas de decisões durante o período de desenvolvimento e execução do projeto.

Quero agradecer em especial aos colegas e amigos que estavam o tempo todo fazendo parte dessa caminhada, por grandes aprendizados e também momentos de descontração Dani Barbie, Rafinha, Marizinha, Eduardo, Márcio, Ana Maccari e Letícia, vocês fizeram essa experiência ter um sentido todo especial.

A todos os colegas do Laboratório de Ecologia do Solo, Aline (*homemate* linda!), Ana, Ana Lova, Bethânia, Mila Casaril, Dani Barbie, Dani Tomazeli, Dani Ortiz, Doug, Eduardo, Elston, Felipe (Xilipe), Gabizinha, Gil (minha bússola lageana), Josi (fia), Julinha, Letícia, Mari, May, Pâm, Pri, Rafa, Ruan, Vanessa, Maria Natália, pela companhia, conversas, risadas, fins de semana e feriados no laboratório e fora dele, conselhos e principalmente pela parceria! Por ser uma equipe unida e sempre disposta a ajudar uns aos outros, tenho orgulho e prazer em fazer parte dessa equipe. Meu muito obrigada!

A “Família 22”, Camila Guerim Pieniz, Júlia Moraes e Cleide Beatriz Bourscheid, obrigada por ter tido o prazer de conviver, viver e ter conquistado a amizade eterna de vocês! Sentirei saudades pra sempre dessa nossa Família 22 de Lages! Amo vocês!!!!!!!

Aos amigos que Lages me trouxe Cristina Correia, Deivid Gótico, Lothar, Henrique Hungria, Tiriva, Carol, Tio Paulo, Beto, Vini, Gessi, Morgana, Aline, Jéssica e Milton, obrigada

pelos grandes momentos de descontração, conversas interessantes, ótimas risadas e aos cuidados e carinho de cada um de vocês!

A UDESC por proporcionar ensino gratuito e de qualidade. Estendo meus agradecimentos aos colegas dos laboratórios de Fertilidade, Química, Manejo e Física, Usos e Gênese do Solo, pelos materiais emprestados, ensinamentos e conversas nos corredores.

A FAPESC pela concessão da bolsa de estudos de mestrado.

MUITO OBRIGADA por terem feito parte dessa etapa tão importante e significativa para mim!

“No meio de tudo isto eu tive felizmente
bastante lucidez para descobrir a estrada do
dever, e nela estou e nela prosseguirei”.

Euclides da Cunha

RESUMO

DALLA ROSA, Vanessa Mignon. **Avaliação de toxicidade do fungicida clorotalonil e do inseticida clorpirimifós em solos subtropicais brasileiros.** 2018. 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Lages, 2018.

O Brasil é considerado um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo, contudo, os efeitos de muitas moléculas ainda não estão bem esclarecidos em relação à sua toxicidade nos organismos edáficos não-alvo, especialmente em solos naturais. Com o intuito de suprir algumas dessas limitações, este estudo tem como objetivo avaliar os efeitos do fungicida clorotalonil (CLT) e do inseticida clorpirimifós (CHP) na reprodução de sete espécies de invertebrados terrestres não-alvo, considerados representativos da biodiversidade edáfica. Foram realizados testes ecotoxicológicos, em condições de laboratório usando metodologias padronizadas, em um Nitossolo Vermelho eutroférico e um Cambissolo húmico, coletados em áreas sob vegetação natural não antropizada. Os organismos edáficos utilizados foram: *Enchytraeus crypticus*, *E. dudichi*, *E. bigeminus*, *Eisenia andrei*, *Perionyx excavatus*, *Eudrilus eugeniae* e *Folsomia candida*. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA One-way) e as médias comparadas pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$). Os valores de EC₅₀ (Concentração que causa Efeito em 50% da população) foram determinados por análise de regressão não linear. A partir dos valores de EC₅₀ foram construídas as Curvas de Distribuição de Sensibilidade das Espécies (SSD) e obtidos os valores de HC₅. No Nitossolo, contaminado com o CLT, a espécie mais sensível foi o *E. bigeminus* e a menos sensível *E. andrei* e, o valor de HC₅ foi 10,61 (1,31 – 27,05) mg i.a. kg⁻¹ de solo seco. Para essas mesmas condições no Cambissolo o HC₅ foi 3,69 (0,34 – 10,7) mg i.a. kg⁻¹ de solo seco e a espécie mais sensível foi a *E. andrei* e a menos sensível foi o *E. dudichi*. Em relação ao CHP, quando aplicado no Nitossolo, o valor HC₅ foi de 0,08 (0,0004 – 0,88) mg i.a. kg⁻¹ de solo seco e a espécie mais sensível foi o *F. candida* e a menos sensível foi o *E. bigeminus*. No Cambissolo, o valor de HC₅ foi de 0,92 (0,018 – 5,33) mg i.a. kg⁻¹ de solo seco e a espécie mais sensível foi a *E. andrei* e a menos sensível foi o *E. bigeminus*. Considerando os resultados obtidos nos testes crônicos com os sete organismos evidenciam efeito negativo sobre o número de juvenis gerados com aumento das doses dos agrotóxicos aplicados, independente do solo avaliado. Contudo, os efeitos dos agrotóxicos na reprodução dos organismos variam nos solos de diferentes classes texturais, sendo os efeitos, na sua maioria, mais expressivos no Cambissolo. Os resultados de EC₅₀s das espécies individualmente observadas são diferentes em relação ao tipo de solo com o mesmo agrotóxico em comparação aos HC₅s, quando são consideradas o conjunto de espécies. Dessa forma o uso das SSDs mostrou-se uma boa ferramenta para comparar a sensibilidade entre as espécies, assim como os diferentes tipos de solo, mostrando que, de maneira geral, que os valores de EC nem sempre são protetivos quando comparados com os valores de HC. Portanto, propõe-se que os valores de HC₅ do solo para agrotóxicos sejam utilizados como dados fundamentais para a realização de avaliações de risco ambiental e que sejam aplicados para estabelecer valores de orientação do solo para a proteção do ecossistema edáfico.

Palavras-chave: Agrotóxicos. Ecotoxicologia terrestre. Fauna edáfica. SSD.

ABSTRACT

DALLA ROSA, Vanessa Mignon. **Toxicity evaluation of chlorothalonil fungicide and chlorpyrifos insecticide in Brazilian subtropical soils.** 2018. 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Lages, 2018.

Brazil is considered one of the largest consumers of the world's pesticides, however, the effects of many molecules are still poorly understood in relation to its toxicity to non-target soil organisms, especially in natural soils. In order to overcome some of these limitations, this study aims to evaluate the effects of the fungicide chlorothalonil (CLT) and the insecticide chlorpyrifos (CHP) on the reproduction of seven species of non-target soil invertebrates, which are considered to be representative of edaphic biodiversity. Ecotoxicological tests were carried out under laboratory conditions using standardized methodologies, in a Nitisol and a Cambisol, collected in areas under natural vegetation and non-anthropic areas. The edaphic organisms used were: *Enchytraeus crypticus*, *E. dudichi*, *E. bigeminus*, *Eiseinia andrei*, *Perionyx excavatus*, *Eudrilus eugeniae* and *Folsomia candida*. The data were submitted to ANOVA (One-way ANOVA) and the means were compared by the Dunnett test ($p \leq 0.05$). EC₅₀ values (Effective Concentration causing a specified effect in 50% of the population) were determined by non-linear regression analysis. From the EC₅₀ values, the Species Sensitivity Distribution Curves (SSD) were constructed and the values of HC₅ were obtained. In Nitisol, contaminated with CLT, the most sensitive specie was *E. bigeminus* and the least sensitive *E. andrei*, and the HC₅ value was 10.61 (1.31 – 27.05) mg a.i kg⁻¹ of dry soil. For these same conditions in the Cambisol the HC₅ was 3.69 (0.34 – 10.7) mg a.i. kg⁻¹ dry soil and the most sensitive specie was *E. andrei* and the least sensitive was *E. dudichi*. Regarding the CHP, when applied in Nitosol, the HC₅ value was 0.08 (0.0004 – 0.88) mg i.a. kg⁻¹ of dry soil and the most sensitive specie was *F. candida* and the less sensitive was *E. bigeminus*. In the Cambisol, the HC₅ value was 0.92 (0.018 – 5.33) mg a.i. kg⁻¹ of dry soil and the most sensitive species was *E. andrei* and the least sensitive was *E. bigeminus*. Considering the results obtained in the chronic tests with the seven organisms, they showed a negative effect on the number of juveniles generated with the increased doses of the pesticides applied, independently of the evaluated soil type. However, the effects of pesticides on the reproduction of organisms vary in different soil texture classes, and the effects are, for the most part, more significant in Cambisol. The results of EC₅₀s when individually observed of the species are different regarding the soil type with the same pesticide compared to the HC₅s, when the set of species are considered. Thus, the use of SSDs proved to be a good tool to compare the sensibility between the species, as well as the different types of soil, showing that, in a general way, the ECs values are not always protective when compared to the HCs values. Therefore, it is proposed that soil HC₅ values for pesticides be used as fundamental data for environmental risk assessments to be applied to establish soil orientation values for the protection of the edaphic ecosystem.

Key-words: Pesticides. Terrestrial ecotoxicology. Edaphic fauna. SSD.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Média de indivíduos (Ind.) juvenis dos enquitreídeos em Nitossolo Vermelho eutroférrego (Nito) e Cambissolo húmico (Cambi) contaminado com concentrações crescentes do fungicida clorotalonil. *Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste de Dunnett. (T) Desvio padrão.....	47
Figura 2 – Média de indivíduos (Ind.) juvenis das minhocas em Nitossolo Vermelho eutroférrego (Nito) e Cambissolo húmico (Cambi) contaminado com concentrações crescentes do fungicida clorotalonil. *Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste de Dunnett. (T) Desvio padrão.....	49
Figura 3 – Média de indivíduos (Ind.) juvenis de colêmbolos em Nitossolo Vermelho eutroférrego (Nito) e Cambissolo húmico (Cambi) contaminado com concentrações crescentes do fungicida clorotalonil. *Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste de Dunnett. (T) Desvio padrão.....	50
Figura 4 – Curva de Distribuição da Sensibilidade de Espécies para o fungicida clorotalonil em um Nitossolo Vermelho eutroférrego com base nos valores de EC ₅₀ para diferentes espécies de oligoquetas. A concentração de risco das espécies para 5% (HC ₅) e 50% (HC ₅₀) são apresentadas juntamente com os limites superiores e inferiores do intervalo de confiança (95%) entre parênteses.....	52
Figura 5 – Curva de Distribuição da Sensibilidade de Espécies para o fungicida clorotalonil em um Nitossolo Vermelho eutroférrego com base nos valores de EC ₅₀ para diferentes espécies de invertebrados. A concentração de risco das espécies para 5% (HC ₅) e 50% (HC ₅₀) são apresentadas juntamente com os limites superiores e inferiores do intervalo de confiança (95%) entre parênteses.....	52
Figura 6 – Curva de Distribuição da Sensibilidade de Espécies para o fungicida clorotalonil em um Cambissolo húmico com base nos valores de EC ₅₀ para diferentes espécies de oligoquetas. A concentração de risco das espécies para 5% (HC ₅) e 50% (HC ₅₀) são apresentadas juntamente com os limites superiores e inferiores do intervalo de confiança (95%) entre parênteses.....	53
Figura 7 – Curva de Distribuição da Sensibilidade de Espécies para o fungicida clorotalonil em um Cambissolo húmico com base nos valores de EC ₅₀ para diferentes espécies de invertebrados. A concentração de risco das espécies para 5% (HC ₅) e 50% (HC ₅₀) são apresentadas juntamente com os limites superiores e inferiores do intervalo de confiança (95%) entre parênteses.....	54
Figura 8 – Média de indivíduos (Ind.) juvenis dos enquitreídeos em Nitossolo Vermelho eutroférrego (Nito) e Cambissolo húmico (Cambi) contaminado com concentrações crescentes	

do inseticida clorpirimifós. *Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste de Dunnett. (T)	
Desvio padrão.....	55
Figura 9 – Média de indivíduos (Ind.) juvenis das minhocas em Nitossolo Vermelho eutroférrico (Nito) e Cambissolo húmico (Cambi) contaminado com concentrações crescentes do inseticida clorpirimifós. *Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste de Dunnett. (T)	
Desvio padrão.....	57
Figura 10 – Média de indivíduos (Ind.) juvenis de <i>Folsomia candida</i> em Nitossolo Vermelho eutroférrico contaminado com concentrações crescentes do inseticida clorpirimifós. *Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste de Dunnett. (T) Desvio padrão.....	59
Figura 11 – Curva de Distribuição da Sensibilidade de Espécies para o inseticida clorpirimifós em um Nitossolo Vermelho eutroférrico com base nos valores de EC ₅₀ para diferentes espécies de invertebrados. A concentração de risco das espécies para 5% (HC ₅) e 50% (HC ₅₀) são apresentadas juntamente com os limites superiores e inferiores do intervalo de confiança (95%) entre parênteses.....	60
Figura 12 – Curva de Distribuição da Sensibilidade de Espécies para o inseticida clorpirimifós em um Cambissolo húmico com base nos valores de EC ₅₀ para diferentes espécies de oligoquetas. A concentração de risco das espécies para 5% (HC ₅) e 50% (HC ₅₀) são apresentadas juntamente com os limites superiores e inferiores do intervalo de confiança (95%) entre parênteses.....	60

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Ingrediente ativo, composição, sistema de ação, titular dos registros, quantidade de produto comercial e de ingrediente ativo usados no experimento e doenças que os fungicidas usados combatem.....	37
Tabela 2 – Características químicas e físicas na camada 0 – 20 cm de um Nitossolo Vermelho Eutroférreico (Nitossolo), Cambissolo Húmico (Cambissolo) e Solo Artificial Tropical (SAT), utilizados para os ensaios ecotoxicológicos (Continua).....	38
Tabela 3 – Concentrações nominais dos agrotóxicos clorotalonil e clorpirifós em miligrama (mg) de ingrediente ativo (i.a.) por quilograma (kg) de solo seco (mg i.a. kg ⁻¹) utilizadas nos testes de toxicidade crônica com os organismos terrestres em cada tipo de solo. – Teste não realizado (Continua).....	40
Tabela 4 – Número médio de juvenis (\pm desvio padrão) nos controles encontrados ao fim dos testes crônicos de ecotoxicidade realizados com as sete espécies de organismos edáficos usando um Nitossolo Vermelho eutroférreico (Nitossolo), Cambissolo húmico (Cambissolo) e Solo Artificial Tropical (SAT) para os agrotóxicos clorotalonil e clorpirifós. – Teste não realizado.	45
Tabela 5 – Concentração efetiva (EC ₅₀) e intervalo de confiança, Modelo estatístico e r ² (% do ajuste dos dados na curva) para os testes de reprodução de enquietreídeos em Nitossolo Vermelho eutroférreico (Nitossolo) e Cambissolo húmico (Cambissolo) com aplicação de doses crescentes de clorotalonil.	48
Tabela 6 – Concentração efetiva (EC ₅₀) e intervalo de confiança, Modelo estatístico e r ² (% do ajuste dos dados na curva) para os testes de reprodução de minhocas em Nitossolo Vermelho eutroférreico (Nitossolo) e Cambissolo húmico (Cambissolo) com aplicação de doses crescentes de clorotalonil (mg i.a. kg ⁻¹).	50
Tabela 7 – Concentração efetiva (EC ₅₀) e intervalo de confiança, Modelo estatístico e r ² (% do ajuste dos dados na curva) para os testes de reprodução de colêmbolos em Nitossolo Vermelho eutroférreico (Nitossolo) e Cambissolo húmico (Cambissolo) com aplicação de doses crescentes de clorotalonil (mg i.a. kg ⁻¹).	51
Tabela 8 – Concentração efetiva (EC ₅₀) e intervalo de confiança, Modelo estatístico e r ² (% do ajuste dos dados na curva) para os testes de reprodução de enquietreídeos em Nitossolo Vermelho eutroférreico (Nitossolo) e Cambissolo húmico (Cambissolo) com aplicação de doses crescentes de clorpirifós.	56

Tabela 9 – Concentração efetiva (EC₅₀) e intervalo de confiança, Modelo estatístico e r² (%) do ajuste dos dados na curva para os testes de reprodução de minhocas em Nitossolo Vermelho eutroférrico (Nitossolo) e Cambissolo húmico (Cambissolo) com aplicação de doses crescentes de clorpirifós (mg i.a. kg⁻¹). – Teste não realizado..... 58

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ARE – Análise de Risco Ecológico
- B.O.D – *Biochemical Oxygen Demand*. Pt: Demanda Bioquímica de Oxigênio. Incubadora para criação das culturas
- CAV – Centro de Ciências Agroveterinárias
- CENO – Concentração de Efeito Não Observado
- CEO – Concentração de Efeito Observado
- CHP – Clorpirifós
- CLT – Clorotalonil
- CL_x – Concentração Letal em X % da População
- CMR – Capacidade Máxima de Retenção de Água
- CRA – Capacidade de Retenção de Água
- Ctrl – Controle. Amostra livre de agrotóxicos
- CTC – Capacidade de Troca Catiônica em pH 7,0
- DSE – Distribuição da Sensibilidade das Espécies
- DT – *Dissipation time*. Pt: Tempo de dissipação. Ex: DT₅₀ = 5. São cinco dias para dissipar 50% do agrotóxico
- EC_x – *Effect Concentration* em X % da População. Pt: Concentração de Efeito
- EFSA – *European Food Safety Authority*. Pt: Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar
- Endpoints – Parâmetros que indicam os ensaios utilizados, ex.: Letalidade (LC) e reprodução (EC) são dos mais comuns
- FAO – Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
- HC_x – *Hazardous Concentration* em X % de uma comunidade. Pt.: Concentração de Risco
- i.a. – Ingrediente Ativo
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais
- ISO – *International Organization for Standardization*. Pt: Organização Internacional de Normalização
- MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
- MO – Matéria Orgânica
- NBR – Norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas

OECD – *Organization for Economic Co-operation and Development*. Pt: Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico

PNDA – Programa Nacional de Defensivos Agrícolas

SAT – Solo Artificial Tropical

Software – Programa

SSD – *Species Sensitivity Distribution*. Pt: Distribuição da Sensibilidade das Espécies (DSE) ou Curva de Sensibilidade das Espécies

TIER – Nível ou Etapa

UDESC – Universidade do Estado de Santa Catarina

UE – União Europeia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
1.1	HIPÓTESES	29
1.2	OBJETIVO GERAL	29
1.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
2	REFERENCIAL TEÓRICO	30
2.1	AGROTÓXICOS.....	30
2.1.1	Fungicida clorotalonil (CLT)	31
2.1.2	Inseticida clorpirimifós (CHP)	32
2.2	ECOTOXICOLOGIA TERRESTRE.....	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1	CARACTERIZAÇÃO DOS AGROTÓXICOS	37
3.2	CRITÉRIOS PARA SELEÇÃO DOS SOLOS E AMOSTRAGEM....	38
3.2.1	Caracterização das amostras de solos	39
3.3	ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS	39
3.3.1	Organismos-teste e condições de ensaio	39
3.3.2	Testes de toxicidade crônica (reprodução) com enquistreídeos.....	41
3.3.3	Testes de toxicidade crônica (reprodução) com minhocas.....	42
3.3.4	Teste de toxicidade crônica (reprodução) com colêmbolos (<i>F. candida</i>)	43
3.3.5	Análise dos dados	44
4	RESULTADOS	45
4.1	VALIDAÇÃO DOS TESTES	45
4.2	TOXICIDADE CRÔNICA COM O FUNGICIDA CLOROTALONIL	46
4.2.1	Toxicidade crônica de enquistreídeos	46
4.2.2	Toxicidade crônica de minhocas	48
4.2.3	Toxicidade crônica de colêmbolos	50
4.2.4	Curvas de Distribuição de Sensibilidade das Espécies (SSD).....	51

4.3	TOXICIDADE COM CLORPIRIFÓS	54
4.3.1	Toxicidade crônica de enquitreídeos	54
4.3.2	Toxicidade crônica de minhocas	56
4.3.3	Toxicidade crônica de colêmbolos	58
4.3.4	Curvas de Distribuição de Sensibilidade das Espécies (SSD).....	59
5	DISCUSSÃO	61
5.1.1	Toxicidade do clorotalonil.....	61
5.1.2	Toxicidade do clorpirifós	63
6	CONCLUSÕES.....	67
7	REFERÊNCIAS.....	68

1 INTRODUÇÃO

No mundo estão sendo produzidos milhões de toneladas de agrotóxicos e o mercado brasileiro teve um aumento nos últimos anos, comercializando o equivalente a oito bilhões de dólares (REIS et al., 2015; DA SILVA et al., 2018). Em virtude do desempenho econômico notável do setor agrícola nacional, a Organização para a Cooperação Econômica e o Desenvolvimento (OECD) e a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) apontaram que o Brasil será o maior produtor agrícola e também o maior consumidor de agrotóxicos do mundo até 2018 (OECD, 2010; BELCHIOR et al., 2017; XAVIER DE CARVALHO et al., 2017; DA SILVA et al., 2018).

Pode-se dizer que os motivos para esse crescimento foram influenciados pela política de modernização da agricultura, na qual o governo ofereceu incentivos fiscais e tributários para aquisição de agrotóxicos (ANDRADE et al., 2016; ALMEIDA et al., 2017). Aliado a isso uma das ações preconizadas pela Revolução Verde foi o incentivo do uso de agrotóxicos para elevar a produtividade agrícola, neste cenário o crédito rural foi uma das ações efetivadas no Brasil, juntamente com a instalação de indústrias produtoras e importadoras, as quais buscavam aumentar a produção agrícola, a mecanização do campo e o aumento do uso de agrotóxicos (LONDRES, 2011).

