

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

KATY BONIZA CANTELLI

**TOXICIDADE AGUDA DE CARBOFURANO E CARBENDAZIM A MINHOCAS
EM SOLO NATURAL**

CURITIBA

2011

KATY BONIZA CANTELLI

**TOXICIDADE AGUDA DE CARBOFURANO E CARBENDAZIM A MINHOCAS
EM SOLO NATURAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Área de Concentração em Química e Biologia do solo e Nutrição de plantas, Departamento de Solos e Engenharia Agrícola, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência do Solo.

Orientador: Prof. Dr. George Gardner Brown

Co-orientador: Prof. Dr. Klaus Dieter Sautter

CURITIBA

2011



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE SOLOS E ENGENHARIA AGRÍCOLA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO(MESTRADO)
Rua dos Funcionários, 1540-Curitiba/PR-80035-050-Fone/Fax 41-3350-5648
Página: www.pgcsolo.agrarias.ufpr.br/
E-mail: pgcsolo@ufpr.br

PARECER

Os Membros da Comissão Examinadora, designados pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado, apresentada pela candidata **KATY BONIZA CANTELLI**, sob o título: "**Toxicidade aguda de carbofurano e carbendazim a minhocas em solo natural**", requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciência do Solo – Área de Concentração: Química e Biologia do Solo e Nutrição de Plantas, do Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná, após haverem analisado o referido trabalho e argüido a candidata, são de Parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação, completando assim, os requisitos necessários para receber o diploma de **Mestre em Ciência do Solo - Área de Concentração: "Química e Biologia do Solo e Nutrição de Plantas"**.

Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, em Curitiba, 28 de fevereiro de 2011.

Eng^o. Agr^o. Dr. George Gardner Brown, Presidente

Prof. Dr. Amarildo Pasini, I^o. Examinador

Prof./Dr. Klaus Dieter Sautter, II^o. Examinador



DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Loreno Abraão Cantelli e Maria Aparecida Boniza Cantelli,
maiores incentivadores que sempre acreditaram no meu potencial mais que eu mesma.

AGRADECIMENTOS

Impossível citar todos aqueles que contribuíram para que esse trabalho fosse concretizado.

Primeiramente agradeço a Deus pela minha vida, pela oportunidade de aprender que por ele me foi concedida.

Ao meu Pai por estar sempre pronto para me enviar mais e mais minhocas quando não foi possível coletar pessoalmente, por ligar só para dizer que acredita na minha capacidade que jamais aceitaria minha desistência. A minha mãe pelo seu carinho e compreensão dando sempre o apoio necessário apesar da distancia.

Aos amigos que encontrei durante essa jornada (Andressa, Carolline, Cíntia, Elodie, Herlon, Izabel, Jairo, Maurício e Thiago) por me incentivarem a superar os obstáculos encontrados pelo caminho, e me auxiliarem durante a trabalhosa montagem dos ensaios. Um agradecimento especial ao estimado Mauricio por estar presente em todos os momentos, me ajudando, me apoiando me fazendo ver que sempre existe um lado bom, que no fim as coisas se ajustam, o importante é seguir em frente sempre.

Ao meu orientador, Prof. George G. Brown, pelos ensinamentos, paciência, amizade e fundamental colaboração para o término desta dissertação. Ao Klaus Dieter Sautter pela co-orientação, incentivos e sinceridade que sem duvida contribuíram muito para meu crescimento acadêmico e profissional.

Aos professores do Programa com os quais tive o privilegio de aprender. Aos funcionários e estagiários da universidade Federal (Cleusa, Elda, Maria e Aldair) e Embrapa floresta (Betânia, Irineu, Paulino, Wilson) pela disposição em me ajudar sempre que necessário.

Ao CPRA por fornecer as minhocas necessárias para execução do projeto. A Denyse do IAPAR- Ponta Grossa por nos receber sempre muito bem e fornecer a quantidade de solo que precisamos.

Aos colegas da turma de mestrado, cujas sugestões e críticas construtivas durante as aulas de Seminário que foram essenciais para a conclusão deste trabalho.

À Universidade Federal do Paraná e Embrapa Floresta pela oportunidade de realizar este trabalho e ao REUNI, pela concessão da bolsa de estudos.

E a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram, Muito Obrigado.

A vida está nos olhos de quem sabe ver.
Se não houve frutos, valeu a beleza das flores.
Se não houve flores, valeu a sombra das folhas.
Se não houve folhas, valeu a intenção da semente.”

Henfil

SUMÁRIO

ABSTRACT	11
CAPÍTULO 1 - TOXICIDADE AGUDA DE DOIS AGROTÓXICOS (CARBOFURANO E CARBENDAZIM) A TRES ESPÉCIES DE MINHOCAS.....	12
1 INTRODUÇÃO	12
2 MATERIAL E MÉTODOS	14
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
3.1 Carbendazim.....	18
3.2 Carbofurano.....	24
4 CONCLUSÕES	32
5 LITERATURA CITADA	33
ANEXOS	37
Apêndice 1- Teste piloto usando <i>Amyntas gracilis</i> em Solo Artificial Tropical	40
Apêndice 2- Escolha do solo padrão para os testes ecotoxicológicos.....	42
Apêndice 3- Adaptações utilizadas com a espécie <i>D. annae</i>	43

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Mortalidade média das espécies *Amyntas gracilis*, *Dichogaster annae* e *Eisenia andrei*, aos 14 dias de exposição a diferentes concentrações de Carbendazim. Diferença estatisticamente significativa * ($p < 0,05$); em relação ao controle, de acordo com teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunnett. 19
- Figura 2: Biomassa individual de *E. andrei*: Inicial, ao 7º e 14º dia de exposição a diferentes concentrações de Carbendazim em solo natural. Diferença estatisticamente significativa * ($p < 0,05$) em relação ao peso inicial. 20
- Figura 3: Biomassa individual de *D. annae*: Inicial, ao 7º e 14º dia de exposição a diferentes concentrações de Carbendazim em solo natural. Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao peso inicial. 21
- Figura 4: Biomassa individual de *A. gracilis*: Inicial, ao 7º e 14º dia de exposição a diferentes concentrações de Carbendazim em solo natural. Diferença estatisticamente significativa * ($p < 0,05$) em relação ao peso inicial. 23
- Figura 5: Mortalidade média das espécies, *Eisenia andrei*, *Dichogaster annae* e *Amyntas gracilis*, aos 14 dias de exposição a diferentes concentrações de Carbofurano. Diferença estatisticamente significativa * ($p < 0,05$) em relação ao controle, de acordo com teste de Kruskal-Wallis. 25
- Figura 6: Biomassa individual de *E. andrei*: Inicial, ao 7º e 14º dia de exposição a diferentes concentrações de Carbofurano em solo natural. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância ($p < 0,05$). 26
- Figura 7: Biomassa individual de *D. annae*: Inicial, ao 7º e 14º dia de exposição a diferentes concentrações de Carbofurano em solo natural. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância ($p < 0,05$). 28
- Figura 8: Biomassa individual de *A. gracilis*: Inicial, ao 7º e 14º dia de exposição a diferentes concentrações de Carbofurano em solo natural. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância ($p < 0,05$). 30

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Características químicas e físicas do solo padrão do IBAMA (1996) e do solo utilizado como substrato para os testes ecotoxicológicos neste estudo..... 14
- Tabela 2: Concentração mediana letal (CL_{50}), concentração mais baixa com efeito observado (CEO) e concentração mais alta sem efeito observado (CENO) das espécies *A. gracilis*, *E. andrei* e *D. annae* após 14 d de exposição aos agrotóxicos Carbendazim e Carbofurano. ... 20
- Tabela 3: Número médio de minhocas de cada espécie mortas após 14 dias em solo natural com diferentes concentrações de Carbendazim. 24
- Tabela 4: Número médio de minhocas de cada espécie mortas após 14 dias em solo natural com diferentes concentrações de Carbofurano..... 31

RESUMO

Para avaliar a periculosidade e toxicidade de uma substância aplicada no meio ambiente são usados testes ecotoxicológicos padronizados pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e International Standards Organization (ISO). Entre os organismos terrestres mais utilizados nestes testes, estão os Oligoquetas (minhocas), estão entre os mais utilizados, devido a sua sensibilidade aos contaminantes e às funções que exercem no solo. Porém no Brasil, poucos trabalhos têm avaliado o impacto de contaminantes, como os agrotóxicos em organismos do solo e, além disso, a espécie de minhoca sugerida pelas normas padronizadas (*Eisenia andrei*) pode ser pouco representativa, por viver na liteira e não ingerir solo. Portanto, o presente trabalho avaliou a mortalidade de duas espécies de minhocas (*Amyntas gracilis*, *Dichogaster annae*), em comparação com a espécie padrão (*E. andrei*) quando submetidas ao teste agudo (mortalidade), através da contaminação de solo natural (Latossolo Vermelho) com duas classes de agrotóxico: um fungicida sistêmico (Carbendazim), referência da norma utilizada, e um inseticida nematicida sistêmico (Carbofurano). Cada agrotóxico foi testado separadamente. A mortalidade foi avaliada em seis concentrações com cinco repetições, para as espécies *E. andrei* e *A. gracilis* e quatro repetições para *D. annae*. Para todos os testes, utilizaram-se 10 indivíduos por unidade experimental. Com o Carbendazim, *E. andrei* apresentou CL_{50} de 8,67 mg de i.a. kg^{-1} de solo, enquanto *A. gracilis* e *D. annae* foram muito mais tolerantes, com apenas 35% e 27% de mortalidade, respectivamente, na maior dose aplicada (100 mg de i.a. kg^{-1} de solo). Portanto, não foi possível calcular a CL_{50} para *A. gracilis* e *D. annae*. Para o pesticida Carbofurano a CL_{50} foi de 4,27 mg de i.a. kg^{-1} de solo para *E. andrei*, não sendo possível calcular para as demais espécies devido à alta mortalidade apresentada (100% dos indivíduos) na menor concentração testada (2,5 mg de i.a. kg^{-1} de solo), e à alta mortalidade de *D. annae* no tratamento testemunha.

