

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

INSTITUTO BIOLÓGICO
PÓS-GRADUAÇÃO

**Avaliação comparativa do efeito de compostos fungicidas
sintético e natural por parâmetros biológicos do solo**

ANGELO STEFANI JUNIOR

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Vegetal

Orientador(a): Dr^a. Mara M. de Andréa.

São Paulo
2009



SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS
AGRONEGÓCIOS

INSTITUTO BIOLÓGICO
Pós-Graduação

Av. Cons. Rodrigues Alves 1252
CEP 04014-002 - São Paulo - SP
pg@biologico.sp.gov.br



FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do candidato: Angelo Stefani Junior

**Título: Avaliação comparativa do efeito de compostos fungicidas
sintético e natural por parâmetros biológicos do solo**

Orientador(a): Dr(a) Mara M. de Andréa

Dissertação apresentada ao Instituto Biológico da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio.

Área de Concentração: Sanidade Vegetal

Aprovado em:

Banca Examinadora

Assinatura:

Prof. (a) Dr.(a): Mara M. de Andréa

Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:

Prof. (a) Dr.(a): Joana D'arc Felício de Souza

Instituição: Instituto Biológico

Assinatura:

Prof. (a) Dr.(a): Dra. Mariana de Melo Rocha

Instituição: UNIABC, Faculdade Cantareira

*Aos meus pais, pelo
amor, oportunidades
e incentivo*

Ofereço

*A minha avó Maroca, com
saudades, pelo exemplo de vida .
A mais que amiga Lurdinha
pela convivência, conversas, e
alegrias.*

Dedico

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Angelo e Edna e, Luciana, Cláudio, Cláudia e Munir pelo carinho e apoio oferecido nos momentos difíceis.

A FAPESP, pela concessão de bolsa de mestrado (processo n.º. 07/51668-0).

A Dra. Mara M. de Andréa, pela orientação, dedicação e conhecimentos transmitidos durante o mestrado.

Ao Professor Dr. Luiz Carlos Luchini, pela prontidão e sugestões que tanto acrescentaram ao trabalho e pelos ensinamentos em Qualidade BPL. A Dra. Deise Helena Baggio Ribeiro, pelos ensinamentos em cromatografia e pelas sugestões e contribuições ao trabalho.

A Dra. Joana D´arc Felício de Souza e Dra. Edlayne Gonçalves, pelo fornecimento do extrato de Yacón e informações sobre o produto, pelas sugestões e contribuições ao trabalho. A Terezinha B. Peres, pelas informações transmitidas sobre a DHA. A Dra. Mariana de Melo Rocha e Dra. Solange Papini pelas sugestões e contribuições ao trabalho.

As amigas Tháís Salomão Leme, Regina C. B. Ferreira e Fernanda P. Soares, pela agradável convivência e indispensável auxílio em toda a parte experimental deste trabalho.

As amigas Tháís Mitre Vampré, Ana Paula Souza, Amanda C. Rios e Flávia C. Serafim, pela amizade, convivência, conhecimentos compartilhados e ajuda oferecida durante os experimentos.

Aos amigos Eliane Vieira, Priscila, Nancy, Wellington, Amanda, pela amizade e agradável convivência no Instituto Biológico. A Sra. Leda e Sr. Manuel, funcionários do LEA, pela ajuda e colaboração na realização dos experimentos. Ao Sr. Walter, bibliotecário, pela confecção da ficha catalográfica da dissertação. A Fernanda G. Carpanelli, funcionária da Pós-graduação, pelos serviços prestados.

Aos meus amigos Alessandra Pedrina, Corel Guimarães, Damaris Teixeira, Fernando Gaspar, Leandro Antonio, Leonardo Medeiros, Marlene Orlovas, Mirian Dias, e Murilo Pimentel pela amizade incondicional e apoio oferecido nos momentos difíceis.

*“O papel dos seres infinitamente
pequenos é infinitamente grande”.*

Louis Pasteur

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
2.1. Objetivos gerais	2
2.2. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1. Agrotóxico: dinâmica e impacto no ecossistema edáfico	3
3.2. Atividade microbiana e os processos biológicos do solo	8
3.2.1. Atividade enzimática do solo	9
3.2.2. Respiração do solo	11
3.3. Fungicida clorotalonil	12
3.4. <i>Polymnia sonchifolia</i>	14
3.5. Minhocas como bioindicador	16
3.6. Testes de toxicidade	18
4. MATERIAL E MÉTODOS	19
4.1. Solos	19
4.1.1. Reativação da atividade microbiana dos solos	19
4.1.2. Determinação da umidade dos solos	20
4.2. Clorotalonil	20
4.2.1. Determinação da curva de calibração do clorotalonil por CLAE	21
4.2.2. Tratamento dos solos com clorotalonil	21
4.2.3. Recuperação do clorotalonil das subamostras dos solos	22
4.3. <i>Polymnia sonchifolia</i>	22
4.3.1. Tratamento dos solos com a fração metanólica do extrato da planta <i>P. sonchifolia</i> ..	22
4.3.2. Teste de sensibilidade por contato de minhocas <i>Eisenia andrei</i> à fração metanólica do extrato da planta <i>P. sonchifolia</i>	23
4.4. Rejeição de minhocas <i>E. andrei</i> a solo contaminado com os compostos fungicidas sintético e natural	23
4.5. Atividade da enzima desidrogenase - DHA	25
4.5.1. Determinação da curva de calibração do TTF-formazan	26
4.6. Respiração do solo	28
4.7. Análise estatística	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÕES	45
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

STEFANI, J. A. AVALIAÇÃO COMPARATIVA DO EFEITO DE COMPOSTOS FUNGICIDAS SINTÉTICO E NATURAL POR PARÂMETROS BIOLÓGICOS DO SOLO. São Paulo. 2009. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

RESUMO

O estudo da dinâmica e dos aspectos ecotoxicológicos dos agrotóxicos, bem como de alternativas naturais, por meio de parâmetros biológicos do solo e em organismos edáficos é importante para o entendimento das possíveis consequências decorrentes da utilização dessas substâncias químicas nas práticas de cultivo agrícola sobre a bioatividade do solo. Neste sentido, o presente trabalho comparou os efeitos do fungicida sintético clorotalonil e da fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* - planta com atividade antifúngica, na atividade biológica de dois tipos de solo (Gley Húmico Eutrófico - GHE e Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico - AVEC), por meio da determinação da atividade da enzima desidrogenase (DHA); da respiração do solo e por teste de rejeição de minhocas *Eisenia andrei* aos solos tratados com os compostos fungicidas. Nos estudos de atividade da microbiota edáfica as amostras dos solos foram reumedecidas sete dias antes do início dos estudos, para reativação da sua atividade microbiana. Estas amostras foram tratadas com clorotalonil ($11 \mu\text{g g}^{-1}$ de solo; T1) ou com a fração metanólica do extrato da planta ($300 \mu\text{g g}^{-1}$ de solo; T2). A atividade da DHA nos solos foi medida em amostras de 3 g imediatamente e 24 h e também aos 7, 14 e 28 dias após os tratamentos, por meio de medidas da conversão do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) em 1,3,5-trifeniltetrazólio formazan (TTF-formazan) por ação da enzima e quantificada por espectrofotometria UV/Vis a 485 nm. A respiração foi induzida pela adição de ^{14}C -glicose às subamostras dos solos tratados, que foram acondicionadas em frascos biométricos. O $^{14}\text{CO}_2$ formado pela respiração da microbiota dos solos foi capturado em solução de NaOH (0,1 M) trocada de duas em duas horas durante 10 horas; após 24 h e também aos 3, 5, 7, 14 e 28 dias após os tratamentos. Sua quantificação foi feita por espectrometria de cintilação em líquido (ECL). Observou-se inibição apenas temporária da atividade da DHA nos dois solos tratados tanto

com clorotalonil quanto com a fração metanólica do extrato de *P. sonchifolia*, demonstrando a capacidade de recuperação da atividade da microbiota desses solos ao longo do período de estudo. Tanto o efeito de inibição quanto o de estímulo da respiração dos solos GHE e AVEC por ação da fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* foram muito pequenos. Porém, o composto fungicida sintético clorotalonil causou grande inibição da respiração no solo GHE (16,4 %), mas praticamente não causou efeito na respiração do solo AVEC. Isto pode ter sido causado pelas diferenças nas características físico-químicas dos solos, pois os efeitos de ambos os compostos fungicidas foram maiores no solo GHE que tem menor conteúdo de matéria orgânica. Entretanto, a dissipação do clorotalonil parece não ter sido influenciada pelas características físico-químicas dos solos durante os 28 dias de estudo, porque ela foi praticamente a mesma em ambos. No teste de rejeição de minhocas aos solos tratados verificou-se que ambos compostos foram subletais às minhocas, mas apenas o clorotalonil provocou rejeição à concentração de recomendação de uso agrícola e ao dobro dela.

Palavras-chave: clorotalonil, *Polymnia sonchifolia*, desidrogenase, respiração do solo, rejeição por minhocas.

STEFANI, J. A. COMPARATIVE ASSESSMENT OF THE EFFECT OF SYNTHETIC AND NATURAL FUNGICIDE COMPOUNDS BY SOIL BIOLOGICAL PARAMETERS. São Paulo. 2009. Dissertation (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

ABSTRACT

The study of the environmental dynamics and ecotoxicological aspects of pesticides as well as of natural alternatives, by soil biological parameters and in soil organisms is important to understand the possible consequences of using these substances in agricultural practices on the soil bioactivity. In this sense, the present study compared the effects of chlorothalonil, a well known synthetic fungicide, and the methanolic fraction from *Polymnia sonchifolia* plant extract – a natural product with antifungal activity, on the biological activity of two soil types (Eutrophic Humic Gley –GHE and Typic Eutroferric Chernosol – AVEC), by the determination of the dehydrogenase activity (DHA-activity); the soil respiration and also by the earthworms *Eisenia andrei* avoidance test to the soils treated with the fungicide compounds. The reactivation of the soil microbial activity was done by remoistening of the soil samples seven days before the studies on the edaphic microbial activity. These samples were treated with chlorothalonil (11 $\mu\text{g g}^{-1}$ soil; T1) or the methanolic fraction from the plant extract (300 $\mu\text{g g}^{-1}$ soil; T2). The DHA-activity was measured in 3 g of soil samples immediately and 24 h, and 7, 14 and 28 days after treatments, by measurements of the conversion of 2,3,5-triphenyltetrazolium (TTC) in 1,3,5-triphenyltetrazolium formazan (TTF-formazan) caused by the enzyme action, and quantified by spectrophotometry UV / Vis at 485 nm. The respiration was induced by ^{14}C -glucose addition to the treated soil samples, which were placed into biometric flasks. The $^{14}\text{CO}_2$ formed by the soil microbial respiration was captured in NaOH solution (0,1 M), which was changed every two hours for 10 hours; 24 h, 3, 5, 7, 14 and 28 days after the treatments, and quantified by liquid scintillation counting (LSC). Just a temporary inhibition effect was observed on the DHA-activity in the two soils treated either with chlorothalonil or the methanolic fraction from *P. sonchifolia* extract, which demonstrates the recovery capacity of the microbiota activity of these soils over the period of

study. Both inhibition and stimulation effects of the methanolic fraction from *P. sonchifolia* extract treatment on the GHE and AVEC soil respiration were very small. However, the synthetic fungicide chlorothalonil caused a strong inhibition of soil respiration of the GHE soil (16.4 %), and nearly no effect on the AVEC soil respiration. This may be caused by the differences in the soil physical and chemical characteristics, as the effects of both fungicides were higher in the GHE soil, which has the lowest organic matter content. However, during the 28 days period of study, the soil dissipation of chlorotalonil was probably not influenced by the soil physical and chemical characteristics because it was almost the same in both soils. The earthworms' avoidance to the treated soil test verified that both compounds were sublethal for earthworms, but only chlorothalonil caused avoidance when present in the recommended or twice the recommended concentration for agricultural use.

Keywords: chlorothalonil, *Polymnia sonchifolia*, dehydrogenase, soil respiration, earthworm avoidance

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias de dissipação de agrotóxicos no agroecossistema	4
Figura 2. Parte aérea e tubérculos da planta <i>Polymnia sonchifolia</i>	15
Figura 3. Fórmula estrutural do fungicida clorotalonil	20
Figura 4. Cromatograma do padrão analítico do clorotalonil	21
Figura 5. Sistemas de estudo de toxicidade aguda de solução da fração metanólica do extrato de <i>Polymnia sonchifolia</i>	23
Figura 6. Diagrama esquemático dos tratamentos no teste de rejeição de minhocas <i>Eisenia andrei</i> aos compostos fungicidas sintético e natural.....	24
Figura 7. Colocação e migração das minhocas no solo	25
Figura 8. Subamostras de solo com diferentes tratamentos das quais se retiraram amostras para o estudo da atividade da DHA.....	27
Figura 9. Esquema da reação de conversão do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) em 1,3,5-trifeniltetrazólio formazan (TTF-formazan) por ação da enzima DHA	27
Figura 10. Centrifugação das triplicatas das subamostras de solo tratadas com diferentes tratamentos e extração do TTF-formazan com acetona por agitação.....	27
Figura 11. Frasco biométrico utilizado na determinação da taxa de respiração do solo por produção de $^{14}\text{CO}_2$	28
Figura 12. Frascos biométricos com subamostras de solos umedecidos para reativação da atividade microbiana	28
Figura 13. Coleta de $^{14}\text{CO}_2$	29
Figura 14. Curva de calibração do clorotalonil por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE	31
Figura 15. Curva de calibração do TTF-Formazan por espectrofotometria UV/Vis a 485 nm.....	32

- Figura 16. Atividade da enzima desidrogenase (DHA) no solo Gley Húmico Eutrófico (GHE) tratado com clorotalonil (GHE_T1), fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* (GHE_T2) e controle (GHE_T0)35
- Figura 17. Atividade da enzima desidrogenase (DHA) no solo Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico (AVEC) tratado com clorotalonil (AVEC_T1), fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* (AVEC_T2) e controle (AVEC_T0)36
- Figura 18. Respiração do solo Gley Húmico Eutrófico (GHE) induzida pela adição de substrato ^{14}C -glicose durante 28 dias após tratamento com clorotalonil (CTL_T1) ou com fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* (PS_T2) e respectivos controles (CTL_T0 e PS_T0).....39
- Figura 19. Produção cumulativa de $^{14}\text{CO}_2$ no solo Gley Húmico Eutrófico (GHE) tratado com clorotalonil (CTL_T1 – clorotalonil e CTL_T0 – controle)...40
- Figura 20. Produção cumulativa de $^{14}\text{CO}_2$ no solo Gley Húmico Eutrófico (GHE) tratado com a fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* (PS_T2 – fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* e PS_T0 – controle)40
- Figura 21. Respiração do solo Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico (AVEC) induzida pela adição de substrato ^{14}C -glicose durante 28 dias após tratamento com clorotalonil (CTL_T1) ou com fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* (PS_T2) e respectivos controles (CTL_T0 e PS_T0)42
- Figura 22. Produção cumulativa de $^{14}\text{CO}_2$ no solo Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico (AVEC) tratado com clorotalonil (CTL_T1 – clorotalonil e T0 – controle).....42
- Figura 23. Produção cumulativa de $^{14}\text{CO}_2$ no solo Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico (AVEC) tratado com a fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* (PS_T2 – fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* e PS_T0 – controle).....43

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Inibição na produção de aflatoxina e no crescimento de *Aspergillus flavus* por diferentes frações do extrato da planta *Polymnia sonchifolia*16
- Tabela 2. Principais características químicas e físicas dos solos Argissolo Vermelho Eutroférico e Gley Húmico Eutrófico 19
- Tabela 3. Recuperação do clorotalonil das subamostras dos solos por extração com metanol por micro-ondas (n=3).....31
- Tabela 4. Concentrações de TTF-formazan formado pela atividade da enzima desidrogenase em subamostras de solo sem tratamento (n=3).....32
- Tabela 5. Rejeição de minhocas *Eisenia andrei* a solo Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico (AVEC) tratado com diferentes concentrações de clorotalonil e da fração metanólica do extrato de *P. sonchifolia*34
- Tabela 6. Atividade da enzima desidrogenase no solo AVEC e GHE em 28 dias de incubação com diferentes tratamentos (n=3).....37
- Tabela 7. Recuperação do clorotalonil dos solos AVEC e GHE por extração com mentanol por micro-ondas no período de 28 dias após tratamento44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVEC	-	Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico
CLAE	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMRA	-	Capacidade Máxima de Retenção de Água
CTL	-	Clorotalonil
DHA	-	Enzima Desidrogenase
ECL	-	Espectrometria de Cintilação em Líquido
GHE	-	Gley Húmico Eutrófico
IB	-	Instituto Biológico
ISO	-	Organização Internacional para Padronização
OECD	-	Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PS	-	<i>Polymnia sonchifolia</i>
SIR	-	Substrate Induced Respiration
TTC	-	Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
TTF-formazan	-	1,3,5-trifeniltetrazólio formazan

1. INTRODUÇÃO

Entre os temas de grande interesse social, a sanidade vegetal e a segurança alimentar vêm sendo amplamente discutidas considerando-se os efeitos causados ao meio ambiente. É necessário que se estabeleçam novos critérios que garantam a expansão das atividades agrícolas e, ao mesmo tempo, que não causem grandes impactos ambientais. A sociedade tem exigido melhorias dos processos de produção de alimentos e por isso, vários segmentos desta sociedade têm buscado o desenvolvimento de pesquisas técnico-científicas que abordem normas de certificação, rastreabilidade vegetal e animal, novos sistemas de produção, modelos fitossanitários, de conservação e armazenamento; melhoramento vegetal, biotecnologia e de utilização de insumos.

Dentre esses assuntos, sabe-se que a utilização de agroquímicos para a manutenção da produtividade agrícola tem sido feita diante das necessidades de fornecer alimentos para uma população cada vez maior e de maximizar a eficiência no combate às pragas e doenças. Porém, de acordo com Ebing (1987), dependendo do tipo e densidade da cultura, em média 35 % a 50 % dos agrotóxicos aplicados por pulverização são depositados no solo, podendo causar impactos ao ambiente edáfico. Além disso, alguns agrotóxicos com alta pressão de vapor volatilizam facilmente durante as aplicações, são transportados a longas distâncias pelo vento e/ou depositados na água e no solo (SPADOTTO et al., 2004). Ao mesmo tempo, a variedade de moléculas químicas de agrotóxicos usados e as possibilidades de interações com diferentes componentes do ambiente são enormes. Essas moléculas podem interagir com diferentes organismos e ser transferidas para plantas não alvos, comunidades microbianas, meso e macrofauna (GARCIA, 2001). Deste modo, os agrotóxicos contaminam cadeias alimentares, uma vez que seus resíduos podem ser bioabsorvidos e até bioacumulados de um nível trófico para outros (ANDRÉA, 2008).

Segundo Caporal e Costabeber (2006), o controle de pragas e doenças na agricultura deve procurar alternativas ecológica e economicamente viáveis. Neste sentido, a utilização de controle biológico é uma prática altamente difundida como ecologicamente correta em várias culturas de interesse do agronegócio. A exploração da atividade biológica de compostos secundários presentes no extrato bruto ou em óleos essenciais de plantas nativas e/ou medicinais representa uma dessas alternativas. Compostos pertencentes a várias classes distintas de substâncias químicas, como: alcaloides, terpenos, ligninas, flavonoides, cumarinas, xantonas, esteroides, entre outras de muitas famílias botânicas têm apresentado atividade antimicrobiana (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; CRUZ, 2000). Entre vários estudos realizados com plantas, as espécies *Baccharis trimera*, *Eucalyptus citriodora*, *Cymbopogon citratus* e *Polymnia sonchifolia* foram relatadas como inibidoras do crescimento micelial e esporulação de fungos, tais como: *Rhizoctonia solani*, *Alternaria*

alternata e *Aspergillus flavus*, mostrando que o uso de óleos essenciais, extratos ou substâncias puras isoladas de plantas podem proteger plantas contra infecções causadas por estes ou outros patógenos. Por isso, estes produtos originários de plantas podem ser uma alternativa estratégica potencial para o controle fitossanitário (SCHWAN-ESTRADA; STANGARLIN; CRUZ, 2000; GONÇALEZ, 2000).

Nesse contexto, cabe às pesquisas científicas a abertura de novos caminhos para a descoberta de substâncias naturais menos impactantes e de produtos sintéticos menos nocivos aos ecossistemas, para expandir as áreas de cultivo e atender as necessidades sócio-ambientais.