Tais mudanças trouxeram ganhos para a agricultura e a economia nacional, aliado ao aumento populacional e mudanças no uso da terra (SOARES, 2012). Entretanto, causaram perdas incalculáveis na diversidade dos ecossistemas, tornando necessárias medidas urgentes que protejam o ambiente natural, a fim de minimizar os danos causados por essas atividades. Essas práticas resultam não só em perda de habitats e biodiversidade, mas também em contaminação ambiental por causa do uso dos agrotóxicos (WAICHMAN et al., 2002).

A legislação federal sobre agrotóxicos foi criada a partir de mobilizações no período pós ditadura (COGHETTO et al., 2015). Com o sancionamento da Lei dos agrotóxicos nº 7.802/89, a sociedade brasileira obteve uma importante conquista no controle destas substâncias, que impõe duras penas para o uso incorreto de agrotóxicos. Essa lei proíbe o registro de agrotóxicos, seus componentes e afins, para os quais o Brasil não disponha de antídotos, que revelem características teratogênicas, carcinogênicas ou mutagênicas, que provoquem distúrbios hormonais, que se revelem perigosos para o homem e que causem danos ao ambiente (DASGUPTA et al., 2001; COGHETTO et al., 2015).

A lei tem sido mal aplicada por ineficiência durante etapas de execução e fiscalização, especialmente nas áreas mais remotas da floresta tropical (WAICHMAN et al., 2007). Estudos

realizados na Amazônia por Röembke et al. (2008) indicaram que os agrotóxicos são livremente comercializados e utilizados em altas concentrações e com frequências e intervalos de tempo diferentes dos recomendados pelos fabricantes.

Por mecanismos de dispersão, os agrotóxicos podem ser carreados além dos pontos de aplicação, chegando a atingir inclusive áreas protegidas (WAICHMAN et al., 2007). Dependendo de sua persistência e toxicidade, os agrotóxicos podem interferir em processos básicos do ecossistema, como redução da atividade microbiana, seleção de espécies resistentes, além de alterar a dinâmica das populações da fauna edáfica refletindo em processos importantes nos ecossistemas terrestres, tais como: 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.

Os efeitos dos agrotóxicos também dependem de características físico-químicas das moléculas, o que determina a recalcitrância no ambiente, mecanismos de dispersão nas matrizes como solo e água, tempo de meia vida e modo de ação. Desta forma, a classe do agrotóxico utilizado nas lavouras de produção agrícola, pode concomitantemente apresentar mecanismos ímpares de ligação dependendo do tipo de solo, clima, pluviosidade etc.

Dentre as diversas classes de agrotóxicos já produzidas, muitas tiveram sua autorização de comercialização vetadas, por apresentarem efeitos nocivos importantes nos ecossistemas. No Brasil, o uso dos ingredientes ativos (i.a.) clorpirifós (CHP) e clorotalonil (CLT) é autorizado, sendo comercializadas 20 e 42 formulações, respectivamente (MAPA, 2017). Ambos são amplamente utilizados em todo o território nacional em diversas culturas de interesse comercial, como a soja, o milho, o trigo, café e pastagens. O CHP, pertencente ao grupo químico dos organofosforados, é um inseticida de aplicação foliar que foi o segundo inseticida mais comercializado no Brasil em 2014. Já o CLT pertence ao grupo químico das isoftalonitrilas, e foi o terceiro mais vendido no mesmo período (IBAMA, 2017).

Dessa forma, o uso indiscriminado de agrotóxicos em áreas agrícolas constitui uma ameaça potencial para a biodiversidade e a função ecológica dos ecossistemas edáficos (CHELINHO et al., 2013). Nesse contexto, a biodiversidade edáfica pode ser influenciada pelo uso dos agrotóxicos e torna-se vulnerável com a dispersão dos contaminantes. Devido à grande importância da comunidade biológica do solo no funcionamento do ecossistema, o monitoramento de práticas antrópicas, devem ser considerados os parâmetros biológicos como um indicador fundamental, além do comportamento dos organismos nos diferentes tipos de solos (CHELINHO et al., 2011; MENEZES-OLIVEIRA et al., 2017).

Uma das maneiras de se avaliar os efeitos prejudiciais dos poluentes nos organismos edáficos, se dá por meio da realização de testes de toxicidade, os quais podem ser utilizados para determinar a concentração aceitável de uma substância-teste no solo. A ecotoxicologia pode ser definida como a ciência que estuda os efeitos adversos de substâncias sintéticas ou naturais nos organismos vivos, populações ou comunidades, nos ambientes terrestres e aquáticos (ZAGATO, 2006). Este tipo de análise utiliza ferramentas que permitem responder antecipadamente a toxicidade das substâncias e compostos que indicam os potenciais ecotoxicológicos e seus mecanismos de ação em organismos vivos (AZEVEDO, 2003; MAGALHÃES e FERRÃO-FILHO, 2008).

Os ensaios ecotoxicológicos são ferramentas capazes de refletir a eficácia de ações de remediação, avaliando a qualidade de um solo contaminado (SISINNO et al., 2006). Dessa forma, os testes de toxicidade, através da medida de biodisponibilidade dos contaminantes, são capazes de fornecer informações para se estabelecer a conexão entre a contaminação de uma área e seus efeitos ecológicos resultantes (LINFURST et al., 1995), antes que esses efeitos possam se manifestar em nível de população, comunidades e ecossistemas (MAGALHÃES e FERRÃO-FILHO, 2008), mesmo antes de serem liberados no ambiente.

Os testes de toxicidade são ensaios laboratoriais realizados sob condições experimentais específicas e controladas, utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, compostos, efluentes industriais, amostras ambientais (águas ou sedimentos) entre outros (COSTA et al., 2008). Esses ensaios são realizados expondo-se os organismos testes a uma matriz (água, sedimento ou solo), contaminada, com o objetivo de avaliar se a contaminação é alta o suficiente para causar algum efeito adverso sobre a taxa de sobrevivência, crescimento, desempenho reprodutivo e mudanças comportamentais (BIANCHINI, 2009).

A ecotoxicologia auxilia a definir limites de substâncias tóxicas permissíveis com níveis de incertezas aceitáveis e que sirvam de guia para as entidades reguladoras para a tomada de decisões (WALKER et al., 2006). Desta forma, o conhecimento dos efeitos dos agrotóxicos sobre a biodiversidade e a definição de padrões de qualidade ambiental se tornam imprescindíveis.

Entretanto, a realização desta tarefa implica, em primeira instância, na construção de uma base de conhecimentos em ecotoxicologia para a região (NIVA et al., 2016; NIEMEYER et al., 2017). A ausência de valores orientadores cria um cenário onde se torna quase impossível implementar ações para a proteção da biodiversidade edáfica e para o uso correto de agrotóxicos e de seus descartes (CARNIEL, 2015). A legislação acerca do risco oferecido pelos agrotóxicos à fauna edáfica não-alvo é estabelecida pela Normativa 84 (IBAMA, 2010). Essa normativa

aponta somente ensaios agudos de letalidade com minhocas na avaliação do risco ambiental oferecido ao ecossistema terrestre.

O processo de avaliação do risco para agrotóxicos utiliza informações de estudos de ecotoxicidade que variam em complexidade, desde bioensaios de laboratório a estudos de campo. 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 (DAAM et al., 2011; NIEMEYER et al., 2012; DEL SIGNORE et al., 2016). Essa diferença de sensibilidade já é considerada para organismos aquáticos (SPADOTTO, 2006).

De modo a reduzir a incerteza da extração realizada a partir de uma ou duas espécies para inferir efeitos no conjunto das espécies do ecossistema foi proposto o método de avaliação da Curva de Distribuição de Sensibilidade de Espécies (SSD). Este método considera que há uma variação na sensibilidade dos organismos aos contaminantes ambientais, que pode ser descrita através da construção de uma curva de distribuição da sensibilidade de espécies (NEWMAN, 2000). Através do método SSD, torna-se possível calcular uma concentração conhecida como o HC5% (concentração que assume risco para 5% das espécies, ou que proporciona um nível de proteção para 95% das espécies), uma vez que é assumido que o ecossistema pode tolerar certo grau de estresse químico (XU et al., 2015; DEL SIGNORE et al., 2016). Com base nessas informações, pode ser proposto um valor máximo da substância no ambiente de acordo com a proporção de espécies que se quer proteger (DAAM e VAN DEN BRINK, 2010; BELANGER et al., 2017; MOREIRA et al., 2017).

A diferença de sensibilidade dos organismos edáficos se dá pelo mecanismo de ação das moléculas testadas, cujos efeitos são distintos em cada organismo, a exemplo do CHP que age diretamente na inibição da acetilcolinesterase dos insetos, porém outros trabalhos relatam o efeito negativo em populações de minhocas (Oligochaeta) (DE SILVA et al., 2009; GIESY e SOLOMON., 2014). A curva de sensibilidade permite a avaliação mais completa dos efeitos nocivos dos agrotóxicos em organismos não alvo, sendo de fundamental relevância para avaliação de risco ecológico na utilização destes compostos em ecossistemas terrestres (FORBES et al., 2001).

Atualmente, diversos órgãos de proteção na Europa e América do Norte vêm utilizando o método SSD para determinar as concentrações máximas de componentes tóxicos no ambiente (SUTER, 2002; EFSA 2007), sendo que no Brasil essa prática não é difundida para organismos edáficos. Esse método poderia ser implementado no Brasil para avaliar os efeitos de contaminantes nos ecossistemas terrestres subtropicais. Isso permitiria delinear estratégias para proteção da biodiversidade edáfica, as quais contribuiriam para o desenvolvimento da

agricultura sustentável. Diante do exposto, este estudo visa determinar a toxicidade crônica de dois agrotóxicos amplamente utilizados na agricultura brasileira (CLT e CHP), em sete espécies de organismos edáficos, em dois solos subtropicais brasileiros, com base na utilização do método de distribuição de sensibilidade de espécies, visando o desenvolvimento da agricultura sustentável.

1.1 HIPÓTESES

1. O fungicida clorotalonil e o inseticida clorpirimifós afetam negativamente a reprodução das espécies testadas individualmente;
2. Os efeitos dos agrotóxicos na reprodução dos organismos variam nos solos com diferentes classes texturais, sendo os efeitos mais expressivos em solos arenosos;
3. A SSD pode ser utilizada como ferramenta para indicar a toxicidade dos agrotóxicos para uma comunidade de organismos edáficos em solos subtropicais brasileiros.

1.2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade do inseticida clorpirimifós e do fungicida clorotalonil sobre sete organismos terrestres não alvo e a SSD em dois solos subtropicais distintos.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar a toxicidade do inseticida clorpirimifós e do fungicida clorotalonil por meio de ensaios ecotoxicológicos com diferentes espécies de invertebrados terrestres em dois solos subtropicais;
2. Criar a Curva de Distribuição de Sensibilidade de Espécies com base nos dados obtidos nos testes ecotoxicológicos, verificando a toxicidade dos agrotóxicos para o conjunto de no mínimo seis organismos edáficos;
3. Contribuir para o estabelecimento de valores limite para o uso de agrotóxicos em dois solos subtropicais brasileiros com características texturais distintas (um argiloso e outro arenoso).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 AGROTÓXICOS

A utilização de substâncias para controle de pragas remonta desde a Grécia antiga, todavia, somente após a 2^a Guerra Mundial, com o avanço da indústria química foi quando se deu início a produção de agrotóxicos propriamente ditos, inicialmente, sintéticos orgânicos, sendo um marco histórico na produção de alimentos em nível mundial (MANSANO, 2016).

No Brasil, não existem relatos concretos do início da utilização destas substâncias, entretanto acredita-se que o advento da Revolução Verde (décadas de 40 e 50) ocorreram os primeiros incentivos ao uso de compostos químicos para maximizar a produtividade agrícola. Mais tarde, no ano de 1975 foi lançado o Programa Nacional de Defensivos Agrícolas (PNDA), em que consistia numa política de incentivo ao consumo de agrotóxicos fomentando com isenção de impostos e taxas de importação (PORTO e SOARES, 2012). Com isso, o Brasil se tornou o maior consumidor de agrotóxicos do mundo no ano de 2008. Tal fato aliado ao mal gerenciamento e controle do consumo pelos órgãos ambientais, resulta em uma situação preocupante tanto no aspecto ambiental, quanto em relação a saúde pública (SOUZA et al., 2017).

A lei brasileira que regulamenta o uso de agrotóxicos é a Lei Federal nº 7082 de 11 de julho de 1989 através do decreto de nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002, sendo ela:

Os agrotóxicos e afins 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 ou ainda substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 2002).

Os agrotóxicos são aprovados pelos Ministérios da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Meio Ambiente (IBAMA). O IBAMA é responsável por avaliar e determinar o risco dos agrotóxicos no ambiente. A toxicidade dos agrotóxicos é distribuída em quatro classes e devem ser indicadas por cores (vermelho para os produtos de Classe I – extremamente tóxico; amarelo para os de Classe II – muito tóxico; azul para os de Classe III – moderadamente tóxico; verde para os de Classe IV – pouco tóxico) de acordo com o seu potencial tóxico, sendo expresso em valores referentes à Dose Letal (DL_{50}), por via oral, representada por miligramas do ingrediente

ativo do produto por quilograma de peso vivo, necessários para matar 50% da população de animais teste (Lei nº 7802/1989, regulamentada pelo Decreto nº 4074/2002).

Em relação ao potencial de periculosidade ambiental, este é definido pela ANVISA e a classificação se baseia em várias características do produto, como as características físicas e químicas, toxicidade a diversos organismos, persistência no ambiente e capacidade de deslocamento, e é dividida em: produtos impeditivos de obtenção de registro, produtos altamente perigosos ao meio ambiente (Classe I); produtos muito perigosos ao meio ambiente (Classe II); produtos perigosos ao meio ambiente (Classe III); e produtos pouco perigosos ao meio ambiente (Classe IV) (IBAMA, 2009). Os agrotóxicos também são divididos expressando o modo de ação do ingrediente ativo no organismo alvo ou à natureza da praga combatida em 21 classes, onde os maiores grupos formados são pelos fungicidas, inseticidas, herbicidas, fumigantes e rodenticidas (YAMASHITA e SANTOS, 2008).

Recentemente diversos autores relatam preocupação em relação ao uso intensivo e contínuo dos agrotóxicos sobre o destino ambiental, comportamento e os possíveis efeitos adversos nos organismos não-alvo destes compostos, incluindo a mobilidade, persistência no ar, água, solo, sedimento, interação com outras moléculas e principalmente a saúde das pessoas que estão diretamente em contato com estes (ALMEIDA et al., 2017; BELCHIOR et al., 2017; CARDOSO et al., 2017; FRANCO e PALEALEZ, 2017; GOMES e SERRAGLIO, 2017; SOUZA et al., 2017; XAVIER DE CARVALHO et al., 2017). A persistência e mobilidade dos agrotóxicos no meio ambiente depende de diversos e complexos processos químicos, físicos e biológicos que acontecem de modo simultâneo, abrangendo retenção (sorção), transformação e transporte (LAROVORENTI et al., 2003; FRAMPTON et al., 2006; SOUZA et al., 2017; MEDDELA e VENKATESWARLU, 2018; LIU et al., 2018). A dinâmica dos agrotóxicos é influenciada também pelas condições ambientais, como as propriedades físicas, químicas e atividade biológica do solo, assim como topografia e o clima (REGITANO et al., 2001; LAROVORENTI et al., 2003; FRAMPTON et al., 2006; LIU et al., 2018).

2.1.1 Fungicida clorotalonil (CLT)

O fungicida foliar clorotalonil (2,4,5,6-tetracloroisoftalonitrilo) é de amplo espectro, com o modo de ação por contato, usado amplamente para controlar infestações fúngicas em diversas culturas, além de possuir registro adicional para uso como aditivo em tintas anti-incrustantes (SZALKOWSKI e STALLARD, 1977; CASTRO et al., 2011; AGROFIT, 2017a).

O CLT foi o terceiro fungicida mais comercializado no país em 42 formulações distintas em produtos comerciais (AGROFIT, 2017a).

É um organoclorado que possui baixa solubilidade, persistência de baixa a moderada, tempo meia-vida no solo de 5 a 90 dias (DT_{50}), é pouco móvel no perfil do solo, consequentemente, não oferece riscos de contaminação de águas subterrâneas (WLATZ et al., 2002; VAN SCOY e TJEERDEMA et al., 2014) reflexo da rápida transformação microbiológica e da elevada formação de resíduos ligados, resultante da alta taxa de sorção dessa molécula no solo (REGITANO et al., 2002).

A baixa mobilidade no solo do CLT se dá ao fato de ficar fortemente adsorvido ao solo e a matéria orgânica, não obstante, solos arenosos, com baixo conteúdo de matéria orgânica (menor CTC) e baixo pH (REGITANO et al., 2002; RÖMBKE et al., 2017), podem aumentar consideravelmente a mobilidade do CLT, conferindo risco de contaminação de corpos de água (VAN SCOY e TJEERDEMA, 2014). Diferenças da ação dos agrotóxicos são observadas entre as regiões tropicais e temperadas, em temperaturas mais elevadas, aumentam a solubilidade dos produtos em água e a absorção por organismos não-alvo, podendo aumentar os riscos ambientais nas regiões tropicais (SANCHEZ-BAYO e HYNE, 2011).

Os efeitos adversos ocasionados pela ação do CLT nos organismos não-alvo se propagam provocando modificações nos diferentes níveis de organização biológica nas características morfológicas dos organismos (YU et al., 2013), dinâmica das populações, na estrutura e função das comunidades e do ecossistema (LEITÃO et al., 2014). Em seres humanos, o CLT pode causar dermatites, irritações nos olhos e pele, problemas gastrointestinais e ser classificado como substância carcinogênica (AGROFIT, 2017a). Diante do exposto, existe carência de estudos do comportamento desse fungicida em solos de regiões de clima subtropical, atentando à toxicidade aos organismos da fauna do solo. Sendo poucos estudos ecotoxicológicos realizados com este fungicida para organismos edáficos em âmbito mundial (LEITÃO et al., 2014; RÖMBKE et al., 2017) e desconhecido em âmbito nacional.

2.1.2 Inseticida clorpirifós (CHP)

O inseticida foliar clorpirifós (0,0-diethyl-0-3-5-6-trichloro-2-pyridylphosphorothioate) é de amplo espectro, com o modo de ação por contato e por ingestão, largamente usado para controlar diversas pragas na agricultura, controle de carapatos em rebanhos e em pragas domésticas como cupins, baratas e outros (AGROFIT, 2017b). O CHP, segundo o último relatório do IBAMA (2016) foi o quinto ingrediente ativo (i.a.) e o segundo inseticida mais

comercializado no país, nas 20 formulações em produtos comerciais (AGROFIT, 2017b). O alto uso dessa substância se dá principalmente ao fato de ser relativamente menos tóxico e mais persistente que seus antecessores consagrados no mercado (MEYER et al., 2005).

O CHP pertence ao grupo dos organofosforados e sua persistência no solo pode variar entre 14 dias e mais de 12 meses (dependendo das características do solo e condições climáticas) (SAVINI et al., 2017). É classificado como um agrotóxico muito perigoso ao meio ambiente (Classificação Toxicológica II), altamente tóxico para organismos aquáticos e aves, com baixa solubilidade em água e alta sorção em solos (AGROFIT, 2017b).

Este agrotóxico age no sistema nervoso dos insetos, inibindo a atividade da enzima acetilcolinesterase presente nas fendas sinápticas e junções neuromusculares, causando paralisia do organismo, evoluindo para morte. A exposição deste composto em mamíferos provoca paralisia dos músculos necessários à respiração e parada dos batimentos cardíacos, resultando em um grave problema de saúde pública (SAVOLAINEN, 2001; EFSA, 2005). Meyer et al. (2005) observaram também alterações no coração e no fígado de ratos sobre os efeitos do CHP durante o desenvolvimento, para além da neurotoxicidade e suas possíveis repercussões sobre distúrbios metabólicos e cardiovasculares não podem ser desprezados.

2.2 ECOTOXICOLOGIA TERRESTRE

Os organismos edáficos e suas relações ecológicas são importantes na determinação da funcionalidade e qualidade do solo (VAN STRAALEN, 1998). O manejo do solo pode alterar as características químicas, físicas assim como causar diversas alterações nas populações de organismos que ali habitam (ROSA et al., 2015; POMPEO et al., 2016; SUŁOWICZ et al., 2016). Dessa forma, são considerados bioindicadores os organismos ou comunidades que sejam sensíveis e que modifiquem a sua dinâmica às alterações na estrutura de um ecossistema, fornecendo informações sobre as condições ambientais caracterizando a qualidade do solo (LAVELLE et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2015).

Com a finalidade de proteger os organismos edáficos e os serviços ecossistêmicos que o solo provê, se faz necessário desenvolver ferramentas de avaliação de risco ecológico em ecossistemas terrestres tropicais e subtropicais, para estabelecer critérios de qualidade do solo que permitam o monitoramento e controle dos impactos das ações antrópicas (LAVELLE et al., 2006; NIEMEYER et al., 2010; CESAR et al., 2015). Truhaut (1975; 1977) definiu a ecotoxicologia como o ramo da toxicologia em relação ao estudo dos efeitos tóxicos, causados

por poluentes naturais ou sintéticos, aos constituintes dos ecossistemas, animais (inclusive humanos), vegetais e organismos microbianos, em um contexto integral.

Uma das formas de se avaliar os efeitos de poluentes nos organismos terrestres é por meio da realização de testes de ecotoxicidade. Estes são utilizados para determinar a concentração de uma substância-teste que produz efeitos deletérios em um grupo de organismos-teste sob condições controladas durante um período de exposição em relação ao período de vida do organismo-teste (ZAGATTO, 2006). Com isso, um dos objetivos da ecotoxicologia é definir limiares de substâncias tóxicas permissíveis com níveis de incerteza aceitáveis e que sirvam de guia para as entidades reguladoras para a tomada de decisões (WALKER et al., 2006; NIVA et al., 2016; NIEMEYER et al. 2017).