Palavras Chave: Oligoquetas; *Dichogaster annae*; *Amyntas gracilis*; *Eisenia andrei*; ecotoxicologia; contaminação do solo

ABSTRACT

To evaluate the hazard and toxicity of a substance applied to the environment, standard ecotoxicological tests are used by the Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) and the International Standards Organization (ISO). Among the terrestrial organisms used in these tests, the Oligochaetes (earthworms), are among the most widely used, due to their sensitivity and functions in maintaining soil fertility. In Brazil, few studies have assessed the impact of contaminants such as pesticides on soil organisms, and the standard earthworm species may be little representative of soil ecosystems, as it lives in the litter and does not consume soil. Therefore this study evaluated the potential bioindicator value of two earthworm species (*Amyntas gracilis* and *Dichogaster annae*) as compared with the standard *Eisenia andrei*. The species were tested using the acute test (mortality) standardized by ISO, by contaminating natural soil (Latossolo Vermelho) with two classes of pesticides: a systemic fungicide (Carbendazim) the standard compound and a systemic nematicide/insecticide (Carbofuran). Each pesticide was tested separately. Mortality was assessed at 6 concentrations with 5 replicates for *E. andrei* and *A. gracilis* and 4 replicates for species *D. annae*. All tests were performed with 10 individuals per container. With Carbendazim, *E. andrei* had an LC_{50} of 8.67 mg active ingredient (a.i.) kg^{-1} soil, while for *A. gracilis* and *D. annae* the LC_{50} could not be calculated because of the high resistance of these species to the contaminant. Even at the highest dose (100 mg a.i. kg^{-1} soil), these species exhibited only 35% and 27% mortality, respectively. With Carbofuran LC_{50} was 4.27 mg a.i. kg^{-1} soil for *E. andrei*, although for the other two species the LC_{50} could not be calculated, due to the high mortality (100%) at the lowest concentration tested (2.5 mg ai kg^{-1} soil), and the high mortality of *D. annae* in the control treatment.

Keywords: Oligochaetas; *Dichogaster annae*; *Amyntas gracilis*; Ecotoxicology; Soil contamination.

CAPÍTULO 1 - TOXICIDADE AGUDA DE DOIS AGROTÓXICOS (CARBOFURANO E CARBENDAZIM) A TRES ESPÉCIES DE MINHOCAS

1 INTRODUÇÃO

A agricultura moderna depende da aplicação de insumos externos como energia fóssil, agrotóxicos, fertilizantes, mecanização, e economia de escala para conseguir um aumento na produtividade exigida pelo crescimento populacional (BARBOSA, 2004). Entre os insumos que garantem uma melhoria na produtividade agrícola estão os agrotóxicos, que vêm apresentando um aumento significativo no uso, nos últimos quarenta anos, com repetitivos relatos de problemas relacionados ao uso excessivo (SPADOTTO et al., 2006).

A utilização dos agrotóxicos na agricultura tem como objetivo exterminar pragas que causam qualquer dano, porém, seu uso desmedido pode acarretar em contaminação de solos, água e seres humanos. A fauna epígea e edáfica, ao ingerir resíduos destas substâncias durante sua alimentação, pode acumulá-las em seus tecidos e transferir para outros animais, contaminando a cadeia alimentar. Dentre os organismos edáficos sensíveis a alterações ambientais estão os oligoquetas (minhocas), que exercem funções fundamentais para manutenção da qualidade do solo e são importantes constituintes da cadeia alimentar (ANDRÉA et al., 2004; AQUINO et al., 2005; BROWN et al., 2005).

Um bom bioindicador da contaminação edáfica é o organismo que responde a alterações nas propriedades químicas, físicas e biológicas do solo, que possui função importante no seu habitat; pode ser facilmente criado em laboratório; é de fácil identificação; tem boa representatividade; e é facilmente coletado (REINECKE & REINECKE, 2004; EDWARDS et al, 2004). Por atender estas exigências, as minhocas estão entre os organismos freqüentemente usados como bioindicadores da qualidade do solo (Paoletti, 1999). Além disso, são também bastante usadas para avaliar a toxicidade de agrotóxicos ao ambiente edáfico, havendo, inclusive, métodos padronizados internacionalmente para esse fim (OECD, 1984; ISO, 2007).

Os testes ecotoxicológicos servem para estabelecer o uso seguro dos agrotóxicos, evitando danos irreparáveis ao ambiente e à fauna terrestre, controlando determinadas pragas agrícolas, protegendo os organismos benéficos presentes nos ecossistemas, além de estimar o efeito desses agrotóxicos nos organismos vivos (RAMOS, 2007; ANDRÉA, 2004; ISO, 2007).

Mundialmente, os ensaios ecotoxicológicos com minhocas usam as espécies padrão *Eisenia andrei* Bouché, 1972 ou *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). Estas espécies são nativas de clima temperado, vivem na liteira e em materiais orgânicos em decomposição, os quais consomem preferentemente para sua alimentação. Não são encontradas em solos tropicais, nem vivem longo tempo neles, necessitando de matéria orgânica fresca para sobreviverem. No Brasil, essas espécies foram adotadas como padrão, apesar de não serem representativas da fauna edáfica tropical, sendo encontradas exclusivamente em vermicompostagem (BROWN et al., 2006; SISINNO et al., 2006; MOSLEH et al., 2003; ANDRÉA, 2004). De fato, um dos parâmetros usados na escolha de espécies para esses testes, é a facilidade de criação em cativeiro.

Portanto faz-se necessário verificar a idoneidade dessas espécies como indicadoras da contaminação do solo, comparando-as com outras espécies de clima tropical, encontradas no Brasil, preferencialmente com ampla distribuição nos solos brasileiros, que ingerem quantidade importante de solo, que estejam presente nos ambientes onde os agrotóxicos são utilizados, e que possam ser criadas em laboratório, ou coletados facilmente no campo.

A espécie asiática *Amyntas gracilis* (Kinberg, 1867) é exótica no Brasil, mas pode ser uma boa candidata a testes ecotoxicológicos, por ser abundante e frequentemente encontrada em ecossistemas perturbados (agrícolas, urbanos e florestais) no país (BROWN et al., 2006), e por ser passível de criação em cativeiro (CHANG, 1997). Além disso, é uma espécie endogêica, que ingere solo durante sua alimentação, ficando, assim, mais exposta à contaminação do solo. A espécie *Dichogaster annae* (Horst, 1913), nativa da África, vive na liteira e consomem matéria orgânica fresca em decomposição, como as espécies padrão. Além disso, é uma espécie facilmente criada em laboratório, e não foram encontrado relatos de sua utilização para fins ecotoxicológicos. Ela é encontrada no Brasil em minhocários comerciais.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a possibilidade de utilização das espécies *A. gracilis*, *E. andrei* e *D. annae* como bioindicadoras da contaminação edáfica em testes ecotoxicológicos com solo natural, avaliando sua sensibilidade a dois agrotóxicos: Carbendazim, fungicida referência das normas utilizadas em testes ecotoxicológicos e, Carbofurano, inseticida comumente utilizado na agricultura. As hipóteses que guiaram nosso trabalho foram de que a espécie *A. gracilis* seria mais sensível aos dois agrotóxicos que a espécie padrão, por ser espécie endogêica, e que *D. annae* teria sensibilidade similar à padrão, por terem categorias ecológicas semelhantes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Solo Utilizado

O solo utilizado para os testes ecotoxicológicos foi um Latossolo Vermelho coletado no município de Ponta Grossa-PR, na Fazenda do Instituto Agronômico do Paraná (IAPAR). A área estava coberta com *Eucalyptus* sp. e não foi encontrado histórico de utilização de agrotóxicos.

Tabela 1: Características químicas e físicas do solo padrão do IBAMA (1996) e do solo utilizado como substrato para os testes ecotoxicológicos neste estudo.

Características	pH (H ₂ O)	pH (KCL)	CO (g kg ⁻¹)	Argila (g kg ⁻¹)	Densidade aparente (kg dm ⁻³)	Porosidade %
Latossolo padrão (IBAMA)	4,9- 5,3	3,8- 4,8	15- 40	580- 700	1,1- 1,5	50- 65
Latossolo Vermelho (Ponta Grossa, PR)	4,7	4,1	21,98	780	1,2	54

As características químicas e físicas do solo encontram-se na tabela 1. Apesar de não se enquadrar em todas as solicitações do IBAMA (1996) como solo natural padrão para teste ecotoxicológicos, é um tipo de solo comum no Estado do Paraná, sendo utilizado para a produção agrícola no Estado, e, portanto, alvo de utilização de agrotóxicos.

Foi coletada uma camada de solo de 0 a 20 cm de profundidade, sem serrapilheira; o solo foi seco ao ar, peneirado em malha de 5 mm e homogeneizado. Posteriormente, foi desfaunado com três ciclos de congelamento e descongelamento com duração de 48 horas ciclo⁻¹ conforme Luz et al. (2008).

