

INSTITUTO BIOLÓGICO
PÓS-GRADUAÇÃO

**Influência de três tipos de solos sobre o efeito do inseticida
cipermetrina em minhocas *Eisenia andrei***

ANA PAULA ALVES DE SOUSA

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, Segurança Alimentar e o Ambiente

Orientadora: Prof^a Dr^a Mara M. de Andréa

São Paulo
2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



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: Ana Paula Alves de Sousa

Título: Influência de três tipos de solos sobre o efeito do inseticida cipermetrina em minhocas *Eisenia andrei*

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:

Profª Drª: Mara M. de Andréa

Instituição: Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Proteção Ambiental - Instituto Biológico

Assinatura:

Drª: Cintia Carla Niva

Instituição: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Florestas)

Assinatura:

Drª: Solange Papini

Instituição: Prefeitura Municipal de São Paulo - Coordenação de Vigilância em Saúde (COVISA)

*Aos meus pais, pelo carinho e
apoio de sempre*

Ofereço

Ao meu amor, Erik Keiti Hieda

Dedico

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Ivaneide e Metom pelo amor incondicional e apoio nos momentos mais difíceis e aos meus irmãos Carlos e Tiago pelo carinho.

Ao meu companheiro de anos, Erik Keiti Hieda pelo amor, pela paciência e por todas as palavras de incentivo.

À Dra Mara Mercedes de Andréa, pela oportunidade, orientação e pelos conhecimentos a mim transmitidos, que serão levados ao longo da minha vida.

Aos pesquisadores do Laboratório de Ecologia de Agroquímicos (LEA): Dra. Deise Helena Baggio Ribeiro, pela contribuição na parte cromatográfica, Dr. Luiz Carlos Luchini e Eliane Vieira pelas sugestões nos experimentos.

Às amigas Thaís Salomão e Regina Cristina pela amizade sincera, apoio nos experimentos e principalmente pela ajuda na alimentação das minhocas.

Às amigas de mestrado Nancy, Amanda, Thaís Vampré e Priscila pelo companheirismo e amizade.

À amiga Lilian Babolin pelas palavras carinhosas, pela amizade sincera e apoio nos momentos de desânimo.

Ao amigo Angelo Stefani pelas risadas, pela amizade, carinho e apoio nos experimentos e parte escrita.

Aos funcionários do LEA, Sra. Leda e Sr. Manuel, pela colaboração nos experimentos. A Fernanda Carpanelli, funcionária da Pós-graduação e ao Sr. Walter da biblioteca, pelos serviços prestados.

Aos colegas da SUVIS Itaquera pela amizade.

Às minhas amigas de longa data, Verônica, Flaviane, Patrícia e Juliana pela amizade presente mesmo quando a distância nos separa.

À Dra. Solange Papini e Dr. George Brown pelas sugestões e conhecimentos compartilhados.

*"Quando tudo estiver escuro,
feche os olhos e acenda a luz
dos pensamentos."*

Tiago Sousa

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivos gerais	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. Dinâmica de agrotóxicos no ambiente.....	4
3.2. Testes ecotoxicológicos no Brasil	8
3.3. Inseticida cipermetrina	9
3.4. Minhocas como bioindicadores.....	11
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1. Solos.....	16
4.2. Determinação da capacidade máxima de retenção de água (CMRA)	17
4.3. Determinação da umidade dos solos	17
4.4. Minhocas	17
4.5. Cipermetrina.....	18
4.5.1. Curva de calibração de cipermetrina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	19
4.6. Teste de toxicidade em papel filtro	20
4.7. Testes de recuperação por extração do cipermetrina de tecido de minhocas	21
4.8. Testes de recuperação por extração do cipermetrina de solo	21
4.9. Bioacumulação de ¹⁴ C-cipermetrina em minhocas.....	22
4.10. Quantificação do radiocarbono nos extratos de tecido de minhoca e de solos.....	25
4.11. Determinação de ¹⁴ C-cipermetrina aplicado e de ¹⁴ C-resíduos não extraíveis ou ligados nos tecidos dos animais e solo.....	26
4.12. Quantificação do cipermetrina nos extratos de tecido de minhoca e de solos.....	26
4.13. Rejeição de minhocas ao cipermetrina grau técnico e cipermetrina pó molhável.....	26
4.14. Influência do cipermetrina sobre a reprodução de minhocas	28
4.15. Análise estatística.....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1. Pureza radioquímica do ¹⁴ C-cipermetrina.....	30
5.2. Curva de calibração do cipermetrina	30
5.3. Toxicidade em papel filtro	31
5.4. Recuperação do cipermetrina de tecido de minhocas.....	32

5.5. Recuperação de ¹⁴ C-cipermetrina de solo	33
5.6. Bioacumulação de cipermetrina em minhocas.....	33
5.7. Rejeição de minhocas ao cipermetrina	38
5.8. Influência do cipermetrina sobre a reprodução de minhocas	42
6. CONCLUSÕES	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

SOUSA, A.P.A. INFLUÊNCIA DE TRÊS TIPOS DE SOLOS SOBRE O EFEITO DO INSETICIDA CIPERMETRINA EM MINHOCAS *Eisenia andrei*. São Paulo. 2010. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

RESUMO

Por ser eficiente no controle de insetos, persistir relativamente pouco no ambiente e ser pouco tóxico para animais, o inseticida cipermetrina tem sido amplamente utilizado na agricultura e em campanhas de saúde pública. Mas, seus resíduos podem contaminar solos e entrar em contato com organismos edáficos, cujas atividades são benéficas para manutenção das boas condições físicas e químicas do solo para crescimento de plantas. Esse trabalho utilizou minhocas da espécie *Eisenia andrei* como bioindicadores da influência das propriedades de três solos (Latossolo Vermelho Distrófico Típico – LV; Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico - PV e Gleissolo Melânico Alumínico Típico - GM) recomendados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) para testes de ecotoxicidade, sobre a bioacumulação, a rejeição e os efeitos do cipermetrina sobre as minhocas. O Fator de Bioacumulação (FBA) foi determinado após exposição de minhocas aos solos tratados com ^{14}C -cipermetrina durante 14 dias. Amostras dos solos e as minhocas foram extraídas com solventes orgânicos e a quantificação dos resíduos de ^{14}C -cipermetrina foi feita por técnicas radiométricas e analíticas convencionais. A rejeição das minhocas foi verificada 48 horas após sua colocação em amostras dos solos tratados com diferentes concentrações do cipermetrina grau técnico ou da formulação do cipermetrina em pó molhável. A influência do inseticida sobre a reprodução das minhocas foi avaliada pela contagem de indivíduos juvenis 56 dias após colocação dos espécimes adultos nos solos tratados. A quantidade de ^{14}C -radiocarbono extraível (máximo de 18%) não foi significativamente diferente entre os solos e também ^{14}C -resíduos ligados se formaram nos solos (de 32% a 41%) e nas minhocas (de 15% a 24%). Os FBA de cipermetrina nas minhocas foram muito próximos, isto é, $3,73 \pm 0,37$ em LV; $3,52 \pm 1,09$ em PV e $2,11 \pm 0,73$ em GM. Não se verificou degradação do cipermetrina e o teste

de toxicidade por contato com papel de filtro contendo cipermetrina formulado provocou hemorragia nas minhocas, demonstrando claramente a influência da formulação e a importância de se incluir as formulações nos estudos. Como as minhocas acumularam o cipermetrina, verifica-se o perigo da presença dos resíduos do cipermetrina no solo para os organismos e a teia alimentar edáfica. Mas, as diferentes propriedades desses solos não determinaram diferentes valores de FBA e, por isso, este teste pode não ser apropriado, nem indicado como novo teste ecotoxicológico a ser requerido. Rejeição das minhocas aos solos com cipermetrina foi detectada tanto por tratamento com o inseticida grau técnico, quanto com o formulado, indicando que os solos com as características selecionadas pelo IBAMA para testes ecotoxicológicos podem ser utilizados também em testes de rejeição de minhocas *E. andrei* a agrotóxicos. Entretanto, a influência do cipermetrina sobre a reprodução das minhocas nos três tipos de solo não foi conclusiva, pois o ensaio de reprodução resultou em um número bem abaixo do recomendado de juvenis nas condições-controle.