O estudo da dinâmica desses produtos por meio de parâmetros biológicos do solo é importante para o entendimento dos efeitos das variações dessas populações e de suas possíveis consequências para as condições agrícolas. Desta forma, conhecer a ação e os aspectos ecotoxicológicos de substâncias químicas sintéticas, bem como de alternativas biológicas e/ou naturais e seus efeitos no ecossistema edáfico contribuirão para a racionalização das práticas de cultivos e disseminação de uma agricultura mais sustentável que leve em conta as relações biológicas nela existentes.

Este trabalho verificou a sensibilidade dos parâmetros de respiração e atividade da enzima desidrogenase do solo como bioindicadores do efeito fungicida de dois compostos, sendo um produto químico sintético (clorotalonil) e outro proveniente do extração da planta *Polymnia sonchifolia*. Teste de rejeição de minhocas *Eisenia andrei* a diferentes doses das substâncias também foi utilizado para verificar possíveis reações biológicas aos compostos estudados.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Dentro do universo de riscos ambientais causados pela utilização dos agrotóxicos nas práticas de cultivo agrícola, este trabalho teve como objetivo avaliar comparativamente os efeitos do clorotalonil – um fungicida sintético – e da fração metanólica do extrato da planta *Polymnia sonchifolia* – produto natural com atividade antifúngica – por parâmetros biológicos de solos com diferentes características. Os efeitos biológicos dessas substâncias também foram avaliados quanto à reação de rejeição de minhocas *Eisenia andrei*, como bioindicadores da macrofauna edáfica.

2.2. Objetivos específicos

- Quantificar e comparar os efeitos dos compostos fungicidas clorotalonil e fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* sobre a atividade microbiana aeróbica por meio de medida da respiração do solo.
- Quantificar e comparar os efeitos dos compostos fungicidas clorotalonil e fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* sobre os processos oxidativos da atividade microbiana, por meio da determinação da atividade da enzima desidrogenase.
- Verificar a sensibilidade de minhocas *Eisenia andrei* por rejeição a solo tratado com doses subletais dos compostos fungicidas sintético – clorotalonil e, natural – fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia*.
- Verificar a relação da atividade da enzima desidrogenase e respiração do solo com as características físicas e químicas dos solos estudados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Agrotóxicos: dinâmica e impacto no ecossistema edáfico

Os agrotóxicos, também conhecidos como pesticidas, são utilizados na agricultura para controle de pragas e doenças que atacam culturas de interesse econômico. De acordo com Brasil (1989), são considerados agrotóxicos “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 e fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos”.

Entretanto, observa-se com muita frequência a ocorrência de resíduos desses compostos químicos, que persistem no ambiente mesmo após exercerem a ação para a qual foram aplicados (HAQUE, 1975).

De acordo com Luchini e Andréa (2002), o solo é o reservatório final para muitos desses compostos químicos e representa uma fonte a partir da qual resíduos dos agrotóxicos podem ser liberados para a atmosfera, águas superficiais e subterrâneas e

organismos vivos. Assim, o uso frequente e muitas vezes incorreto dos agrotóxicos oferece riscos de contaminação para solos agrícolas e pode ter como consequência a contaminação de alimentos e águas superficiais e subterrâneas destinadas ao consumo humano e animal (SPADOTTO et al., 2004). Além disso, seus resíduos podem ser transferidos do solo para organismos, como para plantas, através da absorção pelas raízes e para os componentes da microbiota, da meso e macrofauna (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). Isto pode causar a morte de determinadas populações, diminuição do número de espécies, concentração de resíduos ao longo da cadeia trófica e, com isso, o desequilíbrio do ecossistema.

Os destinos dos agrotóxicos nas diferentes camadas do solo são diversos. Segundo Spadotto et al. (2004), o comportamento e o destino de um determinado composto no solo dependem, principalmente, das propriedades intrínsecas da molécula do agrotóxico, da estrutura química e seus aspectos funcionais. Seu destino no ambiente (Figura 1) é governado por processos que abrangem: retenção nas partículas do solo; transformação por processos de degradação química e biológica; transporte (deriva, volatilização, lixiviação e carreamento superficial), e por interações entre esses processos (LUCHINI; ANDRÉA, 2002). Todos esses destinos podem gerar alterações no ecossistema edáfico e impactos no meio ambiente.

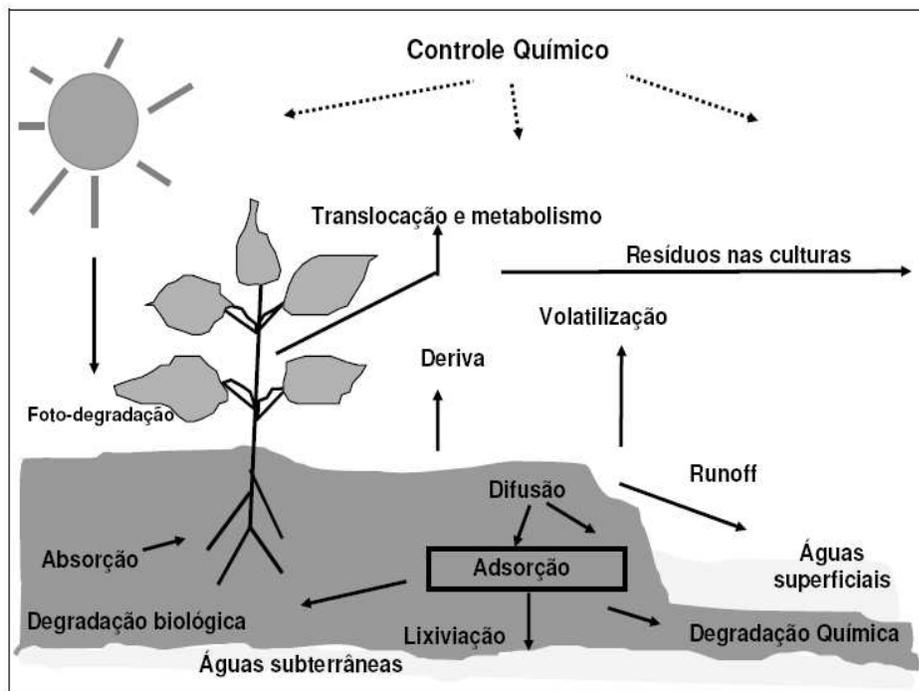


Figura 1. Vias de dissipação de agrotóxicos no agroecossistema (com permissão de LUCHINI; ANDRÉA, 2002)

É, principalmente, por meio de dois processos: adsorção e degradação, que se avalia a maior ou menor persistência de um agrotóxico no ambiente (LUCHINI; ANDRÉA, 2002). Conforme Moreira e Siqueira (2002), persistência pode ser definida como o período em que um produto permanece inalterado no solo, inalterado e dissolvido na água, vaporizado no ar, adsorvido ou ocluído nas partículas minerais e orgânicas do solo. A persistência é, então, o resultado da ausência de processos físicos, químicos e biológicos que podem modificar a estrutura química dos agrotóxicos e promover sua dissipação (LUCHINI; ANDRÉA, 2002). Pode ser avaliada pela taxa de desaparecimento e isto permite a determinação de sua meia vida no ambiente. A meia vida corresponde ao tempo para que a concentração inicial de um composto químico é reduzida à metade e depende de vários fatores ambientais (LUCHINI; ANDRÉA, 2002).

Dentre os fatores de maior importância na transformação de substâncias no ambiente, estão os organismos e, principalmente, os micro-organismos, que produzem enzimas com potencial para degradar várias substâncias (ANDRÉA; WIENDL, 1995). Porém, algumas razões podem levar à persistência dos agrotóxicos, como por exemplo, a inibição da síntese de enzimas microbianas que atuam na degradação desses compostos; a impossibilidade do agrotóxico penetrar na célula microbiana pela falta de enzimas adequadas; a insolubilidade do agrotóxico na solução do solo, indisponibilizando-o para as reações bioquímicas, e o alto poder de adsorção do agrotóxico às partículas do solo, entre outras (MUSUMECI, 1992).

De acordo com Luchini (1987), o termo sorção é usado para diversas associações possíveis entre agrotóxicos e colóides do solo. Dentre elas, destaca-se a adsorção, um fenômeno químico, que não gera modificações nas substâncias envolvidas, mas determina maior ou menor disponibilidade dos agrotóxicos ao ataque microbiano e pode determinar maior persistência desses compostos no solo. Esse processo se refere à ligação do agrotóxico à superfície das partículas do solo, variando em função das propriedades do próprio composto e das propriedades físicas e químicas do solo, tais como: teor de matéria orgânica, pH e teor de argila do solo (LUCHINI; ANDRÉA, 2002). De acordo com muitas pesquisas a matéria orgânica dos solos é, de modo geral, o principal fator de adsorção (LUCHINI, 1987; SPADOTTO; MATALLO; GOMES, 2003; entre outros).

Desta forma, de acordo com Luchini e Andréa (2002), o processo de adsorção determina a fração do agrotóxico que está disponível para sua ação biológica, já que resulta da partição do composto entre a fase sólida (adsorvido às partículas) e a fase líquida do solo (disponível na solução). Ademais, no solo podem também ocorrer ligações químicas mais fortes entre suas partículas e os agrotóxicos, que vão gerar resíduos-ligados e, neste caso, o processo é praticamente irreversível (ANDRÉA, 1992).

Além dos processos de transporte e sorção, no ambiente os agrotóxicos podem ficar sujeitos à degradação, que tem como consequência a alteração da estrutura química e é decorrente de reações mediadas pelas vias química, fotoquímica e microbiana (BOLLAG; LIU, 1990; LUCHINI; ANDRÉA, 2002). Na degradação pode ocorrer a transformação total ou mineralização do agrotóxico, quando a molécula se degrada completamente em formas inorgânicas amplamente presentes na natureza (CO_2 , H_2O , NH_3 , Cl^- , PO_4^{-3} , SO_4^{-2} e outros); ou apenas parcialmente, quando o produto resultante, pode perder ou não a atividade tóxica (LUCHINI; ANDRÉA, 2002).

A degradação por via fotoquímica ocorre sempre que a energia da radiação solar é absorvida pelas moléculas do agrotóxico havendo sua quebra; e é muito pouco significativa no solo, devido à opacidade das partículas (LUCHINI; ANDRÉA, 2002). A via química é a degradação do agrotóxico por meio de reações com a água (hidrólise), de reações de oxido-redução (em presença de oxigênio e, portanto, em ambiente aeróbico) ou de outros processos no solo, sendo controlada essencialmente por fatores abióticos ou do ambiente físico (KERLE; JENKINS; VOGUE, 2007).

A degradação microbiana tem sido considerada a principal via de desaparecimento da maioria dos agrotóxicos no solo e ocorre pela ação direta dos micro-organismos ou indiretamente por meio de seus processos bioquímicos envolvendo atividades enzimáticas (ANDRÉA, 1992). De acordo Musumeci (1992), os agrotóxicos podem ser utilizados pelos micro-organismos do solo como fonte de carbono e energia, necessários ao seu próprio desenvolvimento e crescimento. Na maioria das vezes, a atividade da microbiota é um meio pelo qual os agrotóxicos são eliminados dos ecossistemas. É por isso, portanto, que a atividade microbiana se constitui um importante fator regulador da persistência de moléculas xenobióticas no solo (SPADOTTO et al., 2004; ANDRÉA, 1992).

Apesar da ampla capacidade dos micro-organismos de degradar os xenobióticos, muitos destes compostos são recalcitrantes, isto é, resistem ou apresentam taxa de degradação muito lenta (ANDRÉA, 1992), dentre os quais, inúmeros compostos cloroaromáticos. O fenômeno de recalcitrância ou baixa degradabilidade no solo pode ser determinado pelas características estruturais e tóxicas da molécula do agrotóxico, pela ausência de fatores de crescimento e/ou de condições desfavoráveis ao crescimento dos micro-organismos decompositores (MOREIRA; SIQUEIRA, 2002). Entretanto, é amplamente sabido que a ausência de micro-organismos pode ocasionar maior persistência de agrotóxicos no solo, uma vez que, a taxa de degradação desses compostos pode ser diminuída na ausência de enzimas microbianas que poderiam atuar em diferentes etapas da degradação das moléculas dos agrotóxicos no solo (NAKAGAWA; ANDRÉA, 2000; GEVAO; SEMPLE; JONES, 2000; HOLTZE et al., 2008).

Segundo Moreira e Siqueira (2002), os efeitos dos agrotóxicos sobre os organismos

do solo devem ser avaliados quanto à sua magnitude e reversibilidade. Algumas vezes, a aplicação ou a presença desses xenobióticos no solo causa efeito depressivo temporário na comunidade microbiana. Silva; Fay e Vieira (2005) demonstraram esse efeito temporário na atividade das enzimas desidrogenase e fosfatase ácida da comunidade microbiana de solo após aplicação de metalaxil e fenarimol. Singh e Singh (2005) estudaram os efeitos dos inseticidas diazinon, imidacloprido e lindano na atividade microbiana de solo sob cultivo de amendoim, por meio da determinação da atividade das enzimas desidrogenase e fosfomonoesterase. Os autores verificaram que repetidas aplicações dos agrotóxicos causaram efeito inibitório temporário sobre a comunidade microbiana e que a atividade dessas enzimas foi restabelecida no solo após o cultivo agrícola.

Embora facilmente demonstráveis em condições controladas, os efeitos de agrotóxicos sobre a microbiota podem ser ainda mais variáveis em condições naturais, e por isso devem ser avaliados com muito critério e cautela. De acordo com Andréa e Wiendl (1995), como os agrotóxicos interferem em processos bioquímicos e como todos os organismos têm algumas reações metabólicas em comum, percebe-se que ao ocasionar efeito em alguns processos, todos os organismos, alvo e não-alvo, podem ser afetados. Mesmo que os agrotóxicos atualmente empregados sejam, geralmente, muito específicos, ainda assim podem causar efeitos sobre micro-organismos e outros organismos do ambiente. Peres; Andréa e Luchini (2004), em estudo sobre o efeito de agrotóxicos utilizados no cultivo de algodão sobre a atividade do solo e tendo como parâmetros a atividade das enzimas desidrogenase e arilsulfatase, verificaram que não se pode generalizar quanto ao efeito de um agrotóxico sob a microbiota de solos, porque um mesmo princípio ativo pode causar diferentes efeitos de acordo com as características dos solos e, isso tem relação com a bioatividade da microbiota edáfica. Singh e Kumar (2008) estudaram o efeito da aplicação do inseticida acetamiprido sobre a atividade microbiana de solo também sob cultivo de algodão, por meio da determinação da atividade de diferentes enzimas presentes no solo (nitrato redutase, arginina desaminase, urease e desidrogenase). Verificaram que um mesmo agrotóxico pode causar diferentes efeitos sobre a atividade de diferentes enzimas, isto é, pode estimular umas e inibir outras.

Conforme Spadotto et al. (2004) os agrotóxicos podem alterar não só a diversidade de espécies microbianas do solo, como também sua biomassa, isto é, a quantidade total de micro-organismos do solo. Como os micro-organismos têm atuação fundamental na transformação da matéria orgânica e liberação de nutrientes para as plantas, efeitos sobre a população microbiana podem afetar a disponibilidade de nutrientes e, assim, a fertilidade do solo pode ficar comprometida (SPADOTTO et al., 2004; PERES, 2000).

3.2. Atividade microbiana e os processos biológicos do solo

O solo é um ambiente heterogêneo, composto por fase sólida, líquida e gasosa; constituído de frações orgânicas e inorgânicas e habitado por inúmeras espécies de organismos, formando o ecossistema edáfico. Os micro-organismos que compõem a microbiota presente no solo são representados por bactérias, incluindo as actinobactérias (actinomicetos), os fungos, algas e protozoários, que desempenham papel fundamental na formação, estrutura e qualidade do solo porque são responsáveis por inúmeras reações bioquímicas que ali ocorrem (ALEXANDER, 1977).

Sabe-se que a microbiota do solo desempenha papel essencial nos ciclos biogeoquímicos e na estabilização da estrutura do solo (NANNIPIERI; KANDELER; RUGGIERO, 2002). As reações biológicas da atividade microbiana incrementam o nível de fertilidade dos solos porque disponibilizam nutrientes essenciais às plantas (SCHUSTER; SCHRÖDER, 1990). Como parte dessas dessas reações biológicas, a mineralização da matéria orgânica é realizada por grande parte da comunidade microbiana e envolve uma vasta gama de processos metabólicos (NANNIPIERI; KANDELER; RUGGIERO, 2002).

De acordo com Schinner et al. (1996), os processos enzimáticos dos micro-organismos são importantes não só na degradação da matéria orgânica, como também na ciclagem de compostos orgânicos aplicados nas camadas superficiais ou que caem sobre elas. Ao mesmo tempo, as características físico-químicas do solo e o cultivo agrícola influenciam diretamente as condições do próprio solo, a manutenção da taxa de crescimento de diferentes espécies de micro-organismos e seus processos metabólicos. Assim, de acordo com Andréa (1992), verifica-se que, do ponto de vista de manutenção das condições ambientais, as operações de cultivo agrícola, incluindo a aplicação de agrotóxicos, deveriam atuar apenas nos organismos-alvo sem afetar os demais seres presentes no ambiente. Após o efeito sobre estes organismos-alvo, os agrotóxicos deveriam idealmente passar por processos de degradação e serem dissipados do meio; mas, nem sempre é isso que ocorre.

No solo, os micro-organismos podem ter a sua atividade metabólica inibida pela presença de agrotóxicos e seus resíduos; ou estimulada, quando esses compostos servem de fonte de carbono, nitrogênio, etc. para seus processos metabólicos (SCHUSTER; SCHRÖDER, 1990). Muitas vezes e, conforme a magnitude da interferência, o solo é capaz de manter seus processos biológicos em equilíbrio mesmo sob pressão de algumas variações físicas e bioquímicas, como por exemplo, por alterações climáticas, aporte de matéria orgânica e até aplicação de agrotóxicos. Isso pode ocorrer devido a um efeito tamponante ou de resiliência, que é a capacidade concreta do solo de retornar ao estado anterior após superar uma situação crítica (BENITEZ; MELGAR; NOGALES, 2004). Essa

capacidade é decorrente da diversidade microbiana e seus constantes processos biológicos e ecológicos (ZILLI et al., 2003; BENITEZ; MELGAR; NOGALES, 2004). Porém, a redução na diversidade microbiana poderia ocasionar a perda da capacidade de resiliência e, conseqüentemente, de características que são indispensáveis para manutenção do equilíbrio ecológico e do potencial produtivo do solo.

Segundo Andréa e Hollweg (2004), as variações nos números de indivíduos ou na comunidade de micro-organismos no solo podem ser medidas pela biomassa microbiana, pela respiração do solo e por diferentes processos enzimáticos, entre outros. Vários estudos foram feitos utilizando essas medidas como bioindicadores para se avaliar o efeito de agrotóxicos como interferentes no ambiente edáfico (ANDRÉA; PETTINELLI, 2000; ANDRÉA; PERES; MATALLO, 2000; ANDRÉA et al., 2003; PEREZ; ANDRÉA; LUCHINI, 2004; ANDRÉA et al., 2004; SINGH; SINGH, 2005; SUKUL, 2006; SINGH; KUMAR, 2008; BOUCARD et al., 2008; NIEMI et al., 2009; GONÇALVEZ et al., 2009; EISENHAUER et al., 2009; GOMES et al., 2009).

3.2.1. Atividade enzimática do solo

De acordo com Dilly (2008), a atividade microbiana do solo pode ser estimada observando-se as reações bioquímicas. O conhecimento das atividades enzimáticas do solo juntamente com outros processos, como a respiração têm contribuído para análise e avaliação dos efeitos dos agrotóxicos e práticas agrícolas sobre a microbiota edáfica. Portanto, alterações na atividade enzimática e na respiração microbiana do solo podem ocorrer como resposta à presença de agrotóxicos (PERES; ANDRÉA; LUCHINI, 2004).

SCHINNER et al. (1996) descrevem vários métodos para avaliar a qualidade do ambiente edáfico por meio de determinação da atividade de enzimas como, desidrogenase, arilsulfatase, nitrato redutase e arginina desaminase, entre outras.

A atividade enzimática e sua determinação descrevem a relação existente entre as enzimas do solo e as condições ambientais que afetam suas atividades; ademais, são importantes em termos de conhecimento sobre o funcionamento do ecossistema edáfico (SINGH; KUMAR, 2008). Assim, a mensuração da atividade enzimática pode ser utilizada como bioindicador das mudanças que ocorrem no solo (ANDRÉA, 2008). Numerosos estudos têm sido conduzidos para determinar alterações na atividade enzimática do solo causada por chuvas ácidas, metais pesados, fertilizantes, antibióticos, resíduos industriais e agrotóxicos (FRIEDEL; MÖLTER; FISCHER, 1994; PERES, 2000; GIANFREDA; RAO, 2004; PERES; ANDRÉA; LUCHINI, 2004; THIELE-BRUHN; BECK, 2005;

BHATTACHARYYA; CHAKRABARTI; CHAKRABORTY, 2005; KLOSE; MARTÍNEZ; AJWA, 2006; XIE et al., 2009; GRENNI et al., 2009; entre outros).