2.2 Espécies de Oligoquetas

Foram utilizados, para este experimento, indivíduos adultos (clitelados) de três espécies de minhocas: *E. andrei*, *A. gracilis* e *D. annae*. *Eisenia andrei* foi obtida de um minhocário no Centro Paranaense de Referência em Agroecologia (CPRA) em Pinhais,

região metropolitana de Curitiba (25°18'47''S; 49°09'28''W), e mantida em caixa de plástico de 50 L com esterco de gado orgânico no laboratório de Ecologia na Embrapa Florestas até sua utilização (sempre inferior a 1 semana). As minhocas adultas usadas pesaram de 0,2 a 0,4 g indivíduo⁻¹, com média de 0,2 mg indivíduo⁻¹.

Amyntas gracilis foram coletadas na Cooperativa Agrícola de Uiratã no município de Uiratã, PR (24° 53'09''S; 53° 00'32''W), nos meses de agosto e novembro de 2010, e levadas ao laboratório de Ecologia na Embrapa Florestas onde foram mantidas em solo natural do local de coleta até sua utilização. As minhocas adultas usadas pesaram de 1,0 a 1,3 g indivíduo⁻¹, com média de 1,3 g indivíduo⁻¹.

Dichogaster annae foram adquiridas da Minhobox (Juiz de Fora, MG), onde são criadas em minhocários. Os exemplares adultos utilizados pesaram de 0,2 a 0,4 g indivíduo⁻¹, com média de 0,3 g indivíduo⁻¹.

2.3 Agrotóxicos avaliados

Os ingredientes ativos (i.a.) foram avaliados dentro do formulado comercial, sendo calculada a quantidade de i.a. baseada na forma apresentada pelo produto selecionado.

DEROSAL[®] 500 SC, tem como i.a. Carbendazim (500 g L⁻¹). É um fungicida sistêmico, pertencente ao grupo químico benzimidazol, que tem como mecanismo de ação a inibição da mitose (divisão celular), através da inibição da síntese de tubulinas, proteína que compõem os microtúbulos, impossibilitando a divisão do núcleo (GENET, 2005). O fungicida é indicado no tratamento de doenças da parte aérea nas culturas de citros, feijão, trigo, soja, e no tratamento de sementes de feijão, soja e algodão e é classificado toxicologicamente como II (Altamente tóxico) e com periculosidade III (Produto perigoso ao ambiente). Este pesticida foi selecionado por sua substância ser de referência em ensaios ecotoxicológicos (OECD, 1984; DA LUZ, 2008). A persistência deste pesticida no ambiente é relativamente curta pode variar de 4 dias até 24 meses, dependendo das condições encontradas e da exposição a organismos com potencial de degradação (SILVA, 1999).

FURADAN[®] 350 SC, i.a. Carbofurano (350 g L⁻¹), é um inseticida nematicida sistêmico pertencente ao grupo químico metilcarbamato de benzofuranilano grupo dos carbamatos e tem como mecanismo de ação a inibição da enzima acetilcolinesterase, o que impede a transmissão de impulsos nervosos. Sua aplicação é realizada na época de plantio em culturas de algodão, arroz, banana, feijão e milho. É classificado como extremamente tóxico (Classe I) e com periculosidade II (Produto muito perigoso ao ambiente).

2.4 Teste agudo (Mortalidade)

A taxa de mortalidade das minhocas foi avaliada conforme protocolo da ISO 11268-1 (ISO, 1993), e realizada em temperatura ambiente ($20 \pm 4^\circ\text{C}$).

Cada unidade experimental recebeu 10 minhocas adultas das espécies *A. gracilis*, *E. andrei* ou *D. annae*, pesadas e colocadas em seus respectivos frascos, que foram tampados com plástico filme e perfurados no centro para permitir a oxigenação.

Cada minhoca foi utilizada apenas uma vez, sendo descartada após o término de cada teste. Antes dos testes, as minhocas foram mantidas no solo teste controle por 24 horas, para ambientação.

Devido à diferença na biomassa das espécies selecionadas para o experimento, foram utilizados frascos de vidros de tamanhos diferenciados (810 ml para *E. andrei* e *D. annae* e 3100 ml para *A. gracilis*), com diferentes quantidades de substratos (500 g solo seco para *E. andrei* e *D. annae* e 2 kg solo seco para *A. gracilis*). Sendo proporcionais ao tamanho das espécies. Após sete dias de exposição, as minhocas mortas foram retiradas e as sobreviventes pesadas e reinseridas no teste, permanecendo até o 14º dia, quando o teste foi concluído. Os percentuais de mortalidade foram comparados com o controle e, novamente, foi feita a pesagem das minhocas sobreviventes para avaliar a perda de biomassa.

Foi realizado um teste para cada pesticida, com cinco repetições de cada concentração adotada para as espécies *A. gracilis* e *E. andrei* e quatro repetições para *D. annae*. O menor número de repetições para a última espécie foi devido ao número insuficiente de minhocas adultas para montagem com cinco repetições.

As concentrações foram baseadas nas doses recomendadas e em trabalhos realizados anteriormente, sendo Carbendazim (0; 1; 3,16; 10; 31,6; 100 mg i.a. kg^{-1} de solo) e Carbofurano (0; 2,5; 5; 10; 16; 32 mg i.a. kg^{-1} de Solo) (BUCH, 2010; GARCIA, 2004).

A adição do agrotóxico foi feita manualmente, através do preparo de uma calda, utilizando água necessária para obtenção de 50% de umidade do solo, para evitar diferença de concentração entre as espécies, o substrato foi preparado uma única vez para cada concentração e homogeneizado manualmente.

2.5 Delineamento experimental e Análises estatísticas

O delineamento experimental consistiu de um fatorial de três espécies de minhocas, dois agrotóxicos e seis concentrações de cada agrotóxico, com cinco repetições de cada

tratamento para *E. andrei* e *A. gracilis* e 4 repetições para *D. annae*, totalizando 168 unidades experimentais ($2 \times 2 \times 6 \times 5 + 1 \times 2 \times 6 \times 4$).

Os valores de concentração mediana letal (CL_{50}) foram determinados através do método Trimmed Spearman–Karber (HAMILTON et. al., 1997). A Concentração mais elevada sem efeito observável (CENO) e a Concentração mais baixa com efeito observável (CEO), foram determinadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunnett para os dados anormais e teste de Friedman, seguido do teste de Dunnett para os dados normais, através do programa Assistat (SILVA, 2002). Não foi necessário transformação dos dados para aplicação das análises estatísticas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Carbendazim

3.1.1 *Eisenia andrei*

Esta espécie apresentou aumento de mortalidade conforme o aumento das concentrações testadas. A mortalidade foi significativa nas concentrações maiores que 10 mg i.a. kg⁻¹ de solo em comparação ao controle (Figura 1).

A concentração mediana letal (CL₅₀) foi de 8,67 mg i.a. kg⁻¹ (Tabela 1), valor menor que encontrado por BUCH (2010), quando testou as mesmas concentrações de Carbendazim em solo artificial tropical (19,74 mg i.a. kg⁻¹). Ensaio realizado por Garcia et al. (2004) com *E. fetida*, em quatro diferentes tipos de solos contaminados com Carbendazim, também mostraram maior sensibilidade dessa espécie em solo natural tropical, do que em solo artificial. Contudo a concentração mais elevada sem efeito observado (CENO 3,16 mg i.a. kg⁻¹ de solo), e a concentração mais baixa com efeito observado (CEO 10 mg i.a. kg⁻¹ de solo) (Tabela 2) foram maiores que encontrados por BUCH (2010) (CENO 1,0 mg i.a. kg⁻¹ e CEO 3,16 mg i.a. kg⁻¹ de solo, respectivamente) em solo artificial. A biomassa individual das minhocas também foi menos afetada, havendo efeito significativo somente na maior dose (100 mg i.a. kg⁻¹) no solo natural (Figura 2) em comparação com efeitos em menor dose (10 mg i.a. kg⁻¹) no solo artificial (BUCH, 2010). Portanto, a contaminação de solo natural, parece permitir que as minhocas suportem maiores concentrações do agrotóxico que no solo artificial. Contudo essa “tolerância” precisa ser melhor avaliada, pois a CL₅₀ foi menor no solo natural, que no solo artificial.

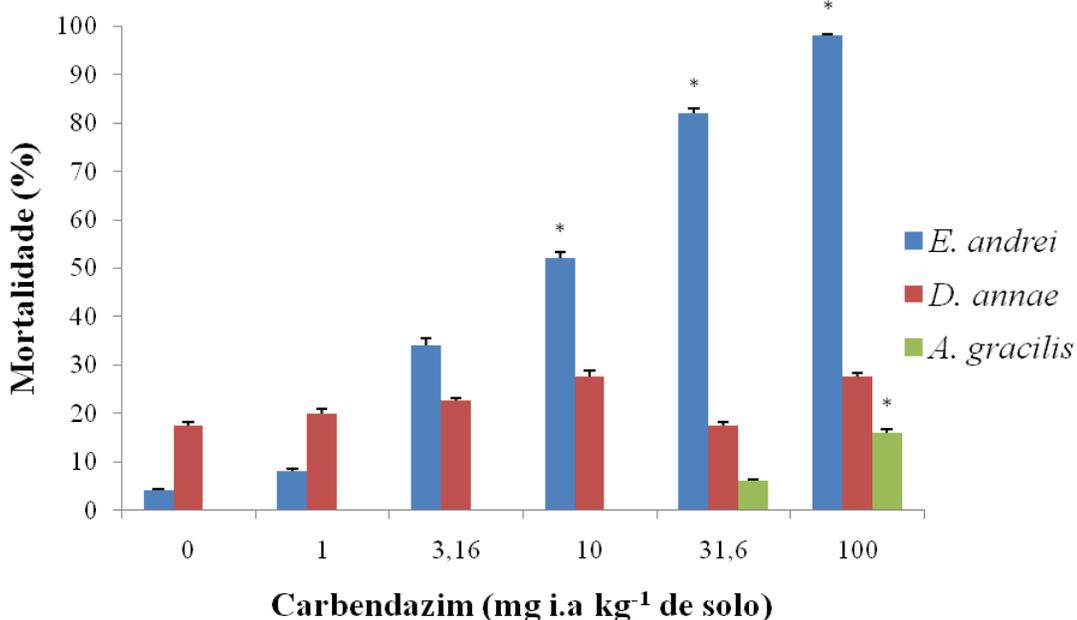


Figura 1: Mortalidade média das espécies *Amynthes gracilis*, *Dichogaster annae* e *Eisenia andrei*, aos 14 dias de exposição a diferentes concentrações de Carbendazim. Diferença estatisticamente significativa * ($p < 0,05$); em relação ao controle, de acordo com teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunnett.