Palavras-chave: bioacumulação, rejeição, reprodução, características de solos, testes ecotoxicológicos, formulação.

SOUSA, A.P.A. INFLUENCE OF THREE TYPES OF SOILS ON THE EFFECT OF THE INSECTICIDE CYPERMETHRIN IN EARTHWORMS *Eisenia andrei*. São Paulo. 2010. Dissertation (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico.

ABSTRACT

Because cypermethrin is efficient in controlling insects, has relatively low environmental persistence and is little toxic to animals, it has been widely used in agriculture and public health campaigns. Its residues, however, can contaminate soils and affect soil organisms, which activities support the good physical and chemical soil conditions for growing plants. This study used the earthworms *Eisenia andrei* as bioindicators of the different properties of the three soils (Typic Hapludox - LV, Mollic Hapludalf - PV and Typic Humaquept - GM) recommended by the Brazilian Institute of Environment and Natural Resources (IBAMA) for ecotoxicity tests, on the bioaccumulation, rejection and effects of cypermethrin in the earthworms. The Bioaccumulation Factor (BFA) was determined exposure of the earthworms *E. andrei* to the soils treated with ¹⁴C-cypermethrin during 14 days. Soil samples and the earthworms were extracted with organic solvents and the ¹⁴C-cypermethrin residues were quantified by radiometric and conventional techniques. The compost worms' rejection was verified 48 hours after their placement in the soil samples treated with different concentrations of the technical grade or cypermethrin formulated as wettable powder. The influence of the insecticide on the earthworms reproduction was assessed by the number of juvenile specimens present 56 days after the placement of the adult specimens in the treated soils. The amount of ¹⁴C-extractable residues (maximum of 18%) was not significantly different among the soils, and besides ¹⁴C-bound residues were also detected in the soils (from 32% to 41%) and earthworms (from 15% to 24%). The BFA values were very close, i. e, 3.73 ± 0.37 in LV, 3.52 ± 1.09 PV and 2.11 ± 0.73 in GM. No degradation products were found, and the acute toxicity test by contact with filter paper treated with formulated cypermethrin caused hemorrhage in the earthworms, clearly demonstrating the influence and

the importance of studying the effect pesticide formulations. The earthworms accumulated the insecticide, indicating the risk of the cypermethrin soil residues to the organisms and the soil food web. The different soil properties did not determine different BFA values, and thus, this test may neither be appropriate, nor be indicated as a newly required ecotoxicological test. The earthworms rejected the soils with the technical grade and formulated cypermethrin, indicating that the soils with the characteristics indicated by IBAMA to the ecotoxicological tests may also be utilized in avoidance tests for pesticide with *E. andrei*. The reproduction assay of cypermethrin on the earthworms was not conclusive since it resulted in a number of juveniles lower than the recommended in the untreated-soil conditions, therefore requiring further investigations.

Keywords: bioaccumulation, avoidance, reproduction, soil characteristics, ecotoxicological tests, formulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Minhocário do Laboratório de Ecologia de Agroquímicos do Instituto Biológico	18
Figura 2. Fórmula estrutural do cipermetrina.....	18
Figura 3. Cromatograma típico do cipermetrina grau técnico	19
Figura 4. Teste de toxicidade em papel filtro	20
Figura 5. Extração de cipermetrina de tecido de minhoca por meio de energia de micro-ondas	21
Figura 6. Diagrama esquemático do estudo de bioacumulação.....	23
Figura 7. Bioacumulação de ¹⁴ C-cipermetrina em minhocas.....	25
Figura 8. Câmaras utilizadas no estudo de rejeição.....	27
Figura 9. Diagrama esquemático dos tratamentos realizados no estudo de rejeição	27
Figura 10. Colocação das minhocas e vedação das câmaras do estudo de rejeição.....	28
Figura 11. Curva de diferentes concentrações de cipermetrina por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE.	30
Figura 12. Toxicidade aguda de formulação de cipermetrina para minhocas <i>Eisenia andrei</i> .	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais características físicas e químicas dos solos	16
Tabela 2. Recuperação de ¹⁴ C-cipermetrina dos tecidos de minhocas por diferentes condições de extração por energia de micro-ondas.....	32
Tabela 3. Recuperação de ¹⁴ C-cipermetrina por diferentes métodos de extração de amostras de solo	33
Tabela 4. Peso total dos cinco espécimes de minhocas <i>Eisenia andrei</i> no início e término do estudo de bioacumulação	34
Tabela 5. Radiocarbono recuperado de solos e de minhocas <i>Eisenia andrei</i> após 14 dias de contato com solos tratados com ¹⁴ C-cipermetrina.....	36
Tabela 6. Distribuição do radiocarbono nas minhocas <i>Eisenia andrei</i> e no solos e fatores de bioacumulação de ¹⁴ C-cipermetrina (FBA)	38
Tabela 7. Rejeição de minhocas aos solos PV, LV e GM tratados com diferentes concentrações de cipermetrina grau técnico	40
Tabela 8. Rejeição de minhocas aos solos PV, LV e GM tratados com diferentes concentrações de cipermetrina formulado como pó molhável	41
Tabela 9. Número de espécimes de juvenis de minhocas <i>Eisenia andrei</i> detectados nos solos PV, GM e LV com e sem tratamento de cipermetrina	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	-	Associação Brasileira de Normas Técnicas
BCG	-	British Columbia Government
CCD	-	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	-	Cromatografia Líquida de Alta eficiência
CMRA	-	Capacidade Máxima de Retenção de Água
Cs	-	Concentração de ¹⁴ C nos solos
Ctm	-	Concentração de ¹⁴ C nos tecidos de minhocas
Cu	-	Cobre
ECL	-	Espectrometria de Cintilação em Líquido
EMBRAPA	-	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPA	-	Environmental Protection Agency
EXTOXNET	-	Extension Toxicology Network
FBA	-	Fator de Bioacumulação
GM	-	Gleissolo Melânico Alumínico Típico
IBAMA	-	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ISO	-	International Organization for Standardization
LV	-	Latosolo Vermelho Distrófico Típico
MO	-	Matéria Orgânica
OECD	-	Organização de Cooperação e Desenvolvimento Económico
PV	-	Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico
USEPA	-	United States Environmental Protection Agency
Zn	-	Zinco

1. INTRODUÇÃO

O crescimento contínuo da população causa preocupação em relação às quantidades de alimento produzidas pela agricultura e as perdas causadas por ataques de pragas e doenças. Nos últimos 60 anos a diminuição das perdas ocorreu, entre outros fatores, por influência da aplicação de agrotóxicos como método dominante para controle de pragas e doenças (YUDELMAN; RATTÀ; NYGAARD, 1998). Além de sua utilização na agricultura, os agrotóxicos também são utilizados em campanhas de saúde pública, para controle de vetores e hospedeiros de agentes causadores de doenças como, por exemplo: dengue, febre amarela, malária, doença de Chagas, leishmaniose e esquistossomose (SUCEN, 2009).