As diferentes enzimas têm especificidade de substrato, como por exemplo a arilsulfatase que está envolvida no metabolismo do enxofre e catalisa a hidrólise de ésteres sulfatos que compõem uma das formas orgânicas do enxofre, sendo responsável pela ciclagem do enxofre por meio da mineralização, liberando sulfato, que é a forma em que o enxofre é assimilado pelas plantas (SCHINNER et al., 1996). Já a arginina desaminase tem participação na liberação da amônia (NH_3) a partir de catabolismo da matéria orgânica do solo (ALEF; NANNIPIERI, 1998). As enzimas nitrato redutases catalisam a redução do NO_2 (forma não assimilável pelas plantas) disponibilizando o nitrogênio como NH_3 (ALEF; NANNIPIERI, 1998).

A atividade da enzima desidrogenase está envolvida nos processos de oxi-redução das células dos micro-organismos, tendo uma estreita correlação com a respiração microbiana (SCHINNER et al., 1996). Sua atividade reflete o potencial redox do solo e, como esta é uma enzima intracelular de baixa atividade quando em estado livre no solo, reflete a bioatividade de grande parte da população microbiana ativa (NANNIPIERI; KANDELER; RUGGIERO, 2002). A atividade da desidrogenase é comumente estimada por meio da conversão do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) em 1,3,5-trifeniltetrazólio formazan (TTF-formazan) por ação da enzima (FRIEDEL; MÖLTER; FISCHER, 1994). O produto TTF-formazan é um composto de coloração rósea na presença de acetona, cuja quantificação pode ser feita por espectrofotometria. Por ser um processo extremamente correlacionado com o metabolismo dos micro-organismos edáficos, pode-se então, avaliar se há influência de curto ou longo prazo dos agrotóxicos na atividade microbiana do solo (PERES, 2000).

Sukul (2006) estudou a atividade das enzimas desidrogenase, fosfatase, urease, arilsulfatase e β -glucosidase em solo tratado com metalaxil e concluiu que a dissipação do fungicida no solo ocorreu principalmente por causa da atividade microbiana, porque a quantidade total de nitrogênio e carbono foram alteradas, bem como as atividades de diferentes enzimas. Estas alterações podem ter como consequências impactos diretos na ciclagem dos nutrientes e no fluxo de energia no solo.

Também Pandey e Singh (2006) monitoraram durante um ano a atividade da desidrogenase e arginina desaminase de solos sob cultivo de amendoim, avaliando os efeitos das aplicações dos inseticidas clorpirifós e quinalfós utilizados no tratamento de sementes. Eles observaram que a atividade da desidrogenase foi inibida em 37 % após 15 dias do tratamento com quinalfós, e em 17,2 % após o tratamento com clorpirifós. Já a atividade da arginina desaminase foi estimulada após o tratamento com clorpirifós, e inibida após tratamento com quinalfós. Portanto, verificou-se que diferentes inseticidas podem

provocar efeitos diversos sobre a atividade de diferentes enzimas do solo, e por isso, a utilização não criteriosa destas substâncias pode alterar a fertilidade do solo ao longo do tempo.

Pozo et al. (2003) estudaram os efeitos de diferentes concentrações de 3,3'-diaminobenzidina sobre a microbiota do solo por meio da atividade das enzimas fosfatase ácida e alcalina, arilsulfatase e desidrogenase. Essa substância química é um corante bastante utilizado nas indústrias têxtil, de papel e alimentos e, geralmente, lançado em rios e córregos podendo, desta forma, atingir o ambiente edáfico. Nas condições deste ensaio, a atividade das enzimas no solo foi estimulada pelos tratamentos, mas os autores indicaram que o efeito deste xenobiótico sobre a microbiota do solo em condições naturais pode ter efeito diferente e potencialmente prejudicial aos micro-organismos edáficos.

3.2.2. Respiração do solo

A respiração do solo é o processo biológico de oxidação da matéria orgânica em CO₂ por meio da atividade respiratória de micro-organismos aeróbicos no ambiente edáfico que, deste modo, atuam como o principal meio pelo qual o carbono fotossinteticamente fixado é devolvido à atmosfera (ALEF, 1998).

A influência dos agrotóxicos na atividade microbiológica do solo como um todo pode ser estudada por meio da interferência na respiração microbiana do solo e consequente produção de CO₂ pela microbiota (LIU et al., 2006). De acordo com Paul e Clark (1996), medidas de respiração microbiana refletem diretamente a atividade de micro-organismos heterótrofos e informam quanto à bioatividade do solo. Os métodos para quantificação variam, sendo que a indução da respiração a partir da adição de um substrato de fácil metabolização, como a glicose, é bem aceita nas pesquisas que verificam a influência dos agrotóxicos sobre a atividade microbiana do solo. Este método é conhecido como respiração induzida pelo substrato ("substrate induced respiration" – SIR) e sua resposta é sempre proporcional à atividade da microbiota ativa no solo (ALEF; NANNIPIERI, 1998). A quantificação do CO₂ produzido pode ser feita por diferentes métodos, incluindo espectrometria de cintilação em líquido (ECL) quando se utiliza ¹⁴C-glicose (ANDRÉA; HOLLWEG, 2004).

A medida da respiração do solo é uma das mais antigas técnicas utilizadas para a quantificação da atividade microbiana; como exemplo, os estudos de Bartha e Pramer datados de 1965 (ANDRÉA et al., 2003). Bartha e Pramer (1965) idealizaram um frasco biométrico utilizado para avaliação do efeito do agrotóxico na atividade de respiração microbiana. A partir deste trabalho inúmeros estudos, inclusive em condições tropicais, foram feitos para avaliar a influência de agrotóxicos na respiração do solo e sobre sua

mineralização. Dentro deste contexto, Andréa et al. (2003) estudaram o efeito de repetidas aplicações do herbicida glifosato sobre micro-organismos edáficos, por meio de medidas da respiração e da atividade da enzima desidrogenase. Verificaram que a biomineralização do glifosato diminuiu quanto maior o número de aplicações do herbicida, indicando efeito direto do agrotóxico sobre a atividade microbiana do solo; mas, o efeito do herbicida sobre a atividade da desidrogenase foi apenas transitório e praticamente não influenciou a atividade desta enzima no solo estudado. Em outro estudo, Andréa e Pettinelli (2000) utilizaram o método da respiração induzida pelo substrato e detectaram variações nas taxas de respiração em dois tipos de solos tratados com diferentes agrotóxicos recomendados para o cultivo do algodão. Os autores observaram que as aplicações dos agrotóxicos provocaram tanto estímulo quanto inibição da respiração microbiana do solo, mas que os efeitos foram apenas temporários e variaram conforme as características físico-químicas do solo.

Gonçalves et al. (2009) estudaram o efeito do paclobutrazol, um regulador de crescimento vegetal amplamente utilizado diretamente no solo sob cultivo de manga, sobre a respiração do solo e observaram alteração da atividade microbiana ali presente em um curto período de tempo, com diminuição da taxa de respiração. Eisenhauer et al. (2009) também observaram que a respiração microbiana pode ser inibida por alguns agrotóxicos e estimulada por outros. Esses autores verificaram que a aplicação de clorpirifós (inseticida) e fostiazato (nematicida) estimulou a respiração microbiana, mas a aplicação de dimetoato (inseticida) a diminuiu. Também, Pal et al. (2005) verificaram que a aplicação do fungicida pencicuron no solo em diferentes concentrações de recomendação para uso agrícola causou pequena e temporária inibição da respiração microbiana. Os autores consideraram a possibilidade do efeito negativo e de curta duração do composto em condições controladas de estudo poder ser diferente do que pode ocorrer em condições de campo, onde o impacto ecológico pode ser maior e mais realista.

3.3. Fungicida clorotalonil

No Brasil, o fungicida clorotalonil é comercializado para o controle de fungos fitopatogênicos em muitas culturas, especialmente para hortaliças e frutíferas, entre as quais: banana, café, tomate, batata e uva (BRASIL, 2007). A maioria das marcas comerciais que possui o clorotalonil como ingrediente ativo é classificada toxicologicamente como produto medianamente tóxico – com rótulo azul, ou extremamente tóxico – rótulo vermelho, e classificação ambiental de produto muito perigoso (BRASIL, 2007).

O clorotalonil é derivado da ftalonitrila conhecido quimicamente como 2,4,5,6-tetracloroisofthalonitrila (CAS: 1897-45-6) com ação por contato. Apresenta DL₅₀

(concentração necessária para matar 50 % de um grupo de organismos teste) aguda oral maior que 10.000 mg kg⁻¹ para ratos e é altamente irritante aos olhos. Suas propriedades físico-químicas são: pressão de vapor 1,3 Pa (40 °C) ou 0,076 mPA (25 °C); solubilidade de 0,9 mg L⁻¹ em água (25 °C) e 80 g L⁻¹ de xileno, 30 g L⁻¹ de ciclohexanona ou dimetilformamida, 20 g L⁻¹ de dimetil sulfóxido e menor que 10 g L⁻¹ de querosene, a 25° C (TOMLIN, 1995).

O clorotalonil é classificado como um fungicida de amplo espectro, pois inibe o crescimento de diferentes fungos fitopatogênicos, como: *Mycosphaerella musicola*, *Alternaria solani*, *Phytophthora infestans*, *Botrytis cinerea*, entre outros (BRASIL, 2007). O modo de ação do clorotalonil envolve sua combinação com uma molécula presente nas células dos fungos chamada glutathione – composto tiol não proteico – encontrada nas células da maioria dos micro-organismos aeróbios. Com a formação da conjugação glutathione-clorotalonil no interior das células, as enzimas dependentes da glutathione para a realização do processo de respiração celular ficam incapazes de funcionar e, assim, ocorre o efeito tóxico do clorotalonil (COX, 1997; KIM et al., 2004).

De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, o clorotalonil é um fungicida policlorado aromático atípico porque não exibe alto grau de persistência como a maioria dos compostos organoclorados (EPA, 1999a). Sua diferença em relação aos outros organoclorados é atribuída aos dois grupos nitrila que ativam sua molécula. Mesmo assim, de acordo com Regitano et al. (2002), o clorotalonil é resistente à hidrólise, fotólise e volatilização, e sua adsorção no solo está diretamente relacionada com o teor de matéria orgânica presente, sendo apenas moderadamente suscetível à degradação no solo sob condições aeróbias.

Entretanto, mesmo sendo recomendado para pulverização aérea, as análises de solos de regiões onde o clorotalonil é utilizado têm apresentado valores residuais altos (VIEIRA; SILVA; FAY, 2001), provavelmente porque, uma vez tendo alcançado o solo, este fungicida pode persistir no ambiente edáfico mas, de acordo com Scribner et al. (2006), o modo de aplicação por pulverização e o carreamento superficial provocado pelo excesso de água que chega no solo por chuva ou rega, podem facilitar o transporte do clorotalonil para áreas distantes do ponto de aplicação.

De acordo com Cox (1997), a meia-vida de um agrotóxico é o período necessário para que metade da quantidade aplicada desapareça. Meias-vidas de dissipação do clorotalonil variando de 0,4 a 43 dias já foram verificadas (REGITANO et al., 2001; CHAVES; SHEA; COPE, 2007; IPCS, 1996). Regitano et al. (2001) estudaram a dissipação do clorotalonil em três solos brasileiros em condições tropicais e observaram que a meia-vida do clorotalonil foi muito rápida, variando de 0,4 a 13 dias. Por outro lado, Motonaga;

Takagi e Matumoto (1996) verificaram que o clorotalonil persistiu no solo por até 12 meses após sua aplicação, e que, em alguns casos, dependendo dos teores de argila e matéria orgânica do solo, a persistência chegou a 200 dias. Desta forma, verifica-se diferentes resultados de persistência do clorotalonil e isto se deve às diferenças nas características físico-químicas dos solos e às condições ambientais.

De acordo com Andréa (1992), dissipação relativamente rápida poderia ser reflexo da rápida transformação do composto pela microbiota ou da elevada formação de resíduos ligados. Spessoto; Melo e Monteiro (2006), por exemplo, verificaram formação de até 60% de resíduos-ligados do fungicida ^{14}C -metalaxil e, muito provavelmente por isso, a persistência do fungicida foi determinada como baixa. Nakagawa e Andréa (2000) verificaram que a formação de resíduos ligados de ^{14}C -atrazina em solo foi elevada – até 55,7%. Grandes quantidades de resíduos-ligados têm sido verificadas para vários agrotóxicos, entretanto, de acordo com Andréa (1992), sua formação também tem relação com determinadas características das moléculas. Por exemplo, quanto maior o número de átomos de cloro na molécula, menor a formação de resíduos-ligados.

Por outro lado, a degradação de compostos pode gerar a formação de metabólitos oriundos de processos de degradação parcial da molécula original. Conforme Chaves; Shea e Danehower (2008), os metabólitos do clorotalonil são resultantes de reações que substituem os átomos de cloro, e da conversão do grupo funcional CN em grupos ácidos, tiazóis e amidas.

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos estudou a degradação do clorotalonil em amostras de águas subterrâneas e verificou a formação de vários metabólitos também policlorados, sendo que estes foram mais persistentes e muito mais móveis do que o composto original (EPA, 1999b). Em condições de laboratório, Motonaga; Takagi e Matumoto (1998) estudaram solos tratados com clorotalonil e verificaram que o seu principal metabólito, o 4-hidroxi-2,5,6-tricloroisofitalonitrila foi mais persistente no solo do que o próprio clorotalonil. De acordo com Cox (1997), este metabólito é 30 vezes mais tóxico que a molécula original.

Desta forma, a ação, degradação e persistência do clorotalonil e/ou de seus metabólitos dependem de condições do próprio ambiente, tais como, características físico-químicas, teor de umidade do solo, dentre outras. Além disso, as características da molécula de clorotalonil, como a quantidade de átomos de cloro, podem indicar particularidades no seu comportamento, e tal fato ainda foi pouco estudado no ambiente edáfico tropical.

3.4. *Polymnia sonchifolia*

Pesquisas têm sido desenvolvidas buscando nos produtos naturais uma alternativa às aplicações de agrotóxicos para o controle de pragas e doenças no cultivo agrícola, a partir de observações das relações alelopáticas entre plantas e de que algumas plantas possuem alta resistência natural a pragas e doenças. Como exemplo, cita-se as pesquisas efetuadas por GONÇALEZ (2000) com a planta conhecida como Yacón, cujo nome científico é *Polymnia sonchifolia* Poepp. & Endl. (Figura 2), pertencente à família das Asteraceae (ZARDINI, 1991).



(Fonte:http://www.pref.kyoto.jp/plant2/migoro/1612/161210/kikaku/IMG_3756.jpg)

(Fonte:<http://amerique-latine.com/ala/fr/pltyacon.jpg>)

Figura 2. Parte aérea e tubérculos da planta *Polymnia sonchifolia*

Esta planta também recebe os nomes *Polymnia edulis* Wedd. e *Smallanthus sonchifolius* (Poepp. & Endl.) H. Robison. De acordo com Pak et al. (2006), a *Polymnia sonchifolia* é uma planta arbustiva nativa dos Andes e utilizada popularmente no controle da *diabetes mellitus*. Apresenta um sistema aéreo com aproximadamente 2 m de altura, folhas pilosas e com marcas púrpuras. As flores são pequenas e vão do amarelo ao alaranjado. Suas raízes são tuberosas, com variação na quantidade de açúcares, formas e tamanhos irregulares, pesando de 200 a 500 g, podendo atingir até 2 kg.

No gênero *Polymnia* spp, 19 espécies vêm sendo estudadas por serem fontes de compostos bioativos contra fungos de importância econômica. Na sistemática vegetal, a família Asteraceae apresenta como característica taxonômica a presença em seus tecidos de poliacetilenos, terpenos e flavonoides - substâncias com alto grau de diversidade química e amplo espectro de atividade biológica. Alguns compostos já foram isolados, como os diterpenoides do tipo kaureno e os melampolídeos (sonchifolin, polymatin, viverdalin e enhydrin) que, de acordo com Pak (2002), são substâncias provavelmente envolvidas em mecanismos de defesa dessas plantas.

Observações realizadas nas partes aéreas da planta durante o seu cultivo verificaram que se faz desnecessária a aplicação de agrotóxicos para o controle fitossanitário, levando a crer que suas partes aéreas poderiam conter substâncias com atividade antimicrobiana (GONÇALEZ et al., 2003). Gonzalez (2000) avaliou o extrato de *Polymnia sonchifolia* e relatou o seu efeito inibidor do crescimento do fungo *Aspergillus flavus* e da biossíntese de aflatoxina (Tabela 1) – micotoxina produzida pelo fungo. Aflatoxina é substância natural carcinogênica, sendo tóxica aos animais e seres humanos, podendo levá-los à morte. Pak (2002) isolou e identificou as substâncias químicas responsáveis pela atividade da *P. sonchifolia*, mostrando que esta planta pode vir a ser utilizada no controle do fungo *A. flavus*.

De acordo com os efeitos relatados por Gonzalez et al. (2003), o extrato vegetal das folhas de *P. sonchifolia* poderia representar também uma alternativa aos fungicidas sintéticos. Verifica-se que as frações com maior potencial de uso como fungicida são a hexânica e metanólica (Tabela 1). Entretanto, há necessidade de se avaliar seu potencial no controle de fungos fitopatogênicos, e ainda sua influência no ecossistema edáfico e a possível influência de fatores edáficos na sua atividade.

Tabela 1. Inibição na produção de aflatoxina e no crescimento de *Aspergillus flavus* por diferentes frações do extrato da planta *Polymnia sonchifolia* (adaptado de GONÇALEZ, 2000)

Frações do extrato de <i>Polymnia sonchifolia</i> (100 µg mL ⁻¹)	Inibição de aflatoxina B1 (%)	Redução do crescimento de <i>Aspergillus flavus</i> (%)
Hexânica	96,91	37,82
Clorofórmica	8,84	0
Acetato de etila	78,99	34,08
Metanólica	87,04	56,86

3.5. Minhocas como bioindicador

As minhocas são anelídeos pertencentes à ordem *Oligochaeta*, incluindo mais de 8.000 espécies de cerca de 800 gêneros que vivem no solo. Sua população varia muito em termos de número ou biomassa e diversidade e são, provavelmente, o mais importante componente da biota edáfica de invertebrados (EDWARDS, 2004). São animais subterrâneos que escavam galerias e canais no solo, buscando abrigo e restos vegetais que

são seu principal alimento, ingeridos com grandes quantidades de terra (RUPPERT; BARNES, 1996).

Minhocas são organismos da base de várias teias alimentares e, por isso, podem ser consideradas bioindicadores em estudos ecotoxicológicos que avaliam a contaminação de solos (ANDRÉA, 2008). Um bioindicador deve exibir alterações em resposta a agente estressor, deve ser facilmente encontrado no ambiente que se deseja analisar, não morrer sob efeito de doses subletais do contaminante e estar na base de teias alimentares e, portanto, servir de alimento para outros organismos, indicando assim uma possível contaminação (BURGER, 2006). Segundo Berry (1994), algumas minhocas possuem características de tempo de geração curto, alta taxa reprodutiva, facilidade para coleta em fontes naturais, fácil criação em laboratório, ingerem grande quantidade de solo e possuem estreita relação com seus compartimentos. São ainda importantes na cadeia trófica por serem uma fonte de alimentos para diversos organismos e, os seus dados de crescimento, sobrevivência e reprodução podem ser obtidos em bioensaios (BERRY, 1994; ANDRÉA, 2008). Por isso, as minhocas têm sido cada vez mais empregadas como bioindicadores de poluição do ambiente edáfico (PAOLETTI, 1999).

A capacidade de adaptação das minhocas na exploração de diversos ambientes evidencia sua importância para as práticas agrícolas, porque algumas espécies se movem aleatoriamente, deixando fissuras e fendas de diferentes tamanhos, que favorecem a aeração e drenagem de águas nos solos (EDWARDS, 2004). Durante a alimentação, as minhocas aceleram a taxa de degradação e estabilização das frações húmicas da matéria orgânica (BROWN; DOUBE, 2004). Devido ao seu hábito alimentar e, principalmente, por sua interação com a matéria orgânica, fragmentando-a e misturando-a às partículas minerais do solo, as minhocas são de extrema importância na formação, estruturação e fertilidade do solo; na decomposição dos resíduos vegetais, ciclagem dos nutrientes e formação de húmus (ANDRÉA, 2008).