Observou-se, em diversos casos, que as minhocas aderiam à lateral do frasco antes de morrer (Figura 1 anexos), e encontravam-se envolvidas por líquido amarelado. Comportamento semelhante foi descrito por BUCH (2010), após a exposição de *E. andrei* ao Carbendazim. Na primeira semana do teste, observou-se mortalidade de *E. andrei* a partir de 10 mg i.a. kg⁻¹ de solo, sendo visível a decomposição inicial na região posterior das minhocas e alongamento do corpo.

O decréscimo na biomassa individual foi significativo ($p < 0,05$) apenas no 14º dia do teste e somente na concentração mais elevada (100 mg i.a. kg⁻¹) (Figura 2). Portanto, a espécie adaptou-se bem as condições do teste e do solo usado, não apresentando perda de biomassa em função da falta de alimento, sendo essa perda significativa somente devido a alta dose de Carbendazim.

Tabela 2: Concentração mediana letal (CL₅₀), concentração mais baixa com efeito observado (CEO) e concentração mais alta sem efeito observado (CENO) das espécies *A. gracilis*, *E. andrei* e *D. annae* após 14 d de exposição aos agrotóxicos Carbendazim e Carbofurano.

Concentrações mg i.a. kg ⁻¹ de solo					
Agrotóxicos/Espécies	CL ₅₀	95% de confiança		CEO	CENO
		Alta	Baixa		
Carbendazim					
<i>Eisenia andrei</i>	8,67	11,47	6,56	10	3,16
<i>Dichogaster annae</i>	-	-	-	-	100
<i>Amyntas gracilis</i>	-	-	-	100	31,6
Carbofurano					
<i>Eisenia andrei</i>	4,27	5,54	3,29	5	2,5
<i>Dichogaster annae</i>	-	-	-	2,5	-
<i>Amyntas gracilis</i>	-	-	-	2,5	-

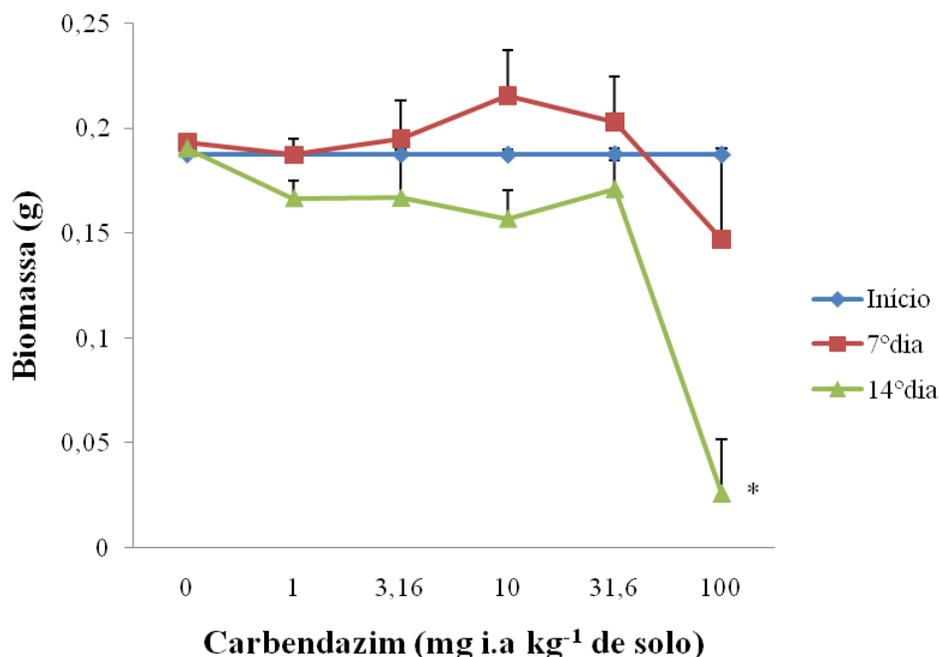


Figura 2: Biomassa individual de *E. andrei*: Inicial, ao 7º e 14º dia de exposição a diferentes concentrações de Carbendazim em solo natural. Diferença estatisticamente significativa * ($p < 0,05$) em relação ao peso inicial.

3.1.2 *Dichogaster annae*

A mortalidade de *D. annae* não foi significativa em nenhuma das concentrações testadas; além disso, a espécie apresentou mortalidade superior aos 10% no controle (Figura 1), valor considerado como máximo na testemunha em ensaios ecotoxicológicos padronizados. Acredita-se que a umidade escolhida e/ou a quantidade de matéria orgânica presente no solo utilizado poderiam ter sido fatores limitantes à sobrevivência da espécie. Observou-se enrolamento das minhocas em todas as concentrações, inclusive no controle, indicando provável repelência ao substrato. As minhocas se alojaram próximas à lateral do frasco, enroladas e em grupos, ou dentro de agregados de solo, permanecendo com o corpo limpo (Figura 2, anexos). Esse comportamento também foi observado por NUNES (2010) e BUCH (2010) com a espécie *E. andrei*.

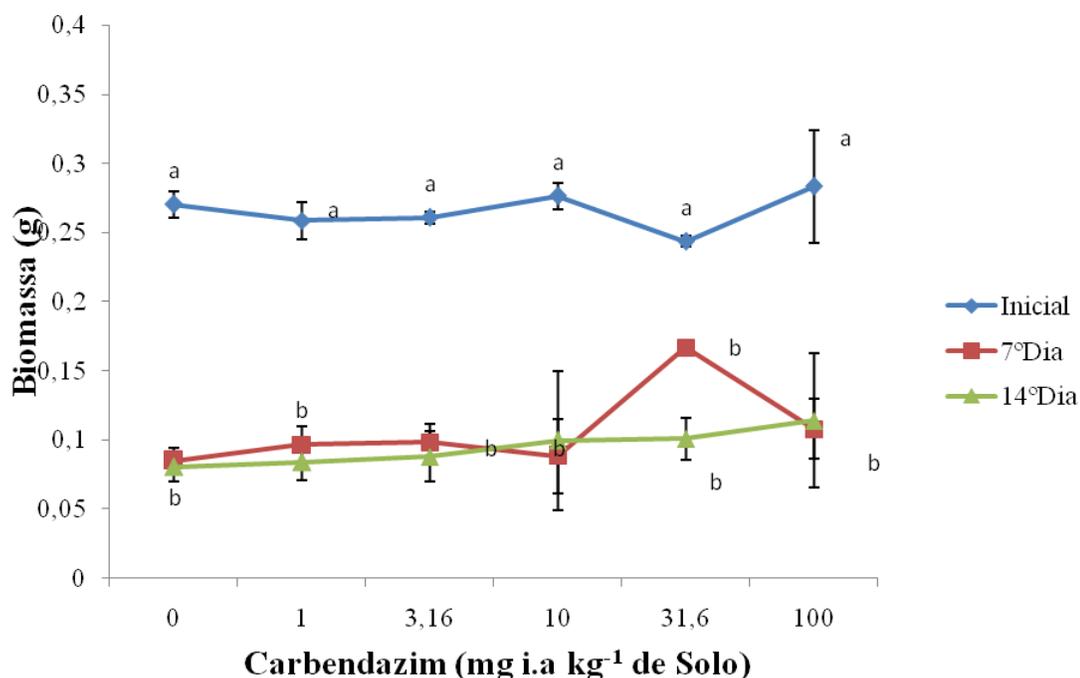


Figura 3: Biomassa individual de *D. annae*: Inicial, ao 7º e 14º dia de exposição a diferentes concentrações de Carbendazim em solo natural. Diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao peso inicial.

Houve perda de biomassa significativa da espécie no 7º e 14º dia quando comparado ao peso inicial em todas as concentrações, incluindo o controle (Figura 3), indicando uma não adaptação ao substrato. Como essa é a primeira vez que se realizam testes ecotoxicológicos com *D. annae*, são necessárias adequações metodológicas no tipo de

solo/substrato, os teores de água e matéria orgânica, para encontrar as condições ideais para os ensaios com essa espécie.

3.1.3 *Amyntas gracilis*

A espécie *A. gracilis* apresentou grande tolerância ao Carbendazim (Figura 1), contrariando a hipótese inicial de maior sensibilidade da espécie do que a espécie padrão, devido ao seu maior tamanho e hábito de ingerir solo na alimentação.

A CENO foi de 31,6 mg i.a. kg⁻¹ de solo e a CEO de 100 mg i.a. kg⁻¹ de solo (Tabela 2), demonstrando a necessidade de realizar testes com concentrações maiores para possibilitar o cálculo da CL₅₀.