Os agrotóxicos podem ser classificados pela sua finalidade, modo de ação, persistência, deslocamento, duração do efeito do tratamento, toxicidade, origem e grupo químico. Quimicamente são classificados como organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides, entre outros. Os organoclorados constituem o grupo pioneiro de agrotóxicos sintéticos, porém devido à sua alta persistência no ambiente – alguns são detectados por mais de 30 anos no solo - e a acumulação nas cadeias alimentares, o uso da grande maioria dos agrotóxicos organoclorados foi proibido em muitos países (RISSATO et al., 2004). Desenvolvidos na década de 40, os organofosforados foram os primeiros a substituírem os organoclorados, devido ao baixo custo, à síntese fácil (SANTOS et al., 2007) e por serem quimicamente instáveis, degradando-se mais rapidamente do que os organoclorados (FARIA, 2009). Já os agrotóxicos do grupo dos carbamatos começaram a ser comercializados por volta de 1950, mas, de modo geral, apresentam pequeno espectro de atividade inseticida (CASIDA; QUISTAD, 1998). Os agrotóxicos piretróides foram desenvolvidos nos anos 70 com a finalidade de substituir os organofosforados, devido a alta toxicidade para seres humanos e animais e os organoclorados devido aos problemas relacionados com o alto poder residual (ALMEIDA, 1994). Além disso, e segundo Vijverberg e Bercken (1990) devido à eficiência dos piretróides, que determina a necessidade de uso de menores quantidades de princípio ativo, podendo resultar em menor contaminação dos aplicadores e do ambiente, eles têm sido frequentemente empregados na área da saúde, para controle de pragas urbanas, além de seu uso na agricultura. Entre os piretróides, o inseticida cipermetrina é utilizado tanto na agricultura como em saúde pública, por ser eficaz no controle de insetos, ter persistência moderada no ambiente, isto é, tipicamente ao redor de 30 dias (USEPA, 2006) e ser pouco tóxico para aves e mamíferos (COLLINS; CAPPELLO, 2005; RASCH et al., 2003).

Apesar das vantagens que agrotóxicos como o cipermetrina apresentam, seu uso constante e incorreto pode resultar em contaminação do ambiente, principalmente do solo

como local onde os resíduos das aplicações podem ser depositados, e nele entrar em contato com os organismos edáficos, entre eles as minhocas (SPADOTTO et al., 2004). As minhocas merecem destaque, pois devido ao seu nicho ecológico são importantes para a fertilidade do solo, porque ao se alimentarem, ajudam na decomposição da matéria orgânica e na ciclagem dos nutrientes (RIGHI, 1997; SHIPITALO; BAYON, 2004). Elas também são importantes porque auxiliam na manutenção da estrutura do solo devido à sua constante atividade de escavação, por meio da qual revolvem, misturam e agregam as partículas, além de atuarem na drenagem e aeração do solo (BROWN; DOUBE, 2004; REINECKE; REINECKE, 2007).

Além disso, segundo Andréa (2008) as minhocas têm sido usadas como bioindicadores de poluição do ambiente edáfico porque exibem alterações em resposta à contaminação, são facilmente encontradas no solo, não morrem sob efeito de doses subletais do contaminante e estão na base de teias alimentares, podendo servir de alimento para outros organismos. Além de ficarem em contato direto com os contaminantes ali presentes e ingerí-los junto com as partículas do solo, segundo Reinecke e Reinecke (2007) algumas espécies de minhocas podem sentir a presença de produtos químicos por meio de receptores existentes na superfície do seu corpo.

Minhocas das espécies *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) e *Eisenia andrei* (Bouché, 1972) têm sido utilizadas em avaliações do potencial tóxico de contaminantes (OECD, 1984; PAPINI, 2003; XIAO et al., 2006, entre outros), principalmente por causa da relativa facilidade de criação dessas espécies em condições controladas de laboratório e sua rápida taxa de reprodução. Para avaliação da toxicidade de agrotóxicos, primeiramente se fazem os testes de toxicidade aguda como ferramenta de triagem inicial; mas, para detectar efeitos adversos gerados pela exposição de minhocas a contaminantes em doses sub-letais, os testes que envolvem observação de mudanças comportamentais são mais indicados (WEEKS; COMBER, 2005). Entre estes, os testes de rejeição, por exemplo, têm sido utilizados como uma ferramenta valiosa para avaliação da presença de resíduos em solos contaminados (YEARLEY et al., 1996; SCHAEFER, 2003). Bioensaios que avaliam os efeitos de contaminantes sobre os parâmetros de reprodução também são utilizados e têm se mostrado sensíveis (SOUSA et al., 2008).

No entanto, estes ensaios são realizados com solos artificiais (OECD, 1984) e, como as características dos solos têm influência no destino e na disponibilidade dos agrotóxicos para os organismos (SPADOTTO et al. 2004), para melhor compreensão das possibilidades de contaminação em ambientes reais, faz-se necessário realizar estes testes com solos naturais.

Paralelamente, necessita-se de técnicas precisas para detecção das quantidades de agrotóxicos que provocam efeitos negativos ou que permanecem nos diferentes

compartimentos do ecossistema. Segundo Andréa (1992), procedimentos analíticos que permitem a detecção precisa da substância em estudo, como por exemplo, a utilização de compostos radiomarcados com Carbono-14, permitem a detecção de quantidades mínimas de resíduos de agrotóxicos e facilitam o rastreamento da molécula ou de seus metabólitos nos compartimentos ambientais. Desta forma, a utilização da técnica com radiotraçador além de mostrar com muita precisão a eficiência dos procedimentos de extração da molécula das matrizes ambientais, permite elaborar um julgamento preciso a respeito do comportamento destas substâncias no ambiente. Por todas essas vantagens, o presente estudo utilizou ^{14}C -cipermetrina no estudo de bioacumulação.

Com o intuito de aprofundar o conhecimento sobre as interações dos agrotóxicos com o ambiente, este trabalho foi feito com minhocas, como bioindicadores da influência das propriedades dos solos sobre o efeito de cipermetrina. Os solos escolhidos para tratamento com o inseticida foram os três tipos de solo indicados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 1996) para testes de biodegradabilidade de agrotóxicos. Os solos foram estudados quanto à influência de suas características sobre a bioacumulação de ^{14}C -cipermetrina em minhocas *Eisenia andrei* por meio de técnicas radiométricas e analíticas convencionais. A influência dos tipos de solos também foi avaliada quanto à rejeição e à reprodução dessas minhocas aos solos tratados com o inseticida cipermetrina.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Verificar a influência das características de diferentes tipos de solos sobre a bioacumulação do inseticida ^{14}C -cipermetrina em minhocas *Eisenia andrei*, e sobre a reprodução e a rejeição de minhocas a solos tratados com cipermetrina.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar a faixa de concentração do inseticida cipermetrina que exerce ação tóxica para minhocas da espécie *E. andrei*.
- Determinar o fator de bioacumulação (FBA) de cipermetrina em minhocas a partir de solos com as características dos três solos recomendados pelo Instituto Brasileiro do Meio

Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) tratados com ^{14}C -cipermetrina.

- Determinar a rejeição de minhocas *E. andrei* aos diferentes solos tratados com diferentes concentrações de cipermetrina.
- Determinar a influência das características dos três tipos de solo sobre o efeito do cipermetrina na reprodução de minhocas.
- Comparar o conjunto dos resultados de bioindicação nos diferentes solos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Dinâmica de agrotóxicos no ambiente

Segundo a Lei Federal 7.802, de 11 de julho de 1989 (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”. Eles são liberados em diferentes ambientes, mas como seu principal uso é na agricultura, são aplicados principalmente sobre plantações ou no solo de regiões agrícolas. Entretanto, muitos desses produtos também têm sido utilizados em campanhas de saúde pública, para controle de vetores e hospedeiros de agentes causadores de doenças como, por exemplo, dengue, febre amarela, malária, doença de Chagas, leishmaniose e esquistossomose (SUCEN, 2009). Assim, os agrotóxicos são substâncias usadas para controlar o crescimento de organismos sem interesse econômico, eliminar os fitoparasitas e fitopredadores que competem por recursos do ambiente com os organismos de interesse, como as plantas cultivadas (SPADOTTO et al., 2004).

Ao serem liberados no ambiente, os agrotóxicos podem passar por processos de retenção, transformação e transporte que irão determinar o seu destino (LUCHINI; ANDRÉA, 2002). O comportamento da substância também dependerá das interações de suas propriedades físicas e químicas com os vários parâmetros ambientais, tais como: condições geográficas e climáticas, composição e atividade de micro-organismos do solo,

características físicas e químicas do solo e a presença ou ausência de plantas (SPADOTTO et al., 2004).