Diferentes organismos podem ser utilizados como bioindicadores de qualidade do solo nos estudos ecotoxicológicos terrestres, tais como bactérias, fungos, plantas, organismos da macrofauna (minhocas), mesofauna (enquitreídeos, colêmbolos, entre outros) e microfauna (nematoídeos) (VAN GESTEL et al., 1992; VAN STRAALEN et al., 1998; KULA e RÖMBKE, 1998; RÖMBKE et al., 2005; KUPERMAN et al., 2006; SOCHOVÁ, et al., 2006; HAMEL et al., 2007; PÉRÈS et al., 2011; DAAM et al., 2011; CLUZEAU et al., 2012; SUŁOWICZ et al., 2016). Para a escolha dos organismos-teste a serem utilizados em ensaios ecotoxicológicos, alguns critérios devem ser considerados, tais como: valor ecológico e econômico da espécie, sensibilidade frente aos fatores envolvidos no estudo, abundância, distribuição geográfica, ciclo de vida e facilidade de cultivo em laboratório (VAN LEEUWEN, 1995; VAN STRAALEN, 1998; NIVA et al., 2010; BANDOW et al., 2013; BUCH et al., 2016; MADDELA e VENKATESWARLU, 2018).

Nessa perspectiva, entre as formas de avaliação de contaminação ambiental por diferentes compostos químicos e outros estressores, a ecotoxicologia terrestre utiliza metodologias padronizadas internacionalmente para a avaliação ampla e segura dos possíveis efeitos causados pelos poluentes sobre organismos edáficos. Desta forma lança-se mão de organismos-testes padronizados como por exemplo os enquitreídeos (*Enchytraeus albidus*), as minhocas (*Eisenia fetida*) e os colêmbolos (*Folsomia candida*) (RÖMBKE et al., 2006; MENEZES-OLIVEIRA et al., 2011). O efeito é mensurado por meio de *endpoints*, parâmetros que determinam o risco a partir de concentrações de efeito na sobrevivência, reprodução, fuga, medição de biomassa, entre outros parâmetros (NIVA et al., 2016; NIEMEYER et al., 2017; RÖMBEK et al., 2017).

Cada organismo-teste pode responder diferentemente a um determinado fator de estresse devido à diferença de sensibilidade que cada um expressa (VAN DEN BRINK et al.

2006; TEREKHOVA, 2011). Deste modo, essa abordagem na definição das concentrações máximas de substâncias permitidas é falha, quando determinada em apenas uma espécie, pois não considera as particularidades dos demais organismos que compõem a fauna edáfica, tratando-se apenas da pretensão de proteger somente a espécie testada. Por outro lado, os ensaios ecotoxicológicos devem considerar os efeitos secundários nas populações, comunidades e os ecossistemas terrestres de modo geral, via de regra se recomenda avaliar o efeito de um composto tóxico para mais que uma espécie e de diferentes grupos taxonômicos (SOLOMON e SIBLEY, 2002; TEREKHOVA, 2011).

A curva de Distribuição de Sensibilidade das Espécies ou também chamada de SSD (*Species Sensitivity Distribution*) é uma forma de minimizar o entrave da extrapolação a partir do uso de uma única espécie para inferir os efeitos dos contaminantes em um conjunto de espécies do ecossistema, para isso foi proposto o uso da SSD, considerando que há uma variação na sensibilidade das substâncias testadas entre as diferentes espécies do ecossistema terrestre (NEWMAN, 2000; FRAMPTON et al., 2006; DOMENE et al., 2008; KWAK et al., 2018). Baseada nessas informações é possível chegar a valores de risco ambiental para cada substância testada com as diferentes espécies testadas, a partir da realização de testes ecotoxicológicos, e a construção da SSD, se obtém uma concentração de risco a partir da qual se pretende proteger a biodiversidade (FRAMPTON et al., 2006; DAAM et al., 2011; DAAM e VAN DEN BRINK, 2010; BERLANGER et al., 2017; SANNI et al., 2017).

As SSDs podem ser utilizadas para avaliações prospectivas quanto retrospectivas. A avaliação prospectiva permite o cálculo da concentração de risco para 5% das espécies (*Hazardous concentration 5% – HC₅*), e retrospectivamente, pode ser utilizada para estimar a fração das espécies potencialmente afetadas numa certa concentração do agrotóxico, (por exemplo HC₅₀). Outra funcionalidade para as curvas SSDs é a comparação de sensibilidade entre diferentes táxons, habitats e ambientes, afim de proporcionar uma melhor representação da sensibilidade para toda a biota terrestre (FRAMPTON et al., 2006; DAAM et al., 2011; DAAM e VAN DEN BRINK, 2010; BERLANGER et al., 2017).

O uso da SSD para determinação de concentrações de risco de contaminantes no ambiente foi proposto nos Estados Unidos na década de 70 e vem sendo utilizada nas análises de risco de agrotóxicos para organismos aquáticos (SOLOMON et al., 1996; NEWMAN et al., 2000; SUTER, 2002; VAN STRAALEN e VAN LEWEEN, 2002; BELANGER et al., 2017; SANNI et al., 2017). Em 2007, na Europa o modelo foi proposto pela EFSA para as análises de risco ecológico (ARE) onde os órgãos de proteção vêm utilizando este método para novas substâncias químicas (EFSA, 2007). Contudo, nota-se uma grande escassez de informações de

dados ecotoxicológicos dificultando o uso de SSDs, uma vez que é depende da quantidade e da qualidade de dados existentes (WHEELER et al., 2002; FRAMPTON et al., 2006; RÖMBKE et al., 2017).

No Brasil vem sendo utilizada recentemente as SSDs em pesquisas com organismos aquáticos (SOUZA, 2014; CAMPOS, 2015; MANSANO, 2016; MOURA, 2016; SOUZA-BASTOS et al., 2017). Contudo, existem poucos estudos científicos sobre a ecotoxicidade nos organismos terrestres e em solos naturais brasileiros, tropicais e subtropicais, onde a maioria dos trabalhos de ecotoxicologia terrestre disponíveis na literatura abrangem apenas uma ou duas espécies com o mesmo contaminante (NIVA et al., 2016; NIEMEYER et al., 2017). Além disso, a maioria dos estudos são realizados em solos artificiais que não refletem as condições dos solos naturais, uma vez que o teor de matéria orgânica e outras propriedades do solo, tais como a textura podem alterar o destino e os efeitos dos agrotóxicos (KUPERMAN et al., 2006; CHELINHO et al., 2011). Portanto, é um desafio estabelecer a concentração máxima de agrotóxicos com os dados existentes de forma que proteja a biodiversidade e os atributos funcionais dos ecossistemas naturais, se justificando o desenvolvimento de pesquisas específicas sobre os efeitos causados pelos agrotóxicos aos organismos terrestres não alvo representativos desses ecossistemas edáficos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DOS AGROTÓXICOS

Os agrotóxicos escolhidos para a realização dos testes ecotoxicológicos foram o fungicida clorotalonil (CLT) e o inseticida clorpirimifós (CHP). Desta forma optou-se por não utilizar os ingredientes ativos dos produtos, uma vez que os agricultores fazem o uso de formulações comerciais, tornando o estudo mais representativo dentro da realidade da agricultura. A composição e as características dos agrotóxicos são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Ingrediente ativo, composição, sistema de ação, titular dos registros, quantidade de produto comercial e de ingrediente ativo usados no experimento e doenças que os fungicidas usados combatem.

Agrotóxico	Clorotalonil	Clorpirimifós
Nome comercial	Bravonil® 500	Lorsban® 480 BR
Nome químico	Tetrachloroisophthalonitrile	0,0-diethyl-0-3-5-6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate
Composição	(Clorotalonil) 500 g L ⁻¹ (50% m v ⁻¹); Ingredientes inertes 750 g L ⁻¹ (75 % m v ⁻¹); Propilenoglicol 54 g L ⁻¹ (5,4% m v ⁻¹)	(Clorpirimifós) 480 g L ⁻¹ (48% m v ⁻¹); Mistura de hidrocarboneto aromático (Solvente de Nafta, aromático pesado, mistura hidrocarbonetos aromáticos pesados) 536,35 g L ⁻¹ (53,6% m v ⁻¹); Outros ingredientes 114,9 g L ⁻¹ (11,49% m v ⁻¹)
Fórmula química	C ₈ Cl ₄ N ₂	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Fórmula Estrutural		
Classe	Fungicida	Inseticida-acaricida
Grupo químico	Isoftalonitrilas	Organofosforados
Classificação toxicológica	II altamente tóxico	I extremamente tóxico
Classificação do periculosidade ambiental	II produto muito perigoso ao meio ambiente	II produto muito perigoso ao meio ambiente
Modo de ação	De contato.	De contato e ingestão
Titular do registo	Syngenta Proteção de Cultivos Ltda.	Dow AgroSciences Industrial Ltda.

Fonte: produção do próprio autor, 2018.

3.2 CRITÉRIOS PARA SELEÇÃO DOS SOLOS E AMOSTRAGEM

Foram utilizadas amostras da camada superficial (0 – 0,20 m de profundidade) de dois solos com diferentes características texturais, classificados de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (EMBRAPA, 2013), sendo um Nitossolo Vermelho eutrófico (Nitossolo), coletado no município de Concórdia, SC [27°48'71"S e 51°59'34"W] e um Cambissolo húmico (Cambissolo), coletado no município de Lages, SC [27°48'57"S e 50°21'45"W] em áreas sob vegetação natural não antropizada, livre de adubação e uso de agroquímicos.

Os solos foram secos a 55 °C em estufa de circulação forçada e tamisados em peneira de malha 2 mm, para separação de fragmentos vegetais e outros resíduos. Como referência foi utilizado um Solo Artificial Tropical (SAT) proposto por Garcia (2004) com adaptações da seguinte forma: uma mistura de 75% de areia industrial (fina), 20% de argila caulinítica e 5% de fibra de coco (seca e peneirada).

A capacidade de retenção de água (CRA) dos solos naturais e do SAT foi ajustada para 50% da capacidade máxima de retenção (CMR) (ISO, 1998). O pH do SAT foi corrigido para $6,0 \pm 0,5$ por meio da adição de carbonato de cálcio (CaCO_3) conforme preconizado na ISO 1039 (ISO, 2004; ABNT NBR ISO, 2010), para os solos naturais o pH não foi corrigido para simular as condições de campo.

Os solos foram desfaunados por meio da aplicação de três ciclos de congelamentos a -20 °C e descongelamento a temperatura ambiente durante 24 horas para cada ciclo. Características químicas e físicas dos solos estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Características químicas e físicas na camada 0 – 20 cm de um Nitossolo Vermelho Eutroférico (Nitossolo), Cambissolo Húmico (Cambissolo) e Solo Artificial Tropical (SAT), utilizados para os ensaios ecotoxicológicos (Continua).

Parâmetros	Nitossolo	Cambissolo	SAT
MO (%)	4,2	5,5	2,2
CTC	21,1	25,3	1,2
pH (H_2O)	5,8	4,7	6,9
Índice SMP	5,7	4,5	7,2
P (mg dm^{-3})	47,1	6,9	11,1
K (mg dm^{-3})	162	52	262
Ca ($\text{cmol}_c \text{ dm}^{-3}$)	11,7	2,6	2,0

Tabela 2 – Características químicas e físicas na camada 0 – 20 cm de um Nitossolo Vermelho Eutroférrico (Nitossolo), Cambissolo Húmico (Cambissolo) e Solo Artificial Tropical (SAT), utilizados para os ensaios ecotoxicológicos (Conclusão).

Mg (cmol _c dm ⁻³)	2,5	1,4	0,9
Al (cmol _c dm ⁻³)	0,0	3,0	0,0
Al + H (cmol _c dm ⁻³)	6,5	25,3	1,2
Cu (mg dm ⁻³)	10,6	2,8	10,2
Zn (mg dm ⁻³)	34,8	3,8	0,7
B (mg dm ⁻³)	0,65	0,67	1,38
Mn (mg dm ⁻³)	159	21,1	2,2
S (mg dm ⁻³)	20,4	15,3	18,5
Areia (%)	11	60	77
Silte (%)	39	19	15
Argila (%)	50	21	8
Classe textural	Argilosa	Franco-Argilo-Arenosa	Franco-Arenosa

Fonte: produção do próprio autor.

3.2.1 Caracterização das amostras de solos

A determinação da granulométrica foi realizada pelo método da pipeta (DAY, 1965) empregando-se NaOH 0,1 mol L⁻¹ como dispersante químico e agitação rápida, sendo a fração areia (2 – 0,03 mm) separada por meio de peneira. O pH em água e o teor de nutrientes foram determinados conforme EMBRAPA (1997), sendo o Ca, Mg e Al trocáveis extraídos com KCl 1 mol L⁻¹, e P, K, Cu, Mn e Zn disponíveis por extração com HC1 0,05 mol L⁻¹ + H₂SO₄ 0,0125 mol L⁻¹ (Mehlich 1). A determinação do pH SMP foi realizada conforme a metodologia proposta por Tedesco (1995). Os atributos químicos e físicos dos solos estão apresentados na Tabela 2.

Ao final da montagem de cada teste foram guardadas amostras de solo para análise química dos agrotóxicos. Os ensaios foram conduzidos no Departamento de Ciências dos Solos da Universidade Estadual de Santa Catarina (UDESC/CAV), em Lages – SC.

3.3 ENSAIOS ECOTOXICOLÓGICOS

3.3.1 Organismos-teste e condições de ensaio

A escolha dos organismos-teste, sua manutenção em laboratório e exigências para sua utilização nos testes basearam-se nas recomendações dos protocolos ISO (ISO, 1999; 2004) e ABNT NBR ISO (ABNT NBR ISO, 2011; 2012), com adaptações descritas nos trabalhos de Kuperman et al. (2004), Garcia (2006), Niva et al. (2010), Bandow et al. (2013) e Buch et al. (2016). Para os ensaios foram utilizados organismos terrestres de sete diferentes espécies cultivadas em laboratório: enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*, *E. bigeminus* e *E. dudichi*), minhocas (*Eisenia andrei*, *Perionyx excavatus* e *Eudrilus eugeniae*) e colêmbolo (*Folsomia candida*).

Os organismos foram expostos a concentrações dos agrotóxicos CLT e CHP, formando um gradiente de concentração e foram preparados separadamente para cada uma das espécies e para cada ensaio, conforme a Tabela 3. A escolha das concentrações testadas foram baseadas na literatura em testes realizados com o mesmo i.a. (AMORIM et al., 2008; DE SILVA et al., 2009; LEITÃO et al., 2014) e nos resultados de ensaios também realizados com o mesmo i.a. realizados em solo SAT (dados não apresentados e não publicados). Para os organismos que não haviam sido testados com o mesmo i.a., as concentrações foram baseadas nos resultados dos testes de outras espécies (minhocas ou enquitreídeos) já realizados para o presente estudo.

Tabela 3 – Concentrações nominais dos agrotóxicos clorotalonil e clorpirifós em miligrama (mg) de ingrediente ativo (i.a.) por quilograma (kg) de solo seco (mg i.a. kg⁻¹) utilizadas nos testes de toxicidade crônica com os organismos terrestres em cada tipo de solo. – Teste não realizado (Continua).

Organismos	Nitossolo	Cambissolo
Clorotalonil		
<i>E. crypticus</i>	1; 5; 10; 20; 30; 40; 60; 90; 150; 250; 500	0,5; 2,5; 5; 12,5; 25; 50; 100; 150; 250
<i>E. bigeminus</i>	5; 10; 20; 30; 40; 60; 90; 150; 200	5; 10; 20; 30; 40; 60; 90; 150; 200
<i>E. dudichi</i>	5; 10; 20; 30; 40; 60; 90; 150; 200	5; 10; 20; 30; 40; 60; 90; 150; 200
<i>E. andrei</i>	1; 5; 10; 50; 100; 500; 750	5; 10; 20; 50; 100; 200; 500
<i>P. excavatus</i>	5; 10; 25; 50; 100; 300; 500; 750	5; 10; 25; 50; 100; 300; 500; 750
<i>E. eugeniae</i>	5; 10; 20; 50; 100; 200; 500	5; 10; 20; 50; 100; 200; 500
<i>F. candida</i>	3; 5; 10; 20; 30; 50; 80; 150; 200; 500	3; 5; 10; 20; 30; 50; 80; 150; 200; 500
Clorpirifós		
<i>E. crypticus</i>	1; 5; 10; 25; 50; 100; 200; 300; 500	1; 5; 10; 25; 50; 100; 200; 300; 500
<i>E. bigeminus</i>	5; 25; 50; 100; 200; 400	5; 25; 50; 100; 200; 400

Tabela 3 – Concentrações nominais dos agrotóxicos clorotalonil e clorpirimifós em miligrama (mg) de ingrediente ativo (i.a.) por quilograma (kg) de solo seco (mg i.a. kg⁻¹) utilizadas nos testes de toxicidade crônica com os organismos terrestres em cada tipo de solo. – Teste não realizado (Conclusão).

<i>E. dudichi</i>	5; 10; 50; 100; 150; 300; 600	5; 10; 50; 100; 150; 300; 600
<i>E. andrei</i>	4; 8; 12; 16; 24; 32; 64	3; 5; 7; 10; 15; 30; 50; 100
<i>P. excavatus</i>	3; 5; 7; 10; 15 ;30 ;50; 100	0,5; 1; 3;5; 7; 10; 15; 30; 50
<i>E. eugeniae</i>	–	3; 5; 7; 10; 15; 30; 50; 100
<i>F. candida</i>	0,00125; 0,0025; 0,005; 0,01; 0,02; 0,05; 0,075; 0,1; 0,2; 0,5	–

Fonte: produção do próprio autor, 2018.

Todos os ensaios foram conduzidos no laboratório de Ecologia do Solo da UDESC/CAV, em Lages – SC, e mantidos sob temperatura 25 ± 2 °C, conforme proposto por Alves et al. (2015) para regiões tropicais e fotoperíodo controlado de 12 horas de luz e 12 horas de escuro (12:12).

3.3.2 Testes de toxicidade crônica (reprodução) com enquitreídeos

Os ensaios com os enquitreídeos foram realizados conforme as diretrizes da normativa ABNT NBR ISO 16387:2004 (ABNT NBR ISSO, 2012), com adaptações sugeridas por Kuperman et al. (2014) sendo o ensaio conduzido durante quatro semanas para *E. crypticus* e três semanas para as outras espécies conforme Niva et al. (2010) e Bandow et al. (2013). O critério de seleção de indivíduos adultos para *E. crypticus* foi a presença de clitelo, para os demais enquitreídeos, a escolha dos organismos foi conforme o seu tamanho (8 a 12 mm), pois essas espécies são fragmentadoras. As espécies de enquitreídeos fragmentadoras possuem clitelo, no entanto, são capazes de segmentar o seu corpo e a partir dos fragmentos novos indivíduos são formados não sendo possível identificar quais foram os indivíduos inseridos no início dos testes ao final do experimento (NIVA et al., 2010; BRANDOW et al., 2013).

Os organismos foram acondicionados em recipientes de 125 mL, preenchidos com 30 g de solo contaminado e controle (não contaminado), com cinco repetições, sendo quatro delas com dez organismos e uma sem organismos afim da verificação da umidade e pH ao final do ensaio. Os indivíduos foram alimentados uma vez por semana com 2 mg de aveia moída e adicionada água destilada conforme a necessidade para manter a umidade do solo a 50% da

capacidade máxima de retenção de água. Ao final dos testes, foram adicionados 5 mL de álcool absoluto para preservação dos enquistreídeos, dez gotas de solução corante rosa bengala em etanol (1%) e aproximadamente 80 mL de água, para evitar seu ressecamento. Após 5 dias, as amostras foram lavadas em filtro coador de café de poliéster 103 para retirar o excesso de solo. Então cada amostra foi despejada em uma bandeja com água, para facilitar a visualização dos indivíduos e posteriormente contabilizados os organismos com auxílio de uma lupa.

3.3.3 Testes de toxicidade crônica (reprodução) com minhocas

As matrizes de minhocas, sua manutenção em laboratório e exigências para sua utilização nos testes basearam-se nas recomendações do protocolo ISO 11268 - 2 (ISO, 1998). Lotes de minhocas das espécies *E. andrei*, *P. excavatus* e *E. eugeniae* foram obtidos da empresa Minhocbox® e então mantidas e cultivadas em laboratório em caixas plásticas com volume de 12 L. O meio de cultivo utilizado foi composto de uma mistura de duas partes de esterco equino seco (livre de contaminantes químicos) peneirado (2 mm), uma parte de fibra de coco (Amafibra® – Golden Mix, tipo 80) e 10% do peso dos dois primeiros de areia fina, o pH da mistura foi corrigido (quando necessário) para faixa entre 6 e 7 com adição de CaCO₃.

A desfaunagem do meio foi realizada conforme antes descrita a desfaunagem dos solos (Item 3.2, p. 37). Foi acrescida quantidade suficiente de água destilada para deixar o meio de cultivo úmido, essa verificação da umidade do substrato a ponto de escorrer líquido quando uma quantidade de substrato é pressionada na mão foi adotada. Em cada caixa de cultivo foram colocadas cerca de 300 minhocas adultas das espécies *E. andrei* e *P. excavatus* e 100 minhocas adultas da espécie *E. eugeniae*. O substrato foi totalmente substituído quando se observava pouca presença de fibra de coco, colocando os organismos em caixas com substrato novo. A alimentação dos organismos consistiu em fornecimento semanal de flocos de aveia, previamente cozidos em água destilada. Os cultivos foram mantidos a 25 ± 2°C e fotoperíodo 12:12 (claro: escuro).