O comportamento apresentado pela espécie difere do relatado para *E. andrei*, pois 100% das minhocas mortas foram encontradas na superfície do frasco e na maioria das vezes isoladas umas das outras, ocorrendo mortalidade somente após os 14 dias de experimento.

Houve perda significativa de peso individual de *A. gracilis* em relação ao peso inicial, apenas com 31,6 mg i.a. kg⁻¹ de solo, mas a perda de biomassa foi pequena (Figura 4). Como se encontraram indivíduos mortos nessa concentração, o Carbendazim poderia já estar tendo efeitos nocivos no comportamento dessa espécie, levando a uma perda de biomassa. Contudo, os indivíduos que sobreviveram na concentração mais alta (100 mg i.a. kg⁻¹ de solo) não haviam perdido peso, indicando alta tolerância dessa espécie ao Carbendazim.

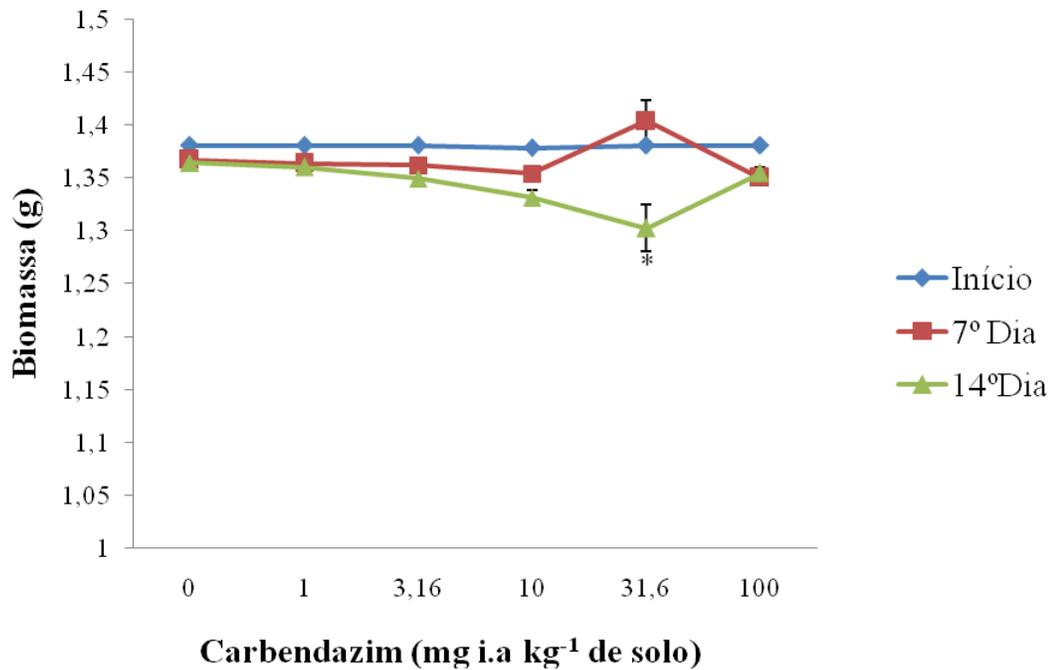


Figura 4: Biomassa individual de *A. gracilis*: Inicial, ao 7º e 14º dia de exposição a diferentes concentrações de Carbendazim em solo natural. Diferença estatisticamente significativa * ($p < 0,05$) em relação ao peso inicial.

3.1.4 Sensibilidade das espécies ao Carbendazim

Independente da concentração utilizada, as minhocas demonstraram diferenças significativas ($p < 0,05$) em resposta ao Carbendazim. A espécie que apresentou maior sensibilidade foi *E. andrei*, sendo que *A. gracilis* e *D. annae* apresentaram alta tolerância ao pesticida.

Comparando as respostas de cada concentração (Tabela 3), na testemunha e com 1 mg i.a kg⁻¹ de solo não se encontraram diferenças significativas entre as espécies. Nas concentrações 3,16 e 10 mg i.a kg⁻¹ de solo, apenas *A. gracilis* diferiu das demais, apresentando maior tolerância. Nas concentrações 31,6 e 100 mg i.a kg⁻¹ de solo, *A. gracilis* e *D. annae* diferiram da espécie padrão devido a maior tolerância das mesmas ao Carbendazim.

Tabela 3: Número médio de minhocas de cada espécie mortas após 14 dias em solo natural com diferentes concentrações de Carbendazim.

Espécie	Carbendazim mg i.a. kg ⁻¹ solo					
	0	1	3,16	10	31,6	100
<i>E. andrei</i>	0,500 aD	1,000 aCD	4,000 aBC	4,500 aB	9,000 aA	9,750 aA
<i>D. annae</i>	1,750 aA	2,000 aA	2,250 abA	2,750 aA	1,750 bA	2,750 bA
<i>A. gracilis</i>	0,000 aA	0,000 aA	0,000 bA	0,000 bA	0.7500 bA	2,000 bA

As letras minúsculas referem-se a diferenças significativas entre os valores nas colunas (espécies), e letras maiúsculas diferenças significativas entre valores nas linhas (concentrações), a 5% de probabilidade.

3.2 Carbofurano

3.2.1 *Eisenia andrei*

A mortalidade da espécie cresceu com o aumento das doses do Carbofurano, como esperado. Na concentração de 2,5 mg i.a. kg⁻¹ de solo houve mortalidade de apenas 28% das minhocas, sendo estas envolvidas por um líquido transparente, semelhante ao muco secretado pelas minhocas quando em condições de estresse (Figura 3, anexos), e diferente do observado nas lesões de *A. gracilis*. Os fungos estiveram ausentes na presença do líquido. Além disso, a espécie apresentou um alongamento do corpo e foram encontradas na superfície do frasco com maior frequência do que no teste com Carbendazim, onde as minhocas mortas estavam no interior do frasco. O comportamento de agrupamento antes de morrer, observado para *E. andrei* com Carbendazim, repetiu-se com o Carbofurano em todas as concentrações. Dados semelhantes foram encontrados por BUCH (2010) e acreditamos ser um comportamento da espécie quando em condições de estresse.

A CL₅₀ (Tabela 2) foi de 4,27 mg i.a. kg⁻¹ de solo, e a CENO 2,5 mg i.a. kg⁻¹ de solo e CEO 5 mg i.a. kg⁻¹ de solo. Os valores de CL₅₀, CEO e CENO encontrados aqui foram menores comparados aos de BUCH (2010) (CL₅₀ = 13,2 mg i.a. kg⁻¹ de SAT e CENO 5 mg i.a. kg⁻¹ de SAT CEO = 10 mg i.a. kg⁻¹ de SAT). Portanto, *E. andrei* parece ser mais sensível ao Carbofurano em solo natural, que no solo artificial tropical.

A partir da concentração 5 mg i.a. kg⁻¹ de solo a mortalidade foi superior a 50% (Figura 5). No sétimo dia de exposição, as minhocas encontradas vivas nas concentrações

2,5 e 5 mg i.a. kg⁻¹ de solo estavam na superfície do frasco e apresentavam enrolamento e união, além de grande quantidade de líquido transparente semelhante ao muco. Esse comportamento (de aumentar a produção de muco) é uma função do sistema excretor das minhocas que tem como objetivo protegê-las de uma substância indesejada (EDWARDS & BOHLEN, 1996). As minhocas mortas apresentaram alongamento do corpo e rompimento dos segmentos, características semelhantes foram encontradas por NUNES (2010) durante a exposição da espécie a diferentes doses de Abamectina.

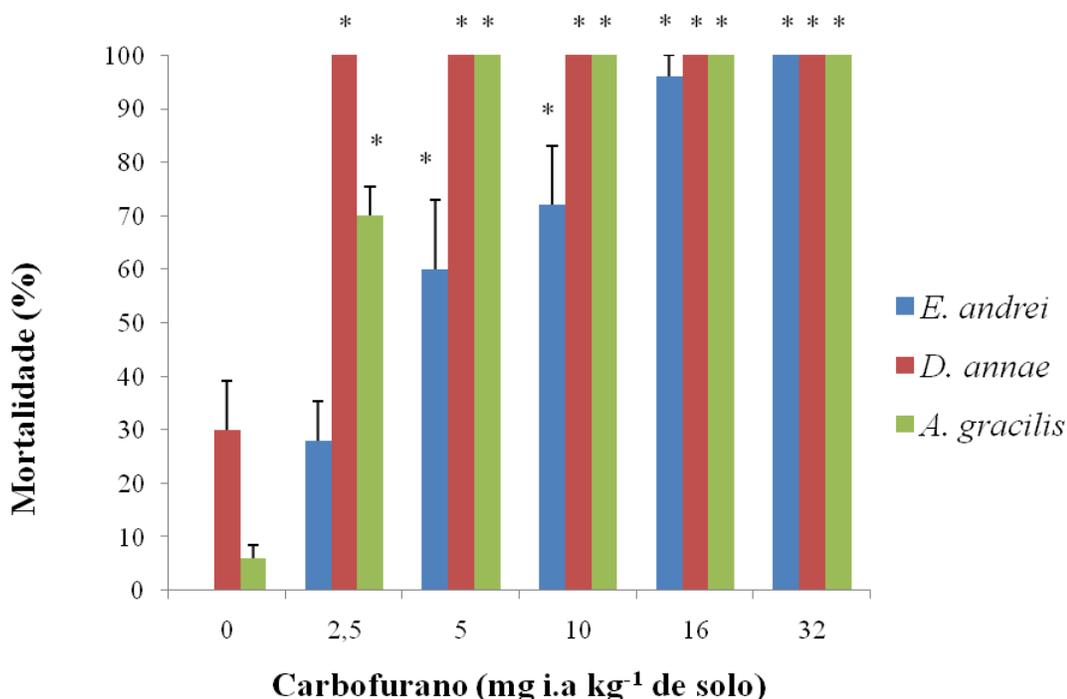


Figura 5: Mortalidade média das espécies, *Eisenia andrei*, *Dichogaster annae* e *Amyntas gracilis*, aos 14 dias de exposição a diferentes concentrações de Carbofurano. Diferença estatisticamente significativa * ($p < 0,05$) em relação ao controle, de acordo com teste de Kruskal-Wallis.