Ao mesmo tempo em que o solo é o suporte para a agricultura, onde as plantas crescem e, por isso, é onde os agrotóxicos são aplicados ou têm seu destino final após aplicações nas culturas, ele é um sistema dinâmico e complexo, que funciona como habitat para micro-organismos e vários organismos da flora e da fauna (ANDRÉA, 1998; SPADOTTO et al., 2004; SOUSA, 2008). E esses organismos dependem diretamente do solo como fonte de alimento e como suporte para seu desenvolvimento e crescimento; outros, como os micro-organismos, atuam no meio edáfico liberando e reciclando os diferentes nutrientes que ficarão disponíveis para outros micro e macro-organismos. Ainda de acordo com Spadotto et al. (2004), dada à estreita relação entre os ambientes, verifica-se que a contaminação de solos pode influenciar diretamente na contaminação de águas superficiais e subterrâneas, e causar efeitos negativos em organismos terrestres e aquáticos, que podem chegar a intoxicar até a população humana, por meio do consumo de água e alimentos contaminados. De acordo com Luchini e Andréa (2002), esta contaminação pode ocorrer porque, dentre os processos de transporte com os quais os agrotóxicos estão relacionados depois de aplicados no ambiente, a lixiviação de resíduos que estão na solução aquosa que percola através do perfil do solo pode causar a contaminação de águas subterrâneas. O carreamento de resíduos de agrotóxicos na superfície do solo por ação da água após chuva ou rega também merece destaque porque favorece a contaminação das águas superficiais de rios e lagos, pois os agrotóxicos podem ser levados adsorvidos às partículas do solo erodido ou em solução na água de escoamento. A quantidade do agrotóxico levado pelo carreamento superficial depende de fatores como declive do terreno, textura e teor de umidade do solo (BCG, 2009); mas, como o transporte de resíduos dos agrotóxicos se dá pela água, tanto a lixiviação quanto o carreamento superficial serão maiores, quanto mais hidrossolúvel for o agrotóxico, e em solos arenosos porque as partículas arenosas não adsorvem fortemente as moléculas de agrotóxicos (LUCHINI; ANDRÉA, 2002).

Ainda segundo Luchini e Andréa (2002), o transporte para a atmosfera por volatilização e a perda para áreas vizinhas por deriva também podem representar processos importantes de deslocamento de agrotóxicos no ambiente. Mas, a volatilização de agrotóxicos depende principalmente das características da molécula, que determinam se o composto é facilmente transformado em gás e transportado para fora da área tratada por correntes de ar. Por outro lado, o processo de volatilização depende também da interação da molécula com as partículas do solo, como por exemplo, da quantidade de argila e de matéria orgânica do solo, pois ambas têm muitos sítios de ligação que podem adsorver as moléculas de agrotóxicos. Assim, os agrotóxicos estão sujeitos à menor volatilidade e outros

tipos de transporte que representem perdas, a partir de solos ricos em matéria orgânica por causa da grande capacidade de adsorção dos produtos químicos às partículas de matéria orgânica do solo (SPADOTTO et al., 2004).

Desta forma, verifica-se que os resíduos de agrotóxicos podem interagir com as fases sólida, líquida e gasosa do solo, mas também com sua microbiota. Segundo Andréa (1998), a biodegradação representa o principal processo de degradação de agrotóxicos no solo. A grande variedade de micro-organismos ali presentes é capaz de biodegradar agrotóxicos até produtos mais simples, que podem entrar nos ciclos biogeoquímicos da natureza. Essa degradação se dá principalmente por meio das enzimas que micro-organismos têm ou produzem para utilização da molécula nos seus processos metabólicos. Assim, fatores ambientais, tais como temperatura, conteúdo de matéria orgânica, acidez, umidade e tipo de solo, que influenciam a atividade microbiana, influenciam também as taxas de degradação dos agrotóxicos.

Como consequência das interações com o meio, o composto pode se transformar em metabólitos mais ou menos tóxicos, ou também mais persistentes do que o produto original. De qualquer forma, todos esses processos de dissipação dos agrotóxicos no solo dependem tanto das características do próprio solo, como das características físicas e químicas das substâncias. Por exemplo, moléculas de peso molecular muito alto, moléculas com elementos halógenos, principalmente o Cloro, e/ou com anéis aromáticos altamente condensados são mais persistentes, principalmente porque essas ligações químicas são mais estáveis e são mais difíceis de serem rompidas, até mesmo pela atividade dos micro-organismos (ANDRÉA, 1998; LUCHINI; ANDRÉA, 2002).

Segundo Miyamoto (1996), além da degradação biótica, as substâncias químicas também podem ser degradadas por ações abióticas, como hidrólise e fotólise. Fotólise pode ocorrer quando agrotóxicos aplicados sobre a folhagem, por exemplo, têm sua estabilidade comprometida pela exposição à luz solar. Por outro lado, a hidrólise pode ocorrer sempre que houver água no meio e a molécula for suscetível à quebra pela presença de água (MIYAMOTO, 1996). Mas, a incorporação do agrotóxico ao solo por métodos mecânicos durante ou após a aplicação, ou a irrigação do solo com água por rega ou chuva após a aplicação, podem reduzir a exposição do agrotóxico à luz solar e, por isso, a fotólise no solo é insignificante.

Além desses processos que afetam o destino dos agrotóxicos, outros fatores, como as diferenças nas estruturas e propriedades químicas das moléculas, as características dos solos, as condições climáticas, a composição da microbiota, a presença ou a ausência de plantas e a quantidade de água que se move no perfil do solo, também podem afetar significativamente sua persistência no ambiente edáfico (LOPES et al., 2002). Segundo Kerle; Jenkins e Vogue (2007), a persistência do agrotóxico no ambiente é expressa pela

sua meia-vida, isto é, o período de tempo necessário para degradar a metade da quantidade inicialmente aplicada no ambiente. Com base na meia-vida dos agrotóxicos, eles podem ser divididos em três categorias: não persistentes com meia-vida no solo de menos de 30 dias; moderadamente persistentes, com meia-vida no solo de 30 a 100 dias, ou persistentes, com meia-vida de mais de 100 dias (KERLE; JENKINS; VOGUE, 2007).

A classificação da molécula nestas categorias é feita a partir de resultados de inúmeros estudos e protocolos, como por exemplo, estudos de permanência e degradação das moléculas em solos e águas (EXTOXNET, 2010) e também a partir de testes de comportamento das moléculas no solo, que são solicitados pelos órgãos ambientais (TALLUR; MEGADI; NINNEKAR, 2008; SINGH; SINGH, 2004; WEBER; WIKERSON; REINHARDT, 2004). Os protocolos de avaliação da periculosidade de agrotóxicos no solo se referem à biodegradabilidade da molécula pela microbiota edáfica (OECD, 1981); aos efeitos do agrotóxico na transformação de Nitrogênio e de Carbono do solo (OECD, 2000 a, b) e também sobre o efeito desses compostos em organismos da macrofauna, como por exemplo, as minhocas (OECD, 1984; EPA, 1999; OECD, 2004; ISO, 2007).

Esses estudos e avaliações são feitos no solo porque, dentre os compartimentos ambientais, o solo é o ambiente mais importante para a agricultura e é também um dos ambientes mais ricos da natureza, graças às reações de decomposição de resíduos de plantas e de ciclagem de nutrientes que são efetuadas principalmente por micro-organismos e por organismos da macro-fauna, como as minhocas (ANDRÉA, 2008). Ainda de acordo com Andréa (2008), como as minhocas exercem importante função na decomposição de resíduos orgânicos; na ciclagem de nutrientes da matéria orgânica e no melhoramento da estrutura, fertilidade, porosidade e capacidade de infiltração, drenagem e retenção de água, ar e também no transporte de micro-organismos e nutrientes do solo por meio dos canais formados por sua escavação e seus deslocamentos, elas têm sido usadas como bioindicadores de contaminação do ambiente edáfico. Por meio de seus deslocamentos e de ingestão de solo ou de serapilheira contaminados, as minhocas entram em contato com poluentes que atingem ou são aplicados no solo e nele podem permanecer adsorvidos nas partículas minerais, na matéria orgânica e na solução do solo. Elas podem ainda se expor e absorver os contaminantes da solução do solo por meio de contato direto e passagem pela cutícula de seu corpo. A partir desse contato, as minhocas podem se intoxicar, morrer, ou sobreviver, incorporar e até bioacumular esses poluentes em seus tecidos.