Foram realizados testes de reprodução (56 dias), seguindo a metodologia ISO 11268 - 2 (ISO, 1998). Nos ensaios foram utilizados dez organismos adultos (clitelados) e com peso médio de 250 – 600 mg para as espécies *E. andrei* e *P. excavatus*. Para os testes com a espécie *E. eugeniae* foram utilizados seis organismos adultos com peso médio de 600 – 1200 mg. Essa adaptação foi necessária uma vez que esses indivíduos são maiores do que os comumente testados e a quantidade de solo se manteve a mesma, desse modo, seria inviável manter dez organismos em um espaço pequeno tornando os resultados duvidosos. Os organismos foram

mantidos em recipientes de 1000 mL, preenchidos com 500 g de solo contaminado ou controle, correspondendo a altura do solo entre cinco e seis centímetros. Conduziram-se quatro repetições, sendo verificada, ao final de cada teste, a umidade e o pH. Para evitar a fuga dos indivíduos, os recipientes de ensaio foram cobertos com tampas transparentes com alguns furos para a aeração.

Os organismos foram alimentados (uma vez por semana) com, aproximadamente, 15g de esterco equino, desfaunado e livre de contaminantes. A umidade, quando necessária, também foi mantida adicionando-se água destilada uma vez por semana. Ao final de 28 dias as minhocas adultas foram removidas, contadas e pesadas, deixando os casulos incubados por mais 28 dias para eclosão. Ao final do teste, os potes plásticos foram colocados em banho-maria a 60 °C por no mínimo 60 minutos para forçar a migração dos indivíduos juvenis à superfície do solo, coletados com pinças e feita contagem do número de indivíduos juvenis.

3.3.4 Teste de toxicidade crônica (reprodução) com colêmbolos (*F. candida*)

As matrizes de colêmbolos da espécie *F. candida* vieram de criações já estabelecidas do Laboratório de Ecologia do Solo. Os colêmbolos foram cultivados em recipientes plásticos (caixas) com capacidade de um litro, em meio de cultura composto de uma mistura de carvão ativado, gesso e água destilada na proporção de 1:11:7. Adicionalmente, foram alimentados três vezes por semana com 1 g de fermento biológico seco e umedecidos com água destilada. Os adultos foram trocados de meio para estimular sua reprodução. Após cinco a sete dias, os ovos depositados foram coletados e colocados em novo recipiente, sob pequenos pedaços de gesso. Após a eclosão dos primeiros ovos, esperam-se mais dois dias para retirar o restante dos ovos não eclodidos, de forma que o recipiente possua organismos com diferença de idade entre um e dois dias. Estes organismos sincronizados foram utilizados para os testes quando tinham dez a doze dias de idade. Os cultivos foram mantidos em incubadora BOD com temperatura de 20 \pm 2 °C e fotoperíodo de 12:12 (luz: escuro) conforme protocolo ISO (ISO, 1999). Dois dias antes dos ensaios as caixas com os organismos sincronizados foram levadas a sala climatizada em 25 \pm 2 °C para aclimatação de temperatura, onde foram mantidos os testes.

Para os testes os organismos foram mantidos em recipientes (pote) com capacidade para 120 mL, preenchidos com 30 g de solo úmido contaminado ou controle. Foram conduzidas cinco repetições, sendo quatro delas com dez organismos e uma como referência, sem organismos para medição do pH e umidade no final dos testes. O alimento foi adicionado uma vez por semana, consistindo em 2 mg de fermento biológico seco assim como corrigida a

umidade de cada pote. No final do período de 28 dias do teste, cada recipiente de ensaio foi esvaziado para um recipiente maior, onde foi adicionada água e algumas gotas de tinta de carimbo preta. Após leve agitação para que os organismos flutuassem na superfície da água, foram contados o número dos adultos e então foram fotografados, para posterior contagem dos juvenis no programa computacional ImageJ (IMAGEJ, 2004).

3.3.5 Análise dos dados

Nos testes de toxicidade crônica os dados obtidos foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk W ($p>0,05$), homogeneidade de Bartlett ($p>0,05$), à análise de variância (ANOVA *One-way*) e as médias comparadas pelo teste de Dunnett ($p\leq0,05$). Os valores de EC₅₀ foram determinados por análise de regressão não linear, usando o modelo que melhor se ajustou aos dados. Para estas análises foi utilizado *software* Statistica v7.0 (STATSOFT, 2004).

As SSDs para os organismos testados com o CLT e o CHP foram construídas a partir dos valores de EC₅₀ dos organismos para cada solo testado, realizadas de acordo com Aldenberg & Jaworska (2000) utilizando o *software* ETX 2.0 (VAN VLAARDINGEN et al., 2004). Para o CLT, foi possível construir duas curvas para cada solo, onde uma estavam todas as oligoquetas testados e na outra com a inserção do artrópode *F. candida*. Já para o agrotóxico CHP foi construída apenas uma curva para cada solo testado, sem diferenciar os organismos.

Os valores de HC₅ das espécies, com limite de confiança de 95%. Uma vez que o modelo assume uma distribuição log-normal dos dados, a log-normalidade foi testada com o teste de Anderson-Darling incluído no pacote do *software* ETX 2.0 (VAN VLAARDINGEN et al., 2004). A normalidade dos dados de toxicidade foi estabelecida em $p\geq0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 VALIDAÇÃO DOS TESTES

A umidade do solo se manteve constante ao longo de todos os testes e a variação do pH entre o início e o final, para todas as doses, foi igual ou inferior à 0,5 para os dois solos e agrotóxicos testados em relação aos controles.

Tabela 4 – Número médio de juvenis (\pm desvio padrão) nos controles encontrados ao fim dos testes crônicos de ecotoxicidade realizados com as sete espécies de organismos edáficos usando um Nitossolo Vermelho eutroférico (Nitossolo), Cambissolo húmico (Cambissolo) e Solo Artificial Tropical (SAT) para os agrotóxicos clorotalonil e clorpirifós. – Teste não realizado.

Organismos	Nitossolo	Cambissolo	SAT
Clorotalonil			
<i>E. crypticus</i>	774 \pm 73	417 \pm 34	955 \pm 77
<i>E. bigeminus</i>	315 \pm 25	393 \pm 36	306 \pm 21
<i>E. dudichi</i>	117 \pm 18	126 \pm 16	121 \pm 22
<i>E. andrei</i>	54 \pm 9	87 \pm 15	65 \pm 4
<i>P. excavatus</i>	37 \pm 5	40 \pm 4	100 \pm 24
<i>E. eugeniae</i>	95 \pm 6	36 \pm 7	59 \pm 14
<i>F. candida</i>	471 \pm 74	358 \pm 69	499 \pm 91
Clorpirifós			
<i>E. crypticus</i>	3778 \pm 399	352 \pm 36	2704 \pm 346
<i>E. bigeminus</i>	92 \pm 29	161 \pm 14	162 \pm 42
<i>E. dudichi</i>	150 \pm 32	416 \pm 22	113 \pm 19
<i>E. andrei</i>	103 \pm 18	71 \pm 10	117 \pm 25
<i>P. excavatus</i>	47 \pm 8	156 \pm 29	100 \pm 24
<i>E. eugeniae</i>	–	37 \pm 7	46 \pm 9
<i>F. candida</i>	594 \pm 71	–	499 \pm 91

Fonte: produção do próprio autor, 2018.

Os testes com enquitreídeos cumpriram os critérios de validação ISO 16387 (ISO, 2004) e ABNT NBR ISO 16387:2004 (ABNT NBR ISO, 2012), para efeito de poluentes na reprodução para os enquitreídeos. Onde, para os controles, a mortalidade dos adultos no solo não foi superior à 20% para *E. crypticus*. Para as demais espécies utilizadas, o critério de

mortalidade de adultos, não foi considerado, uma vez que são espécies fragmentadoras, impossibilitando a identificação de indivíduos adultos clitelados. Desse modo, a validação se deu pelo critério de sobrevivência de 25 juvenis, por réplica e coeficiente de variação inferior à 50%.

Os testes com *E. andrei*, *P. excavatus* e *E. eugeniae* foram validados conforme os critérios ISO 11268 - 2 (ISO, 1998). Onde, a mortalidade das adultas foi inferior a 10%, tendo número superior à 30 indivíduos juvenis em cada repetição e o coeficiente de variação não excedeu a 30%.

Também foram validados os testes com colêmbolos da espécie *F. candida* atendendo os critérios das normativas ISO 11267 (ISO, 1999) e ABNT NBR ISO 11267 (ABNT NBR ISO, 2011). Onde, a mortalidade dos adultos foi inferior à 20%, o número de juvenis superior a 100 indivíduos para cada repetição e o coeficiente de variação inferior à 30%. Na tabela 4 encontram-se o número médio de juvenis nos controles ao fim dos testes de ecotoxicidade terrestre crônicos realizados.

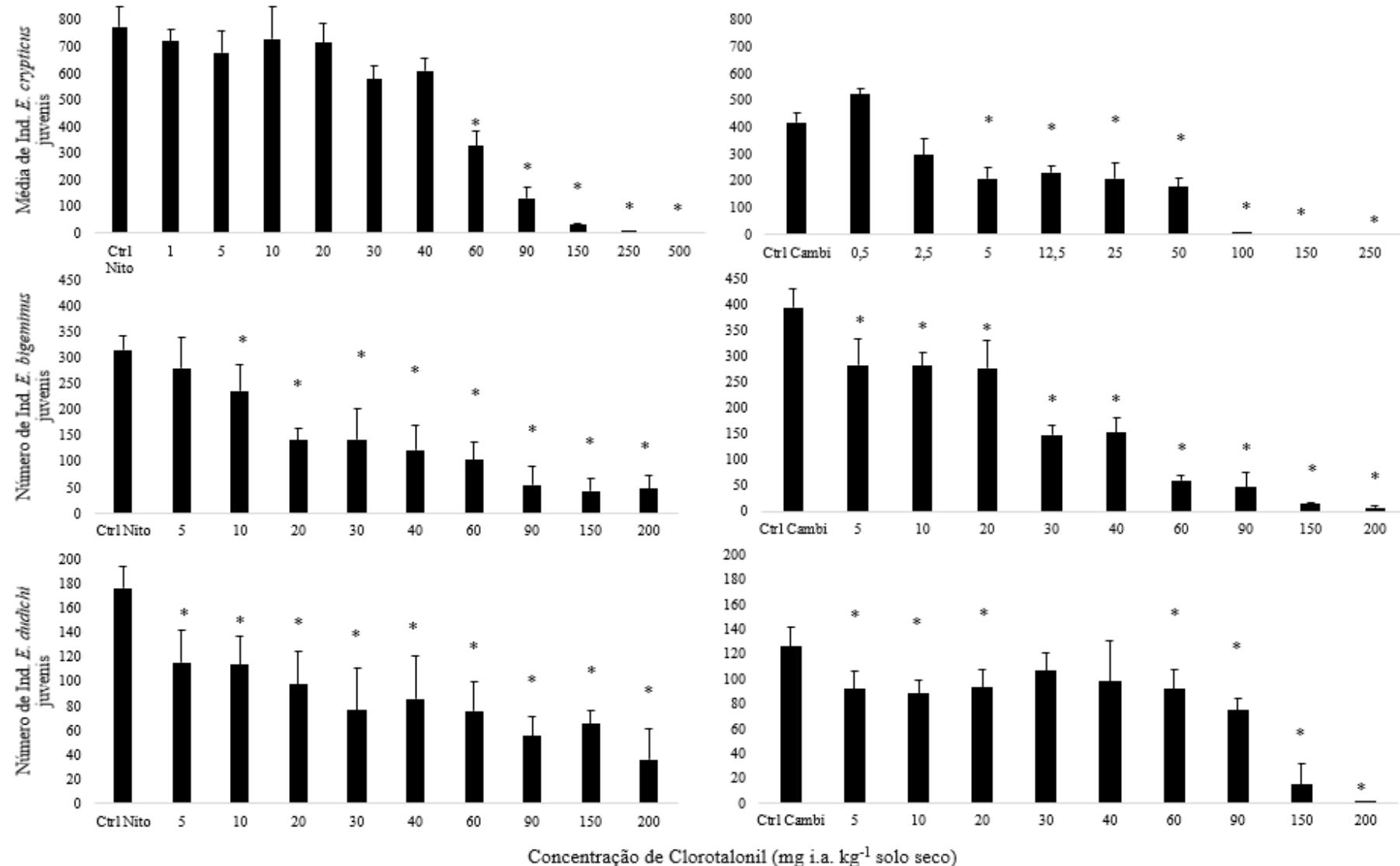
4.2 TOXICIDADE CRÔNICA COM O FUNGICIDA CLOROTALONIL

4.2.1 Toxicidade crônica de enquitreídeos

A reprodução dos enquitreídeos foi afetada ($p \leq 0,05$) pela aplicação do fungicida clorotalonil em todos os testes realizados no Nitossolo Vermelho eutroférrego assim como no Cambissolo húmico (Figura 1).

Com base nos resultados obtidos para o Nitossolo e Cambissolo estimou-se a concentração efetiva EC₅₀ dos organismos, com seus respectivos intervalos de confiança (Tabela 5). Os valores de EC₅₀ estimados para o Nitossolo variaram entre 24,43 a 57,67 mg i.a. kg⁻¹ de CLT entre as espécies de enquitreídeos, enquanto os valores de EC₅₀ no Cambissolo variaram entre 7,68 a 112,51 mg i.a. kg⁻¹ de CLT.

Figura 1 – Média de indivíduos (Ind.) juvenis dos enquistreídeos em Nitossolo Vermelho eutroferríco (Nito) e Cambissolo húmico (Cambi) contaminado com concentrações crescentes do fungicida clorotalonil. *Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste de Dunnett. (T) Desvio padrão.



Fonte: produção do próprio autor, 2018.

Tabela 5 – Concentração efetiva (EC₅₀) e intervalo de confiança, Modelo estatístico e r² (%) do ajuste dos dados na curva) para os testes de reprodução de enquitreídeos em Nitossolo Vermelho eutroférreco (Nitossolo) e Cambissolo húmico (Cambissolo) com aplicação de doses crescentes de clorotalonil.

	EC ₅₀ (mg i.a. kg ⁻¹)	Modelo Estatístico	r ² (%)
Nitossolo			
<i>E. crypticus</i>	57,67 (52,87 – 62,46)	Logístico	98
<i>E. bigeminus</i>	24,43 (17,34 – 31,53)	Exponencial	92
<i>E. dudichi</i>	29,42 (11,65 – 47,2)	Exponencial	80
Cambissolo			
<i>E. crypticus</i>	7,68 (3,25 – 12,11)	Hormesis	92
<i>E. bigeminus</i>	27,68 (22,3 – 33,05)	Exponencial	95
<i>E. dudichi</i>	112,51 (95,07 – 129,96)	Gompertz	90

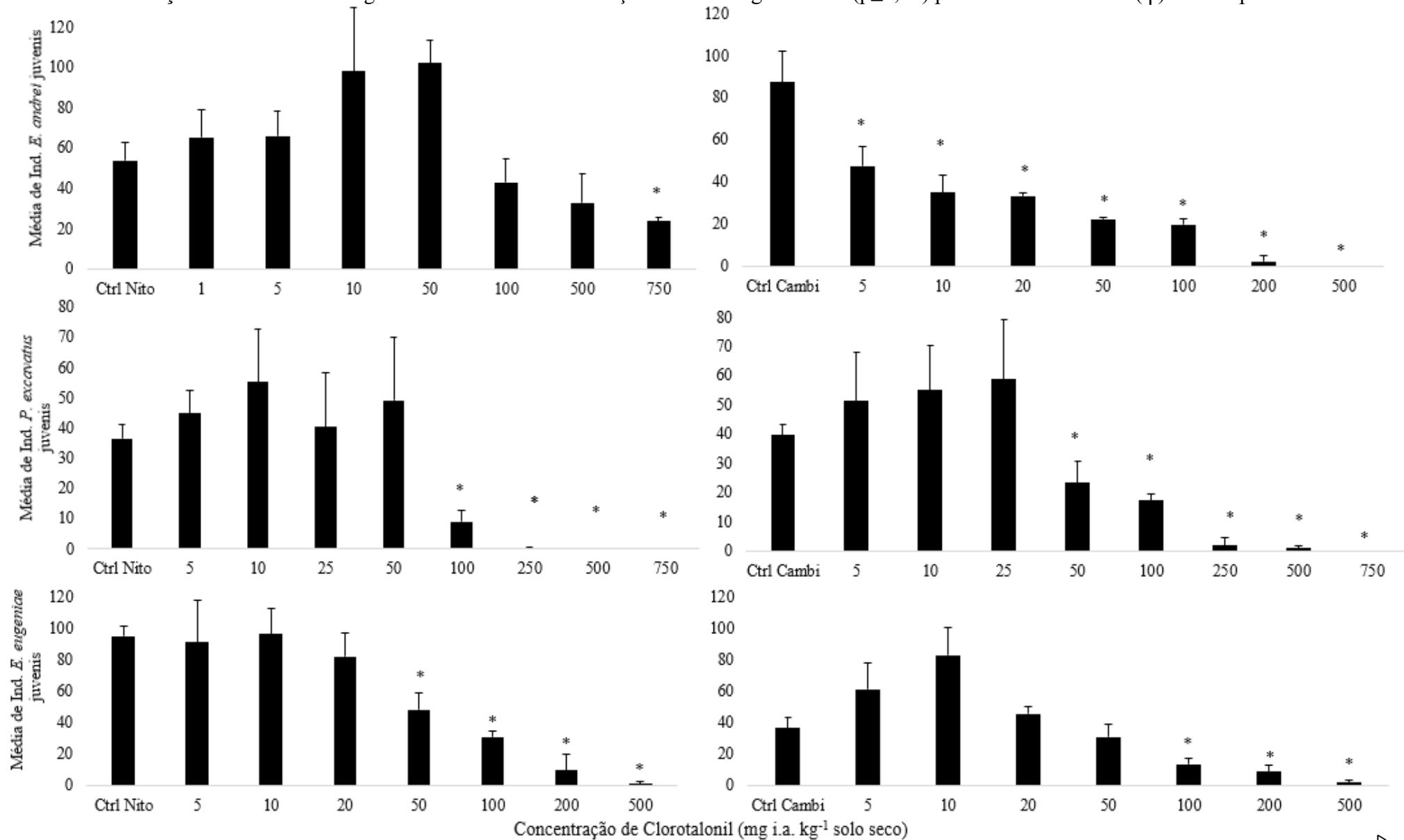
Fonte: produção do próprio autor, 2018.

4.2.2 Toxicidade crônica de minhocas

A reprodução das minhocas foi afetada ($p \leq 0,05$) pela aplicação do fungicida clorotalonil em todos os testes realizados tanto para o Nitossolo Vermelho eutroférreco como para o Cambissolo húmico (Figura 2).

Os valores de EC₅₀ estimados para o Nitossolo variaram entre 56,53 a 475,72 mg i.a. kg⁻¹ de CLT entre as espécies de minhocas, enquanto os valores de EC₅₀ no Cambissolo variaram entre 6,87 a 79,78 mg i.a. kg⁻¹ de CLT (Tabela 6).

Figura 2 – Média de indivíduos (Ind.) juvenis das minhocas em Nitossolo Vermelho eutroférico (Nito) e Cambissolo húmico (Cambi) contaminado com concentrações crescentes do fungicida clorotalonil. *Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste de Dunnett. (T) Desvio padrão.



Fonte: produção do próprio autor, 2018.

Tabela 6 – Concentração efetiva (EC₅₀) e intervalo de confiança, Modelo estatístico e r² (%) do ajuste dos dados na curva) para os testes de reprodução de minhocas em Nitossolo Vermelho eutroférico (Nitossolo) e Cambissolo húmico (Cambissolo) com aplicação de doses crescentes de clorotalonil (mg i.a. kg⁻¹).

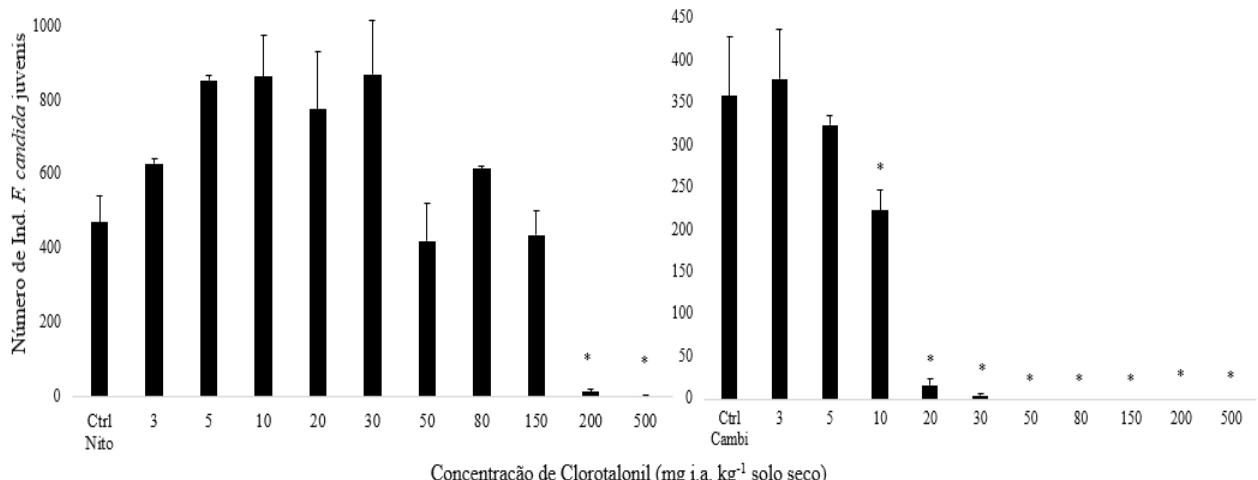
	EC ₅₀ (mg i.a. kg ⁻¹)	Modelo Estatístico	r ² (%)
Nitossolo			
<i>E. andrei</i>	475,72 (161,8 – 789,64)	Gompertz	64
<i>P. excavatus</i>	96,11 (91,72 – 100,5)	Logístico	80
<i>E. eugeniae</i>	56,53 (39,76 – 73,31)	Exponencial	89
Cambissolo			
<i>E. andrei</i>	6,87 (3,19 – 10,55)	Logístico	95
<i>P. excavatus</i>	67,89 (44,48 – 91,31)	Hormesis	91
<i>E. eugeniae</i>	79,78 (36,69 – 122,89)	Hormesis	92

Fonte: produção do próprio autor, 2018.