Entretanto, as minhocas podem ser fortemente afetadas por muitas das práticas agrícolas, em particular, pelos tratamentos culturais que utilizam fertilizantes e agrotóxicos (PAOLETTI, 1999; ANDRÉA et al., 2004; ADESODUN; DAVIDSON; ROPKINS, 2005; XIAO et al., 2006; LI et al., 2009). Embora a maioria dos agrotóxicos seja apenas ligeiramente tóxico às minhocas, alguns podem causar efeitos indiretos e drásticos sobre elas (EDWARDS, 2004). Por meio do seu deslocamento e da ingestão de solo ou serrapilheira contaminados, as minhocas entram em contato com contaminantes ali presentes e que permaneceram adsorvidos nas partículas ou disponíveis na solução do solo. Desta forma, elas podem ficar expostas ou absorver esses contaminantes, se intoxicar, morrer ou sobreviver, incorporando-os e até bioacumulando-os em seus tecidos (ANDRÉA, 2008).

Andréa et al. (2004) estudaram a ação do herbicida glifosato sobre minhocas e verificaram que as elas bioacumularam o herbicida em quantidades maiores, quanto maior foi o tempo de permanência desses organismos em solo tratado com o agrotóxico. Ainda outros trabalhos indicam que não só as características das moléculas dos agrotóxicos, mas também as características dos solos, principalmente seu conteúdo de matéria orgânica, podem influenciar a bioacumulação de agrotóxicos nas minhocas (ANDRÉA; PAPINI, 2005; PAPINI et al., 2006; PAPINI; ANDRÉA, 2004; VISWANATHAN et al., 1988). Slimak (1997) avaliou os efeitos dos inseticidas lindano, clorano e endrim sobre o comportamento de minhocas e concluiu que quanto maior a concentração dos agrotóxicos no solo maior a rejeição das minhocas ao solo que os continha.

Loureiro et al. (2005) estudaram o comportamento de rejeição de minhocas *Eisenia andrei* expostas a solos tratados com carbendazim, benomyl, dimetoato e sulfato de cobre e observaram rejeição das minhocas a todos os tratamentos e seu deslocamento para o solo sem tratamento. Os autores concluíram que o comportamento de rejeição a doses subletais foi um parâmetro tão ou mais sensível que os parâmetros de reprodução e de crescimento, e indicaram o teste de rejeição de minhocas como ferramenta de triagem na avaliação de solos contaminados. Sisino et al. (2005) utilizaram o teste de rejeição com minhocas *Eisenia fetida* na avaliação da contaminação de solo por mercúrio e verificaram que as minhocas rejeitaram as amostras de solo contaminado, sendo encontradas em sua totalidade no solo controle. Os autores concluíram que, de fato, o resultado obtido por meio de um organismo de real importância no ecossistema edáfico como as minhocas indicou o impacto negativo da contaminação de solo por metais pesados (em particular, o mercúrio).

3.6. Testes de toxicidade

Testes de toxicidade já estabelecidos avaliam potenciais efeitos tóxicos de substâncias químicas sobre organismos, possibilitando o estabelecimento de limites permissíveis de várias moléculas no ambiente e de seus impactos nos organismos (ETC EPS 1/RM/43, 2004). A Organização Internacional para Padronização (ISO) estabeleceu um teste que tem como objetivo avaliar a rejeição de minhocas *Eisenia fetida* ou *Eisenia andrei* a doses subletais de agrotóxicos por contato com solo em curto período de tempo (ISO 17512-1, 2007). Esse teste é definido como teste de fuga, rejeição ou evitamento, e tem sido utilizado também como indicador de contaminação em situações nas quais se requer análises iniciais rápidas e de baixo custo (LOUREIRO; SOARES; NOGUEIRA, 2005).

A Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) estabeleceu um teste de toxicidade em papel de filtro para avaliar a toxicidade aguda de substâncias

químicas sobre minhocas *Eisenia fetida* ou *Eisenia andrei*, que se constitui em uma ferramenta adicional para avaliação de riscos ecotoxicológicos (OECD 207, 1984).

Assim, as minhocas têm sido usadas em testes de ecotoxicidade por serem organismos resistentes a doses subletais, pela sua capacidade de escolher ou evitar um determinado solo limpo ou contaminado e por serem bioindicadoras.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Solos

Dois tipos de solos agrícolas foram coletados de 0 a 15 cm de profundidade do perfil de localidades livres de aplicação de agrotóxicos. Os solos foram peneirados em malha 2 mm e tiveram suas características químicas e físicas determinadas pelo Departamento de Ciências do Solo da ESALQ/USP – no caso do Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico (AVEC) coletado na região de Piracicaba (SP), e pelo Departamento de Ciências do Solo da FCA/UNESP Botucatu – no caso do Gley Húmico Eutrófico (GHE) coletado na região de Botucatu (SP) (Tabela 2).

Tabela 2. Principais características químicas e físicas dos solos Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico e Gley Húmico Eutrófico

Solo	pH	MO*	Areia Total g kg ⁻¹	Argila	Silte	Textura
Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico - AVEC						
	6,2 (H ₂ O)	42	310	480	210	argilosa
Gley Húmico Eutrófico - GHE						
	5,5 (CaCl ₂)	13	704	154	142	média

* Matéria orgânica

4.1.1. Reativação da atividade microbiana dos solos

Baseando-se nas recomendações do protocolo OECD 217 (2000), as subamostras de solos foram umedecidas e mantidas a 60 % da capacidade máxima de retenção de água – CMRA, desde 7 dias antes do início dos estudos, para reativação da atividade microbiana.

A determinação da CMRA foi feita basicamente conforme Monteiro e Frighetto (2000): três subamostras de 10 g dos solos foram colocadas em funis analíticos com diâmetro de 5 cm contendo lã de vidro na saída e apoiados sobre provetas graduadas. Dez

mL de água destilada foram adicionados repetidas vezes às subamostras dos solos, até que o volume escoado para as provetas fosse constante. O volume de água retido foi anotado e somado após cada adição. O volume total retido em cada subamostra indicou o 100 % de CMRA nas subamostras de 10 g dos solos e, então, calculou-se o volume de água necessário para umedecer as amostras dos solos a 60 % de sua CMRA. Durante os estudos o umedecimento foi mantido por meio de pesagens constantes e adição de água destilada quando necessário.

4.1.2. Determinação da umidade dos solos

No momento das análises, a umidade presente nas subamostras foi determinada em triplicatas de aproximadamente 3 g dos solos submetidas a 120° C por 20 minutos em dessecador infra-vermelho (Mettler LJ16). Por intermédio destas determinações, os resultados foram uniformizados para equivalente em peso seco dos solos.

4.2. Clorotalonil

O padrão analítico do fungicida clorotalonil (2,4,5,6-tetracloroisofalotnitrila, $C_8Cl_4N_2$; CAS: 1897-45-6. Figura 3) com pureza química de 99,3 % utilizado nos estudos foi adquirido da Riedel-de Haën (Alemanha; Lote: 7296X). A partir de uma solução cetônica de 1,0 mg mL⁻¹ foram preparadas soluções metanólicas de 1,0; 3,0; 5,0; 6,0; 7,0 e 8,0 µg mL⁻¹, para análise por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE e elaboração de curva-padrão.

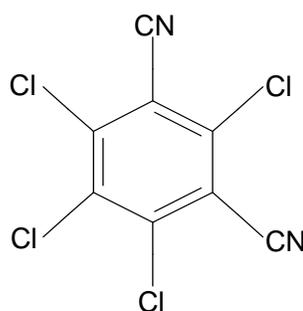


Figura 3. Fórmula estrutural do fungicida clorotalonil

4.2.1. Determinação da curva de calibração do clorotalonil por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para determinação da curva-padrão do fungicida e outras análises, utilizou-se equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, composto de detector UV/visível SPD 10AV, bomba LC-10AD, forno CTO 10A, módulo de integração CBM 20A e “software LC solution”, todos da marca Shimadzu, e injetor Reodyne com *loop* de 20 μL . As condições cromatográficas foram baseadas em ROJAS et al. (2004) e utilização de coluna (Phenomenex) Spherex C18 com dimensões de 250 x 3,2 mm e tamanho de partícula de 5 μm , mantida a 40° C. A fase móvel usada foi acetonitrila:água (70:30 v/v), sob fluxo de 0,8 mL min^{-1} e a detecção foi feita a 231 nm. Sob estas condições o tempo de retenção do clorotalonil foi de aproximadamente 2,25 minutos (Figura 4).

As concentrações das amostras experimentais foram feitas por intermédio das concentrações da curva-padrão do clorotalonil determinadas por meio do método de Meier e Zünd (1993), utilizando as áreas cromatográficas das concentrações analisadas por CLAE.

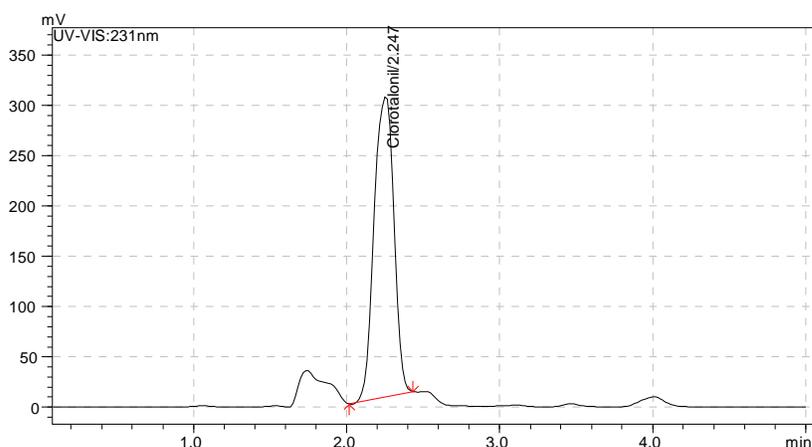


Figura 4. Cromatograma do padrão analítico do clorotalonil

4.2.2. Tratamento dos solos com clorotalonil

Baseando-se nas doses de tratamento preconizadas pelos fabricantes (BRASIL, 2007), isto é, de 1313 g ha^{-1} de ingrediente ativo, a dose de tratamento com clorotalonil foi convertida em 11 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo, considerando-se a densidade média de solos de textura

média em $1,2 \text{ g cm}^{-3}$, conforme Michelin et al. (2009); e 1,0 cm a altura das subamostras de solos acondicionadas nos diferentes frascos utilizados nos estudos.

4.2.3. Recuperação do clorotalonil das subamostras dos solos

Baseando-se em Andréa; Papini e Nakagawa (2001), a recuperação do clorotalonil das subamostras de solo foi testada por extração por micro-ondas de quatro replicatas de 3 g (equivalente peso seco) dos solos tratados com $11 \mu\text{g}$ clorotalonil g^{-1} de solo com 10 mL de metanol. Utilizou-se 25 ciclos de 20 segundos e 160 Watts em cada ciclo de aparelho comercial Panasonic 1600, intercalados com banho de gelo.

Os extratos de cada replicata foram filtrados em papel de filtro e os volumes recuperados foram corrigidos para 10 mL com metanol. O clorotalonil presente nos extratos foi analisado por CLAE nas condições descritas previamente, e quantificado por comparação com as concentrações obtidas na curva de calibração do padrão analítico por meio do método de Meier e Zünd (1993).

4.3. *Polymnia sonchifolia*

De acordo com o Laboratório de Química e Farmacologia de Produtos Naturais (IB) que cedeu a fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia*, as folhas secas e moídas da planta foram submetidas a maceração com etanol a frio por 7 dias. O solvente foi filtrado e evaporado à secura. O resíduo resultante foi submetido à cromatografia em coluna de sílica gel 60 eluída com os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. A secagem do solvente levou à obtenção das frações: hexânica, clorofórmica, acetato de etila e metanólica (GONÇALEZ, 2000).

4.3.1. Tratamento dos solos com a fração metanólica do extrato da planta *Polymnia sonchifolia*

Este estudo triplicou a dose de controle de *Aspergillus flavus* em meio de cultura obtida por Gonzalez (2000), tendo em vista os possíveis efeitos protetores das partículas dos solos. Assim, soluções da fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* para tratamento na dose de $300 \mu\text{g g}^{-1}$ de solo foram sempre preparadas imediatamente antes dos tratamentos, solubilizando o resíduo da fração com Tween 80 (0,7 %) em água.

4.3.2. Teste de sensibilidade por contato de minhocas *Eisenia andrei* à fração metanólica do extrato da planta *Polymnia sonchifolia*

Para verificação prévia dos possíveis efeitos das diferentes concentrações da fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* no teste de rejeição com minhocas, realizou-se teste de sensibilidade de minhocas por contato com o dobro da dose escolhida para tratamento com a fração do extrato da planta nos estudos, ou seja, $600 \mu\text{g g}^{-1}$ de solo.

O teste foi baseado em OECD 207 (OECD, 1984) e foi realizado em sistemas compostos por cinco frascos de vidro de 9 cm de altura por 3 cm de diâmetro, que foram forrados internamente com papel de filtro sobre o qual pipetou-se 1,0 mL da solução aquosa de $600 \mu\text{g mL}^{-1}$ da fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia*. Cada frasco recebeu um espécime de minhoca e foi vedado com filme plástico PVC perfurado para permitir a troca gasosa. Os frascos foram acamados em bandeja (Figura 5) e permaneceram no escuro a aproximadamente 22°C durante 48 horas, quando então, a mortalidade foi avaliada. O tratamento controle foi realizado nas mesmas condições anteriormente descritas, com papel de filtro embebido apenas com solução aquosa de Tween 80 (0,7 %), para certificar a ausência de influência deste agente tensoativo no resultado do teste de rejeição.



Figura 5. Sistemas de estudo de toxicidade aguda de solução da fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia*

4.4. Rejeição de minhocas *Eisenia andrei* a solo contaminado com os compostos fungicidas sintético e natural

Os possíveis efeitos de doses maiores ou menores do que a preconizada na prática agrícola para aplicação de clorotalonil e a escolhida para tratamento dos solos com a fração

metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* foram verificados em testes de rejeição de minhocas baseados em ISO 17512-1 (2007).

Subamostra de 1,8 kg do solo Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico (AVEC) foi umedecida a 60 % da CMRA. Porções de 450 g (equivalente peso seco) da subamostra do solo foram separadas para tratamento com os compostos fungicidas. Em seguida, foram subdivididas em porções menores de 150 g e colocadas em triplicatas de câmara circular de aproximadamente 20 cm de diâmetro e 8 cm de altura, dividida em 4 parcelas (Figuras 6 e 7). Cada parcela recebeu o solo tratado com diferentes concentrações dos compostos fungicidas (C1, C2 e C3), além do controle (C0).

Para o clorotalonil, as doses de tratamento utilizadas foram (em μg clorotalonil g^{-1} de solo): 5,5 (C1); 11 (C2 - dose comercial); 22 (C3). A amostra controle foi tratada com 22 μL acetona (C0). Para tratamento com a fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia*, também se utilizou amostra controle (C0 – 1,0 mL de solução aquosa de Tween 80 a 0,7 %), além dos seguintes tratamentos (em μg da fração metanólica do extrato g^{-1} de solo): 150 (C1); 300 (C2) e 600 (C3).

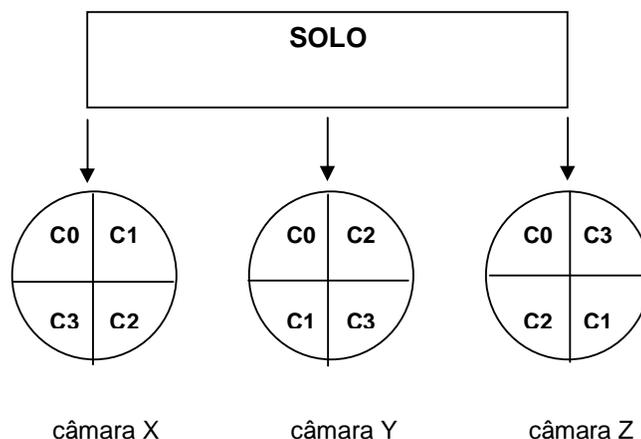


Figura 6. Diagrama esquemático dos tratamentos no teste de rejeição de minhocas *Eisenia andrei* aos compostos fungicidas sintético e natural

Dez espécimes de minhocas *Eisenia andrei* adultas e cliteladas pesando mais que 300 mg foram selecionadas no minhocário do Laboratório de Ecologia de Agroquímicos (IB). No laboratório, as minhocas foram lavadas e mantidas em frasco de vidro com o fundo forrado com papel de filtro umedecido com água, durante aproximadamente duas horas antes do teste, para aclimação. Em seguida, todas foram colocadas ao mesmo tempo no centro de cada uma das câmaras circulares (Figura 7), que foram vedadas com filme

plástico perfurado e mantidas a aproximadamente 22° C sob iluminação constante, para maximizar o contato das minhocas com o solo.



Figura 7. Colocação e migração das minhocas no solo

Após 48 horas de contato com solo tratado com as diferentes concentrações dos compostos, efetuou-se a contagem das minhocas presentes em cada parcela de tratamento, calculando-se a porcentagem de rejeição aos diferentes tratamentos em relação à porção controle (CO) pela fórmula: $R(\%) = [(C-T) / N] \times 100$, onde R = rejeição; C = nº de indivíduos na condição controle; T = nº de indivíduos na concentração teste e N = total de indivíduos (ISO 17512-1, 2007).

Antes da colocação das minhocas nas câmaras e após a desmontagem do sistema, porções aleatórias de aproximadamente 3 g do solo tratado com as diferentes concentrações dos dois compostos fungicidas foram retiradas para o monitoramento do pH do solo, a fim de verificar a ocorrência de mudanças que poderiam interferir nos testes propriamente ditos. Estas alíquotas de solo foram acondicionadas em tubos de vidro e misturadas com 9 mL de água destilada, para determinação do pH em peagômetro Quimis (Q400MT).

4.5. Atividade da enzima desidrogenase – DHA

Subamostras de 100 g dos solos foram colocadas em recipientes de vidro e umedecidas a 60 % da CMRA, 7 dias antes do início do estudo, para reativação da atividade da microbiota (subitem 4.1.1). O tratamento com solução aquosa da fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* foi completado com volume de água destilada necessário para umedecer as subamostras de solo a 60% da CMRA.

Estas subamostras receberam tratamento com o clorotalonil (T1) e com a fração metanólica do extrato de *P. sonchifolia* (T2), respectivamente nas doses de 11 µg e 300 µg g⁻¹ de solo. A subamostra controle (T0) recebeu tratamento apenas com acetona. Todas as subamostras dos solos foram mantidas em câmara de temperatura e luminosidade controlada a 25° ± 1°C e 12 horas de iluminação durante todo o período do estudo (Figura 8). A umidade foi mantida a 60 % da CMRA por pesagens regulares e adição de água destilada quando necessário.

Conforme Peres; Andréa e Luchini (2004), triplicatas de aproximadamente 3 g foram retiradas das subamostras imediatamente e 24 h, e aos 7, 14 e 28 dias após os tratamentos. Essas subamostras foram acondicionadas em tubos de centrifuga, nos quais se adicionou 1,0 mL de solução de glicose (30 mg mL⁻¹); 0,5 mL de solução de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a 3 % e 5,0 mL de solução "tris-buffer" 0,1 mol L⁻¹ com o pH corrigido a 7,6 - 7,8 por meio da adição de HCl 1 M. Os tubos foram tampados e incubados a 37° C por 24 horas (Figura 8), para que ocorresse a reação de redução do TTC pela enzima, resultando em 1,3,5-trifeniltetrazólio formazan (TTF-formazan) (Figura 9). Outras subamostras de aproximadamente 3 g foram retiradas para determinação da umidade dos solos, para o cálculo de equivalente em peso seco.

No dia seguinte, as triplicatas foram centrifugadas a 2500 rpm durante 15 minutos, desprezando-se o sobrenadante. O TTF-formazan resultante do processo de reação e presente nas subamostras dos solos foi extraído por agitação duas vezes com 10 mL de acetona, durante 30 e 15 minutos, respectivamente (Figura 10). Em seguida, o volume de extrato de TTF-formazan extraído foi elevado a 30 mL.

Conforme Peres (2000), os extratos de solos com os diferentes tratamentos foram analisados por espectrofotometria UV/Vis a 485 nm (Quimis Q798U) e as concentrações de TTF-formazan formado foram determinadas por comparação com a curva de calibração.