Dada a importância da resposta das minhocas, com o objetivo de manter uniformidade de obtenção de resultados entre laboratórios e se fazer comparações dos resultados obtidos nos ensaios com diferentes espécies, Reinecke (1992) recomendou que os testes de ecotoxicidade usassem solos artificiais, com características específicas e possíveis de serem reproduzidas em todos os laboratórios. Entretanto, doze anos depois,

Van Gestel e Weeks (2004) recomendaram a utilização de solos naturais porque, segundo esses autores, os resultados obtidos com solo artificial não poderiam ser traduzidos diretamente para o ambiente natural. Desta forma, compreender a influência de diferentes características dos solos, a forma como elas interagem com os agrotóxicos e como essas características influenciam na toxicidade para os organismos edáficos ajuda na extrapolação das respostas possíveis de acontecer em ambientes reais (AMORIM et al., 2002).

Verifica-se então que, a interação dos agentes físicos, químicos e biológicos do ambiente com resíduos de agrotóxicos pode causar a transformação e a degradação das moléculas, e a compreensão das possibilidades de comportamento de substâncias tóxicas sob diferentes condições do ambiente tem sido considerada essencial para previsões dos possíveis efeitos adversos da aplicação de agrotóxicos e de como eles podem ser minimizados (LUCHINI; ANDRÉA, 2002).

3.2. Testes ecotoxicológicos no Brasil

No Brasil os ensaios de avaliação da ecotoxicidade para organismos não-alvo são requeridos pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis do Ministério do Meio Ambiente – IBAMA, para registro e comercialização das moléculas de agrotóxicos e utilizam algas, micro-organismos, minhocas, abelhas, microcrustáceos, peixes e aves (IBAMA, 1996). Mas, com organismo especificamente do solo, somente o teste de toxicidade aguda para minhocas *Eisenia fetida* já foi normatizado no país, pela Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT (ABNT, 2007). Os outros testes exigidos para o registro e a comercialização das moléculas de agrotóxicos aceitam os procedimentos de protocolos da Organização Internacional para Padronização (ISO - *International Organization for Standardization*), da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD - *Organization for Economic Co-operation and Development*) e da Agência Americana de Proteção do Ambiente (EPA - *Environmental Protection Agency*).

De acordo com Luo et al. (1999), os estudos de ecotoxicidade com organismos do solo são feitos para avaliar a toxicidade de poluentes ambientais e os possíveis riscos sobre os ecossistemas terrestres. O protocolo do teste de toxicidade aguda em minhocas (ABNT, 2007) dá a receita do solo artificial a ser usado e não utiliza solos naturais. Por outro lado, a Portaria Normativa nº 84 do IBAMA (IBAMA, 1996) estabelece os tipos de solos naturais que devem ser utilizados nos estudos ecotoxicológicos sobre comportamento das moléculas de agrotóxicos no solo. Foram escolhidos três tipos de solos naturais cujas diferenças residem principalmente no conteúdo de argila e no conteúdo de matéria orgânica. Mas, exige-se que eles sejam usados apenas nos testes de biodegradabilidade imediata, biodegradabilidade

em solos, teste para avaliação da mobilidade no solo e teste para avaliação da adsorção / dessorção do agrotóxico no solo.

3.3. Inseticida cipermetrina

Entre os princípios ativos muito utilizados atualmente como agrotóxicos, encontram-se os piretróides, que são substâncias sintéticas similares às piretrinas produzidas por algumas plantas do gênero *Chrysanthemum*, conhecidas como Crisântemo (VIJVERBERG; BERCKEN, 1990). De acordo com Galera et al. (1996), essas piretrinas naturais são compostos com atividade inseticida e têm sido utilizadas para controle de insetos desde a descoberta da sua atividade inseticida no século passado. Mas, a partir da década de 70, começaram a ser produzidos os piretróides sintéticos, com moléculas análogas aos componentes obtidos a partir da planta, mas algumas vezes, muito mais tóxicos (GALERA et al., 1996).

Segundo Saha e Kaviraj (2008) e Liu et al. (2008) os piretróides sintéticos têm substituído os compostos organoclorados, organofosforados e carbamatos, devido a sua alta eficiência de controle de insetos, sendo necessárias menores quantidades de princípio ativo para controle de pragas. Além disso, têm sido considerados melhores do que aqueles compostos, pois de modo geral, apresentam curta persistência no ambiente e baixa toxicidade para aves e mamíferos (OVIEDO; TOLEDO; VICENTE, 2003). Mas, por outro lado, segundo Borges et al. (2007), os piretróides são extremamente tóxicos para os peixes devido à baixa capacidade desses animais de metabolizar estes compostos.

Entre os piretróides sintéticos comercializados, o cipermetrina é um inseticida que está disponível em várias formulações, por exemplo, como concentrado emulsionável ou pó molhável (JONES, 1991). Segundo o órgão de proteção ambiental dos Estados Unidos (EPA, 2006) e a Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN (SUCEN, 2009), o cipermetrina é usado em volta de edificações e em gramados, principalmente para controle de pragas urbanas como baratas, escorpiões, moscas e mosquitos. Mas também é utilizado na agricultura em várias culturas, inclusive verduras e frutas, como por exemplo, em: algodão, amendoim, arroz, batata, café, cebola, ervilha, feijão, fumo, melancia, milho, soja, tomate, etc. Ele é classificado como moderadamente tóxico, age por contato e ingestão, e apresenta uma DL₅₀ (concentração necessária para matar 50% de um grupo de organismos-teste) aguda oral para ratos maior que 247 mg/kg de peso corpóreo do animal (JONES, 1991). Além disso, segundo Kaufman et al. (1981) e Worthing e Hance (1991), o cipermetrina é pouco solúvel em água (apenas de 0,01 a 0,2 mg L⁻¹ a 20°C), mas é bastante solúvel em acetona (> 450 g L⁻¹), hexano, etanol e outros solventes, além de não ser

facilmente volatilizado por ter uma pressão de vapor muito baixa $1,3 \times 10^{-9}$ mm Hg (a 20°C). Segundo a EPA (2006), ele é rapidamente adsorvido às partículas do solo, movendo-se pouco através do perfil do solo.

Entretanto, fatores do solo podem influenciar o comportamento do cipermetrina, pois conforme observado por Chapman et al. (1981), a persistência do cipermetrina em solos aumentou quanto maior o conteúdo de matéria orgânica, quanto menor a atividade da microbiota dos solos e em condições anaeróbicas. Em solos arenosos o inseticida foi relativamente pouco persistente, com meia-vida de 2 a 4 semanas. Assim, além de ser hidrofóbico, o cipermetrina é fortemente adsorvido à fase sólida do solo (MAUND et al., 2002) e, com isso, os organismos associados ao solo ou a sedimentos ficam expostos aos resíduos adsorvidos e podem se contaminar ou mesmo bioacumulá-los em seus tecidos (AMORIM, 2002; HARTNIK; SVERDRUP; JENSEN, 2008).

Segundo Zhu, Wang e Xu (1999) e Garg et al. (2004), apesar do cipermetrina ser menos tóxico para mamíferos do que inseticidas organoclorados e organofosforados, ele pode ser prejudicial para alguns animais como aves, abelhas e organismos aquáticos. Já se observou importante efeito indireto do cipermetrina em população de pássaros *Parus caeruleus* em florestas, pois as aves foram prejudicadas pela morte de larvas de insetos que lhes serviriam de alimento, além disso, observaram-se também efeitos diretos do cipermetrina sobre esses pássaros, relacionados com a diminuição na proporção de ninhos efetuados, aumento na morte dos filhotes e diminuição do peso dos filhotes sobreviventes (PASCUAL; PERIS, 1992). Além do cipermetrina ser altamente tóxico por contato para abelhas, com DL₅₀ de 0,023 a 0,56 µg/abelha (EPA 2006), verificou-se que mesmo seus resíduos na superfície das folhas mataram 25% das abelhas testadas e por mais de três dias após o tratamento (TAYLOR; WALLER; CROWDER, 1987).