4.2.3 Toxicidade crônica de colêmbolos

A reprodução dos colêmbolos da espécie *F. candida* foi afetada ($p \leq 0,05$) pela aplicação do fungicida clorotalonil no Nitossolo, assim como no Cambissolo (Figura 3).

Figura 3 – Média de indivíduos (Ind.) juvenis de colêmbolos em Nitossolo Vermelho eutroférico (Nito) e Cambissolo húmico (Cambi) contaminado com concentrações crescentes do fungicida clorotalonil. *Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste de Dunnett. (T) Desvio padrão.



Fonte: produção do próprio autor, 2018.

Os valores de EC₅₀ estimados para o Nitossolo foi de 158,82 e 11,27 mg i.a. kg⁻¹ para o Cambissolo (Tabela 7).

Tabela 7 – Concentração efetiva (EC₅₀) e intervalo de confiança, Modelo estatístico e r² (%) do ajuste dos dados na curva) para os testes de reprodução de colêmbolos em Nitossolo Vermelho eutroférreco (Nitossolo) e Cambissolo húmico (Cambissolo) com aplicação de doses crescentes de clorotalonil (mg i.a. kg⁻¹).

	EC ₅₀ (mg i.a. kg ⁻¹)	Modelo Estatístico	r ² (%)
Nitossolo			
<i>F. candida</i>	158,82 (140,25 – 177,4)	Gompertz	85
Cambissolo			
<i>F. candida</i>	11,27 (12,33 – 19,22)	Gompertz	98

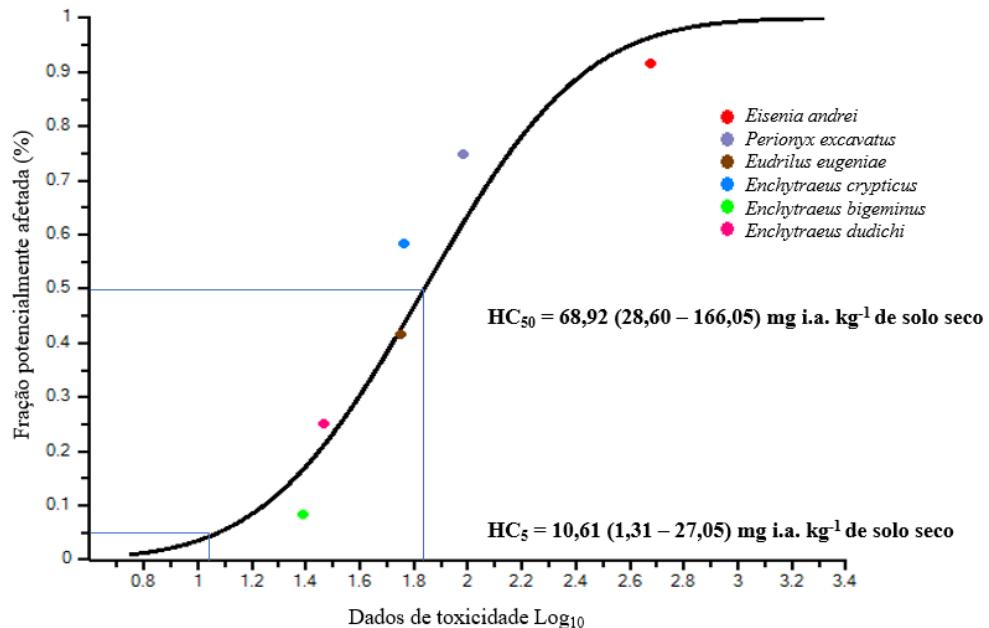
Fonte: produção do próprio autor, 2018.

4.2.4 Curvas de Distribuição de Sensibilidade das Espécies (SSD)

Para o Nitossolo, o valor de HC₅ para as seis espécies de oligoquetas estimado foi de 10,61 (1,31 – 27,05) mg i.a. kg⁻¹ de solo seco, e o HC₅₀ 68,92 (28,60 – 166,05) mg i.a. kg⁻¹ de solo seco (Figura 4). Pode se observar nesta curva que, a ordem crescente de sensibilidade das espécies é *E. bigeminus* > *E. dudichi* > *E. eugeniae* > *E. crypticus* > *P. excavatus* > *E. andrei* (Figura 4).

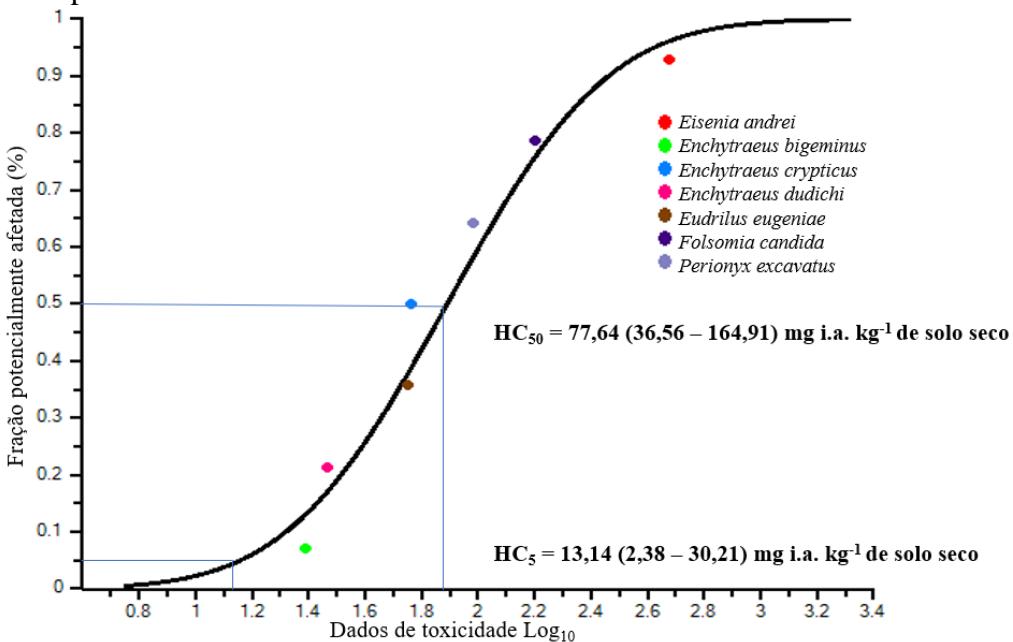
Quando o artrópode, *F. candida*, é inserido na curva de sensibilidade, o valor de HC₅ aumenta, ficando em 13,14 (2,38 – 30,21) mg i.a. kg⁻¹ de solo seco, e o HC₅₀ para 77,64 (36,56 – 164,91) mg i.a. kg⁻¹ de solo seco. Pode se observar nesta curva que, a ordem crescente de sensibilidade das espécies é *E. bigeminus* > *E. dudichi* > *E. eugeniae* > *E. crypticus* > *P. excavatus* > *F. candida* > *E. andrei* (Figura 5).

Figura 4 – Curva de Distribuição da Sensibilidade de Espécies para o fungicida clorotalonil em um Nitossolo Vermelho eutroférrego com base nos valores de EC₅₀ para diferentes espécies de oligoquetas. A concentração de risco das espécies para 5% (HC₅) e 50% (HC₅₀) são apresentadas juntamente com os limites superiores e inferiores do intervalo de confiança (95%) entre parênteses.



Fonte: produção do próprio autor, 2018.

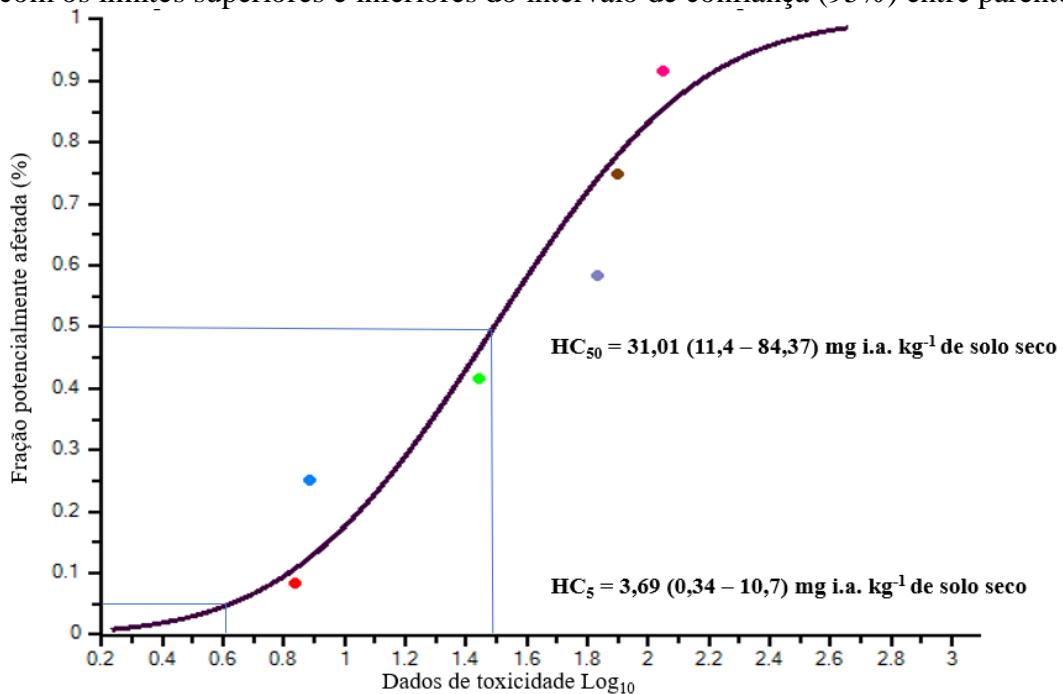
Figura 5 – Curva de Distribuição da Sensibilidade de Espécies para o fungicida clorotalonil em um Nitossolo Vermelho eutroférrego com base nos valores de EC₅₀ para diferentes espécies de invertebrados. A concentração de risco das espécies para 5% (HC₅) e 50% (HC₅₀) são apresentadas juntamente com os limites superiores e inferiores do intervalo de confiança (95%) entre parênteses.



Fonte: produção do próprio autor, 2018.

Para o Cambissolo o valor de HC₅, para as seis espécies de oligoquetas testadas foi de 3,69 (0,34 – 10,7) mg i.a. kg⁻¹ de solo seco, e o HC₅₀ para 31,01 (11,4 – 84,37) mg i.a. kg⁻¹ de solo seco (Figura 6). Pode-se observar nesta curva que, a ordem crescente de sensibilidade das espécies é *E. andrei* > *E. crypticus* > *E. bigeminus* > *P. excavatus* > *E. eugeniae* > *E. dudichi* (Figura 6).

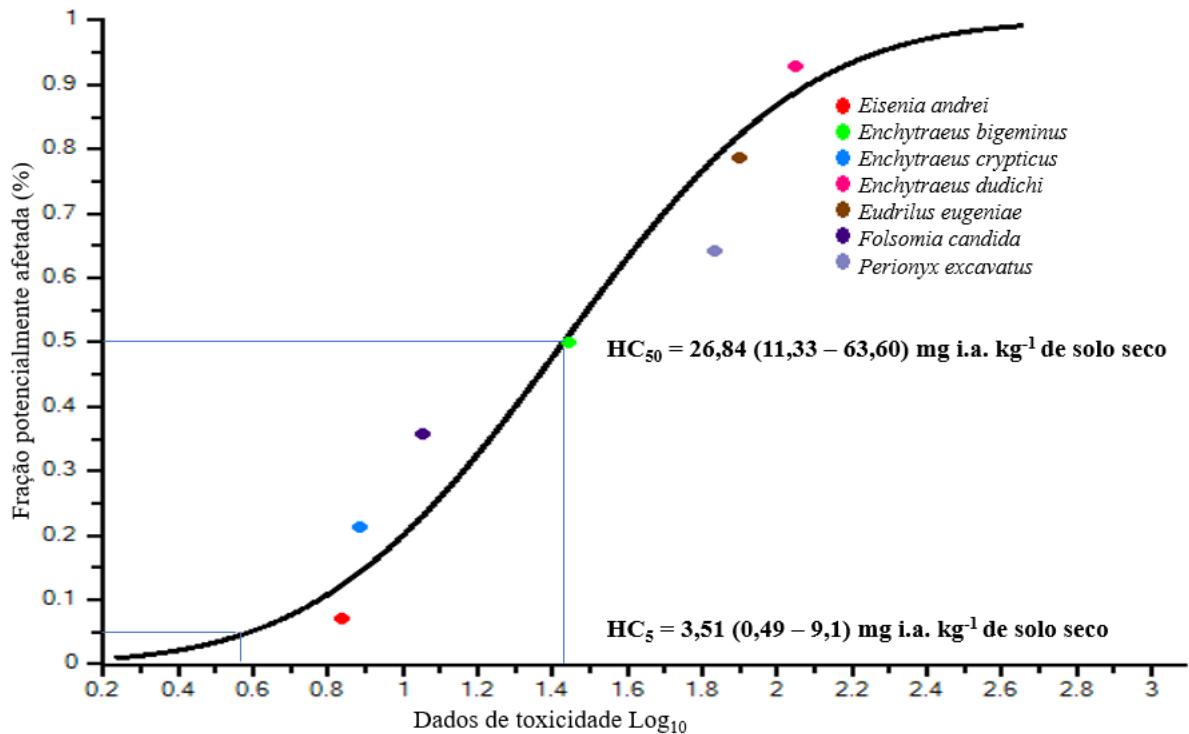
Figura 6 – Curva de Distribuição da Sensibilidade de Espécies para o fungicida clorotalonil em um Cambissolo húmico com base nos valores de EC₅₀ para diferentes espécies de oligoquetas. A concentração de risco das espécies para 5% (HC₅) e 50% (HC₅₀) são apresentadas juntamente com os limites superiores e inferiores do intervalo de confiança (95%) entre parênteses.



Fonte: produção do próprio autor, 2018.

Quando um artrópode (*F. candida*) é inserido na curva, podemos observar que o valor de HC₅ fica menor, sendo HC₅ = 3,51 (0,49 – 9,1) mg i.a. kg⁻¹ de solo seco, e o HC₅₀ para 26,84 (11,33 – 63,6) mg i.a. kg⁻¹ de solo seco (Figura 7). Nesta curva a ordem crescente de sensibilidade das espécies é *E. andrei* > *E. crypticus* > *F. candida* > *E. bigeminus* > *P. excavatus* > *E. eugeniae* > *E. dudichi* (Figura 7).

Figura 7 – Curva de Distribuição da Sensibilidade de Espécies para o fungicida clorotalonil em um Cambissolo húmico com base nos valores de EC₅₀ para diferentes espécies de invertebrados. A concentração de risco das espécies para 5% (HC₅) e 50% (HC₅₀) são apresentadas juntamente com os limites superiores e inferiores do intervalo de confiança (95%) entre parênteses.



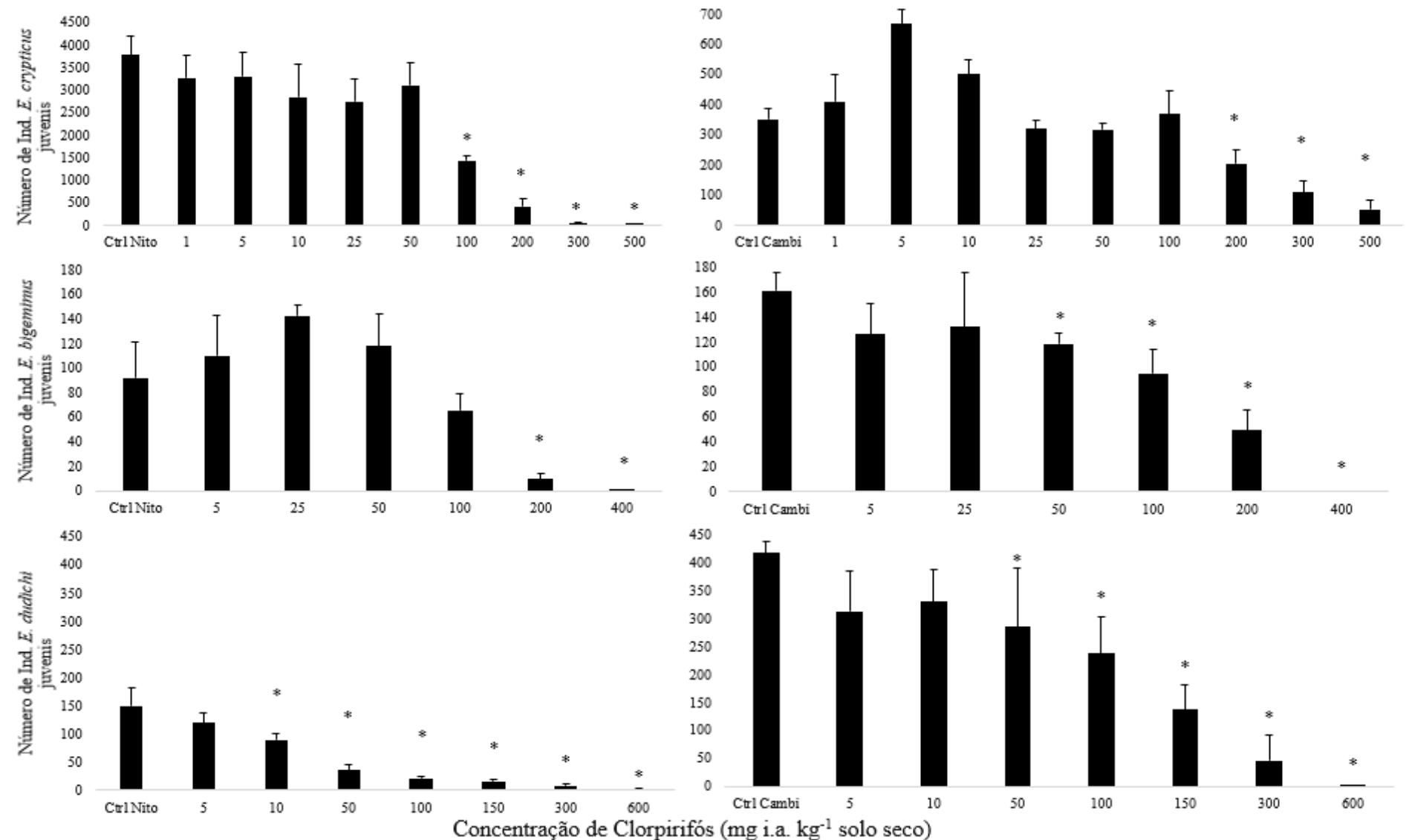
Fonte: produção do próprio autor, 2018.

4.3 TOXICIDADE COM CLORPIRIFÓS

4.3.1 Toxicidade crônica de enquitreídeos

A reprodução dos enquitreídeos foi afetada ($p \leq 0,05$) pela aplicação do inseticida clorpirifós em todos os testes realizados no Nitossolo Vermelho eutroférrico assim como no Cambissolo húmico (Figura 8).

Figura 8 – Média de indivíduos (Ind.) juvenis dos enquistreídeos em Nitossolo Vermelho eutroférico (Nito) e Cambissolo húmico (Cambi) contaminado com concentrações crescentes do inseticida clorpirifós. *Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste de Dunnett. (T) Desvio padrão.



Fonte: produção do próprio autor, 2018.

Os valores de EC₅₀ estimados para o Nitossolo variaram entre 16,09 a 106,33 mg i.a. kg⁻¹ de solo seco entre as espécies de enquitreídeos, enquanto os valores de EC₅₀ no Cambissolo variaram entre 125,63 a 165,02 mg i.a. kg⁻¹ de solo seco (Tabela 8).

Tabela 8 – Concentração efetiva (EC₅₀) e intervalo de confiança, Modelo estatístico e r² (%) do ajuste dos dados na curva) para os testes de reprodução de enquitreídeos em Nitossolo Vermelho eutroférrego (Nitossolo) e Cambissolo húmico (Cambissolo) com aplicação de doses crescentes de clorpirifós.