Ao contrário do observado para o Carbendazim, observou-se perda significativa de biomassa individual de *E. andrei* a partir da concentração mais baixa de Carbofurano (2,5 mg i.a. kg⁻¹ de solo) aos 14 dias de exposição. Aos 7 dias de exposição, apenas nas concentrações 16 e 32 mg i.a. kg⁻¹ de solo as minhocas tiveram peso individual menor comparado ao inicial (Figura 6).

Portanto, a espécie *E. andrei* demonstrou baixa tolerância ao Carbofurano, que teve efeitos tóxicos (CL_{50}) e sub-letais (perda de peso) em doses mais baixas, comparadas ao Carbendazim. Na concentração controle, assim como observado com o Carbendazim, não houve perda de biomassa, confirmando a afinidade da espécie ao solo natural, para o período de teste (14 dias).

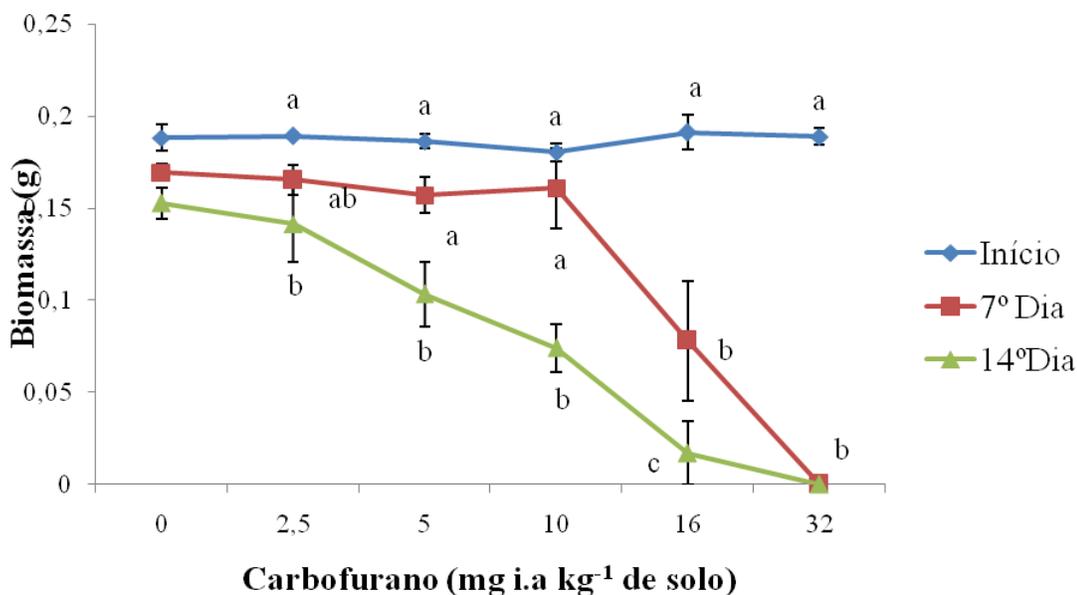


Figura 6: Biomassa individual de *E. andrei*: Inicial, ao 7º e 14º dia de exposição a diferentes concentrações de Carbofurano em solo natural. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância ($p < 0,05$).

3.2.3 *Dichogaster annae*

A espécie *D. annae*, apresentou uma mortalidade superior a 10% no controle. Observou-se enrolamento das minhocas encontradas vivas, dentro de agregados aderidos a lateral do frasco (Figura 4, anexos), o que poderia ser uma adaptação comportamental de proteção, mesmo no solo controle. Dados de comportamento semelhante foram observados por BUCH, (2010) com a espécie *Pontoscolex corethrurus* após exposição ao Carbendazim.

As minhocas encontradas mortas apresentavam partículas de solo presas ao corpo e grande produção de muco. A presença de fungos envolvendo o corpo das minhocas mortas foi observada em todas as concentrações testadas.

Na concentração de 2,5 mg i.a. kg⁻¹ de solo havia minhocas vivas no sétimo dia de exposição, com lesões corporais e rompimento de segmentos (Figura 5, anexos). Isso deve-se ao fato do contaminante pertencer ao grupo químico dos carbamatos que através da

inibição da enzima acetilcolinesterase promove lesões musculares (LEVISKE, 2007). As demais concentrações apresentaram 99% de mortalidade a partir do sétimo dia de exposição.

Devido à mortalidade superior a 10% no controle e a alta mortalidade (100%) em todas as concentrações (Figura 5), não foi possível calcular a CL_{50} , sendo necessária a realização de testes com concentrações menores para tal finalidade. Também houve perda significativa de biomassa individual de *D. annae* em todos os tratamentos, inclusive no controle, aos 14 dias de exposição (Figura 7), confirmando sua intolerância ao solo utilizado nesse experimento. Aos sete dias de exposição, perdas significativas foram observadas somente nos tratamentos com Carbofurano.

A CENO não pode ser observada, visto que na menor concentração (2,5 mg i.a. kg^{-1} de solo) houve mortalidade significativa, sendo este, portanto, o valor da CEO (Tabela 2). Contudo, são necessários testes com menores concentrações, e outros substratos, para calcular a sensibilidade real de *D. annae* ao Carbofurano. Entretanto, o fato de até a menor dose de esse agrotóxico causar mortalidade às minhocas confirma a alta toxicidade do mesmo à essa espécie, em doses usadas na agricultura. Em termos de comparação, essa toxicidade não foi observada com o Carbendazim que, ao contrário, teve poucos efeitos tóxicos nessa espécie.

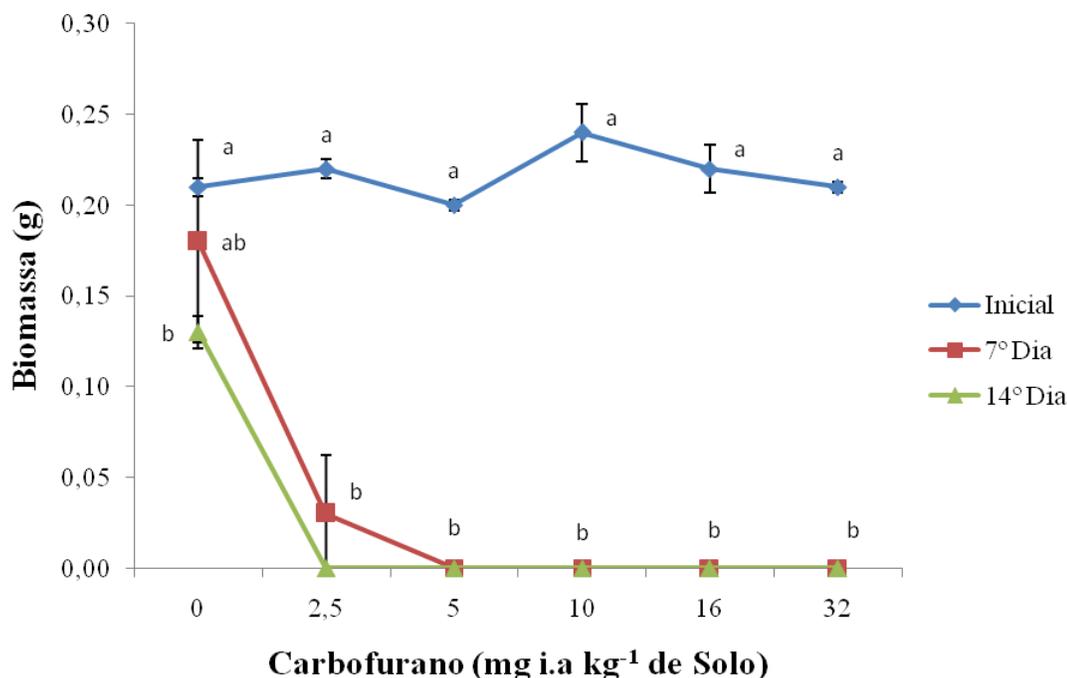


Figura 7: Biomassa individual de *D. annae*: Inicial, ao 7º e 14º dia de exposição a diferentes concentrações de Carbofurano em solo natural. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância ($p < 0,05$).

3.2.2 *Amyntas gracilis*

O Carbofurano teve efeitos tóxicos muito mais acentuados na espécie *A. gracilis*, do que os observados com Carbendazim. A partir da menor dose (2,5 mg i.a. kg⁻¹ de solo), já houve mortalidade de 70% aos 14 dias, nessa e nas demais concentrações testadas, foram observadas deformidades no corpo das minhocas. (Figura 5). A alta toxicidade deste produto é bem reconhecida, e observou-se maior sensibilidade de *A. gracilis* em relação à espécie padrão, confirmando nossa hipótese inicial.