O efeito de concentrações de 0,1 a 0,6 mg L⁻¹ de cipermetrina em água produziram efeitos tóxicos como hiperatividade, perda de equilíbrio, natação extremamente rápida e convulsões em peixes da espécie *Channa punctatus* (KUMAR; SHARMA; PANDEY, 2007), sendo que esses efeitos foram associados à alta lipossolubilidade do cipermetrina, possibilitando maior permanência do inseticida nos tecidos gordurosos dos animais, podendo desencadear reações no sistema nervoso desses peixes (SIEGFRIED, 1993).

Collins e Capello (2005) relataram efeito negativo do cipermetrina sobre os processos de crescimento e de muda do camarão de água doce *Palaemonetes argentinus*, além de 100% de mortalidade após 50 dias de contato com soluções de apenas 0,0001, 0,001 e 0,01 µg L⁻¹ de cipermetrina.

Entre organismos não-alvo, Li et al. (2005) verificaram que algas *Scenedesmus obliquus* expostas a soluções de 50 a 250 mg L⁻¹ de cipermetrina tiveram inibição de crescimento e das atividades metabólicas quanto maior a concentração do inseticida na

solução. Ainda entre os organismos não-alvo, segundo a EPA (2006), o cipermetrina é muito tóxico por contato para minhocas (LC_{50} aguda = 26,09 g/cm² de papel de filtro). Isto significa que o cipermetrina pode afetar as espécies terrestres não-alvo e prejudicar as relações dinâmicas entre os organismos do solo. Já em 1984, Inglesfield avaliou a toxicidade de cipermetrina à minhoca *E. fetida* em condições de laboratório (INGLESFIELD, 1984), tendo detectado que não ocorreu mortalidade aos 7 ou aos 14 dias após tratamentos com 0,1, 1,0, 10 e 100 mg de cipermetrina kg⁻¹ de solo. A ausência de toxicidade foi atribuída à possível adsorção do cipermetrina às partículas do solo, tornando-o menos disponível. Mais recentemente, Zhou et al. (2008) verificaram que o cipermetrina foi menos tóxico aos adultos do que aos espécimes juvenis de minhocas da espécie *E. andrei*. As minhocas juvenis tiveram redução no crescimento, desenvolvimento mais lento e reprodução mais tardia. Os mesmos autores observaram, entretanto, que a resposta de rejeição foi similar entre as minhocas adultas e os juvenis, mas a rejeição deve ser mais significativa nas minhocas adultas porque elas podem se mover e fugir mais facilmente do solo contaminado. Este tipo de observação é importante, pois indica os possíveis efeitos de agrotóxicos nos diferentes aspectos e estágios de vida dos organismos.

Hartnik, Sverdrup e Jensen (2008) também verificaram a toxicidade de alfa-cipermetrina, não só às minhocas *E. fetida*, como também para o oligoqueta *Enchytraeus crypticus*, o colêmbolo *Folsomia candida* e o molusco *Helix aspersa*. Os estudos foram conduzidos em solos naturais tratados com diferentes concentrações de alfa-cipermetrina e verificou-se LC_{50} de 31,4 e 762 mg / kg, respectivamente para *E. crypticus* e *E. fetida*. Em relação ao efeito do cipermetrina sobre a reprodução, verificou-se sensibilidade de *E. crypticus* > minhocas > colêmbolos, sendo que o molusco foi pouco sensível. Desta forma, verifica-se que o cipermetrina pode provocar diferentes efeitos sobre diferentes organismos.

De acordo com os exemplos citados, percebe-se que a presença de agentes químicos no solo pode influenciar a fauna ali presente. Entre as possíveis influências cita-se o comportamento de rejeição dos organismos edáficos como um indicador do potencial de estresse do solo tratado ou contaminado (EDWARDS; COULSON, 1992; HUND-RINKE; WIECHERING, 2001).

3.4. Minhocas como bioindicadores

Os bioindicadores podem ser definidos como espécies ou conjunto de espécies que, se bem adaptados às características específicas do local em que vivem, reagem aos impactos e mudanças ambientais (PAOLETTI, 1999) e, apesar de não morrerem por essas alterações do ambiente, respondem a elas por meio de reações comportamentais ou

metabólicas mensuráveis, que indicam e refletem alguma mudança no ambiente onde eles vivem (BURGER, 2006; ANDRÉA, 2008). Exemplos de bioindicadores são espécies que suportam altos níveis de poluentes em seus tecidos e espécies que reagem a uma determinada prática de manejo do solo (PAOLETTI, 1999), como minhocas e colêmbolos, respectivamente.

Entre os organismos que têm sido muito utilizados como bioindicadores da presença de poluentes no ambiente edáfico, encontram-se as minhocas. As minhocas pertencem à classe Oligochaeta e representam aproximadamente 80% da fração da biomassa de invertebrados edáficos (EDWARDS; BOHLEN, 1996; RIGHI, 1997; EDWARDS, 2004; AQUINO et al., 2005).

Segundo Andréa (2008), as minhocas são consideradas boas bioindicadoras da contaminação de solos, pois têm papel importante na sua formação e são organismos da base de várias teias alimentares, indicando o potencial de contaminação dos organismos que se alimentam delas. Neste ambiente elas atuam na decomposição de resíduos de plantas e ciclagem de nutrientes da matéria orgânica, na formação do húmus e de agregados; também atuam no melhoramento da estrutura, fertilidade e porosidade do perfil do solo; na capacidade de infiltração, drenagem e retenção de água e ar, e também, no transporte de micro-organismos e nutrientes por meio dos canais formados por sua escavação e seus deslocamentos (BROWN; DOUBE, 2004; EDWARDS, 2004; REINECKE; REINECKE, 2007).

Nesses deslocamentos e pela ingestão de solo ou serapilheira contaminados, as minhocas entram em contato com substâncias ou poluentes que são aplicados ou atingem o solo, e nele podem permanecer adsorvidos nas partículas minerais, na matéria orgânica e na solução do solo (ANDRÉA, 2008). Elas podem ainda se expor e absorver os contaminantes da solução do solo por meio de contato direto e passagem pela cutícula (PAPINI, 2003). A partir desse contato, as minhocas podem se intoxicar, morrer, ou sobreviver, incorporar e até bioacumular esses poluentes em seus tecidos.

Já se verificou que as minhocas podem bioacumular resíduos de agrotóxicos. A bioacumulação de ^{14}C -lindano em minhocas *E. fetida*, por exemplo, foi avaliada por Viswanathan, Scheunert e Korte (1988) há mais de 20 anos. Também já se verificou que: elas podem reagir à presença de agrotóxicos, evitando solo contaminado (REINECKE et al., 2002; LUKKARI; HAIMI, 2005; LOUREIRO; SOARES; NOGUEIRA, 2005; NATAL-DA-LUZ et al., 2008; STEFANI, 2010); os resíduos de determinadas moléculas de agrotóxicos podem causar efeitos histológicos nelas (MALERI et al., 2008; REDDY; RAO, 2008; LUO et al., 2009) e também causar efeitos sobre sua reprodução (HELLING; REINECKE; REINECKE, 2000; LUKKARI et al., 2005; DE SILVA; PATHIRATNE; VAN GESTEL, 2009). Por outro lado, conforme já citado anteriormente, alguns fatores ambientais, como por exemplo, o

conteúdo de matéria orgânica do solo, também podem influenciar a relação entre os agrotóxicos e as minhocas.