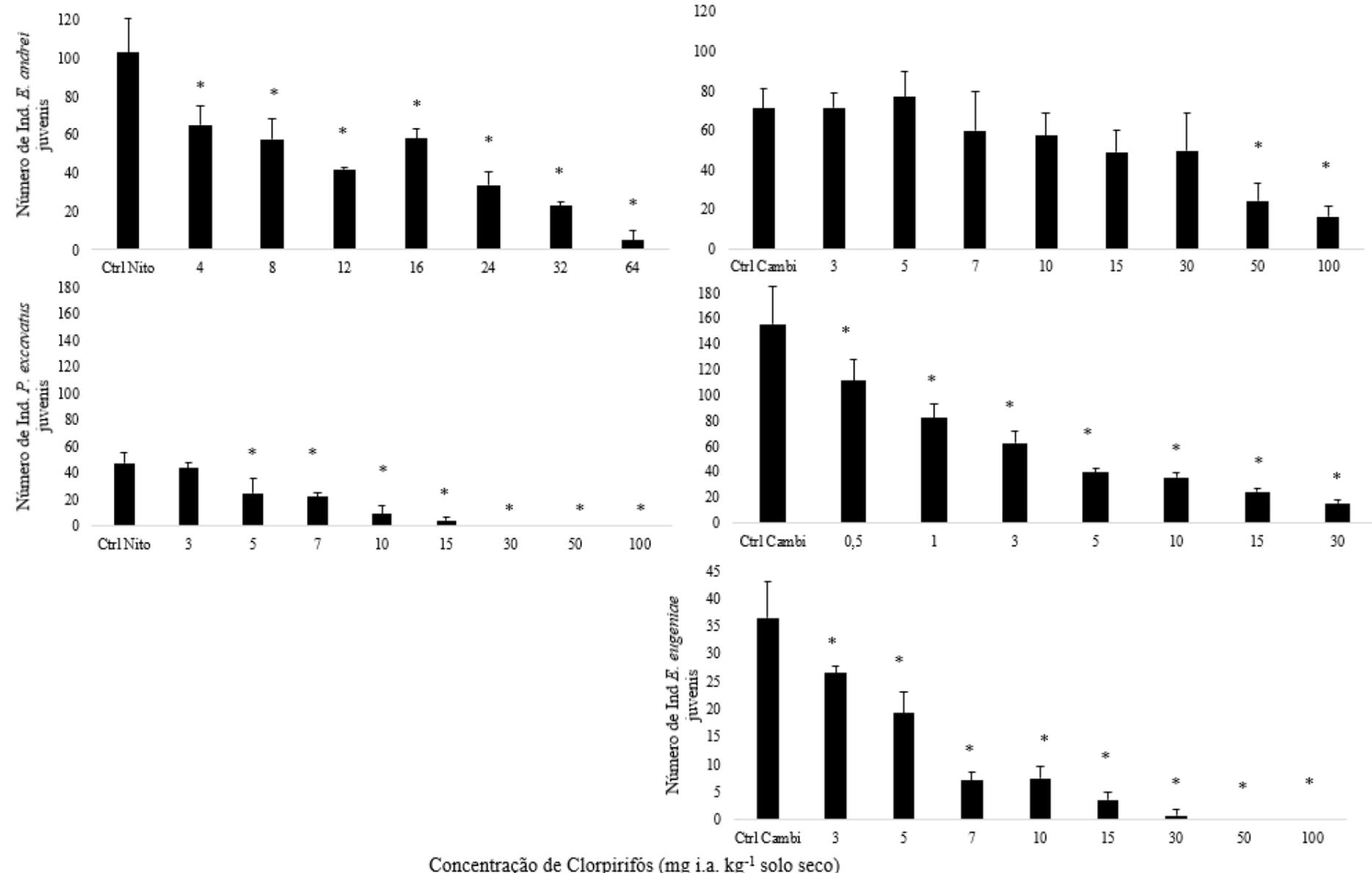
	EC ₅₀ mg i.a. kg ⁻¹	Modelo Estatístico	r ² (%)
Nitossolo			
<i>E. crypticus</i>	97,6 (83 – 112,19)	Logístico	98
<i>E. dudichi</i>	16,09 (11 – 21,18)	Logístico	97
<i>E. bigeminus</i>	106,33 (86,07 – 126,6)	Logístico	90
Cambissolo			
<i>E. crypticus</i>	165,02 (92,57 – 237,47)	Gompertz	82
<i>E. bigeminus</i>	140,18 (99,39 – 180,96)	Gompertz	90
<i>E. dudichi</i>	125,63 (92,19 – 159,07)	Logístico	91

Fonte: produção do próprio autor, 2018.

4.3.2 Toxicidade crônica de minhocas

A reprodução das minhocas foi afetada ($p \leq 0,05$) pela aplicação do inseticida clorpirifós em todos os testes realizados no Nitossolo assim como no Cambissolo (Figura 9).

Figura 9 – Média de indivíduos (Ind.) juvenis das minhocas em Nitossolo Vermelho eutroférico (Nito) e Cambissolo húmico (Cambi) contaminado com concentrações crescentes do inseticida clorpirifós. *Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste de Dunnett. (T) Desvio padrão.



Fonte: produção do próprio autor, 2018.

Os valores de EC₅₀ estimados para o Nitossolo 11,11 mg i.a. kg⁻¹ para a *E. andrei* e 5,8 mg i.a. kg⁻¹ de CHP para espécies *P. excavatus*. Os valores de EC₅₀ no Cambissolo variaram entre 1,44 a 42,93 mg i.a. kg⁻¹ de CHP (Tabela 9).

Tabela 9 – Concentração efetiva (EC₅₀) e intervalo de confiança, Modelo estatístico e r² (% do ajuste dos dados na curva) para os testes de reprodução de minhocas em Nitossolo Vermelho eutroférrego (Nitossolo) e Cambissolo húmico (Cambissolo) com aplicação de doses crescentes de clorpirifós (mg i.a. kg⁻¹). – Teste não realizado.

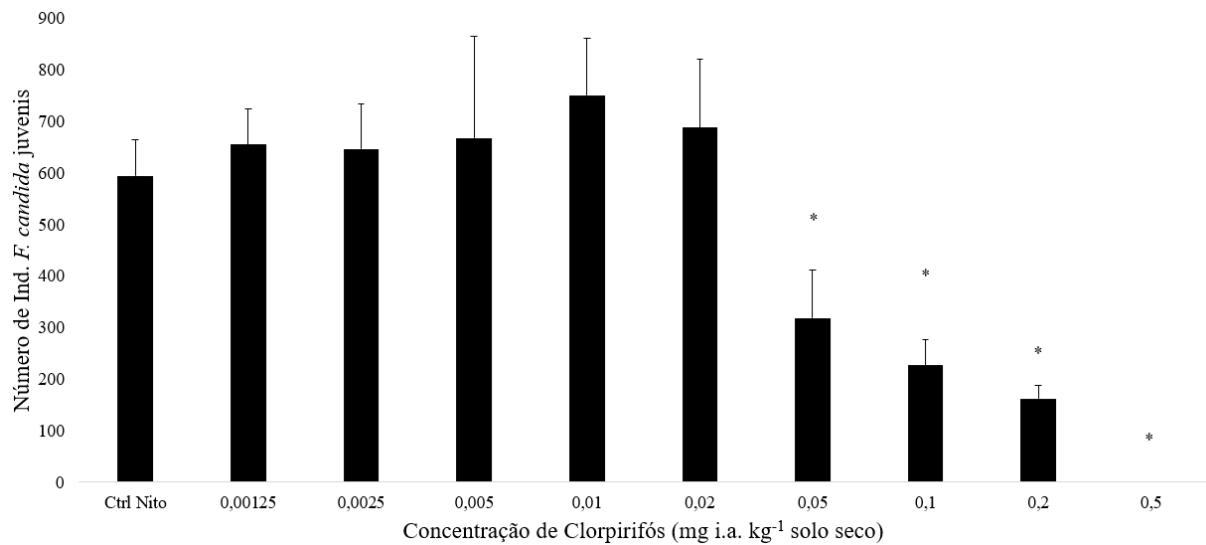
	EC ₅₀ mg i.a. kg ⁻¹	Modelo Estatístico	r ² (%)
Nitossolo			
<i>E. andrei</i>	11,11 (7,24 – 14,98)	Gompertz	93
<i>P. excavatus</i>	5,8 (4,9 – 6,68)	Logístico	96
<i>E. eugeniae</i>	–	–	–
Cambissolo			
<i>E. andrei</i>	42,93 (30,11 – 55,76)	Gompertz	88
<i>P. excavatus</i>	1,44 (0,92 – 1,95)	Logístico	96
<i>E. eugeniae</i>	4,72 (4,11 – 5,33)	Logístico	97

Fonte: produção do próprio autor, 2018.

4.3.3 Toxicidade crônica de colêmbolos

A reprodução dos colêmbolos da espécie *F. candida* foi afetada (p≤0,05) pela aplicação do inseticida clorpirifós no Nitossolo (Figura 10) obtendo um EC₅₀ de 0,065 (0,046 – 0,083 mg kg⁻¹), onde o modelo que melhor se adaptou aos dados foi o Exponencial. Os dados de CENO (0,02 mg kg⁻¹) e CEO (0,05 mg kg⁻¹) podem ser observados na figura abaixo (Figura 10).

Figura 10 – Média de indivíduos (Ind.) juvenis de *Folsomia candida* em Nitossolo Vermelho eutroférrico contaminado com concentrações crescentes do inseticida clorpirimifós. *Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste de Dunnett. (T) Desvio padrão.



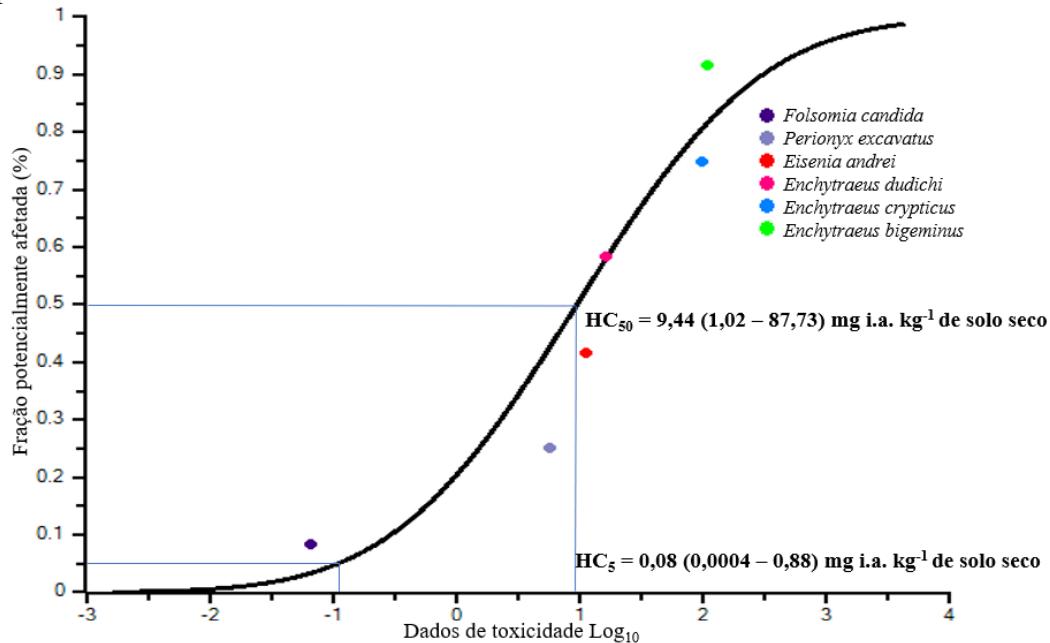
Fonte: produção do próprio autor, 2018.

4.3.4 Curvas de Distribuição de Sensibilidade das Espécies (SSD)

Para o Nitossolo, o valor de HC_5 para as espécies avaliadas foi de 0,08 (0,0004 – 0,88) mg i.a. kg⁻¹ de solo seco, e o HC_{50} para 9,44 (1,02 – 87,73) mg i.a. kg⁻¹ de solo seco. (Figura 11). Pode se observar nesta curva que a ordem crescente de sensibilidade das espécies foi *F. candida* > *P. excavatus* > *E. andrei* > *E. dudichi* > *E. crypticus* > *E. bigeminus* (Figura 11).

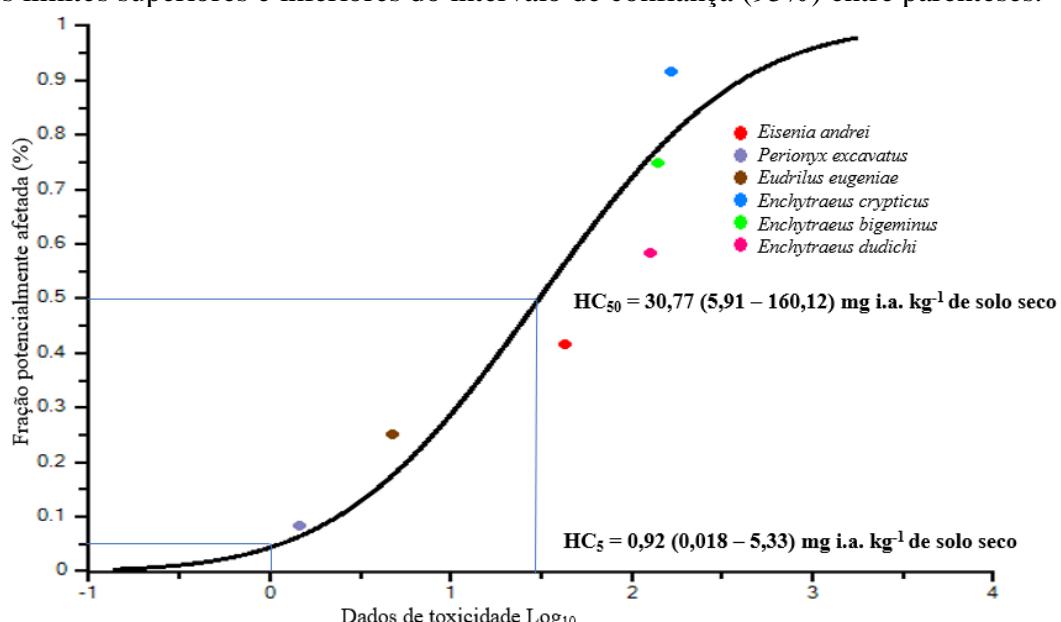
Para o Cambissolo, o valor de HC_5 para as espécies de oligoquetas testadas, foi maior quando comparados ao Nitossolo, sendo HC_5 0,92 (0,018 – 5,33) mg i.a. kg⁻¹ de solo seco, e o HC_{50} para 30,77 (5,91 – 160,12) mg i.a. kg⁻¹ de solo seco (Figura 12). Nesta curva a ordem crescente de sensibilidade das espécies *P. excavatus* > *E. eugeniae* > *E. andrei* > *E. dudichi* > *E. bigeminus* > *E. crypticus*.

Figura 11 – Curva de Distribuição da Sensibilidade de Espécies para o inseticida clorpirimfós em um Nitossolo Vermelho eutroférico com base nos valores de EC₅₀ para diferentes espécies de invertebrados. A concentração de risco das espécies para 5% (HC₅) e 50% (HC₅₀) são apresentadas juntamente com os limites superiores e inferiores do intervalo de confiança (95%) entre parênteses.



Fonte: produção do próprio autor, 2018.

Figura 12 – Curva de Distribuição da Sensibilidade de Espécies para o inseticida clorpirimfós em um Cambissolo húmico com base nos valores de EC₅₀ para diferentes espécies de oligoquetas. A concentração de risco das espécies para 5% (HC₅) e 50% (HC₅₀) são apresentadas juntamente com os limites superiores e inferiores do intervalo de confiança (95%) entre parênteses.



Fonte: produção do próprio autor, 2018.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo foram realizados testes de toxicidade crônica com dois agrotóxicos sobre sete diferentes organismos edáficos em dois solos naturais distintos, mesmo que o uso de solos naturais (ao invés do SAT) dificulte conclusões e comparações com outros estudos, optamos por sua utilização dada importância ecológica e relevância (AMORIM et al., 2005a), especialmente para regiões tropicais, onde há uma escassez considerável de informações sobre os efeitos de diferentes xenobióticos (ALVES et al., 2013; MENEZES-OLIVEIRA et al., 2017). Comumente, os dados gerados a partir de regiões temperadas são extrapolados para se realizarem as AREs e tomadas de decisões sobre regiões tropicais, sendo este procedimento nem sempre apropriado, uma vez que as propriedades específicas do solo originam, muitas vezes, sensibilidades específicas (AMORIM et al., 2005b; NIVA et al., 2016).

5.1.1 Toxicidade do clorotalonil

Os efeitos do fungicida CLT nos organismos não-alvo foram ainda pouco avaliados, principalmente no que se refere à ecotoxicologia terrestre, em uma revisão bibliográfica realizada por Römbke et al. (2017), verificaram que até então, há apenas um experimento com enquitreídeos usando este fungicida CLT. Os resultados de toxicidade crônica em enquitreídeos observados em ambos os solos demonstram efeito significativo na reprodução dos enquitreídeos a partir da concentração 2,5 mg i.a. kg⁻¹ de solo seco (Figura 1).

Em relação aos EC₅₀, estes variaram entre as espécies e os solos (Tabela 5). Contudo, Leitão et al. (2014) testando a toxicidade do CLT em um solo natural de Portugal de textura franco – argilo – arenosa, com *E. crypticus*, encontraram valores de EC₅₀ de 112,9 mg i.a. kg⁻¹ de solo seco, sendo muito semelhantes a um dos EC₅₀ encontrado no presente trabalho em Cambissolo de mesma textura (Tabela 2) sendo este 112,51 mg i.a. kg⁻¹ de solo seco, porém com outra espécie (*E. dudichi*), sendo esta menos sensível entre as espécies testadas (Tabela 5).

Em relação ao Nitossolo, pode-se observar que o *E. crypticus* não foi a espécie mais sensível ao CLT e sim o *E. bigeminus* (Tabela 5). Bandow et al. (2013) testaram a viabilidade de utilizar o enquitreídeo fragmentador *E. bigeminus* para se utilizar em testes ecotoxicológicos padronizados e concluíram ser uma espécie de fácil cultivo em laboratório e adequada para realizar os testes ecotoxicológicos. A diferença de sensibilidade entre as espécies de enquitreídeos testadas em diferentes solos naturais foi relatada por Kuperman et al. (2006) onde

o *E. crypticus* se mostrou ser o mais tolerante aos diferentes pHs, texturas e MO dos solos testados.

Nas três espécies de minhocas utilizadas no presente estudo, a toxicidade do CLT mostrou sensibilidades diferentes entre elas e também em relação ao tipo de solo. Em ambos os solos foram observados efeitos significativos na reprodução das minhocas a partir da concentração de 5 mg i.a. kg⁻¹ de solo seco (Figura 2) A toxicidade mais alta verificada nos testes realizados no Nitossolo foi com a espécie *E. eugeniae* (EC₅₀ = 56,53 mg i.a. kg⁻¹ de solo seco) e, no Cambissolo a espécie *E. andrei* (EC₅₀ = 6,87 mg i.a. kg⁻¹ de solo seco) (Tabela 6). Uma possível explicação para isso, é uma maior capacidade de bioacumulação de metais pesados (Zn e Cu) da espécie *E. eugeniae* que nas outras espécies, uma vez que o Nitossolo utilizado para este experimento apresentou maiores quantidades de Zn e Cu que o Cambissolo (Tabela 2) corroborando com o estudo de Patnaik e Reddy (2011), que observaram maiores concentrações de metais pesados no tecido de *E. eugeniae* do que a de *E. fetida* e *P. excavatus*, provavelmente devido à variação em seu metabolismo.

As variações entre os solos testados no que diz respeito aos valores de EC₅₀ para colêmbolos podem ser explicadas, em partes, pelas características físicas e químicas das duas classes de solo incluídas no presente estudo (Nitossolo e Cambissolo), especialmente no que se refere a adsorção os ingredientes ativos nas partículas de argila e na matéria orgânica (REGITANO et al., 2001). Desta forma os EC₅₀ para a espécie *F. candida* demonstraram maior sensibilidade a presença do CLT no Cambissolo (Tabela 7), apresentando resultados tanto inferior quanto superior ao resultado obtido por Leitão et al. (2014) que encontraram EC₅₀ de 31,1 mg i.a. kg⁻¹ de solo seco em um solo natural português.

O efeito tóxico do CLT presente no Nitossolo para os colêmbolos se mostraram ser menos sensíveis ao passo que as oligoquetas testados foram mais sensíveis, exceto a *E. andrei* (Figura 5) estando de acordo com o estudo de Kohlschmid e Ruf (2016), que concluíram que para os fungicidas, em geral, as minhocas são mais sensíveis do que os artrópodes. Em termos de concentração de risco em relação ao CLT, os valores encontrados de HC₅ para as seis oligoquetas foi menor quando comparado ao HC₅ após a inclusão do artrópode *F. candida* no Nitossolo (Figuras 4 e 5). Isso pode ser explicado pelo mecanismo de absorção dos agrotóxicos nos organismos do solo que se dá pelos compostos presentes na solução do solo. Os organismos do solo de corpo mole (ausência de exoesqueleto), tais como minhocas e enquîtreídeos, absorvem os agrotóxicos por meio da difusão passiva através da pele ou pela ingestão, juntamente com partículas do solo (DE SILVA et al., 2009).

Esses resultados demonstram maior toxicidade dos organismos quando expostos ao Cambissolo do que no Nitossolo, que pode ser explicado pela combinação dos efeitos do fungicida CLT e das propriedades físicas e químicas dos solos testados. Os baixos níveis de argila do Cambissolo (Tabela 2), podem resultar na menor adsorção do contaminante, com consequente disponibilidade desses compostos para os organismos do solo (REGITANO et al., 2001). Contudo, estudos envolvendo solos subtropicais ainda são praticamente inexistentes envolvendo organismos edáficos.

Segundo Chelinho et al. (2011), as propriedades do solo influenciam na biodisponibilidade e na toxicidade dos contaminantes. Não obstante, o Cambissolo possui menores valores de pH quando comparados ao Nitossolo. Foi relatado na literatura que, valores de pH menores do que 5,0 aumentam a disponibilidade de agrotóxicos no solo (KUPERMAN et al., 2006). Adicionalmente, o clorotalonil possui baixa solubilidade e taxa de adsorção elevada, facilitando assim, sua adsorção às partículas do solo (Tabela 1) (REGITANO et al., 2001; REGITANO et al., 2002). Contudo, segundo Leitão et al. (2014) a mobilidade desse fungicida pode ocorrer devido à afinidade média para o compartimento da água e potencial de lixiviação dependendo das características do solo (Tabela 2). Se estiver presente na fração de água do solo (água dos poros do solo), o pesticida pode ser biodisponível para a absorção pelos organismos do solo (STYRISHAVE et al., 2008; REGITANO et al., 2001). Isso explica o fato de termos maior toxicidade de organismos no Cambissolo quando comparado ao Nitossolo.

Esses resultados servem de alerta para a importância de utilizar mais critérios relacionados as características dos solos, como o caso da textura, para elaboração de novas diretrizes da legislação (SEGAT et al., 2015; MACCARI et al., 2016; NIVA et al., 2016; MENEZES-OLIVEIRA et al., 2017; ZORTÉA et al., 2017), uma vez que os custos para remoção dos fungicidas aplicados em doses superiores às recomendadas, excedem os ganhos obtidos durante a vida produtiva dos sistemas agrícolas e do solo (ORONA et al., 2013).