4.5.1. Determinação da curva de calibração do TTF-formazan

Conforme Peres (2000), para quantificação do TTF-formazan formado nos solos com os diferentes tratamentos preparou-se uma solução de 10 mg mL⁻¹ de padrão técnico de TTF-formazan em acetona e esta solução foi diluída até as seguintes concentrações: 1,0; 3,0; 5,0; 7,0; 8,0 e 10,0 µg mL⁻¹, para análise por espectrofotometria UV/Vis a 485 nm em espectrofotômetro Quimis (Q798U) e a determinação dos teores de TTC nas amostras foi feita por comparação com esta curva de calibração do padrão por meio do método de Meier e Zünd (1993).

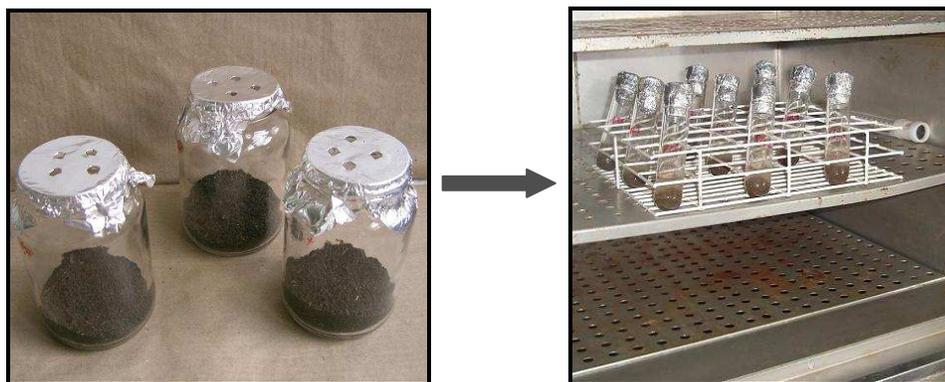


Figura 8. Subamostras de solo com diferentes tratamentos das quais se retiraram amostras para o estudo da atividade da DHA

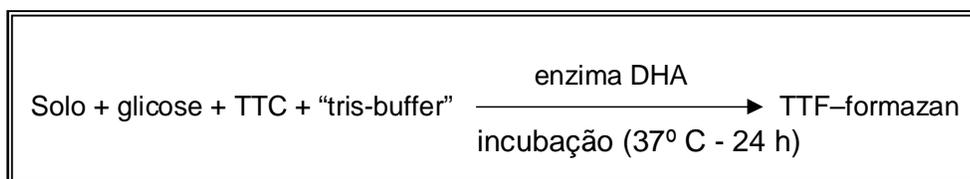


Figura 9. Esquema da reação de conversão do cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) em 1,3,5-trifeniltetrazólio formazan (TTF-formazan) por ação da enzima DHA

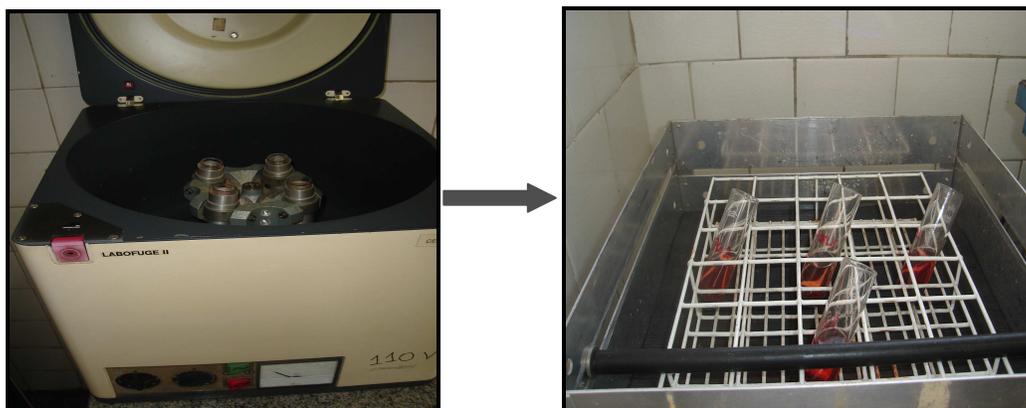


Figura 10. Centrifugação das triplicatas das subamostras de solo tratadas com diferentes tratamentos e extração do TTF-formazan com acetona por agitação

4.6. Respiração do solo

Subamostras de 50 g dos dois tipos de solos foram acondicionadas em frascos biométricos (Figura 11. BARTHA; PRAMER, 1965) e umedecidas a 60 % da CMRA para reativação da atividade microbiana, 7 dias antes do início do estudo (Figura 12) .

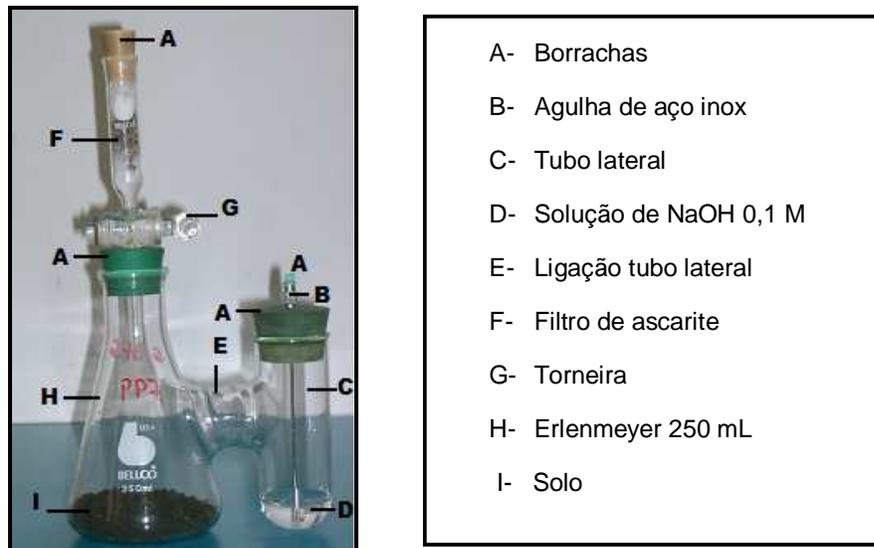


Figura 11. Frasco biométrico utilizado na determinação da taxa de respiração do solo por produção de $^{14}\text{CO}_2$



Figura 12. Frascos biométricos com subamostras de solos umedecidos para reativação da atividade microbiana

No dia do tratamento, as subamostras de solos receberam: clorotalonil (T1) - na dose de $11 \mu\text{g g}^{-1}$ de solo; ou fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* (T2) - na dose de $300 \mu\text{g g}^{-1}$ de solo, ou os controles (T0) - com aplicação apenas dos respectivos solventes das soluções de tratamento, isto é, o controle do tratamento com clorotalonil recebeu $11 \mu\text{L}$ de acetona g^{-1} de solo e, o controle do tratamento com a fração do extrato da planta recebeu $21,5 \mu\text{L}$ de solução aquosa de Tween 80 a $0,7 \text{ \% g}^{-1}$ de solo .

Em seguida, adicionou-se $1,0 \text{ mL}$ de solução aquosa contendo $4,0 \text{ mg}$ de glicose e $5,18 \text{ Bq}$ de ^{14}C -glicose g^{-1} de solo, que completaram o volume de água necessário para atingir os 60 \% da CMRA de cada subamostra. O $^{14}\text{CO}_2$ produzido pela respiração da microbiota presente nos solos foi capturado nos 10 mL de solução de NaOH $0,1 \text{ M}$ colocados no braço lateral dos frascos biométricos (Figura 11). A solução de NaOH foi trocada de duas em duas horas durante 10 horas; após 24 h e também aos 3, 5, 7, 14 e 28 dias após os tratamentos (Figura 13), baseando-se no protocolo OECD 217 (2000). Conforme Andréa et al. (2003), os sistemas assim montados foram mantidos fechados em câmara de temperatura e luminosidade controlada a $25^\circ \pm 1^\circ \text{ C}$ e 12 horas de iluminação.



Figura 13. Coleta de $^{14}\text{CO}_2$

Conforme Andréa et al. (1997), o $^{14}\text{CO}_2$ coletado de pelo menos 5 replicatas de cada tratamento foi analisado por espectrometria de cintilação em líquido (ECL) de alíquotas de $2,0 \text{ mL}$, em equipamento Packard (1600 TR), durante 10 minutos, após mistura com líquido cintilador preparado baseando-se em Mesquita e Rüegg (1984).

As medidas foram calculadas em porcentagem de radiocarbono recuperado em relação ao radiocarbono aplicado como ^{14}C -glicose.

Triplicatas de frascos biométricos com solos tratados com clorotalonil (tratamento T1) foram desmontados aos 0, 7, 14 e 28 dias, e o solo foi separado para análise da quantidade de clorotalonil presente. Para isso, os solos retirados dos frascos biométricos foram colocados em sacos plásticos e congelados, para determinações futuras de umidade presente nas subamostras e extração de triplicatas de 3 g para quantificação de clorotalonil por CLAE conforme subitem 4.2.3.

4.7. Análise estatística

No teste de rejeição, utilizou-se o teste exato de Fisher ($p \leq 5\%$) para comprovação dos resultados obtidos pela aplicação da fórmula de porcentagem de rejeição ($R\% = [(C-T) / N] \times 100$). As frequências de rejeição ou fuga foram comparadas entre as medidas no controle e as três concentrações de cada fungicida. Esta comparação permitiu o cálculo da probabilidade de associações entre as variáveis em análise, possibilitando as conclusões sobre a rejeição a doses com efeito subletais pelas minhocas, admitindo-se apenas duas alternativas sobre uma única variável, ou seja, sim ou não para o comportamento de rejeição.

A análise estatística dos resultados de atividade da enzima desidrogenase e de respiração do solo, foram feitas pelo teste T ($n \leq 30$ e $p \leq 1\%$), que é aplicado para análise da diferença entre duas médias utilizando-se duas amostras independentes, ou seja, se os valores são significativamente diferentes ou se a diferença é nula entre as médias. Todos os resultados foram apresentando em figuras contendo as médias, desvios padrão e respectivas diferenças significativas, indicadas por letras minúsculas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A curva de diferentes concentrações do padrão analítico do fungicida clorotalonil obtida por cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE, com coeficiente de correlação $r = 0,992$ (Figura 14) forneceu informações para cálculo das concentrações presentes nas soluções ou nos extratos de solo tratado.

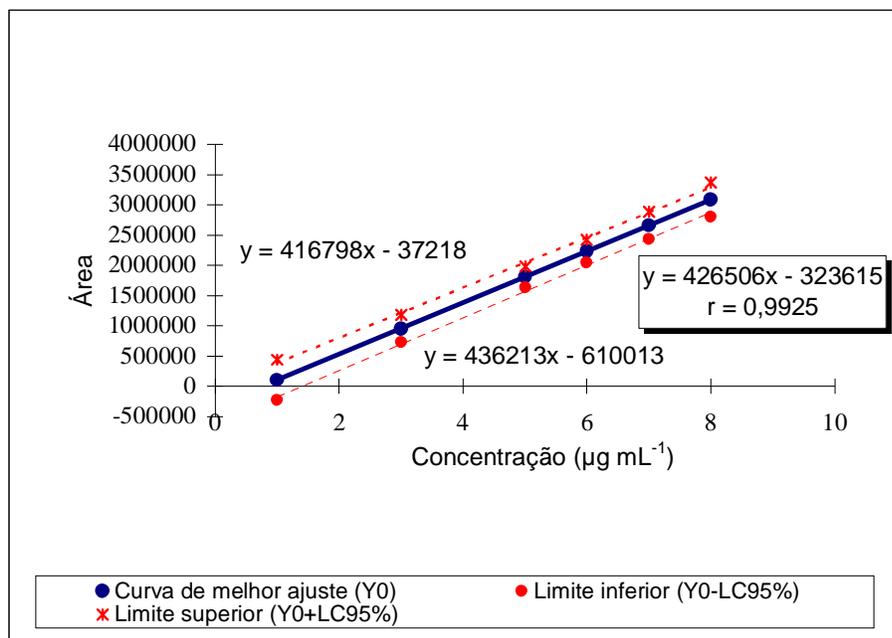


Figura 14. Curva de calibração de clorotalonil por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE

No teste de extração do clorotalonil por micro-ondas recuperou-se grande parte do fungicida aplicado, isto é: 88,9 % ± 1,2 % no solo AVEC e de 89,5 % ± 4,2 % no solo GHE (Tabela 3). Por isso esta metodologia de extração foi adotada para extração e posterior quantificação do clorotalonil nos extratos de solo por CLAE.

Tabela 3. Recuperação do clorotalonil das subamostras dos solos por extração com metanol por micro-ondas (n=3)

Solo	Clorotalonil (% g ⁻¹ de solo* ± d.p.**)	CV (%)***
Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico - AVEC	88,9 ± 1,1	1,2
Gley Húmico Eutrófico – GHE	89,5 ± 4,2	4,7

* equivalente peso seco ** d.p. = desvio padrão *** CV(%) = coeficiente de variação

Também se determinou previamente uma curva com diferentes concentrações de padrão técnico de TTF-formazan em espectrofotômetro UV/Vis (Quimis Q798U) a 485 nm para quantificação da atividade da enzima desidrogenase (DHA) nas subamostras de solos tratados com os compostos fungicidas clorotalonil e fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia*. O coeficiente de correlação (r) desta curva foi 0,992 (Figura 15) e, por isso, a curva foi utilizada nos cálculos da concentração do TTF-formazan produzido nos solos. Antes do estudo, realizou-se teste da atividade de DHA nos dois solos sem qualquer tratamento, para verificação prévia da atividade natural desta enzima nesses solos (Tabela 4).

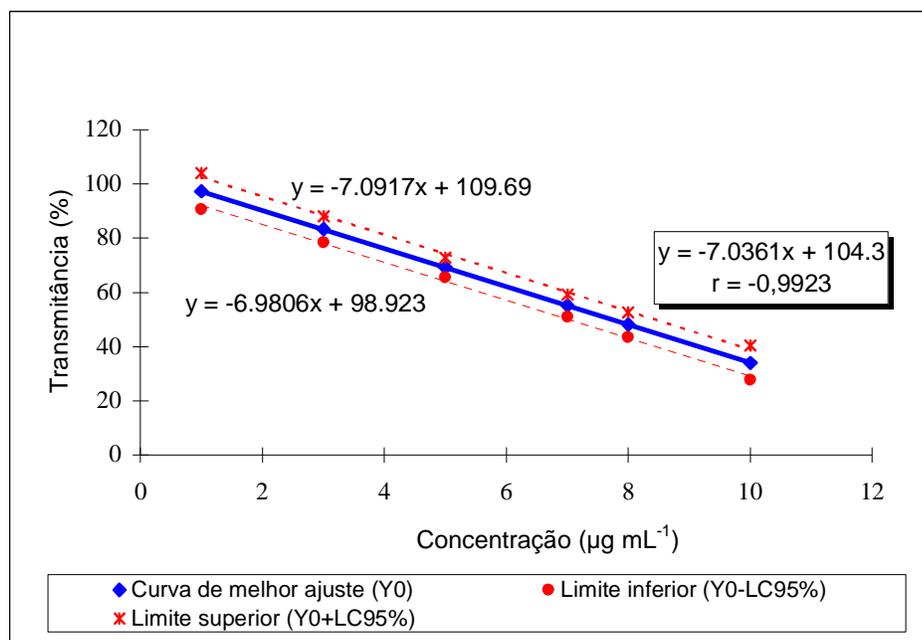


Figura 15. Curva de calibração de TTF-formazan por espectrofotometria UV/Vis a 485 nm

Tabela 4. Concentrações de TTF-formazan formado pela atividade da enzima desidrogenase em subamostras de solo sem tratamento (n=3)

Solo	TTF-formazan (µg g ⁻¹ de solo* ± d.p.**)	CV (%)***
Argissolo Vermelho Eutroférrico Chernossólico - AVEC	114,8 ± 4,6	4,0
Gley Húmico Eutrófico -GHE	146,6 ± 3,0	2,0

* equivalente peso seco ** d.p. = desvio padrão *** CV(%) = coeficiente de variação

Por meio do teste de toxicidade em papel de filtro, realizado previamente ao teste de rejeição, verificou-se que a dose de $600 \mu\text{g g}^{-1}$ de solo, que é o dobro da dose escolhida para tratamento com a fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* nos estudos, assim como, o Tween 80 não provocaram mortalidade das minhocas. Desta forma, verificou-se que não houve interferência do agente tensoativo no estudo e que mesmo o dobro da dose escolhida para tratamento dos solos não foi letal.

O teste de rejeição foi um indicador rápido da toxicidade dos compostos fungicidas sintético e natural sobre as minhocas. Seus resultados (Tabela 5) mostraram que não houve associação significativa ($p = 0,353$) entre os diferentes tratamentos com a fração metanólica do extrato de *P. sonchifolia* e o controle. Os resultados indicaram que as minhocas não fugiram do solo tratado com nenhuma das diferentes concentrações da fração metanólica do extrato de *P. sonchifolia* que, portanto, não causou efeito de rejeição nas minhocas. Assim, verificou-se que de acordo com a ausência de toxicidade e de reação das minhocas, a fração metanólica do extrato da planta poderia ser uma alternativa viável aos compostos fungicidas sintéticos.

No entanto, no teste com o fungicida clorotalonil, o teste de Fisher demonstrou uma associação significativa ($p = 0,050$) entre as concentrações utilizadas na comparação com o controle, indicando que as minhocas rejeitaram o solo tratado com o clorotalonil. Observou-se pelo valor do resíduo ajustado (1,85) que a dose recomendada na prática agrícola (C2) teve uma taxa significativa de rejeição em relação à condição controle e, como era esperado, a dose C3, que é o dobro do que se recomenda na agricultura, gerou o maior efeito de rejeição das minhocas na comparação com as concentrações menores (C1 e C2).

Os resultados mostraram que o teste de rejeição foi um indicador rápido da toxicidade dos fungicidas sobre as minhocas e isso indica, conforme já o fizeram Loureiro et al. (2005), a possibilidade de uso deste teste na avaliação de risco de substâncias presentes no ambiente edáfico.

O composto sintético clorotalonil causou rejeição nas minhocas, mesmo na dose recomendada na prática agrícola. Já as três concentrações utilizadas no tratamento com a fração metanólica do extrato de *P. sonchifolia* não provocaram alteração neste comportamento. Dada a importância das minhocas em muitos processos que ocorrem no solo, substâncias que cheguem ao ambiente edáfico e não sejam tóxicas a elas podem representar alternativas de uso na agricultura. Entretanto, compostos que sejam tóxicos às minhocas podem ter como consequência alterações de fertilidade do solo, pois, estes animais aceleram a taxa de degradação da matéria orgânica (BROWN; DOUBE, 2004). Assim, os resultados do presente estudo indicam que se o composto de origem natural proveniente da planta *P. sonchifolia* apresentar atividade fungicida também para fungos fitopatogênicos, ele poderá ser usado em substituição a compostos sintéticos mais tóxicos.

Tabela 5. Rejeição de minhocas *Eisenia andrei* a solo Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico (AVEC) tratado com diferentes concentrações de clorotalonil e da fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia*

Câmara	Controle (C0) × Concentração Teste			
	C0-C0	C0-C1	C0-C2	C0-C3
AVEC_CTL_X	6 6	6 2	6 1	6 1
AVEC_CTL_Y	3 3	3 5	3 1	3 1
AVEC_CTL_Z	5 5	5 4	5 1	5 0
Total (N)	28	25	17	16
R%	0,0	12,0	64,7	75,0
AVEC_PS_X	3 3	3 0	3 3	3 4
AVEC_PS_Y	2 2	2 2	2 2	2 4
AVEC_PS_Z	0 0	0 5	0 2	0 3
Total (N)	10	12	12	16
R%	0,0	-16,7	-16,7	-35,3

AVEC_CTL – tratamento do solo Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico com clorotalonil. AVEC_PS – tratamento do solo Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico com a fração metanólica do extrato de *P. sonchifolia*. C0 – controles. C1- 5,5 µg g⁻¹ de solo (CTL); 150 µg g⁻¹ de solo (PS). C2 – 11 µg g⁻¹ de solo (CTL); 300 µg g⁻¹ de solo (PS). C3 – 22 µg g⁻¹ de solo (CTL); 600 µg g⁻¹ de solo (PS). Porcentagem de rejeição ao solo contaminado: $R\% = [(C-T) / N] \times 100$, onde C = número de indivíduos na condição controle; T = número de indivíduos na concentração teste e N = número total de indivíduos

Os resultados do efeito dos compostos fungicidas sintético e natural sobre a atividade da enzima desidrogenase (DHA) nos solos, por meio da quantificação da concentração de TTF-formazan são apresentados nas figuras 16 e 17.