Entre os efeitos ecológicos de bioindicação, a bioacumulação ou a bioconcentração traduzem o acúmulo de poluentes nos organismos em relação à quantidade do poluente presente, respectivamente, no solo ou na água (BURATINI; BRANDELLI, 2006; ANDRÉA, 2008). Esse processo inclui a absorção a partir de todas as vias de exposição (inalação, ingestão, contato dérmico) dos compostos ou poluentes presentes nos compartimentos ambientais em que os contaminantes possam estar presentes (água, sedimento, outros organismos). A bioacumulação também depende da retenção dos compostos no organismo, que ocorre, geralmente, nos lipídios, e também das propriedades físico-químicas dos agrotóxicos que podem favorecer sua entrada no organismo (SPADOTTO et al., 2004).

A bioacumulação de uma substância química em um organismo é medida através do fator de bioacumulação (FBA), que é expresso pelo coeficiente de distribuição do composto no tecido do animal e sua concentração no solo (PAPINI, 2003; BURATINI; BRANDELLI, 2006; SARRAZIN et al., 2009).

Desde os resultados de bioacumulação de ^{14}C -lindano em minhocas *Eisenia fetida* obtidos em 1988 por Viswanathan, Scheunert e Korte (1988), muitos outros estudos determinaram a bioacumulação de agrotóxicos, metais e outros compostos em minhocas. Haimi et al. (1992) verificaram a bioacumulação do conservante de madeira clorofenol em minhocas *Lumbricus rubellus* e *Aporrectodea caliginosa*, porém as concentrações de clorofenol foram maiores em *A. caliginosa* do que em *L. rubellus*. A bioacumulação de Cádmio, Cromo e Zinco em minhocas *Eisenia andrei* foi determinada por Van Gestel et al. (1993) a partir de solo artificial contendo esses elementos, sendo que a bioacumulação de Cádmio aumentou de acordo com o aumento da dose de tratamento no solo. O Cromo também foi bioacumulado, mas somente a concentração de $1000 \text{ mg Zn kg}^{-1}$ solo causou um aumento de Zinco nas minhocas. Os autores verificaram também depuração do Zinco, pois ao final de três semanas, as concentrações de Zinco nas minhocas retornaram ao nível dos controles. A bioacumulação de clorobenzenos em minhocas *E. andrei* a partir de solos foi verificada por Belfroid et al. (1994), que detectaram valores de FBA de 1 e 4, a partir de solos tratados, respectivamente, com tetraclorobenzeno e pentaclorobenzeno. Também Spurgeon e Hopkin (1999) verificaram a bioacumulação de metais Cádmio, Cobre, Chumbo e Zinco em minhocas e Talley et al. (2002) verificaram que as minhocas bioacumularam hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAH) a partir de sedimentos contaminados, mas após redução na concentração de PAH nos sedimentos observou-se diminuição da bioacumulação.

No Brasil, Papini e Andréa (2001) verificaram que tratamento de solo com as concentrações do herbicida simazina recomendadas na prática agrícola provocaram

bioacumulação do herbicida em minhocas *E. fetida*, Mas, para o herbicida paraquat (PAPINI et al., 2006) e para o herbicida glifosato (ANDRÉA et al., 2004) o tempo de contato da minhoca com o solo tratado foi muito mais importante do que a concentração do tratamento. Já a bioacumulação de hexaclorobenzeno (HCB), que é um dos poluentes orgânicos persistentes (POP) foi verificada também no Brasil por Vampré, Fuccillo e Andréa (2010), que determinaram FBA de 6,5 a partir de um solo natural.

Verifica-se, portanto, que mesmo entre os agrotóxicos ocorre diferença de bioacumulação, sendo que os organoclorados, como lindano e HCB, por exemplo, apresentaram maiores FBA nas minhocas.

Mas, outros poluentes também foram estudados em minhocas. Por exemplo, Sun et al. (2005) verificaram a bioacumulação de avermectina, que é uma droga veterinária usada principalmente como anti-parasitas de bovinos, suínos e ovinos em minhocas da espécie *E. fetida*, a partir de solo artificial tratado. Este dado pode ser importante, pois as fezes e a urina desses animais atingem o solo e se tiverem resíduos do composto podem afetar o solo e seus organismos. Zhang et al. (2009) verificaram que RDX (um explosivo que tem sido utilizado nas atividades militares e civis em todo o mundo) e seus metabólitos MNX e TNX foram rapidamente absorvidos pelas minhocas *E. fetida*, atingindo concentrações mais elevadas quanto maior o tempo de exposição. A bioacumulação do RDX foi maior (FBA 1,86) do que a de seus metabólitos MNX e TNX (FBA respectivamente: 0,39 e 0,05). Díez-Ortiz et al. (2010) também utilizaram minhocas *E. andrei* como bioindicadores de bioacumulação do metal Molibdênio a partir de diferentes solos naturais e quatro artificiais e verificaram que a bioacumulação não diferiu entre os solos naturais e artificiais. Mas, o que determinou a diferença na bioacumulação foi principalmente o teor de matéria orgânica e o pH, pois ocorreu bioacumulação apenas nos solos alcalinos com menor conteúdo de matéria orgânica.

Outras pesquisas sobre efeitos de agrotóxicos e outras substâncias, ou também de metais em minhocas se concentraram nos efeitos sobre sua reprodução e crescimento e na rejeição de minhocas a solos contaminados.

O comportamento de rejeição de minhocas a solo com contaminantes tem sido considerado tão importante que está sendo indicado para utilização como um dos testes requeridos para registro de comercialização de agrotóxicos na Europa e nos Estados Unidos. As principais vantagens de se utilizar o comportamento de rejeição para avaliar riscos ecológicos são a curta duração do teste (48h) quando comparado a testes de reprodução que são efetuados durante oito semanas (OECD, 2004), e o fato deste teste ser menos trabalhoso, pois não há necessidade de se efetuar a contagem de indivíduos juvenis (AMORIM; RÖMBKE; SOARES, 2005).

Já existe uma quantidade considerável de resultados obtidos em estudos de rejeição

de minhocas a contaminantes. Por exemplo, Lukkari e Haimi (2005) estudaram a rejeição de três espécies de minhocas (*Aporrectodea tuberculata*, *Lumbricus rubellus* e *Dendrobaena octaedra*) a solos naturais contaminados com os metais Cu e Zn e verificaram que as três espécies de minhoca evitaram claramente os solos contaminados com Cu e Zn, mas a sensibilidade ocorreu na seguinte ordem: *D. octaedra* > *L. rubellus* > *A. tuberculata*.

O comportamento de rejeição de minhocas *E. andrei* também foi verificado para solos tratados com carbendazim, benomil, dimetoato e sulfato de cobre (LOUREIRO; SOARES; NOGUEIRA, 2005). Natal-da-Luz et al. (2008) verificaram que o tempo mínimo de exposição necessário para provocar resposta de rejeição de minhocas a solos contaminados com o fungicida carbendazim foi de 24 horas. No Brasil, Garcia et al. (2008) verificaram mortalidade de mais do que 10% das minhocas que foram colocadas em contato com dois solos naturais e dois tipos de solos artificiais tratados com os fungicidas benomil e carbendazim, além do inseticida piretróide lambda-cialotrina, invalidando a possibilidade de estudo de rejeição. Segundo os autores, o Latossolo utilizado não foi viável para as minhocas por ter um alto teor de argila e por sua acidez. Stefani (2010) estudou o comportamento de rejeição de minhocas *E. andrei* a solos tratados com um fungicida sintético (clorotalonil) e com a fração metanólica de extrato de *Polymnia sonchifolia* (planta com atividade antifúngica) e verificou que apenas o clorotalonil provocou rejeição das minhocas.

Finalmente, outro tipo de estudo que tem sido feito é sobre a influência dos compostos na reprodução das minhocas, que é avaliada pela progênie, isto é, pela contagem de indivíduos juvenis no solo. De Silva; Pathiratne e Van Gestel (2009) verificaram que os efeitos do inseticida clorpirifós e do inseticida e nematicida carbofuran sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de minhocas em solo artificial foram maiores sob temperaturas mais elevadas, como as de clima tropical. Mas a toxicidade do fungicida carbendazim foi menor em temperaturas mais elevadas.