5.1.2 Toxicidade do clorpirifós

Na presente dissertação foram apresentados resultados inéditos de testes de toxicidade crônica com organismos edáficos com o i.a. CHP em solos naturais subtropicais, envolvendo as espécies de oligoquetas *E. bigeminus*, *E. dudichi*, *P. excavatus* e *E. eugeniae*. Lowe e Butt (2007), em uma revisão sobre seleção de espécies para testes ecotoxicológicos crônicos, sugerem que o uso mais amplo de técnicas de cultura estabelecidas aliadas aos requisitos ecológicos e ao comportamento das espécies aumentará a consistência e a validade dos testes

de toxicidade subletal dos organismos, incluindo espécies que fragmentam o seu corpo e formam outro indivíduo a partir de cada fragmento, por exemplo *E. bigeminus* e *E. dudichi*.

Os resultados dos testes de toxicidade crônica mostram que a toxicidade do CHP difere para os diferentes organismos testados no presente estudo. No Nitossolo foi observado efeito significativo na reprodução de enquitreídeos a partir da concentração de 5 mg kg⁻¹ de solo seco (Figura 8), onde o *E. dudichi* foi o mais sensível apresentando um EC₅₀ de 16,09 mg i.a. kg⁻¹ de solo seco, valor bem inferior ao encontrado por Carniel (2015) também num solo natural subtropical brasileiro (Nitossolo Bruno) sendo EC₅₀ de 87,81 mg i.a. kg⁻¹ de solo seco, valor este que se aproxima mais dos resultados encontrados para as outras espécies testadas (Tabela 8).

O Cambissolo se mostrou menos sensível para as três espécies testadas, com valores muito superiores aos do Nitossolo, contudo a espécie mais sensível foi a mesma (Tabela 8). Não obstante, Amorim et al. (2008) testaram o comportamento de fuga de *E. albidus* quando expostos ao CHP e encontraram uma dose de efeito muito superior às encontradas no presente estudo, sendo EC₅₀ = 933 mg i.a. kg⁻¹ de solo seco em um solo natural padronizado europeu (LUFA 2.2).

Os valores encontrados de EC₅₀ para as minhocas no Nitossolo foram 11,11 mg i.a. kg⁻¹ de solo seco para a *E. andrei* e 5,8 mg i.a. kg⁻¹ de solo seco para *P. excavatus*. Já no Cambissolo os valores de EC₅₀ foram de 42,93; 1,44 e 4,72 mg i.a. kg⁻¹ de solo seco para *E. andrei*, *P. excavatus* e *E. eugeniae*, respectivamente (Tabela 9). Em um estudo realizado por De Silva et al. (2009) com a mesma temperatura (26 °C) do presente trabalho, com solo natural tropical (franco – argilo – arenoso) e mesmo ingrediente ativo (CHP), foi encontrado um EC₅₀ de 5,87 mg i.a. kg⁻¹ de solo seco para *E. andrei* e sob condições semelhantes. Já para *P. excavatus* De Silva et al. (2010) obtiveram um EC₅₀ de 3 mg i.a. kg⁻¹ de solo seco, em ambos estudos os autores afirmam que a minhoca *P. excavatus* é mais sensível que as espécies *E. andrei* e *E. fetida*, encorajando o uso da espécie *P. excavatus* para condições tropicais.

Tais resultados corroboram com os resultados obtidos neste trabalho sendo a espécie *P. excavatus* a mais sensível entre as minhocas testadas para ambos os solos. Contudo, a toxicidade do CHP entre as espécies de minhoca varia muito conforme relatado. Ma e Bodt (1993), em estudo de toxicidade aguda com espécies ecologicamente relevantes como *Lumbricus rubellus* e *L. terrestris* mostraram que esse gênero é mais sensíveis do que *Eisenia* sp. Isso vai de encontro com o presente conjunto de dados onde a *E. andrei* foi a espécie menos sensível entre as minhocas testadas (Tabela 9), ressaltando a importância de inserir outras espécies e gêneros nas AREs.

No Nitossolo, foram observados efeitos para colêmbolos a partir da dose 0,05 mg i.a. kg^{-1} de solo seco (Figura 10) e um EC_{50} de 0,065 mg i.a. kg^{-1} de solo seco. Kamoun et al. (2017) testaram os efeitos do CHP na reprodução de *F. candida* em quatro diferentes solos, sendo dois deles tropicais, onde os EC_{50} encontrados foram inferiores aos obtidos neste trabalho, sendo para o solo da Nigéria EC_{50} 0,031 (MO = 0,98%) e solo da Tunísia EC_{50} 0,035 (MO = 0,29%). Essa diferença pode ser explicada pela diferença no conteúdo de MO entre os solos, havendo o Nitossolo uma quantidade superior àqueles solos do continente africano (Tabela 2), onde a variabilidade da capacidade de sorção pode ser explicada tanto pela diferença na composição da matéria orgânica quanto pelas interações entre as frações orgânicas e inorgânicas em todo o solo (SAVINI et al., 2017).

Jegede et al. (2017) testaram a influência da temperatura na toxicidade de CHP em colêmbolos em solo artificial OECD, e observaram que o número de juvenis produzidos nos controles foi significativamente menor a 26 °C do que a 20 °C sendo aproximadamente entre 400 – 500 indivíduos juvenis encontrados a 26 °C, valor próximo ao encontrado nos controles dos solos testados neste estudo (Tabela 4). Em testes com outros pesticidas e diferentes solos, muitas vezes a literatura demonstra que os testes em solos artificiais da OCDE são menos sensíveis do que os realizados com solos de campos naturais (RÖMBKE et al., 2007) dependendo do contaminante, o que geralmente é explicado pelo seu maior teor de matéria orgânica e, portanto, menor biodisponibilidade da substância de teste.

Os organismos apresentaram diferentes respostas de toxicidade ao CHP. No Nitossolo o valor de HC_5 foi de 0,08 mg i.a. kg^{-1} de solo seco, para o conjunto de cinco oligoquetas e um artrópode (Figura 11). Por outro lado, no Cambissolo, o valor encontrado de HC_5 foi 0,92 e 30,77 mg i.a. kg^{-1} de solo seco, para as seis oligoquetas testadas (Figura 12), valores estes muito inferiores aos encontrados por Frampton et al. (2006) utilizando dados de toxicidade aguda de seis oligoquetas expostas ao CHP, sendo o HC_5 de 94,9 mg i.a. kg^{-1} de solo seco. Esses resultados podem ser devido ao fato de terem sido utilizados dados de toxicidade aguda e não dados de reprodução. O CHP tem comportamento hidrofóbico no solo, o que pode causar um aumento na disponibilidade adsorvida no solo e maior absorção dos organismos por ingestão (SVOBODOVÁ et al., 2018).

Assim, em um contexto geral, as curvas de sensibilidade são importantes ferramentas e podem ser utilizadas para avaliação do risco ecológico das populações edáficas (FRAMPTON et al., 2006). A busca por um organismo único nas avaliações é totalmente inviável (DAAM et al., 2010), devido as características distintas dos solos, dos mecanismos químicos de adsorção dos agrotóxicos e outras variáveis do solo como teor de matéria orgânica, pH, CTC, bases e

textura do solo que podem ser importantes condicionantes nas inter-relações entre os três componentes (solo, organismos, pesticida) (KAMOUN et al., 2017). Desta forma, para melhor compreensão destas interações é possível construir curvas que demonstram a sensibilidade dos organismos à exposição dos pesticidas e/ou outros contaminantes.

A busca pelo indicador universal ainda não é possível, entretanto a indicação de SSDs para diferentes tipos de solo é altamente recomendável, devido a heterogeneidade do solo em uma mesma região (CHELINHO et al., 2011). Para utilizar uma abordagem baseada em SSDs, seria necessário utilizar um número mínimo de espécies, existindo um consenso de quais as espécies seriam mais viáveis, em quais condições, se devem ser geradas curvas distintas (para oligoqueta ou artrópode) ou SSD combinadas, além do desenvolvimento de novos métodos padronizados e diretrizes validadas levaria um tempo e esforço consideráveis.

6 CONCLUSÕES

1. O fungicida CLT e o inseticida CHP afetaram negativamente a das reprodução das espécies individualmente testadas;
2. Os efeitos dos agrotóxicos na reprodução dos organismos variaram nos solos de diferentes classes texturais, sendo os efeitos mais expressivos no Cambissolo;
3. Os resultados de EC₅₀s das espécies individualmente observadas se comportam diferentemente em relação ao tipo de solo com o mesmo agrotóxico em comparação aos HC₅s, quando são consideradas o conjunto de espécies.
4. A curva de Distribuição de Sensibilidade de Espécies (SSD) pode ser utilizada como ferramenta para indicar a toxicidade dos agrotóxicos para uma comunidade de organismos edáficos em solos subtropicais.

7 REFERÊNCIAS

ABNT NBR ISO 11267. Qualidade do solo – Inibição da reprodução de Collembola (*Folsomia candida*) por poluentes do solo. Rio de Janeiro: **Associação Brasileira de Normas Técnicas**, p. 24, 2011.

ABNT NBR ISO 16387. Qualidade do solo – Efeitos de poluentes em Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.) – Determinação de efeitos sobre a reprodução e sobrevivência. Rio de Janeiro: **Associação Brasileira de Normas Técnicas**, p. 35, 2012.

ABNT NBR ISO 17616. Qualidade do solo – Guia para a seleção e a avaliação de bioensaios para caracterização ecotoxicológica de solos e materiais de solo. Rio de Janeiro: **Associação Brasileira de Normas Técnicas**, p. 15, 2010.

AGROFIT. Consulta de ingrediente ativo: clorotalonil. 2017a. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 05 dez. 2017.

AGROFIT. Consulta de ingrediente ativo: clorpirifós. 2017b. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 05 dez. 2017.

ALDENBERG, T.; JAWORSKA, J. S. Uncertainty of the Hazardous concentration and fraction affected for normal species sensitivity distributions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 46, p. 1-18, 2000.

ALMEIDA, V. E. S.; FRIEDRICH, K.; TYGEL, A. F.; MELGAREJO, L.; CARNEIRO, F. F. Uso de sementes geneticamente modificadas e agrotóxicos no Brasil: cultivando perigos. **Ciência & Saúde Coletiva**. v. 22, n. 10, p. 3333-3339, 2017.

ALVES, P. R. L.; CARDOSO, E. J.; MARTINES, A. M.; SOUSA, J. P.; PASINI, A. Earthworm ecotoxicological assessments of pesticides used to treat seeds under tropical conditions. **Chemosphere**. v. 90, n. 11, p. 2674-2682, 2013.

ALVES, P. R. L.; NATAL-DA-LUZ, T.; SOUSA, J. P.; CARDOSO, E. J. Ecotoxicological characterization of sugarcane vinasses when applied to tropical soils. **Science of the Total Environment**. v. 526, p. 222-232, 2015.

AMORIM, M. J. B.; RÖMBKE, J.; SCHEFFCZYK, A.; NOGUEIRA, A. J. A.; SOARES, A. Effects of different soil types on the collembolans *Folsomia candida* and *Hypogastrura assimilis* using the herbicide Phenmedipham. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 49, p. 343-352, 2005a.

AMORIM, M. J.; NOVAIS, S.; RÖMBKE, J.; SOARES, A. M. *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae): a test organism in a standardised avoidance test? Effects of different chemical substances. **Environment International**. v. 34, n. 3, p. 363-371, 2008.

AMORIM, M.; SOARESA, A.; RÖMBKE, J. Comparison of the influence of an artificial and a natural soil on the behaviour of *Enchytraeus albidus* – laboratory tests. In: **Proceedings of the Estonian Academy of Sciences, Biology, Ecology.** v. 54, p. 103-112, 2005b.

ANDRADE, M. A. S.; CONRADO, D. M.; NUNES-NETO, N. F.; ALMEIDA, R. O. Agrotóxicos como questão sociocientífica na educação CTSA. **Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental.** v. 33, p. 1-21, 2016.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN A. A. M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia.** São Carlos, SP. p. 322, 2003.

BANDOW, C.; COORS, A.; RÖMBKE, J. *Enchytraeus bigeminus* (Enchytraeidae, Oligochaeta) as a new candidate for ecotoxicological laboratory tests. **Soil Org.** v. 85, p. 103-112, 2013.

BARETTA, D.; SANTOS, J. C. P.; MAFRA, Á. 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.** v. 2 p. 97-106, 2003.

BELANGER, S.; BARRON, M.; CRAIG, P.; DYER, S.; GALAY-BURGOS, M.; HAMER, M.; MARSHALL, S.; POSTHUMA, L.; RAIMONDO, S.; WHITEHOUSE, P. Future needs and recommendations in the development of species sensitivity distributions: Estimating toxicity thresholds for aquatic ecological communities and assessing impacts of chemical exposures. **Integrated environmental assessment and management.** v. 13, n. 4, p. 664-674, 2017.

BELCHIOR, D. C. V.; DE SOUZA, A. S.; LÓPEZ, A. M. C.; SCHEIDT, G. N. Impactos de agrotóxicos sobre o meio ambiente e a saúde humana. **Cadernos de Ciência & Tecnologia.** v. 34, n. 1, p. 135-151, 2017.

BIANCHINI A.; MARTINS S. E.; JORGE M. B. O modelo do ligante biótico e suas aplicações em ecotoxicologia. 2009. Disponível em: <<http://www.inct-ta.furg.br/english/difusao/BLMM.pdf>>.

BUCH, A. C.; NIEMEYER, J. C.; CORREIA, M. E. F.; SILVA-FILHO, E. V. Ecotoxicity of mercury to *Folsomia candida* and *Proisotoma minuta* (Collembola: Isotomidae) in tropical soils: Baseline for ecological risk assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety.** v. 127, p. 22-29, 2016.

CAMPOS, P. S. Efeito dos herbicidas diuron, glifosato e paraquat e curvas de distribuição de sensibilidade de espécies (CDSE) para a proteção da diversidade de macrófitas aquáticas da região Amazônica. 2015. **Tese (Doutorado)** - Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica, Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2015.

CARDOSO, F. D. P.; ALMEIDA, M. C.; RIBEIRO, R. O.; VIANA, S. F. R.; MARQUES, E. E.; SOUZA, L. B. Expansão recente da fronteira agrícola e o consumo de

produtos agroquímicos: indicadores e possíveis impactos na saúde do trabalhador do campo em porto nacional – Tocantins. **Revista de Administração e Negócios da Amazônia.** v. 9, n. 3, p. 37-59, 2017.

CARNIEL, L. S. C. Avaliação do risco ecológico de mancozebe e clorpirifós para representantes da macro e mesofauna do solo e eficiência de leitos biológicos de descarte. 2015. **Dissertação (Mestrado)** - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Universidade Estadual de Santa Catarina. Lages, 2015.

CASTRO, I. B.; WESTPHAL, E.; FILLMANN, G. Tintas anti-incrustantes de terceira geração: novos biocidas no ambiente aquático. **Química Nova.** v. 34, p. 1021-1031, 2011.

CESAR, R., NATAL-DA-LUZ, T., BIDONE, E., CASTILHOS, Z., POLIVANOV, H., SOUSA, J. P. CESAR, Disposal of dredged sediments in tropical soils: ecotoxicological evaluation based on bioassays with springtails and enchytraeids. **Environmental Science and Pollution Research.** v. 22, n. 4, p. 2916-2924, 2015.

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.** v. 83 p. 200-209, 2013.

CHELINHO, S.; DOMENE, X.; CAMPANA, P.; NATAL-DA-LUZ, T.; SCHEFFCZYK, A.; RÖMBKE, J.; ANDRÉS, P.; SOUSA, J. P. Improving Ecological Risk Assessment in the Mediterranean Area: selection of reference soils and evaluating the influence of soil properties on avoidance and reproduction of two Oligochaeta species. **Environmental Toxicology and Chemistry.** v. 30, p. 1050-1058, 2011.

CLUZEAU, D.; GUERNION, M.; CHAUSSOD, R.; MARTIN-LAURENT, F.; VILLENAVE, C.; CORTET, J.; RUIZ-CAMACHO, N.; PERNIN, C.; MATEILLE, T.; PHILIPPOT, L.; BELLIDO, A.; ROUGÉ, L.; ARROUAYS, D.; BISPO, A.; PERÈS, G. Integration of biodiversity in soil quality monitoring: baselines for microbial and soil fauna parameters for different land-use types. **European Journal of Soil Biology.** v. 49, p. 63-72, 2012.

COGHETTO, F.; HILLIG, C.; LOUZADA, J. A.; MENDES, B.; BUZZATTI, M. Lei dos agrotóxicos: Para quê e para quem? **Cadernos de Agroecologia.** v. 10, p. 1-6, 2015.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova.** v. 31, p.1820-1830, 2008.

DAAM, M. A.; LEITÃO, S.; CEREJEIRA, M.J.; SOUSA, J.P. Comparing the sensitivity of soil invertebrates to pesticides with that of *Eisenia fetida*. **Chemosphere.** v. 85, p. 1040-1047, 2011.

DAAM, M. A.; VAN DEN BRINK, P. J. Implications of differences between temperate and tropical freshwater ecosystems for the ecological risk assessment of pesticides. **Ecotoxicology**. v. 19, p. 24-37, 2010.

DASGUPTA, S.; MAMINGI, N.; MEISNER, C. Pesticide use in Brazil in the era of agroindustrialization and globalization. **Environment and Development Economics**. v. 6, p. 459-482. 2001.

DA SILVA, A. C. F.; RECINE, E.; JOHNS, P.; GOMES, F. S.; FERRAZ, M. A.; FAERSTEIN, E. History and challenges of Brazilian social movements for the achievement of the right to adequate food. **Global Public Health**. p. 1-9, 2018.

DAY, P. R. Particle fractionation and particle-size analysis. In: BLACK, C. A. (Ed.). **Methods of soil analysis**: physical and mineralogical properties including statistics of measurement and sampling, part 1. Madison: American Society of Agronomy, p. 545-567, 1965.

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**. v. 44, n. 1, p. 56-60, 2010.

DE SILVA, P. M. C.; PATHIRATNE, A.; VAN GESTEL, C. A. Influence of temperature and soil type on the toxicity of three pesticides to *Eisenia andrei*. **Chemosphere**. v. 76, n. 10, p. 1410-1415, 2009.

DEL SIGNORE, A.; HENDRIKS, J.; LENDERS, R. H. J.; LEUVEN, R. S. E. W.; BREURE, A. M. Development and application of SSD approach in scientific case studies for ecological risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 32, p. 390-398, 2016.

DOMENE, X.; RAMÍREZ, W.; MATTANA, S.; ALCANIZ, J. M.; ANDRÉS, P. Ecological risk assessment of organic waste amendments using the species sensitivity distribution from a soil organisms test battery. **Environmental Pollution**. v. 155, n. 2, p. 227-236, 2008.

EFSA – EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL. **Directorate E - Food Safety: plant health, animal health and welfare, international questions – EFSA**. Altera a Directiva 91/414/CEE do Conselho com o objectivo de incluir as substâncias activas clorpirifos, clorpirifos-metilo, mancozebe, manebe e metiram. Directiva 2005/72/CE de 21 de Outubro de 2005.

EFSA – EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. EUROPEAN COMMISSION HEALTH & CONSUMER PROTECTION DIRECTORATE-GENERAL. **Opinion of the Scientific Panel on Plant protection products and their Residues on a request from the Commission related to the revision of Annexes II and III to Council Directive**

91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market - Ecotoxicological studies, 461: 1-44, 2007.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. Centro Nacional de Levantamento e Conservação do Solo. **Manual de métodos de análises de solo**. Rio de Janeiro, 1997. 212 p.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Rio de Janeiro, 3 ed., 2013. 356 p.

ERNST, G.; KABOUW, P.; BARTH, M.; MARX, M. T.; FROMMHOLZ, U.; ROYER, S.; FRIEDRICH, S. Assessing the potential for intrinsic recovery in a *Collembola* two-generation study: possible implementation in a tiered soil risk assessment approach for plant protection products. **Ecotoxicology**. v. 25, n. 1, p. 1-14, 2016.

FORBES, V. E.; CALOW, P.; SIBLY, R. M. Are current species extrapolation models a good basis for ecological risk assessment? **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 20, n. 2, p. 442-447, 2001.

FOUNTAIN, M. T.; BROWN, V. K.; GANGE, A. C.; SYMONDSON, W. O.; MURRAY, P. J. The effects of the insecticide chlorpyrifos on spider and *Collembola* communities. **Pedobiologia**. v. 51, n. 2, p. 147-158, 2007.

FRAMPTON, G. K.; JÄNSCH, S.; SCOTT-FORDSMAND, J. J.; RÖMBKE, J.; VAN DEN BRINK, P. J. Effects of pesticides on soil invertebrates in laboratory studies: a review and analysis using species sensitivity distributions. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 25, n. 9, p. 2480-2489, 2006.

FRANCO, C. R.; PALEAEZ, V. Antecedentes da Lei Federal de Agrotóxicos (7.802/1989): o protagonismo do movimento ambientalista no Rio Grande do Sul. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**. v. 41, p. 40-56, 2017.

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

GIESY, J. P.; SOLOMON, K. R. **Ecological risk assessment for chlorpyrifos in terrestrial and aquatic systems in North America**. Springer, 2014.

GOMES, D.; SERRAGLIO, U. H. The civil liability arising out of the use and production of pesticides in Brazil. A responsabilidade civil decorrente do uso e da produção de agrotóxicos no Brasil. **Revista Direito Ambiental e Sociedade**. v. 7, n. 2, p. 295-315, 2017.