No solo GHE, observou-se inibição da atividade da DHA logo após a aplicação, isto é, o intervalo entre os tratamentos com os compostos fungicidas e o processamento da amostra (aproximadamente 2 horas) já foi suficiente para provocar uma inibição significativa da enzima ($p = 0,001$), assim como se observou até 24 h após ambos os tratamentos (Figura 16). Porém, o efeito foi mais acentuado pelo tratamento com clorotalonil (GHE_T1), que continuou inibindo a atividade da DHA até 7 dias após tratamento ($p = 0,001$). A partir dos 14 dias e até o final do estudo verificou-se atividade da DHA ligeira e significativamente maior ($p = 0,001$) no solo tratado com clorotalonil do que 7 dias após tratamento, o que significa que houve recuperação da atividade microbiana ao longo do período estudado.

Também no solo GHE, o tratamento com a fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* provocou apenas ligeira, mas significativa diminuição na produção de TTF-formazan nas primeiras 24 horas após o tratamento ($p = 0,001$). Aos 7 dias do tratamento não se observou diferença significativa entre o tratamento com o extrato da planta (GHE_T2; $p = 0,28$) e o controle. Mas, a partir dos 14 dias de incubação do solo com o tratamento GHE_T2 observou-se ligeiro e significativo estímulo ($p = 0,001$) da atividade da DHA em relação ao controle e, novamente, não mais se observou diferença significativa ($p = 0,67$) entre a amostra tratada com o extrato de *P. sonchifolia* (GHE_T2) e a amostra controle (GHE_T0).

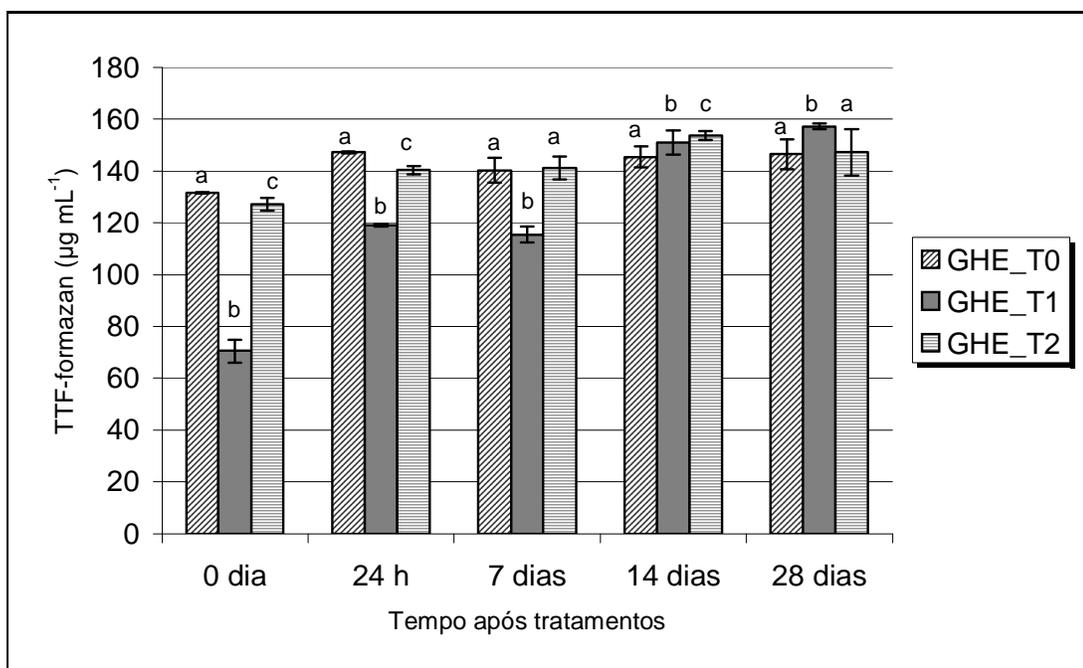


Figura 16. Atividade na enzima desidrogenase (DHA) no solo Gley Húmico Eutrófico (GHE) tratado com clorotalonil (GHE_T1), fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* (GHE_T2) e controle (GHE_T0). [Letras diferentes nas barras indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p = 0,001$)]

No solo AVEC tratado com os dois compostos observou-se, de imediato, efeito inibitório estatisticamente significativo ($p = 0,001$) da atividade de DHA por efeito de ambos compostos fungicidas (Figura 17) sendo que o fungicida natural proveniente da planta *P. sonchifolia* (AVEC_T2) provocou efeito ligeira e estatisticamente menor ($p = 0,001$) do que o clorotalonil (AVEC_T1). No entanto, a atividade da DHA do solo foi retomada, mas foi menor

na amostra controle ($p = 0,001$) do que nas tratadas com ambos compostos 24 horas após tratamentos. Aos 7 dias após incubação não foram verificadas diferenças significativas ($p = 0,169$) em relação ao tratamento com clorotalonil (AVEC_T1) e controle (AVEC_T0). Entretanto, observou-se diminuição da atividade da DHA no solo tratado com o extrato de *P. sonchifolia*, que, no entanto, foi recuperada aos 14 dias após tratamento, demonstrando aumento estatisticamente significativo ($p = 0,001$) da atividade da enzima em relação ao solo sem tratamento a partir desse tempo e até o final do estudo. Também aos 14 dias de incubação notou-se diminuição da atividade da DHA no solo tratado com clorotalonil (AVEC_T1) e novamente aos 28 dias do estudo observou-se retomada bastante significativa desta atividade.

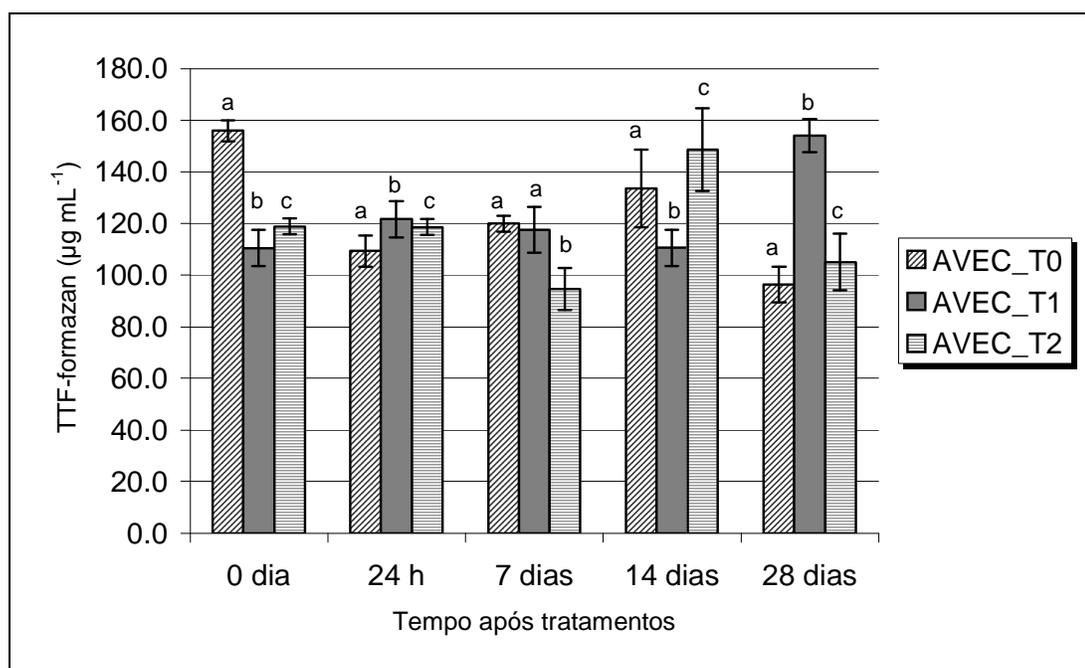


Figura 17. Atividade da enzima desidrogenase (DHA) no solo Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico (AVEC) tratado com clorotalonil (AVEC_T1), fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* (AVEC_T2) e controle (AVEC_T0). [Letras diferentes nas barras indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p = 0,001$)]

A tabela 6 mostra que durante o período de 28 dias a produção de TTF-formazan no solo GHE tratado com clorotalonil (GHE_T1) diminuiu em até 13,8 % em relação a produção no solo sem tratamento (GHE_T0), tendo diminuído apenas 0,2 % como consequência do

tratamento com a fração do extrato da planta (GHE_T2). Isso indica que o clorotalonil inibiu a atividade microbiana no solo GHE, diferentemente do que se detectou com o composto natural que praticamente não provocou alteração nesta atividade microbiana no mesmo solo.

No mesmo período de 28 dias, a produção de TTF-formazan no solo AVEC tratado com clorotalonil (AVEC_T1) praticamente não se alterou, pois diminuiu apenas 0,1 % em relação à produção no controle (AVEC_T0). Entretanto, houve diminuição de 9,6 % na produção de TTF-formazan no solo tratado com a fração metanólica do extrato de *P. sonchifolia* (AVEC_T2), também em relação a produção no controle. Os resultados demonstram que a atividade microbiana no solo AVEC tratado com clorotalonil foi praticamente igual à do controle, mas, foi inibida pelo tratamento com a fração do extrato da planta.

Tabela 6. Atividade da enzima desidrogenase (DHA) no solo AVEC e GHE em 28 dias de incubação com diferentes tratamentos (n=3)

Tratamentos	TTF-formazan ($\mu\text{g g}^{-1}$ de solo* \pm d.p.**)				
	0 ----- horas -----	24	7 ----- dias -----	14	28
AVEC_T0	156,0 \pm 4,0 ^a	109,4 \pm 5,9 ^a	120,0 \pm 2,7 ^a	133,5 \pm 15,2 ^a	96,4 \pm 6,6 ^a
AVEC_T1	110,5 \pm 6,6 ^b	121,7 \pm 7,1 ^b	117,6 \pm 9,0 ^a	110,5 \pm 7,0 ^b	154,2 \pm 6,5 ^b
AVEC_T2	118,9 \pm 2,8 ^c	118,7 \pm 2,9 ^c	94,6 \pm 7,7 ^b	118,7 \pm 16,0 ^c	105,1 \pm 11,2 ^c
GHE_T0	131,6 \pm 0,3 ^a	147,2 \pm 0,4 ^a	140,3 \pm 4,8 ^a	145,5 \pm 3,8 ^a	146,5 \pm 5,8 ^a
GHE_T1	70,5 \pm 4,5 ^b	119,1 \pm 0,4 ^b	115,5 \pm 2,9 ^b	151,0 \pm 4,7 ^b	157,2 \pm 1,2 ^b
GHE_T2	127,2 \pm 2,4 ^c	140,3 \pm 1,7 ^c	141,2 \pm 4,4 ^a	153,8 \pm 1,7 ^c	147,2 \pm 8,9 ^a

* equivalente peso seco ** d.p. = desvio padrão. AVEC – Solo Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico. GHE – Solo Gley Húmico Eutroférico. T0 – tratamento controle; T1 – tratamento com clorotalonil; T2 – tratamento com a fração metanólica do extrato da planta *Polymnia sonchifolia*. [Letras diferentes nas colunas indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p = 0,001$)]

O tempo de incubação teve relação direta com a inibição e a retomada da atividade da DHA. De qualquer forma, verificou-se que ambos os compostos fungicidas causaram efeito inibitório apenas temporário sobre a atividade da DHA nos solos GHE e AVEC, conforme já verificado também por vários autores (PERES; ANDRÉA; LUCHINI, 2004; SILVA; FAY; VIEIRA, 2005; SINGH; SINGH, 2005; PANDEY; SINGH, 2006; entre outros). Esses autores também observaram que a frequência de aplicação de agrotóxicos no solo, características da molécula e características físico-químicas do solo podem afetar a disponibilidade dessas substâncias químicas no ambiente edáfico e determinar diferenças na composição da comunidade microbiana e, com isso, inibir ou estimular a atividade de diferentes enzimas.

O estudo da atividade da DHA no solo GHE e AVEC também demonstrou a capacidade de recuperação da atividade da microbiota ao longo dos 28 dias de estudo, conforme também observado por Chen; Edwards e Subler (2001) em estudo para verificar os efeitos dos fungicidas captan e clorotalonil sobre a atividade da DHA. Desta forma, pode-se atribuir essa capacidade de recuperação à retomada da atividade da microbiota presente no solo, e/ou como consequência do aumento de populações e da atividade de espécies microbianas resistentes aos compostos fungicidas testados, e ainda, pela utilização do clorotalonil e da fração do extrato da planta como fonte de carbono e energia por alguns micro-organismos do solo.

Os resultados do estudo de respiração do solo induzida por adição de ^{14}C -glicose como substrato nos solos GHE e AVEC tratados com os compostos fungicidas sintético e natural são apresentados nas figuras de 18 e 23.

O solo GHE tratado com clorotalonil (CTL_T1) apresentou produção de $^{14}\text{CO}_2$ estatisticamente menor ($p = 0,001$) que o controle até um dia após tratamento (Figura 18), embora as diferenças tenham sido muito pequenas até 6 horas após tratamento. Das 8 horas e até um dia após tratamento, a inibição foi notável e significativamente grande ($p = 0,001$) em relação ao controle. Mas a partir dos 3 dias até os 7 dias após tratamento com clorotalonil notou-se pequeno e significativo estímulo da produção de $^{14}\text{CO}_2$ ($p = 0,001$) em comparação com o tratamento controle (CTL_T0), indicando a retomada da atividade microbiana e a consequente maior biomineralização da ^{14}C -glicose. Porém, de 7 até o final dos 28 dias de estudo, novamente observou-se pequena mas estatisticamente significativa diminuição da produção de $^{14}\text{CO}_2$ ($p = 0,001$).

No solo GHE, o tratamento com a fração metanólica do extrato de *P. sonchifolia* (PS_T2; Figura 18) praticamente não afetou a formação de $^{14}\text{CO}_2$ até as 10 horas após tratamento, em comparação ao controle (PS_T0). Mesmo sendo valores significativamente diferentes ($p = 0,001$) em relação ao tratamento controle (PS_T0), a liberação de $^{14}\text{CO}_2$ foi apenas ligeiramente maior. Isto demonstra que, de modo geral, mesmo havendo diferenças

significativas, o efeito do extrato de *P. sonchifolia* sobre a mineralização da ^{14}C -glicose foi muito pequeno (Figura 18).

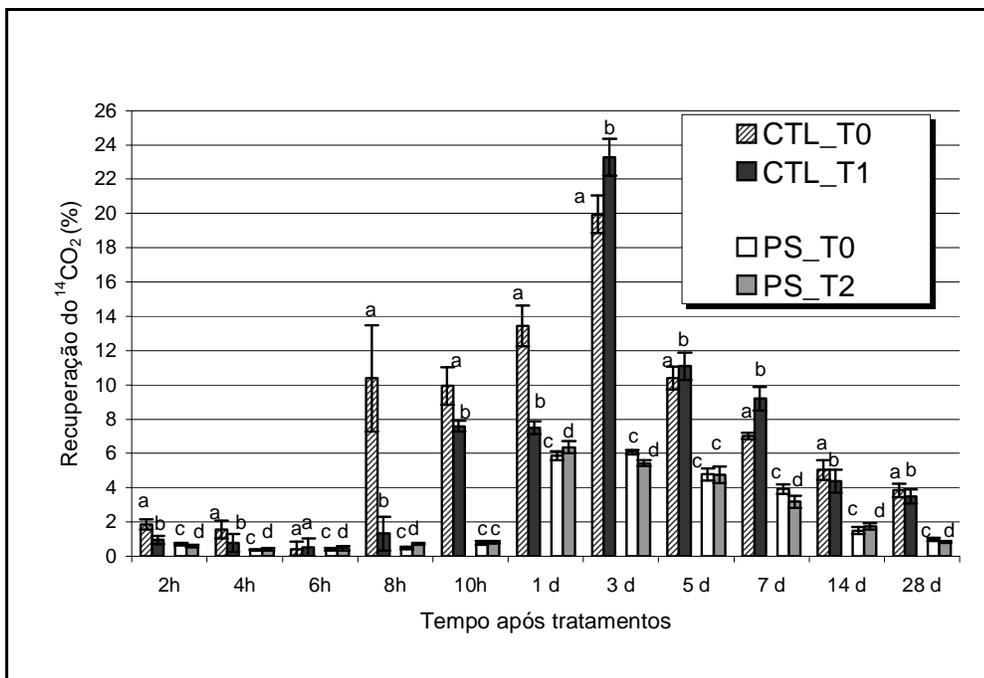


Figura 18. Respiração do solo Gley Húmico Eutrófico (GHE) induzida pela adição de substrato ^{14}C -glicose durante 28 dias após tratamento com clorotalonil (CTL_T1) ou com fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* (PS_T2) e respectivos controles (CTL_T0 e PS_T0). (h = horas; d = dias) [Letras diferentes nas barras indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos ($p = 0,001$)]

Verificou-se também que no período de 28 dias, o tratamento com o clorotalonil inibiu a produção de $^{14}\text{CO}_2$ no solo GHE em até 16,4 % em relação ao controle, durante este período de estudo (Figura 19). Mas, a produção cumulativa de $^{14}\text{CO}_2$ no solo GHE tratado com a fração do extrato da *P. sonchifolia* (PS_T2, Figura 20) foi muito semelhante à do controle, verificando-se efeito inibitório de apenas 2,2 % sobre a mineralização da ^{14}C -glicose.

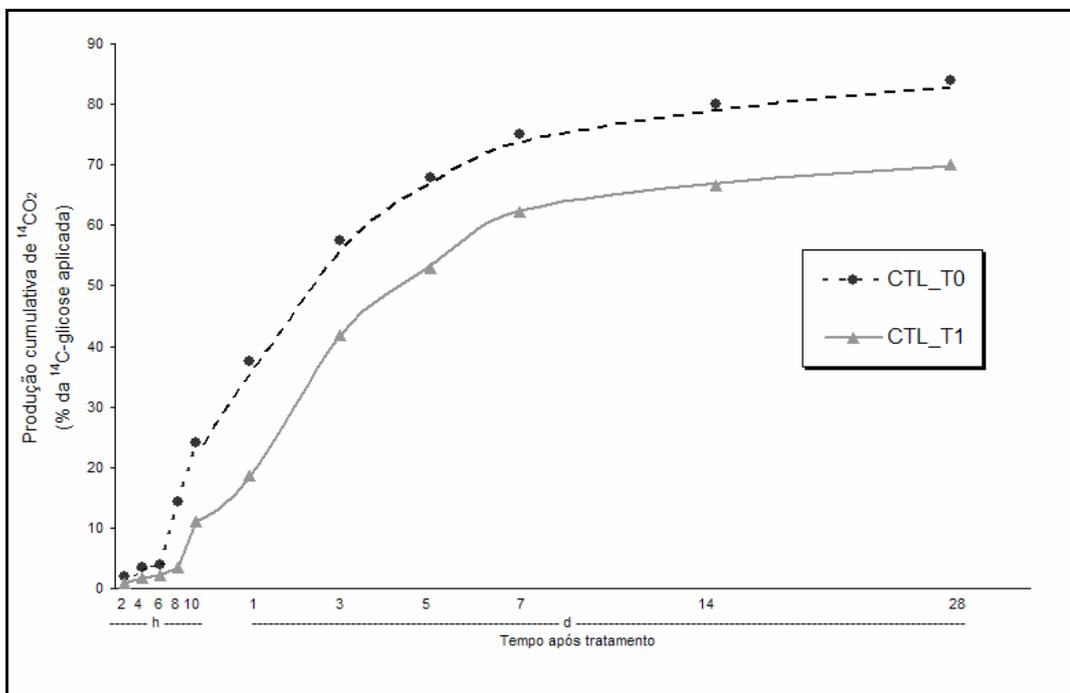


Figura 19. Produção cumulativa de $^{14}\text{CO}_2$ no solo Gley Húmico Eutrófico (GHE) tratado com clorotalonil (CTL_T1 – clorotalonil e CTL_T0 – controle). (h = horas; d = dias)