Com 2,5 mg i.a. kg⁻¹ de solo, aos sete dias de exposição minhocas morta encontradas apresentaram-se envolvidas por fungos ou com esmagamento em segmentos posteriores ao clitelo, o que ocasionou rompimento de tecido e liberação de líquido amarelado (Figura 6, anexos). Essas secreções, possivelmente seriam líquidos celomáticos com presença de células cloragógenas que, de acordo com EDWARDS & BOHLEN (1996), são células especiais com coloração amarelada que auxiliam na remoção de substâncias tóxicas presentes no sangue das minhocas.

Na concentração 5 mg i.a. kg⁻¹ de solo, aos sete dias de exposição, as minhocas ainda vivas apresentavam inchaço segmentar e/ou feridas que liberavam o líquido amarelado citado anteriormente. Na concentração 10 mg i.a. kg⁻¹ de solo, 90% das minhocas foram encontradas mortas ao sétimo dia de exposição. Além disso, as poucas que sobreviveram, apresentavam uma coloração diferenciada, indicando início de decomposição, começando do meio da minhoca para a parte caudal (ou região posterior). Comportamento semelhante foi relatado por BUCH (2010) para espécie *P. corethrurus*, em presença de Carbofurano.

Nas concentrações de 16 e 32 mg i.a. kg⁻¹ todas as minhocas estavam mortas aos sete dias de exposição, apresentando grande quantidade de secreção amarelada e fungos bem desenvolvidos, envolvendo-as na maioria das vezes na superfície do frasco (Figura 6, anexos).

Não foi possível calcular a CL₅₀, pois a mortalidade de *A. gracilis* foi maior que 50% na menor concentração, sendo necessária a realização de testes com concentrações menores de Carbofurano para tal finalidade. A CEO foi de 2,5 mg i.a. kg⁻¹ de solo (Tabela 2) e a CENO não pode ser calculada, pois todas as concentrações tiveram efeitos maléficos nas minhocas.

Aos sete dias de exposição ao Carbofurano, houve perda significativa de biomassa individual de *A. gracilis* em concentrações superiores a 10 mg i.a. kg⁻¹ de solo; aos 14 dias, perdas significativas foram observadas a partir de 5 mg i.a. kg⁻¹ de solo, com morte de todos os indivíduos (Figura 8). No Controle, não houve perda de biomassa individual, comprovando a aceitabilidade da espécie ao solo utilizado.

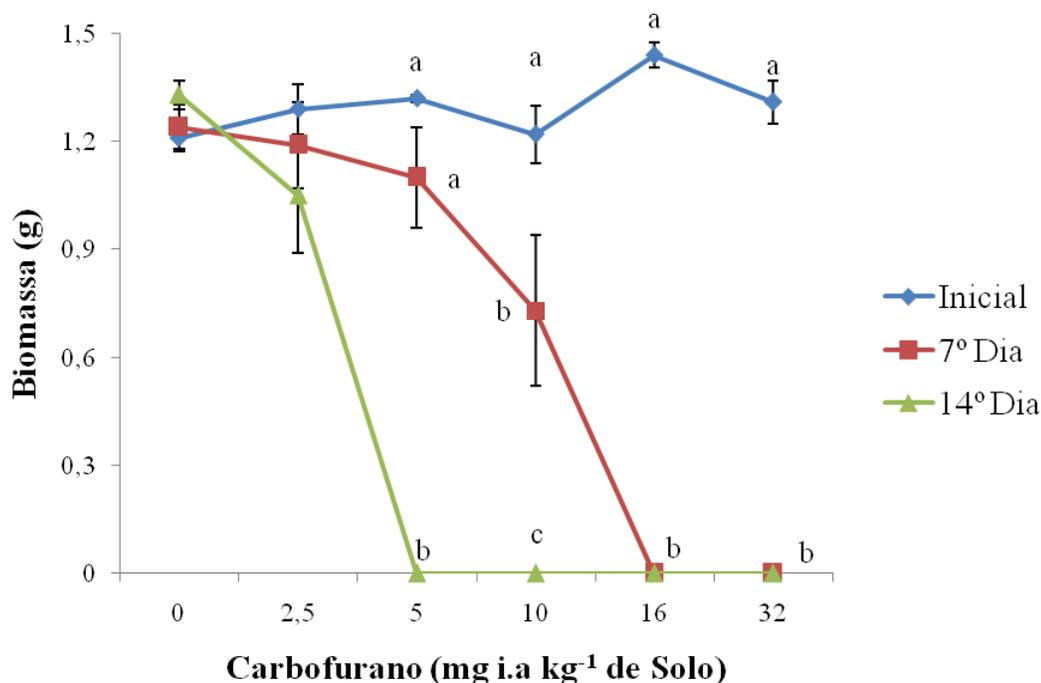


Figura 8: Biomassa individual de *A. gracilis*: Inicial, ao 7º e 14º dia de exposição a diferentes concentrações de Carbofurano em solo natural. Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si ao nível de significância ($p < 0,05$).

3.2.4 Sensibilidade das espécies ao Carbofurano

Comparando as três espécies, *D. annae* foi a que apresentou maior sensibilidade ao Carbofurano, porém, considerando as concentrações testadas, apenas com 2,5 mg i.a. kg⁻¹ de solo encontraram-se diferenças significativas entre as três espécies, sendo *D. annae* a mais sensível, *A. gracilis* moderadamente sensível e *E. andrei* a menos sensível. Nas concentrações de 5 e 10 mg i.a. kg⁻¹ de solo, a espécie *E. andrei* demonstrou maior tolerância que as demais. Porém, em concentrações superiores a 16 mg i.a. kg⁻¹ de solo, as três espécies testadas responderam de forma semelhantes, com mortalidades altas ou absolutas. Esses resultados são opostos ao observado com o Carbendazim, onde *E. andrei* foi mais sensível que as outras espécies à aplicação do pesticida.

Tabela 4: Número médio de minhocas de cada espécie mortas após 14 dias em solo natural com diferentes concentrações de Carbofurano.

Espécie	Carbofurano mg i.a. kg ⁻¹ solo					
	0	2,5	5	10	16	32
<i>E.andrei</i>	0,000 bC	2,500 cC	7,0000 bB	7,000 bB	9,500 aA	10,000 aA
<i>D. annae</i>	3,000 aB	10,00 aA	10,000 aA	10,000 aA	10,000 aA	10,000 aA
<i>A. gracilis</i>	0,500 bC	6,750 bB	10,000 aA	10,000 aA	10,000 aA	10,000 aA

As letras minúsculas referem-se a diferenças significativas entre os valores nas colunas (espécies), e letras maiúsculas diferenças significativas entre valores nas linhas (concentrações), a 5% de probabilidade.

4 CONCLUSÕES

E. andrei apresentou boa sobrevivência no tratamento controle, e a sensibilidade aos dois agrotóxicos (Carbendazim e Carbofurano), o que possibilitou determinação de CL_{50} , CENO e CEO, para ambos agrotóxicos, em solo natural.

A. gracilis apresentou baixa sensibilidade ao Carbendazim e alta sensibilidade ao Carbofurano, comprovando em parte nossa hipótese inicial de maior sensibilidade dessa espécie aos agrotóxicos, em relação a *E. andrei*.

D. annae demonstrou-se diferente da espécie padrão em ambos os testes, diferindo de nossa hipótese inicial. A espécie teve alta sensibilidade ao Carbofurano e baixa sensibilidade ao Carbendazim. Contudo recomenda-se a realização de mais testes para verificar seu real potencial bioindicador em testes ecotoxicológicos, pois sua alta sensibilidade poderia estar relacionada à sua intolerância ao substrato utilizado.

Como considerações, acreditamos que a metodologia ainda necessita de adequações, e estas deveriam ser feitas baseadas nas condições locais de uso (Tipos de solo, espécie predominante, umidade, temperatura), para assim representar de forma realista o que ocorre com a aplicação dos agrotóxicos no solo.

Para indicar uma nova espécie a ser utilizada em testes ecotoxicológicos no Brasil ainda são necessários mais pesquisas em ecotoxicologia do solo, estudando-se seus efeitos agudos e crônicos, e buscando-se os substratos adequados para estas avaliações.

5 LITERATURA CITADA

ANDRÉA, M. M.; PAPINI, S.; PERES, T. B.; SAVOY, V. L. T. E MATALLO, M. B. Glyphosate: influência na bioatividade do solo e ação de minhocas sobre sua dissipação em terra agrícola. *Planta Daninha*, 2:1:95-100, 2004.

AQUINO, A. M.; CORREIA, M.E.F. Invertebrados edáficos e o seu papel nos processos do solo. Seropédica: Embrapa Agrobiologia: Documento 201, 2005. 52p.

ASSOCIACAO BRASILEIRA DE NORMAS TECNICAS. Ecotoxicologia terrestre - Ecotoxicidade aguda - Método de ensaio com minhocas. Brasil, ABNT-NBR 15537, 2007. 1-13p.

BARBOSA, L. C. de A. Os pesticidas, o homem e o meio ambiente. Viçosa: UFV, 2004.

BROWN, G. G. Avaliação de populações de minhocas (Annelida: Oligochaeta) em sistemas agrícolas e naturais, e seu potencial como bioindicadores ambientais. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: Documento 296, 2005.17-22p.

BROWN, G. G.; OLIVEIRA, L. J. ; KORASAKI, V.; SANTOS, A. A. DOS. Biodiversidade como Bioindicadora da Qualidade do Solo no Paraná. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: Documento 308, 2006. 165-172p.

BUCH, A. C. *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) E *Eisenia andrei*, Bouché 1972, Como Bioindicadoras De Solos Contaminados Por Agrotóxicos. Dissertação de Mestrado em Ciência do Solo, 2010.