HAMEL, C.; SCHELLENBERG, M. P.; HANSON, K.; WANG, H. Evaluation of the “bait-lamina test” to assess soil microfauna feeding activity in mixed grassland. **Applied Soil Ecology**. v. 36, n. 2, p. 199-204, 2007.

IBAMA – INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. **Manual para requerimento de avaliação ambiental: agrotóxicos e afins.** p. 180, 2009. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/manual_de_procediment>

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

IBAMA – INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA. 2017. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos,** 2014. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-commercializacao-de-agrotoxicos#sobreosrelatorios>>. Acesso em: 11/2017.

IBAMA – INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. **Portaria Normativa Ibama nº 84, 15 de Outubro de 1996.** Diponível em: www.ibama.gov.br. Acesso em: 07/2016.

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

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

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION – **Soil quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*): part 2, determination of effects on reproduction.** 11268 – 2. Geneva, 1998.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION – **Soil quality – Determination of the water-retention characteristic - laboratory methods.** ISO 11274. Geneva, 1998.

IMAGEJ. Image processing and analysis in Java. 2004. Disponível em: <<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>>.

JÄNSCH, S.; FRAMPTON, G. K.; RÖMBKE, J.; VAN DEN BRINK, P. J.; SCOTT-FORDSMAND, J. J. Effects of pesticides on soil invertebrates in model ecosystem and field studies: a review and comparison with laboratory toxicity data. **Environmental Toxicology and Chemistry.** v. 25, n. 9, p. 2490-2501, 2006.

JEGEDE, O. O.; OWOJORI, O. J.; RÖMBKE, J. Temperature influences the toxicity of deltamethrin, chlorpyrifos and dimethoate to the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* (Acari) and the springtail *Folsomia candida* (Collembola). **Ecotoxicology and Environmental Safety.** v. 140, p. 214-221, 2017.

KAMOUN, J. I.; JEGEDE, O. O.; OWOJORI, O. J.; BOUZID, J.; GARGOURI, R.; RÖMBKE, J. Effects of deltamethrin, dimethoate, and chlorpyrifos on survival and reproduction of the collembolan *Folsomia candida* and the predatory mite *Hypoaspis aculeifer* in two african and two european soils. **Integrated Environmental Assessment and Management.** v. 9999, n. 9999 p. 1-13, 2017.

KOHL SCHMID, E.; RUF, D. Is the risk for soil arthropods covered by new data requirements under the EU PPP Regulation No. 1107/2009?. **Environmental Science and Pollution Research.** v. 23, n. 23, p. 23884-23891, 2016.

KULA, C.; RÖMBKE, J. Evaluation of soil ecotoxicity tests with functional endpoints for the risk assessment of plant protection products. **Environmental Science and Pollution Research.** v. 5, n. 1, p. 55-60, 1998.

KUPERMAN, R. G.; AMORIM, M. J. B.; RÖMBKE, J.; LANNO, R.; CHECKAI, R. T.; DODARD, S. G.; SUNAHARA, G. I.; SCHEFFCZYK, A. Adaptation of the enchytraeid toxicity test for use with natural soil types. **European Journal of Soil Biology.** v. 42, p. S234-S243, 2006.

KWAK, J. I.; MOON, J.; KIM, D.; CUI, R.; AN, Y. J. Species Sensitivity Distributions for Nonylphenol to estimate soil Hazardous Concentration. **Environmental Science & Technology.** v. 51, n. 23, p. 13957-13966, 2017.

LABELLE, P.; DECAËNS, T.; AUBERT, M.; BAROT, S.; BLOUIN, M.; BUREAU, F.; MARGERIE, P.; MORA, P.; ROSSI, J. P. Soil invertebrates and ecosystem services. **European Journal of Soil Biology.** v. 42, p. S3-S15, 2006.

LAVORENTI, A.; PRATA, F.; REGITANO, J. B. Comportamento de pesticidas em solos: fundamentos. **Tópicos em Ciência do Solo.** v. 3, p. 291-334, 2003.

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.** v. 76, p. 124-131, 2014.

LINFURST, R. A.; BOURDEAU, P.; TARDIFF, R. C. **Methods to assess the effects of chemicals on ecosystems.** In: SCOPE 53. Methods to study chemical effects. Scientific Committee on Problems of the Environment Report N° 53. M.S. Swaminathan Research Foundation, Chennai, India, 1995.

LIU, X.; WU, H.; HU, T.; CHEN, X.; DING, X. Adsorption and leaching of novel fungicide pyraoxystrobin on soils by ¹⁴C tracing method. **Environmental Monitoring and Assessment.** v. 190, n. 2, p. 86, 2018.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida.** Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.

LOWE, C. N.; BUTT, K. R. Earthworm culture, maintenance and species selection in chronic ecotoxicological studies: a critical review. **European Journal of Soil Biology**. v. 43, p. S281-S288, 2007.

MA, W.; BODT, J. Differences in toxicity of the insecticide chlorpyrifos to six species of earthworms (Oligochaeta, Lumbricidae) in standardized soil tests. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 50, n. 6, p. 864-870, 1993.

MACCARI, A. P.; BARETTA, D.; PAIANO, D.; LESTON, S.; FREITAS, A.; RAMOS, F.; SOUSA, J. P.; KLAUBERG-FILHO, O. Ecotoxicological effects of pig manure on *Folsomia candida* in subtropical Brazilian soils. **Journal of Hazardous Materials**. v. 314, p. 113-120, 2016.

MADDELA, N. R.; VENKATESWARLU, K. **Soil Enzymes: Indicators of Soil Pollution**. In: Insecticides – Soil Microbiota Interactions. Springer, Cham, p. 7-16, 2018.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO-FILHO, A. S. Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**. v. 3 p. 355-381, 2008.

MANSANO, A. S. Efeitos dos agrotóxicos diuron e carbofuran, isolados e em mistura, sobre organismos aquáticos e avaliação de risco ecológico. 2016. **Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos**, São Carlos, 2016.

MAPA – Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. **Agrofit: Sistema de consulta a Agrotóxicos Fitossanitários**. 2017. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em 11/2017.

MENEZES-OLIVEIRA, V. B.; BIANCHI, M. O.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Hazardous assessment of the pesticides Kraft® 36 ec and Score® in a tropical natural soil using an ecotoxicological test battery. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 2017.

MENEZES-OLIVEIRA, V. B.; SCOTT-FORDSMAND, J. J.; ROCCO, A.; SOARES, A. M. V. M.; AMORIM, M. J. B. Interaction between density and Cu toxicity for *Enchytraeus crypticus* and *Eisenia fetida* reflecting field scenarios. **Science of the Total Environment**. v. 409, n. 18, p. 3370-3374, 2011.

MEYER, A.; SEIDLER, F. J.; ALDRIDGE, J. E.; SLOTKIN, T. A. Developmental exposure to terbutaline alters cell signaling in mature rat brain regions and augments the effects of subsequent neonatal exposure to the organophosphorus insecticide chlorpyrifos. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 203, n. 2, p. 154-166, 2005.

MOREIRA, R. A.; DAAM, M. A.; VIEIRA, B. H.; ...; ROCHA, O. Toxicity of abamectin and difenoconazole mixtures to a Neotropical cladoceran after simulated run-off and spray drift exposure. **Aquatic Toxicology**. v. 185, p. 58-66, 2017.

MOURA, D. S. Avaliação ecotoxicológica de fármacos psicotrópicos e suas possíveis interações com nanomateriais usando embriões de peixe-zebra. 2016. **Dissertação (Mestrado)** – Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília. Brasília, 2016.

NEWMAN, M. C.; OWNBY, D. R.; MEZIN, L. C. A.; POWELL, D. C. Applying species sensitivity distributions in ecological risk assessment: assumptions of distribution type and sufficient number of species. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 19, p. 508-515, 2000.

NIEMEYER, J. C.; MOREIRA-SANTOS, M.; NOGUEIRA, M. A.; CARVALHO, G. M.; RIBEIRO, R.; DA SILVA, E. M.; SOUSA, J. P. Environmental risk assessment of a metal-contaminated area in the Tropics. Tier I: screening phase. **Journal of Soils and Sediments**. v. 10, n. 8, p. 1557-1571, 2010.

NIEMEYER, J. C.; CHELINHO, S.; SOUSA, J. P. Soil ecotoxicology in Latin America: Current research and perspectives. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 36, n. 7, p. 1795–1810, 2017.

NIEMEYER, J. C.; NOGUEIRA, M. A.; CARVALHO, G. M.; COHIN-DE-PINHO, S. J.; OUTEIRO, U. S.; RODRIGUES, G. G.; DA SILVA, B. E. M.; SOUSA, J. P. Functional and structural parameters to assess the ecological status of a metal contaminated area in the tropics. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 86, p. 188-197, 2012.

NIVA, C. C.; NIEMEYER, J. C.; DA SILVA, F. M. R. J; NUNES, M. E. T.; DE SOUSA, D. L.; ARAGÃO, C. W. S.; SAUTTER, K. D.; ESPINDOLA, E. G.; SOUSA, J. P.; RÖMBKE, J. Soil ecotoxicology in Brazil is taking its course. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 23, p. 11363-11378, 2016.

NIVA, C. C.; SCHMELZ, R. M.; BROWN, G. G. Notes on the reproduction, fragmentation and regeneration of *Enchytraeus dudichi* Dózsa-Farkas, 1995 sensu lato (Enchytraeidae, Oligochaeta) found in Paraná State, Brazil. **Newsletter on Enchytraeidae**. n. 12, v. 14, p. 13, 2010.

OECD – ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. 2010. **Agricultural Outlook 2010-2019**. Disponível em: <<http://www.agri-outlook.org/dataoecd/>>. Acesso 11/2017.

ORONA, C. A. L.; RIVAS, C. G. P.; REYES, T. T. A.; CAMPOS, A. R. C. Análisis del costo de remoción de fungicidas utilizados en el control del tizón tardío (*Phytophthora infestans*) del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*). **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**. v. 29, n. 4, p. 295-301, 2013.

PATTNAIK, S.; REDDY, M. V. Heavy metals remediation from urban wastes using three species of earthworm (*Eudrilus eugeniae*, *Eisenia fetida* and *Perionyx excavatus*). **Journal of Environmental Chemistry and Ecotoxicology**. v. 3, n. 14, p. 345-356, 2011.

PÉRÈS, G.; VANDENBULCKE, F.; GUERNION, M.; HEDDE, M.; BEGUIRISTAIN, T.; DOUAY, F.; HOUOT, S.; PIRON, D.; RICHARD, A.; BISPO, A.; GRAND, C.; GALSOMIES, L.; CLUZEAU, D. Earthworm indicators as tools for soil monitoring, characterization and risk assessment. An example from the national Bioindicator programme (France). **Pedobiologia**. v. 54, p. S77-S87, 2011.

POMPEO, P. N.; SANTOS, M. A. B.; BIASI, J. P.; FATIMA, S. S.; ROSA, M. G.; MALUCHE-BARETTA, C. R. D.; BARETTA, D. Fauna e sua relação com atributos edáficos em Lages, Santa Catarina - Brasil. **Scientia Agraria**. v. 17, n. 1, 2016.

PORTO, M. F.; SOARES, W. L. Modelo de desenvolvimento, agrotóxicos e saúde: um panorama da realidade agrícola brasileira e propostas para uma agenda de pesquisa inovadora. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**. v. 37, p. 17-31, 2012.

REGITANO, J. B.; PRATA, F.; DIAS, N. M. P.; LAVORENTI, A.; TORNISIELO, V. L. Sorção-dessorção do fungicida clorotalonil em solos com diferentes teores de matéria orgânica. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**. v. 26, n. 1, 2002.

REGITANO, J. B.; TORNISIELO, V. L.; LAVORENTI, A.; PACOVSKY, R. S. Transformation pathways of ¹⁴C-chlorothalonil in tropical soils. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 40, n. 3, p. 295-302, 2001.

REIS, D. R. L.; CALBINO, D. P.; FERRAZ, L. C. L. Agrotóxicos e transição agroecológica: Relatos de experiência a partir da história de vida de um produtor rural. **Cadernos de Agroecologia**. v. 10, p. 1-5, 2015.

RÖMBKE, J.; JÄNSCH, S.; DIDDEN, W. The use of earthworms in ecological soil classification and assessment concepts. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 62, n. 2, p. 249-265, 2005.

RÖMBKE, J.; JÄNSCH, S.; JUNKER, T.; POHL, B.; SCHEFFCZYK, A.; SCHALLNAß, H. Improvement of the applicability of ecotoxicological tests with earthworms, springtails, and plants for the assessment of metals in natural soils. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 25, n. 3, p. 776-787, 2006.

RÖMBKE, J.; SCHMELZ, R. M.; PELOSI, C. Effects of organic pesticides on enchytraeids (Oligochaeta) in agroecosystems: laboratory and higher-tier tests. **Frontiers in Environmental Science**. v. 5, p. 20, 2017.

RÖMBKE, J.; WAICHMAN, A. V.; GARCIA, M. B. Risk assessment of pesticides for soils of the central amazon, Brazil: comparing outcomes with temperate and tropical data. **Integrated Environmental Assessment and Management**. v. 4, p. 94-104, 2008.

ROSA, M. G.; KLAUBERG, O. F.; BARTZ, M. C. L.; MAFRA, Á. L.; SOUSA, J. P.; BARETTA, D. Macrofauna edáfica e atributos físicos e químicos em sistemas de uso do solo no planalto catarinense. **Revista Brasileira de Ciência do Solo.** v. 39, n. 6, 2015.

SANCHEZ-BAYO, F.; HYNE, R.V. Comparison of environmental risks of pesticides between tropical and nontropical regions. **Integrated Environmental Assessment and Management.** v. 7, p. 577-586, 2011.

SANNI, S.; LYNG, E.; PAMPANIN, D. M.; SMIT, M. G. Species sensitivity distributions based on biomarkers and whole organism responses for integrated impact and risk assessment criteria. **Marine Environmental Research.** v. 127, p. 11-23, 2017.

SAVINI, M. C.; LOEWY, R. M.; NICOTRA, V. E.; PAROLO, M. E. Contribution of Soil Components on the Sorption of Chlorpyrifos. **Water, Air, & Soil Pollution.** v. 228, p. 36 - 47, 2017.

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

SEGAT, J. C.; ALVES, P. R. L.; BARETTA, D.; CARDOSO, E. J. B. N. Ecotoxicological evaluation of swine manure disposal on tropical soils in Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety.** v. 122, p. 91-97, 2015.

SISINNO, C. L. S.; BULUS, M. R. M.; RIZZO, A. C.; MOREIRA, J. C. Ensaio de comportamento com minhocas (*Eisenia foetida*) para avaliação de áreas contaminadas: resultados preliminares para contaminação por hidrocarbonetos. **Revista Brasileira da Sociedade de Ecotoxicologia.** v. 2, p. 41-44, 2006.

SOARES, W. L.; PORTO, M. F. S. Estimating the social cost of pesticide use: an assessment from acute poisoning in Brazil. **Ecological Economics.** v. 68, p. 2721-2728, 2012.

SOCHOVÁ, I.; HOFMAN, J.; HOLOUBEK, I. Using nematodes in soil ecotoxicology. **Environment International.** v. 32, n. 3, p. 374-383, 2006.

SOLOMON, K. R.; SIBLEY, P. New concepts in ecological risk assessment: where do we go from here? **Marine Pollution Bulletin.** v. 44, n. 4, p. 279-285, 2002.

SOUZA, G. S.; COSTA, L. C. A.; MACIEL, A. C.; REIS, F. D. V.; PAMPLO, Y. A. P. Presença de agrotóxicos na atmosfera e risco à saúde humana: uma discussão para a Vigilância em Saúde Ambiental. **Ciência & Saúde Coletiva.** v. 22, n. 10, p. 3269-3280, 2017.

SOUZA, T. C. Toxicidade aguda de agrotóxicos e Curva de Sensibilidade de Espécies para peixes amazônicos. 2014. **Dissertação (Mestrado)** – Programa de Pós-Graduação

em Ciências do Ambiente e Sustentabilidade da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas. Manaus, 2014.

SOUZA-BASTOS, L. R.; VAL, A. L.; WOOD, C. M. Are Amazonian fish more sensitive to ammonia? Toxicity of ammonia to eleven native species. **Hydrobiologia**. v. 789, n. 1, p. 143-155, 2017.

SPADOTTO, C.A. **Avaliação de Riscos Ambientais de Agrotóxicos em Condições Brasileiras**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 20, 2006.

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

STYRISHAVE, B.; MORTENSEN, M.; HENNING KROGH, P.; ANDERSEN, O.; JENSEN, J. Solid-phase microextraction (SPME) as a tool to predict the bioavailability and toxicity of pyrene to the springtail, *Folsomia candida*, under various soil conditions. **Environmental Science & Technology**. v. 42, n. 4, p. 1332-1336, 2008.

SUŁOWICZ, S.; CYCOŃ, M.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Non-target impact of fungicide tetaconazole on microbial communities in soils with different agricultural management. **Ecotoxicology**. v. 25, n. 6, p. 1047-1060, 2016.

SUTER, G. W. North American history of species sensitivity distributions. In: POSTHUMA L.; TRAAS T. P.; SUTER G.W. (eds) **The use of species sensitivity distributions in ecotoxicology**. Lewis, Boca Raton, FL. p. 11-18, 2002.

SVOBODOVÁ, M.; ŠMÍDOVÁ, K.; HVĚZDOVÁ, M.; HOFMAN, J. Uptake kinetics of pesticides chlorpyrifos and tebuconazole in the earthworm *Eisenia andrei* in two different soils. **Environmental Pollution**. v. 236, p. 257-264, 2018.

SZALKOWSKI, M. B.; STALLARD, D. E. Effect of pH on the hydrolysis of chlorothalonil. **Journal of Agricultural and food chemistry**. v. 25, p. 208-210, 1977.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **ANÁLISES DE SOLO, PLANTAS E OUTROS MATERIAIS**. 2ed. Porto Alegre: UFRGS, 1995. 174p. (Boletim Técnico de Solos, 5).

TEREKHOVA, V. A. Soil bioassay: problems and approaches. **Eurasian Soil Science**. v. 44, n. 2, p. 173-179, 2011.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology, a new branch of toxicology: a general survey of its aims, methods and prospects. **Ecological Toxicology Research**. p. 3-23, 1975.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 1, n. 2, p. 151-173, 1977.

VAN DEN BRINK, P. J.; BLAKE, N.; BROCK, T. C.; MALTBY, L. Predictive value of species sensitivity distributions for effects of herbicides in freshwater ecosystems. **Human and Ecological Risk Assessment.** v. 12, n. 4, p. 645-674, 2006.

VAN GESTEL, C. A. M.; DIRVEN-VAN BREEMEN, E. M.; BAERSELMAN, R.; EMANS, H. J. B.; JANSSEN, J. A. M.; POSTUMA, R.; VAN VLIET, P. J. M. VAN GESTEL, C. A. M. Comparison of sublethal and lethal criteria for nine different chemicals in standardized toxicity tests using the earthworm *Eisenia andrei*. **Ecotoxicology and Environmental Safety.** v. 23, n. 2, p. 206-220, 1992.

VAN LEEUWEN, C.J. **Ecotoxicological effects.** In: VAN LEEUWEN, C. J.; HERMANS, J. L. M. (Eds.), **Risk Assessment of Chemicals: An Introduction.** Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands, p. 175–237, 1995.

VAN SCOY, A. R.; TJEERDEMA, R. S. **Environmental fate and Toxicology of chlorothalonil.** In: **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 232.** Springer, Cham, p. 89-105, 2014.

VAN STRAALEN, N. M. Evaluation of bioindicator systems derived from soil arthropod communities. **Applied Soil Ecology.** v. 9, n. 1, p. 429-437, 1998.

VAN STRAALEN, N. M. Threshold models for species sensitivity distributions applied to aquatic risk assessment for zinc. **Environmental Toxicology and Pharmacology.** v. 11, n. 3, p. 167-172, 2002.

VAN VLAARDINGEN, P. L. A.; TRAAS, T.P.; WINTERSEN, A. M.; ALDENBERG, T. **ETX 2.0. A program to calculate hazardous concentrations and fraction affected, based on normally distributed toxicity data.** Bilthoven, the Netherlands: National Institute for Public Health and the Environment (RIVM). Report no. 601501028/2004. p. 68, 2004.

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

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

WALKER, C. H.; HOPKIN, S. P.; SIBLY, R. M. PEAKALL, D. B. **Principles of ecotoxicology.** ed. 3, 2006.

XAVIER DE CARVALHO, M. M.; NODARI, E. S.; NODARI, R. O. “Defensivos” ou “agrotóxicos”? História do uso e da percepção dos agrotóxicos no estado de Santa Catarina, Brasil, 1950-2002. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos.** v. 24, n. 1, 2017.

XU, F. L.; LI, Y. L.; WANG, Y.; HE. W.; KONG, X. Z.; QNI, N.; LIU, W.X.; WU, W. J.; JORGENSEN, S. E. Key issues for the development and application of the species sensitiviti distribution (SSD) model for ecological risk assessemnt. **Ecological Indicators.** v. 54, p. 227-237, 2015.

YAMASHITA, M. G. N.; SANTOS, J. E. G. Análise de Rótulas e Bulas de Agrotóxicos Segundo Dados Exigidos pela legislação Federal de Agrotóxicos e de Acordo com Parâmetros de Legibilidade Tipográfica. **Educação Gráfica.** v. 12, p. 15-25, 2008.

YU, S.; WAGES, M. R.; COBB, G. P.; MAUL, J. D. Effects of chlorothalonil on development and growth of amphibian embryos and larvae. **Environmental Pollution.** v. 181, p. 329-334, 2013.

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

ZORTÉA, T.; SEGAT, J. C.; MACCARI, A. P.; SOUSA, J. P.; DA SILVA, A. S.; BARETTA, D. Toxicity of four veterinary pharmaceuticals on the survival and reproduction of *Folsomia candida* in tropical soils. **Chemosphere.** v. 173, p. 460-465, 2017.