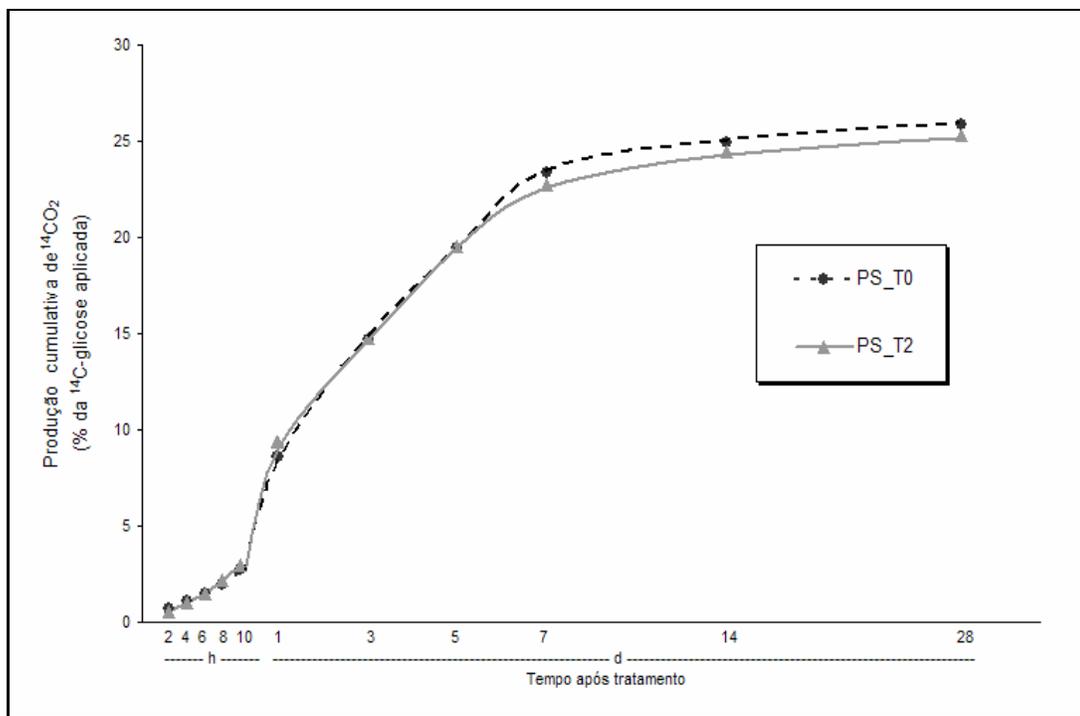


Figura 20. Produção cumulativa de $^{14}\text{CO}_2$ no solo Gley Húmico Eutrófico (GHE) tratado com a fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* (PS_T2 – fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* e PS_T0 – controle). (h = horas; d = dias)

O solo GHE tem textura arenosa, com 5,4 % de argila e apenas 13 g kg⁻¹ de matéria orgânica e, portanto, de acordo com LUCHINI (1987) é de se esperar que compostos químicos permaneçam mais disponíveis na solução deste solo. Conseqüentemente, em solos deste tipo, os compostos ficam mais acessíveis aos micro-organismos e podem exercer ação biológica ou até serem mais facilmente mineralizados (LUCHINI, 1987). Assim, os resultados da respiração microbiana do solo GHE tratado com clorotalonil sugerem a interferência biológica do clorotalonil nos processos oxidativos dos micro-organismos aeróbios, e conseqüentemente na produção de ¹⁴CO₂, mesmo que essa inibição tenha sido temporária. Já o tratamento do solo GHE com a fração metanólica do extrato de *P. sonchifolia* praticamente não provocou alteração na mineralização da ¹⁴C-glicose e, portanto, não provocou grande interferência sobre a atividade respiratória. A pequena inibição detectada sugere que o efeito biológico do fungicida natural sobre a atividade microbiana do solo foi pequeno.

Os resultados do estudo de respiração no solo AVEC tratado com clorotalonil (CTL_T1) e com a fração metanólica do extrato de *P. sonchifolia* (PS_T2) são apresentados na figura 21. No tempo 0, não se observou diferença significativa ($p = 0,815$) entre o tratamento com clorotalonil (CTL_T1) e o controle (CTL_T0), mas 4 horas após o tratamento detectou-se um aumento significativo da produção de ¹⁴CO₂ ($p = 0,001$) que não se confirmou no decorrer do estudo. Isso pode significar um efeito apenas momentâneo provocado por variações naturais da própria amostra de solo. Um dia e 5 dias após tratamento não se detectou diferença significativa ($p = 0,923$) entre o solo tratado com clorotalonil e seu controle. Porém, de 7 até o final do estudo notou-se significante diminuição na produção de ¹⁴CO₂ ($p = 0,001$).

No mesmo solo AVEC tratado com a fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* (PS_T2, Figura 21), a produção de ¹⁴CO₂ foi ligeiramente inferior ($p = 0,001$) logo após o tratamento, excetuando-se as 4 horas. Verificou-se que, apesar das diferenças terem sido significativas, a produção de ¹⁴CO₂ foi pequena no controle e no tratamento desde os 3 dias até o final do estudo, indicando efeito pequeno da fração do extrato da planta sobre a respiração microbiana deste solo.

A produção cumulativa de ¹⁴CO₂ no solo AVEC tratado com clorotalonil (CTL_T1, Figura 22), demonstrou que o fungicida inibiu muito pouco a atividade respiratória da microbiota ao longo dos 28 dias de estudo, pois ela foi só 2,6 % menor no solo tratado em relação ao controle. Já nas amostras de solo AVEC tratado com a fração metanólica do extrato de *P. sonchifolia* (PS_T2, Figura 23), a quantidade de ¹⁴CO₂ foi 1,8 % superior do que no controle (PS_T0). Isso significa que ao contrário do que ocorreu após tratamento com clorotalonil, o tratamento com a fração do extrato da planta estimulou a atividade respiratória da microbiota do solo.

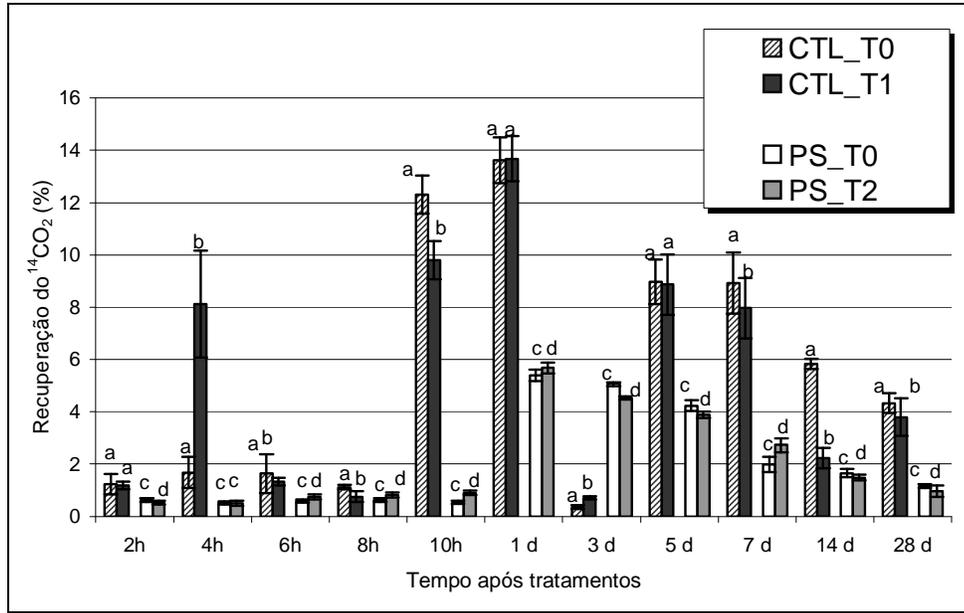


Figura 21. Respiração do solo Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico (AVEC) induzida pela adição de substrato ¹⁴C-glicose durante 28 dias após tratamento com clorotalonil (CTL_T1) ou com fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* (PS_T2) e respectivos controles (CTL_T0 e PS_T0). (h = horas; d = dias). [Letras diferentes nas barras indicam diferenças estatísticas entre os tratamentos (p = 0,001)]

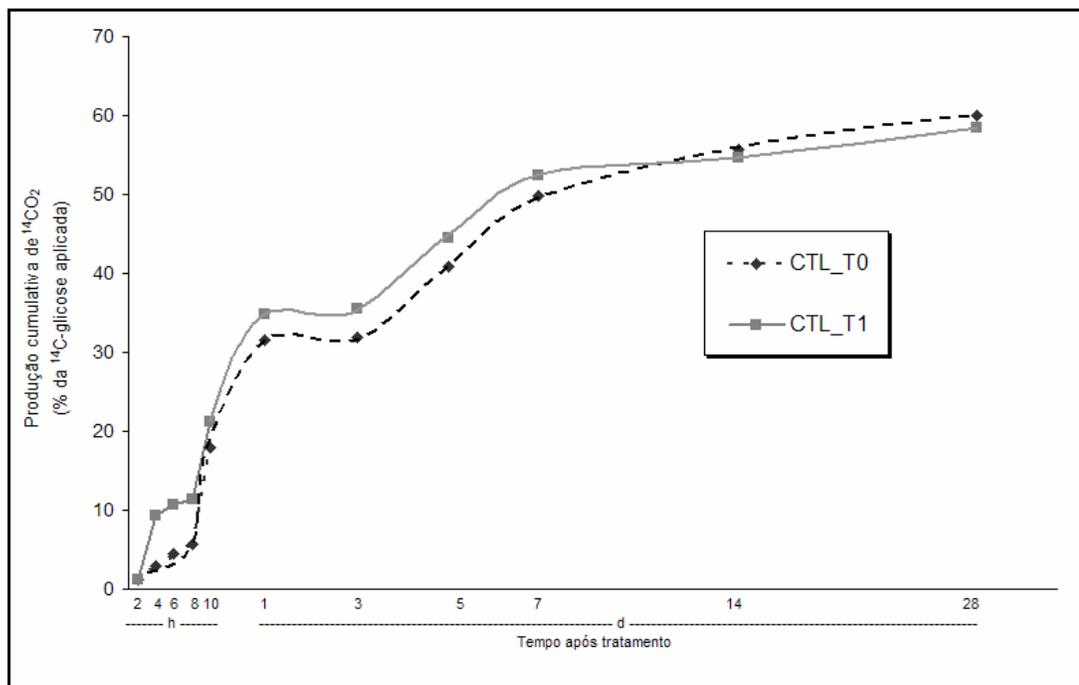


Figura 22. Produção cumulativa de ¹⁴CO₂ no solo Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico (AVEC) tratado com clorotalonil (CTL_T1 – clorotalonil e CTL_T0 – controle). (h = horas; d = dias)

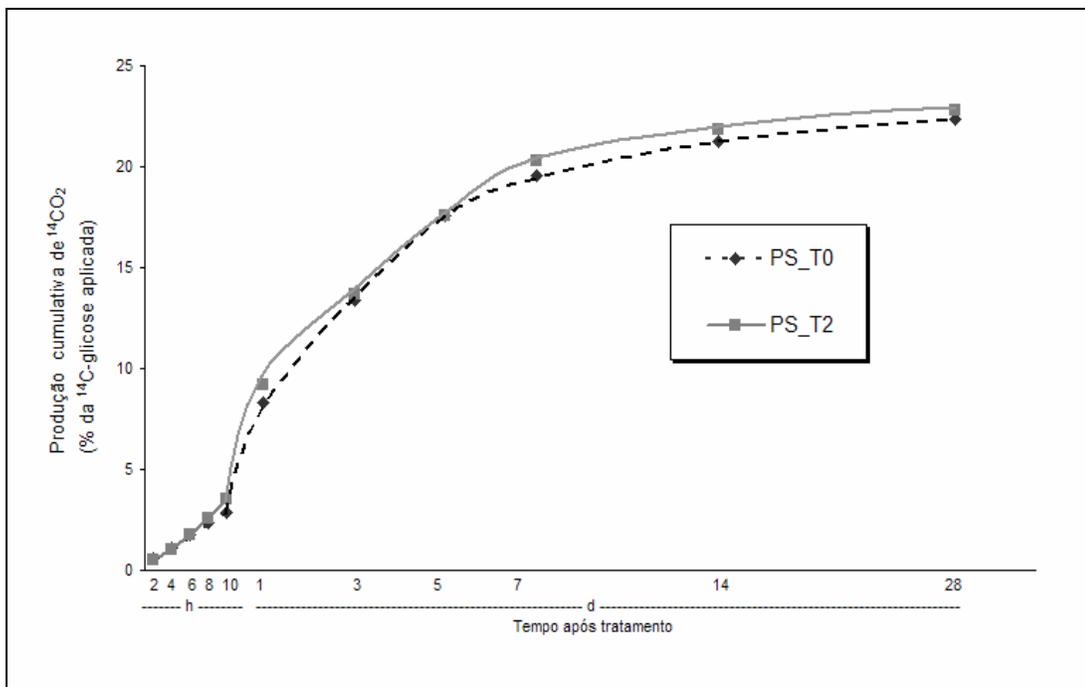


Figura 23. Produção cumulativa de de $^{14}\text{CO}_2$ no solo no solo Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico (AVEC) tratado com a fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* (PS_T2 – fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* e PS_T0 – controle). (h = horas; d = dias)

Apesar de Regitano et al. (2001) terem afirmado que a dissipação do clorotalonil se relacionou principalmente com processos de sorção do fungicida no solo, este trabalho demonstra o efeito do clorotalonil sobre a produção de $^{14}\text{CO}_2$ e, portanto, sobre atividade da microbiota dos solos. De qualquer forma, os resultados demonstraram que a respiração proveniente de ^{14}C -glicose adicionada no solo AVEC foi pouco inibida (diminuição de 2,6 % da produção de $^{14}\text{CO}_2$ em comparação com o controle; Figura 22) pelo tratamento com clorotalonil e pouco estimulada pelo tratamento com a fração do extrato da planta (aumento de 1,8 % da produção de $^{14}\text{CO}_2$ em comparação com o controle; Figura 23). Portanto, ambos compostos fungicidas influenciaram quantitativamente pouco a atividade microbiana deste solo.

Conforme observado por Andréa e Pettinelli (2000) em estudo sobre os efeitos de diferentes agrotóxicos na respiração microbiana do solo, as variações ocorridas na produção de $^{14}\text{CO}_2$ nos solos GHE e AVEC sem tratamento (CTL_T0 e PS_T0) podem ser atribuídas a fatores intrínsecos da própria amostra, tais como, alterações naturais da atividade da microbiota presente. Mas, neste estudo, as variações na produção de $^{14}\text{CO}_2$ ocorreram por efeito dos tratamentos dos solos com clorotalonil ou fração metanólica do extrato de *P.*

sonchifolia porque houve diminuição ou aumento da produção de $^{14}\text{CO}_2$ nas amostras tratadas em relação aos controles (Figuras 18 e 21).

Sabe-se que tanto as características físico-químicas dos solos, como as características da própria molécula dos agrotóxicos influenciam no comportamento da substância e na sua dissipação no solo (LUCHINI; ANDRÉA, 2002). Mas, a tabela 7 mostra que o clorotalonil se dissipou em até 40% durante os 28 dias de estudo em ambos os solos, independentemente do conteúdo de matéria orgânica e das outras características físico-químicas dos solos (WEED; WEBER, 1974).

Tabela 7. Recuperação do clorotalonil dos solos AVEC e GHE por extração com metanol por micro-ondas no período de 28 dias após tratamento (n=3)

Solo	(% média g ⁻¹ de solo* ± d.p.**)			
	Tempo após tratamento (dias)			
	0	7	14	28
Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico - AVEC	103,9 ± 22,1	91,1 ± 12,7	78,5 ± 9,8	65,5 ± 15,9
Gley Húmico Eutrófico – GHE	103,5 ± 12,7	92,1 ± 2,8	81,7 ± 13,7	66,9 ± 12,9

* equivalente peso seco ** d.p. = desvio padrão

Verificou-se que os dois compostos fungicidas atuaram sobre os processos aeróbios dos dois solos. Entretanto, os efeitos foram maiores no solo GHE do que no AVEC. A atividade da DHA foi inibida pelo clorotalonil em 13,8 % e 0,1 %, respectivamente, nos solos GHE e AVEC. Já a respiração foi inibida em 16,4 % no solo GHE e apenas 2,6 % no AVEC. Mas, quando o tratamento foi com a fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* a inibição da atividade da DHA no solo GHE foi de apenas 0,2 %, e de 9,6 % no AVEC. A inibição da respiração pela fração metanólica do extrato da planta foi de 2,2% no solo GHE, mas, foi estimulada quase na mesma proporção (1,8 %) no solo AVEC.

6. CONCLUSÕES

- Os efeitos quantitativos de inibição e de estímulo da respiração dos solos Gley Húmico Eutrófico (GHE) e Argissolo Eutroférico Chernossólico (AVEC) por ação da fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* foram estatisticamente pequenos. Porém, o composto fungicida sintético, clorotalonil, causou grande inibição da respiração no solo GHE e praticamente não causou efeito de inibição da respiração do solo AVEC.
- Houve inibição apenas temporária da atividade da enzima desidrogenase dos solos GHE e AVEC tratados com clorotalonil e com a fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia*, demonstrando a capacidade de recuperação da atividade microbiana.
- A fração metanólica do extrato de *Polymnia sonchifolia* não provocou rejeição de minhocas ao solo tratado com nenhuma das concentrações utilizadas. Já o clorotalonil, em concentração de recomendação para uso agrícola e o dobro dela, causou efeito de rejeição sobre as minhocas.
- Todas as concentrações utilizadas para tratamento com os compostos fungicidas sintético (5,5; 11 e 22 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo) e natural (150; 300 e 600 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo) foram subletais às minhocas.
- As características físico-químicas dos solos GHE e AVEC parecem ter determinado o efeito dos compostos fungicidas sintético e natural, pois os efeitos de ambos foram maiores no solo GHE, que tem menor conteúdo de matéria orgânica. Entretanto, a dissipação do clorotalonil não foi influenciada pelas características físico-químicas dos solos, pois sua dissipação foi praticamente igual nos dois solos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADESODUM, J. K.; DAVIDSON, D. A.; HOPKINS, D. W. Micromorphological evidence for changes in soil faunal activity following application of sewage sludge and biocide. **Applied Soil Ecology**, v. 29, p. 39-45, 2005.

- ALEF, K. Soil Respiration. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P (Eds). **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. 2. ed. San Diego-CA: Academic Press, chapter 5, 1998. p. 214-215.
- ALEF, K.; NANNIPIERI, P. Estimation of microbial activities. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Eds). **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. 2. ed. San Diego-CA: Academic Press, chapter 5, 1998, p. 193-262.
- ALEXANDER, M. **Introduction to microbiology**. 2. ed. New York, Santa Barbara, London, Sidney, Toronto: John Wiley & Sons, 1977. 467 p.
- ANDRÉA, M.M. **Formação e bioliberação de resíduos-ligados de [¹⁴C]-lindano e [¹⁴C]-paration em dois solos brasileiros**. 1992. 130 f. Tese de Doutorado - Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1992.
- ANDRÉA, M. M.; WIENDL, F. M. Formation and biorelease of bound residues of pesticides in two brazilian soils. I. [¹⁴C]-lindane. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 30, n. 05, p. 687-694, 1995.
- ANDRÉA, M. M.; MATALLO, M.B.; TOMITA, R. Y.; LUCHINI, L.C. Effect of temperature on dissipation of [¹⁴C] - atrazine in a Brazilian soil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v 32, n. 01, p. 95-100, 1997.
- ANDRÉA. M. M.; PERES, T. B.; MATALLO, M. B. Effect of the herbicide haloxyfop-methyl on some soil biological parameters. In: THIRD INTERNATIONAL WEED SCIENCE CONGRESS, Foz do Iguaçú: 2000 n. 269, p. 02-07.
- ANDRÉA, M. M.; PETTINELLI, A. J. Efeito de aplicações de pesticidas sobre a biomassa e a respiração de microrganismos de solos. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 223-228, jun./dez. 2000.
- ANDRÉA, M.M.; PAPINI, S.; NAKAGAWA, L.E. Optimizing microwave-assisted solvent extraction (MASE) of pesticides from soil. **Journal of Environmental Science and Health**, Nova York, v. B36, p. 87-93, 2001.
- ANDRÉA, M. M.; PERES, T. B.; LUCHINI, L. C.; BAZARIN, S.; PAPINI, S.; MATALLO, M. B.; SAVOY, V. L. T. Influence of repeated applications of glyphosate on its persistente and soil bioactivity. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 38, n. 11, p. 1329-1335, nov. 2003.
- ANDRÉA, M. M.; HOLLWEG, M. J. M. Comparison of methods for determining microbial biomass in two soils. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 28, n. 06, p. 981-986, nov./dez. 2004.
- ANDRÉA, M. M.; PAPINI, S.; PERES, T. B.; BAZARIN, S.; SAVOY, V. L. T.; MATALLO, M. B. Glyphosate: Influência na bioatividade do solo e ação de minhocas sobre sua dissipação em terra agrícola. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, n. 1, p. 95-100, 2004.