CHANG, Y.-C. "Minireview natural history of *Amyntas hawayanus* (Rosa, 1891)." *Acta. Sci. Biol. Sci*, 26:39-50, 1997.

EDWARDS, C. A., BOHLEN, P. J. *Biology and Ecology of Earthworms*. Chapman and Hall Ltd, London, 1996 p. 3-424.

EDWARDS, C. A.; et al. The importance of earthworms as key representatives of the soil fauna. In: Edwards, C.A. Earthworm Ecology. 5th International Symposium on Earthworm Ecology, 2 ed. by Clive A. Edwards, 2004. p. 3-11.

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

GENET, J. Bendomidazoles. Fungicide Resistance Action Committee. Disponível em: <http://www.frac.info/frac/work/work_benz.htm>. Acesso em 05 fev. 2011.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS RENOVAVEIS. Manual de testes para avaliação de ecotoxicidade de agentes químicos. IBAMA, 1990. 1-32p.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS RENOVAVEIS. Portaria normativa IBAMA, nº 84. IBAMA, 1996. 46-47p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Soil quality – Avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals on behaviour – Part 1: Test with earthworms. Geneva, Switzerland, 2007.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Soil quality – Effects of pollutants on earthworms – Part 2: Determination of effects on reproduction. ISO 11268-2. Geneva, Switzerland, 1998.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Soil quality- Effects of pollutants on earthworms – Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate. ISO 11268-1. Geneva, Switzerland, 1993.

LEVISKE, J. V. Condições de segurança do produtor rural na utilização de agrotóxico na região oeste do Paraná. Faculdade Assis Gurgacz, 2007. 79p.

LUZ, T. N.; AMORIM, M. J. B.; ROMBKEC, J.; SOUSA, J. P. Avoidance tests with earthworms and springtails: Defining the minimum exposure time to observe a significant response. *Ecotoxicol. Environ. Saf*, 71: 545-551, 2008.

MOSLEH, Y. Y.; PARIS PALACIOS, S.; COUDERCHER, M. VERNET, G. Effects of the herbicide Isoproturon on survival, growth rate, and protein content of mature earthworms (*Lumbricus terrestris* L.) and its fate in the soil. *Appl. Soil. Ecol*, 23:69-77, 2003;

NUNES, M. E. T. Avaliação dos efeitos de agrotóxicos sobre a fauna edáfica por meio de ensaios ecotoxicológicos com *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) e com comunidade natural de solo. Tese de Doutorado Universidade de São Carlos, 2010.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Guideline for the Testing of Chemicals n. 207, Earthworm Acute Toxicity Tests. OECD, Paris, France, 1984.

PAOLETTI, M. G. The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. *Agric. Ecos. Environ*, 74:137-155, 1999.

RAMOS, A. S. Implantação do laboratório de ecotoxicologia aplicada a indústria minero-metalurgica (LECOMIM) do CETEM. I Jornada do Programa de Capacitação Interna – CETEM,1-8, 2007.

REINECKE, A.J.; REINECKE S.A. Earthworms as test organisms in ecotoxicological assessment of toxicant impacts on ecosystems. In.: Edwards, C.A. ed. *Earthworm Ecology*. 2 ed. 2004. p. 299-320.

SILVA, C. M. M. S.; DE MELO, I. S.; MAIA, A. H.; ABAKERLI, R. B. Isolamento de fungos degradadores de Carbendazim. *Pesq. Agropec. Bras*, 34:1255-1264, 1999.

SILVA, F. DE A. S. E. & AZEVEDO, C. A. V. DE. Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 4:71-78, 2002.

SISINNO, C. L. S. et al. Ensaio de comportamento com minhocas (*Eisenia fetida*) para avaliação de áreas contaminadas: resultados preliminares para contaminação por hidrocarbonetos. J. Braz Soc. Ecotoxicol, 1:137-140, 2006.

SPADOTTO, C. A. Avaliação de Riscos Ambientais de agrotóxicos em condições Brasileiras. Jaguariúna Embrapa Meio Ambiente: Documento 58, 2006. 20p.

ANEXOS



Figura 1: *Eisenia andrei* aderida a lateral do frasco, envolvida por liquido amarelado após 14 dias de exposição ao Carbendazim.



Figura 2: *Dichogaster annae* enrolada na lateral do frasco, dentro de agregado do solo, no tratamento com exposição ao Carbendazim.



Figura 3: Comportamento de união e de liberação de secreção transparente da espécie *E. andrei*.



Figura 4: *Dichogaster annae* demonstrando um comportamento de enrolamento em grupo e aderência na lateral do frasco.



Figura 5: *Dichogaster annae* com fragmentação segmentar após 14 dias de exposição ao Carbofurano.



Figura 6: *Amynthes gracilis* com lesão e liberação de secreção amarelada.

Apêndice 1- Teste piloto usando *Amyntas gracilis* em Solo Artificial Tropical

Objetivo

Verificar a mortalidade da espécie *A. gracilis* em Solo Artificial Tropical, sem adição de agrotóxicos para testar sua adaptação a esse substrato padrão em ensaios ecotoxicológicos com minhocas pela ISO (1993), ABNT (2007) e OECD (1984).

Materiais e Métodos

O substrato utilizado no teste de mortalidade foi o Solo Artificial Tropical (SAT), proposto por Garcia (2004), este solo é composto de, 70 % areia fina, 20 % caulim, 10 % fibra da casca de coco.

No primeiro ensaio (A) colocou-se 500 g de SAT e 20 g de esterco bovino desfaunado (com 3 ciclos de congelamento) como alimento na superfície. No segundo ensaio (B) colocou-se 500 g de SAT sem esterco como alimento para determinar se o esterco poderia estar causando mortalidade das minhocas, e não o SAT. No terceiro ensaio (C) colocou-se 1500 g de SAT e 80 g de esterco bovino como alimento, visando verificar se 500 g de SAT era quantidade insuficiente de substrato para essas minhocas de grande porte (pesando 7 vezes mais que *E. andrei*, em média). Em todos os ensaios foram colocadas 10 minhocas adultas em cada frasco, com quatro repetições.

Os ensaios se realizaram seguindo as normas 11268-1 (ISO, 1993), em temperatura ambiente ($20 \pm 4^{\circ}\text{C}$).

Resultados

Em todas as condições testadas a mortalidade da espécie foi superior aos 10% do valor considerado máximo em ensaios ecotoxicológicos padronizados.

A adição do esterco no primeiro teste criou grande quantidade de fungos, o que foi relacionado com a mortalidade das minhocas, porém a mortalidade continuou em 25%, mesmo sem o esterco como alimento, indicando que não era apenas o esterco que estava causando essa mortalidade. No ensaio com maior quantidade de SAT também houve mortalidade de 20%, inviabilizando o uso do SAT para os ensaios com *A. gracilis*. Portanto, optou-se pela utilização de substrato (solo) natural.

Tabela 5: Relação das minhocas sobreviventes em solo artificial durante 7 e 14 dias, e porcentagem das minhocas mortas após os 14 dias e exposição.

Ensaio	No. minhocas vivas			Mortalidade total (%)
	Início	7 Dias	14 Dias	
Teste A (500 g de Sat + 20g de esterco)	40	28	26	35
Teste B (500 de Sat)	40	30	nd	25
Teste C (1500 de Sat + 80g de esterco)	40	35	32	20

Nd = não determinado

Apêndice 2- Escolha do solo padrão para os testes ecotoxicológicos

O IBAMA estabelece em sua normativa sobre avaliação ambiental de agrotóxicos (1996), tipos de solo disponíveis para realização de ensaios ecotoxicológicos. Em consultoria com Itamar Bognola e Gustavo Curcio pedólogos da Embrapa Florestas, foram realizadas coletas de solo em um gleissolo, próximo a Embrapa Florestas e num Latossolo em Ponta Grossa, para analisar qual se encaixava melhor nas condições de solo padrão do IBAMA.

O Latossolo não se enquadrou nas exigências do padrão no valor de pH em H₂O e na quantidade de argila, enquanto o Gleissolo, não se enquadrou nos valores de pH em KCl, Carbono orgânico e Argila. Como o Latossolo é um solo bastante representativo na região do Paraná, uma região com intensa produção agrícola, foi optado a utilização deste para os ensaios ecotoxicológicos.

Tabela 6: Dados químicos e físicos dos solos coletas e dos solos padrões para ensaios ecotoxicológicos.

	pH em H ₂ O	pH em KCl	CO (g kg ⁻¹)	Argila (g kg ⁻¹)	Densidade aparente (kg dm ⁻³)	Porosidade (%)
Latossolo Padrão	4,9 - 5,3	3,8 - 4,8	15 a 40	580 a 700	1,1 a 1,5	50 a 65
Latossolo Teste	4,7	4,1	21,98	780	1,2	54
Gleissolo Padrão	3,5 a 5,1	3,0 a 4,7	50 a 100	300 a 500	0,8 a 1,0	---
Gleissolo Teste	3,6	2,8	37	280	---	---

Apêndice 3- Adaptações utilizadas com a espécie *D. annae*

Diferente das demais espécies testadas, a *D. annae* é dotada de extrema habilidade escaladora, já que a espécie conseguiu escalar o plástico filme e fugir dos vasos pelos furos feitos para oxigenação no centro da tampa de plástico filme. Todas as fugitivas foram encontradas mortas no dia seguinte a montagem do teste dentro da estufa e nas laterais externas dos frascos. Devido a esse problema, o teste com o Carbendazim precisou ser repetido, e foi utilizado tecido (organza) com menores aberturas que permitiram a passagem de ar sem permitir a fuga.