ANDRÉA, M. M.; PAPINI, S. Influence of soil properties on bioaccumulation of ¹⁴C-simazine in earthworms *Eisenia foetida*. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, Nova York, v.41, p. 55-58, 2005.

ANDRÉA, M. M. Bioindicadores ecotoxicológicos de agrotóxicos. Instituto biológico [internet]. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=83. Acesso em: 22 set. 2008.

BARTHA, R.; PRAMER, D. Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Science**, Baltimore, v. 100, n. 1, p. 68-70, 1965.

BENITEZ, E.; MELGAR, R.; NOGALES, R. Estimating soil resilience to a toxic organic waste by measuring enzyme activities. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 36, p. 1615-1623, 2004.

BERRY, E. C. Earthworms and other fauna in the soil. In: HATFIELD, J. L.; STEWART, B.A. (Eds). **Soil Ecology: effects on soil quality**. 2. ed. Boca Raton, London, New York: CRC Press, 1994. p. 61-90.

BHATTACHARYYA, P.; CHAKRABARTI, K.; CHAKRABORTY, A. Microbial biomass and enzyme activities in submerged rice soil amended with municipal solid waste compost and decomposed cow manure. **Chemosphere**, v. 60, p. 310-318, 2005.

BOLLAG, J. M.; LIU, S. Y. Biological transformation processes of pesticides. In: CHENG, H. H. et al. (Eds.). **Pesticides in the soil environment: processes, impacts and modeling**. Madison: SSSA, 1990. p.169-212.

BOUCARD, T. K.; MCNEILL, C.; BARDGETT, R. D.; PAYNTER, C. D.; SEMPLE, K. T. The impact of synthetic pyrethroid and organophosphate sheep dip formulations on microbial activity in soil. **Environmental Pollution**, v. 153, p. 207-214, 2008.

BRASIL. **Lei nº 7.802**, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a produção, e embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Legislação federal de agrotóxicos e afins, Brasília, Ministério da Agricultura e do Abastecimento. p. 7-13, 1998.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. AGROFIT, Brasília. Chlorothalonil: Relatório de ingrediente ativo. [internet]. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 09 mar. 2007.

BROWN, G.G.; DOUBE, B. M. Foundation interactions between earthworm, microorganisms, MO and plants. In: EDWARDS, C. A. (Ed). **Earthworm ecology**. 2. ed. Boca Raton, London, New York: CRC Press, 2004. p. 213-239.

BURGER, J. Bioindicators: types, development and use in ecological assessment and research. **Environmental Bioindicators**, v. 1, p. 22-39, 2006.

CAPORAL, F. R.; COSTABEBER, J. A. Segurança alimentar e agricultura sustentável: uma perspectiva agroecológica. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 1, n. 1, p. 87-90, nov. 2006.

CHAVES, A.; SHEA, D.; COPE, W. G. Environmental fate of chlorothalonil in a Costa Rican banana plantation. **Chemosphere**, v. 69, p. 1166-1174, 2007.

CHAVES, A.; SHEA, D.; DANEHOWER, D. Analysis of chlorothalonil and degradation products in soil and water by GC/MS and LC/MS. **Chemosphere**, v. 71, p. 629-638, 2008.

CHEN, S.K.; EDWARDS, C.A.; SUBLER, S. Effects of the fungicides benomyl, captan and chlorothalonil on soil microbial activity and nitrogen dynamics in laboratory incubations. **Soil Biology & Biochemistry**, v.33, p.1971-1980, 2001.

COX, C. Chlorothalonil. **Journal of Pesticide Reform**, Oregon, v. 17, n. 4, p. 14-20, 1997.

DILLY, O. Estimating soil microbial activity. In: BLOEM, J.; KPKINS, D. W.; BENEDETTI, A. **Microbiological methods for assessing soil quality**. 2. ed. Cambridge: Bidlles Ltd, 2008. p. 114.

EBING, W.K. Fate of pesticides in soil. In: GREENHALG, R.; ROBERTS, T.R. (Eds.) **Pesticide Science and Biotechnology**. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1987, p. 411-416.

EDWARDS, C.A. The importance of earthworms as key representatives of the soil fauna. In: EDWARDS, C. A. (Ed). **Earthworm ecology**. 2. ed. Boca Raton, London, New York: CRC Press, 2004. p. 213-239.

EISENHAEUER, N.; KLIER, M.; PARTSCH, S.; SABAIS, A. C. W.; SCHERBER, C.; WEISSER, W. W. SCHEU, S. No interactive effects of pesticides and plant diversity on soil microbial biomass and respiration. **Applied Soil Ecology**, v. 42, p. 31-36, 2009.

Environmental Protection Agency – EPA. Prevention, pesticides and toxid substances (7508C). **Chlorothalonil**. United States. Reregistration Eligibility Decision – RED. EPA-738-R-99-004. 337 p. april, 1999 a.

Environmental Protection Agency – EPA. Prevention, pesticides and toxid substances (7508C). **Chlorothalonil**. United States. Reregistration Eligibility Decision – RED. EPA-738-F-99-008. 14 p. april, 1999 b.

Environmental Techology Centre. Environmental Canadá – ETC. **Biological test method: tests for toxicity of contaminated soil to earthworms (*Eisenia andrei*, *Eisenia fetida*, or *Lumbricus terrestris*)**. Report EPS 1/RM/43, Ottawa, Canadá. 184p. jun. 2004.

FRIEDEL, J. K; MÖLTER, K; FISCHER, W. R. Comparison and improvement of methods for determining soil dehydrogenase activity using triphenyltetrazolium chloride and iodinitrotetrazolium chloride. **Biology and Fertility of Soils**, v 18, p. 21-296, 1994.

GARCIA, E.G. **Avaliação das consequências da * lei dos agrotóxicos * nas intoxicações e nas classificações toxicológica e de potencial de periculosidade ambiental no período de 1990 a 2000.** 2001. 132 f. Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

GEVAO, B.; SEMPLE, K. T.; JONES, K. C. Bound pesticide residues in soils: a review. **Environmental Pollution**, v. 108, p. 3-14, 2000.

GIANFREDA, L.; RAO, M. A. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35. p. 339-354, 2004.

GOMES, E.; FERRERAS, L.; LOVOTTI, L.; FERNANDEZ, E. Impact of glyphosate application on microbial biomass and metabolic activity in a vertic argiudoll from Argentina. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 163-167, 2009.

GONÇALEZ, E. **Avaliação toxicológica de *Polymnia sonchifolia* em culturas de *Aspergillus flavus* e de células vero.** 2000. 71 f. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

GONÇALEZ, E.; FELÍCIO, J. D.; PINTO, M. M.; ROSSI, M. H.; MEDINA, C.; FERNANDES, M. J. B.; SIMONI, I. C. Inhibition of aflatoxin production by *Polymnia sonchifolia* and its in vitro cytotoxicity. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v. 70, n. 2, p. 159-163, abr./jun. 2003.

GONÇALVEZ, I. C. R.; ARAÚJO, A. S. F.; CARVALHO, E. M. S.; CARNEIRO, R. F. V. Effect of paclobutrazol on microbial biomass, respiration and cellulose decomposition in soil. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 235-238, 2009.

GRENNI, P.; CARACCILOLO, A. B.; RODRIGUEZ-CRUZ, M. S.; MARTIN, M. J. S. Changes in the microbial activity in a soil amended with oak and pine residues and treated with linuron herbicide. **Applied Soil Ecology**, v. 41, p. 2-7, 2009.

HAQUE, R. Role of adsorption in studying the dynamics of pesticides in a soil environmental. In: HAQUE, R.; FREED, V. H. (Eds). **Environmental dynamics of pesticides**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1975. p. 97-114.

HOLTZE, M. S.; SORENSEN, S. R.; SORENSEN, J.; AAMAND, J. Microbial degradation of the benzonitrile herbicides dichlobenil, bromoxynil and ioxynil in soil and subsurface environments – insights into degradation pathways, persistent metabolites and involved degrader organisms. **Environmental Pollution**, v. 154, p. 155-168, 2008

INTERNACIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO/FDIS 17512-1:2007: Soil quality – Avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals on behaviour – Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*), Geneva, 2007.

International Programme on Chemical Safety – IPCS. United Nations Environment Programme, International Labour organisation and World Health Organization. **Environmental Health Criteria 183 – Chlorothalonil**. Report. Geneva, Switzerland, 163 p. 1996.

KERLE, A. E.; JENKINS, J. J.; VOGUE, A. P. **Understanding pesticide persistence and mobility for groundwater and surface water protection**. Extension Service. Oregon State University, 8p. 2007.

KIM, Y. M.; PARK, K.; JUNG, S.; CHOI, J.; KIM, W.; JOO, G.; RHEE, I. Chlorothalonil – biotransformation by glutathione S-transferase of *Escherichia coli*. **The Journal of Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 42-46, 2004.

KLOSE, S.; MARTÍNEZ, V. A.; AJWA, H. A. Microbial community composition and enzyme activities in a sandy loam soil after fumigation with methyl bromide or alternative biocides. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, p. 1243-1254, 2006.

LI, L. Z.; ZHOU, D. M.; WANG, P.; ALLEN, H. E.; SAUVÉ, S. Predicting Cd partitioning in spiked soils and bioaccumulation in the earthworm *Eisenia fetida*. **Applied Soil Ecology**, v. 42, p.118-123, 2009.

LIU, H. S.; LI, L.H.; HAN, X. G.; HUANG, J. H.; SUN, J. X.; WANG, H. Y. Respiratory substrate availability plays a crucial role in the response of soil respiration to environmental factors. **Applied Soil Ecology**, v. 32, p. 284-292, 2006.

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

LUCHINI, L. C. **Adsorção-dessorção dos herbicidas paraquat, diuron e 2,4-D em seis solos brasileiros**. 1987. 91 f. Dissertação de Mestrado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1987.

LUCHINI, L. C; ANDRÉA, M. M. Dinâmica de Agrotóxicos no Ambiente. In: AMBIENTE, Ministério do Meio; AGRICULTURA, Fórum Nacional de Secretários de. (Org.). **Programa de Defesa Ambiental Rural - Textos Orientadores**, Brasília, 2002, p. 27-44.

MEIER, P.C.; ZÜND, R.E. **Statistical methods in analytical chemistry**. New York: N.Y. John Wiley & Sons, 1993.

MESQUITA, T.B.; RÜEGG, E.F. Influência de agentes tensoativos na detecção da radiação beta. **Ciência e Cultura**, v. 36, p. 446-450, 1984.

MICHELON, J. C.; CARLESSO, R.; PETRY, T. M.; MELO, L. G.; SPOHR, R. B.; ANDRADE, J. G. Qualidade física dos solos irrigados de algumas regiões do Brasil Central. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. UAEA/UFCGV, Campina Grande, v. 13, n. 1, p. 39-45, 2009.

MONTEIRO, R. T. R. M.; FRIGHETTO, R. T. S. **Indicadores biológicos e bioquímicos da qualidade do solo. Manual Técnico. Embrapa**. Centro Nacional de pesquisa de monitoramento e avaliação de impacto ambiental – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Jaguariúna-SP, p. 37-38, 2000.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Editora Ufla, capítulo 6, 2002. p. 243-245.

MOTONAGA, K.; TAKAGI, K.; MATUMOTO, S. Biodegradation of chlorothalonil in soil after suppression of degradation. **Biology and Fertility of Soils**, v. 23, p. 340-345, 1996.

_____. Suppression of chlorothalonil degradation in soil after repeated application. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 17, n. 8, p. 1469-1472, 1998.

MUSUMECI, M. R. Defensivos agrícolas e sua interação com a microbiota do solo. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (Eds). **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 1992. 360 p.

NAKAGAWA, L. E.; ANDRÉA, M. M. Degradação e formação de resíduos não-extraíveis ou ligados do herbicida atrazina em solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 8, p. 1509-1515, ago. 2000.

NANNIPIERI, P.; KANDELER, E.; RUGGIERO, P. Enzymes activities and microbiological and biochemical processes in soil. In: BURNS, R. G.; DICK, R. P. (Eds). **Enzymes in environment: activity, ecology and applications**. Boca Raton, London, New York: CRC Taylor & Francis, 2002, chapter 1, p. 1-34.

NIEMI, M.; HEISKANEN, I.; AHTIAINEN, J. H.; RAHKONEN, A.; MANTYKOSKI, K.; WELLING, L.; LAITINEN, P.; RUUTTUNEN, P. Microbial toxicity and impacts on soil enzyme activities of pesticides used in potato cultivation. **Applied Soil Ecology**, v. 41, p. 293-304, 2009

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD Nº 207**. Earthworm, Acute Toxicity Tests. 1984.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD Nº 217**. Guideline for the testing of chemicals. Soil microorganisms: carbon transformation test. 2000.

PAK, A. **Polymnia sonchifolia: Fitoquímica e avaliação do crescimento e na produção de aflatoxinas por Aspergillus flavus**. 2002. 100 f. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita filho”, Araraquara-SP, 2002.

PAK, A.; GONÇALEZ, E; FELÍCIO, J. D.; PINTO, M. M.; ROSSI, M. H.; SIMONI, I. C.; LOPES, M.N. Inhibitory activity of compounds isolated from *Polymnia sonchifolia* on aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 199-203, 2006.

PAL, R.; CHAKRABARTI, K.; CHAKRABORTY, A.; CHOWDHURY, A. Pencycuron application to soils: degradation and effect on microbiological parameters. **Chemosphere**, v. 60, p. 1513-1522, 2005.

PANDEY, S.; SINGH, D. K. Soil dehydrogenase, phosphomonoesterase and arginine deaminase activities in an insecticide treated groundnut (*Arachis hypogaea* L.) field. **Chemosphere**, v. 63 (5), p. 869-880, 2006.

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

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

PAPINI, S.; LANGENBACH, T.; LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. Influence of substrate on bioaccumulation of ¹⁴C-paraquat in compost worms *Eisenia foetida*. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 41, p. 523-530, 2006.

PAUL, E.A.; CLARK, F.E. **Soil microbiology and biochemistry**. 2. ed. Boca Raton, London, New York: Academic Press, 1996. p. 109-127.

PERES, T. B. **Efeito da aplicação de pesticidas na atividade microbiológica do solo e na dissipação do ¹⁴C-paraquat metílico**. 2000. 75f. Dissertação de Mestrado – Instituto de Pesquisa Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

PERES, T. B.; ANDRÉA, M. M.; LUCHINI, L. C. Agrotóxicos usados na cultura do algodão: efeito na atividade das enzimas desidrogenase e arilsulfatase do solo. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 3, p. 363-369, jul./set. 2004.

POZO, C.; MARTÍNEZ-TOLEDO, M. V.; RODELAS, B.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Response of soil microbiota to the addition of 3,3'-diaminobenzidine. **Applied Soil Ecology**, v. 23, p. 119-126, 2003.

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

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**, Viçosa, v. 26, p. 267-274, 2002.

ROJAS, Z. C.; MENDOZA, R. B., FIGUEROA, M. S.; SOKOLOV, M. Y.; Chlorothalonil degradation under anaerobic conditions in an agricultural tropical Soil. **Kluwer Academic Publishers**, Netherland, v. 151, p. 397-409, 2004.

RUPPERT, E. E.; BARNES, D.R. Anelídeos e progonóforos. In: RUPPERT, E. E.; BARNES, D.R. (Eds). **Zoologia dos Invertebrados**. 6. ed. São Paulo: Ed. Roca, 1996. capítulo 11, p.486-664.

SCHINNER, F.; ÖHLINGER, R.; KANDELER, E.; MARGESIN, R. Enzymes involved in intracellular metabolism. **Methods in soil biology**. Berlim: Springer-Verlag, 1996. chapter 15, p.235-243.

SCHUSTER, E; SCHRÖDER, D. Effects of sequentially-applied pesticides on no-target soil microorganisms: field experiments. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 22, n. 3, p. 367-373, 1990.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; CRUZ, M. E. S. Uso de extratos vegetais no controle de fungos fitopatogênicos. Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná – FUPEF. **Floresta**, v. 30 (1/2), p. 129-137, 2000.

SCRIBNER, E. A.; ORLANDO, J. L.; BATTAGLIN, W. A.; SANDSTROM, M. W.; KUIVILA, K. M.; MEYER, M. T. Results of analyses of the fungicide chlorothalonil, its degradation products, and other selected pesticides at 22 surface- water sites in five southern states, 2003-04. **U.S. Geological survey toxic substances hydrology program**. U.S. Geological Survey, 2006. 69 p.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; VIEIRA, R. F. Efeito dos fungicidas metalaxil e fenarimol na microbiota do solo: Pesticidas. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v.15, p. 93-104, jan/dez. 2005.

SINGH, J.; SINGH, D. K. Dehydrogenase and phosphomonoesterase activities in groundnut (*Arachis Hypogaea* L.) field after diazinon, imidacloprid and lindane treatments. **Chemosphere**, v.60 (1), p. 32-42, 2005.

SINGH, D. K.; KUMAR, S. Nitrate reductase, arginine deaminase, urease and dehydrogenase activities in natural soil (ridges with forest) and in cotton soil after acetamiprid treatments. **Chemosphere**, v. 71 (3), p. 412-418, 2008.

SISINNO, C.; BULUS, M.; RIZZO, A. C. L.; MOREIRA, J. Avoidance test using earthworms as a complement for metal contaminated site evaluation: preliminary results. Comunicação técnica. In: ao XIII INTERNATIONAL CONFERENCE ON HEAVY METALS IN THE ENVIRONMENT – ICHMET, CT2005-038-00. 2005, Rio de Janeiro-RJ, jun. 2005. 6 p.

SLIMAK, K. M. Avoidance response as a sublethal effect of pesticides on *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). **Soil Biology & Biochemistry**, v. 29 (3-4), p. 713-715, 1997.

SPADOTTO, C. A.; MATALLO, M. B.; GOMES, M. A. Sorção do herbicida 2,4-D em solos brasileiros: Pesticidas. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 103-110, jan/dez. 2003.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações**. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, v. 42, 29 p., dez. 2004.

SPESSOTO, A. M.; MELO, I. S.; MONTEIRO, R. T. R. Mineralização do fungicida ¹⁴C-metalaxil em solos brasileiros. In: SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. (Eds). **Impacto ambiental do fungicida metalaxil**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 1. ed. Jaguariuna, Embrapa Meio Ambiente. 2006. Capítulo 4, p. 47-60.

SUKUL, P. Enzymatic activities and microbial biomass in soil as influenced by metalaxyl residues. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, p. 320-326, 2006.

THIELE-BRUHN, S.; BECK, I. C. Effects of sulfonamide and tetracycline antibiotics on soil microbial activity and microbial biomass. **Chemosphere**, v. 59, p. 457-465, 2005.

TOMLIN, C. **The pesticide manual**. The Royal Society of Chemistry 10. ed. Surrey, 1995. p. 161.

VIEIRA, R. F.; SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. Efeito da suplementação orgânica sobre a toxidez do fungicida clorotalonil na microbiota do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 12, p.1555-1560, dez. 2001.

VISWANATHAN, R. R. S.; SCHEUNERT, I.; KORTE F. Investigations on accumulation and biotransformation by earthworms of lindane occurring as soil contaminant. In: ABOU, R. E (Eds.). **Hazardous Waste: Detection, Control, Treatment**. 2. ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science Publishers, 1988. p. 759-765.

WEED, S. B.; WEBER, J. B. Pesticide - organic matter interactions. In: GUENZI, W. D. (Ed.). **Pesticides in soil and water**. Madison: South Segoe Road, 1974. p. 39-60.

XIAO, N.; JING, B.; GE, F.; LIU, X. The fate of herbicide acetochlor and its toxicity to *Eisenia fetida* under laboratory conditions. **Chemosphere**, v. 62, p. 1366-1373, 2006.

XIE, W.; ZHOU, J.; WANG, H.; CHEN, X.; LU, Z.; YU, J.; CHEN, X. Short-term effects of copper, cadmium and cypermethrin on dehydrogenase activity and microbial functional diversity in soils after long-term mineral or organic fertilization. **Agriculture, Ecosystems and Environmental**, v. 129, p. 450-456, 2009

ZARDINI, E. Ethnobotanical Notes on "Yacon" *Polymnia shonchifolia* (Asteraceae). **Economic Botany**, v. 45 (1), p. 72-85, 1991.

ZILLI, J. E.; RUMJANEK, N. G.; XAVIER, G. R.; COUTINHO, H. L. C.; NEVES, M. C. P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade de solo. **Caderno de Ciência e Tecnologia**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, set./dez. 2003.



SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO



This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)