Aspectos como crescimento, tempo de maturação, produção de casulos, sucesso reprodutivo, número total de juvenis produzidos e tempo de incubação dos casulos de minhocas *E. fetida* expostas a oxicloreto de cobre, um fungicida utilizado em videiras, foram verificados por Helling; Reinecke e Reinecke (2000). Os autores verificaram que ocorreu uma redução significativa no número de casulos: $9,36 \pm 1,24$ no controle e $3,47 \pm 2,63$ na concentração de $108,72 \text{ mg kg}^{-1}$; impacto sobre a reprodução no tratamento já com as doses entre $8,92$ e $15,92 \text{ mg kg}^{-1}$, e crescimento das minhocas afetado a partir da exposição à concentração de $8,92 \text{ mg kg}^{-1}$ solo.

Também já se determinou que a presença dos metais Cu e Zn exerce efeito sobre a reprodução da minhoca *Aporrectodea tuberculata* (LUKKARI et al., 2005), pois ocorreu inibição na produção de casulos e a biomassa das minhocas também foi menor em solo

com os metais.

Verifica-se, portanto, que os testes de bioacumulação, rejeição e reprodução utilizando minhocas em solos tratados com doses sub-letais de diversos contaminantes, têm se mostrado sensíveis, fornecem boas respostas sobre a dinâmica desses compostos e que os resultados desses estudos podem indicar riscos ecológicos da presença de poluentes no solo. De qualquer forma, as condições de estudo devem ser controladas, de tal forma, que apenas a presença do agrotóxico represente agente estressor e a resposta seja relativa apenas a este agente.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Solos

As amostras dos três tipos de solo foram coletadas de 0 a 20 cm do perfil de solos de zona rural de Piracicaba (SP), de áreas não expostas anteriormente a agrotóxicos, e analisadas pelo Departamento de Ciência do Solo da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo. Os três tipos de solo utilizados nos experimentos foram selecionados de acordo com os parâmetros solicitados para o teste de biodegradabilidade de agrotóxicos em solo (Portaria Normativa IBAMA nº 84, Art. 4º, § 5º).

As principais características físicas e químicas dos solos são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Principais propriedades físicas e químicas dos solos

Tipo de solo	pH (H ₂ O)	CMRA*	C g kg ⁻¹	N mg kg ⁻¹	Argila _____	Silte g kg ⁻¹	Areia _____
Latossolo Vermelho Distrófico Típico (LVd)	4,7	62	23	2800	630	140	230
Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico (PV)	6,0	41	24	2996	480	180	340
Gleissolo Melânico Aluminico Típico (GM)	4,1	143	74	6994	600	330	70

* Capacidade Máxima de Retenção de Água (g/100g de solo seco)

4.2. Determinação da capacidade máxima de retenção de água (CMRA)

As subamostras dos solos também tiveram a CMRA determinada no Laboratório de Ecologia de Agroquímicos do Instituto Biológico, onde foram realizados todos os estudos. Para isso e por adaptação de metodologia da EMBRAPA (FRIGHETTO; VALARINI, 2000), triplicatas de 10 g de cada solo foram colocadas em funis analíticos com lã de vidro na saída e montados sobre provetas graduadas. Adicionaram-se 10 mL de água destilada várias vezes, até que o volume escoado dos funis fosse igual aos 10 mL de água adicionados inicialmente. O volume de água retido nos solos foi anotado e o volume percolado foi desprezado após cada adição. As médias dos volumes adicionados foram calculadas e subtraídas dos volumes de água escoados, obtendo-se 100% do volume de água retido pelos solos, ou 100% da sua CMRA. Com este valor, calculou-se o volume de água necessário para umedecer os solos a 60% de sua CMRA.

As amostras dos diferentes estudos foram umedecidas e mantidas a 60% da capacidade máxima de retenção de água (CMRA) sempre uma semana antes do início dos estudos, para reativação da atividade biológica dos solos.

4.3. Determinação da umidade dos solos

No início dos estudos, a umidade dos solos foi checada por meio de triplicatas de aproximadamente 3 g dos três tipos de solo que foram secas a 120°C por 20 min em dessecador infravermelho Mettler ("Moisture Analyzer" - LJ16) e os valores de peso úmido, da porcentagem de água e do peso de água perdida foram anotados para cálculos do volume de água presente nas subamostras dos solos e de equivalência para peso seco.

4.4. Minhocas

Minhocas da espécie *Eisenia andrei* adultas, com clitelo e pesando mais do que 300 mg foram coletadas no minhocário do Laboratório de Ecologia de Agroquímicos, onde são criadas em meio que consta de mistura de partes iguais de terra vegetal e esterco de cavalo, mantido úmido por adições de água (Figura 1). Os animais são alimentados semanalmente com frutas e legumes frescos e picados.



Figura 1. Minhocário do Laboratório de Ecologia de Agroquímicos do Instituto Biológico: (a) caixas de criação; (b) detalhe de uma caixa

4.5. Cipermetrina

O inseticida cipermetrina [(RS)- α -ciano-3-fenoxibenzil (1 RS)-cis-trans-3-(2,2-diclorovinil)-1,1-dimetil ciclopropano carboxilado; n° CAS: 52315-07-8] grau técnico com 99,5% de pureza foi comprado da ChemService Inc (West Chester, PA – EUA). Seu equivalente ^{14}C -cipermetrina (^{14}C -fenóxi – Figura 2) foi obtido da Shell Research Limited (Londres – Reino Unido) com atividade específica $366,7 \text{ MBq mmol}^{-1}$ e pureza radioquímica de 99%.

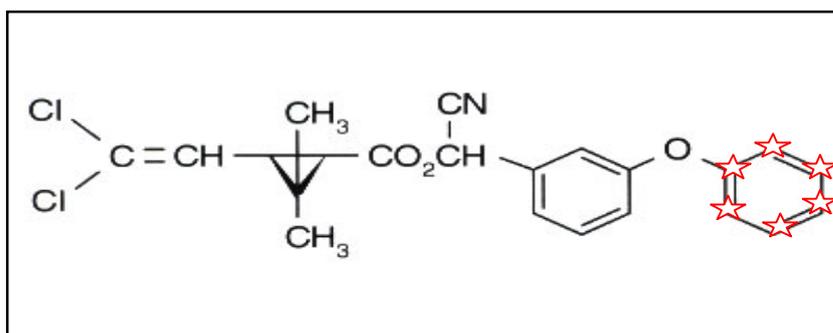


Figura 2. Fórmula estrutural do cipermetrina (★ radiomarcagem com átomos de Carbono 14)

No momento do uso, a pureza radioquímica do ^{14}C -cipermetrina foi verificada por cromatografia em camada delgada (CCD) por meio de aplicação de solução de $15 \mu\text{g}$ de cipermetrina grau técnico e $3,39 \text{ kBq}$ de ^{14}C -cipermetrina mL^{-1} de metanol em cromatoplaças de alumínio revestidas com sílica gel-60 e indicador fluorescente F_{254} (Merck, Brasil). De acordo com Furuzawa et al. (1986), os cromatogramas foram desenvolvidos utilizando-se como fase móvel os seguintes sistemas de solventes: (a)- tolueno: acetato de etila: ácido acético (75:25:1 v/v/v) e (b)- hexano: tolueno: ácido acético (3:15:2 v/v/v). O R_f do

cipermetrina foi determinado após visualização sob lâmpada UV a 254 nm. O cromatograma também foi submetido à analisador linear de varredura de radiação (LB 2723, Berthold) para determinação da zona radioativa, no Rf do cipermetrina.

Nos estudos, além deste cipermetrina grau técnico, utilizou-se também uma formulação de cipermetrina em pó molhável contendo 40% de princípio ativo, para comparação com o produto grau técnico.

4.5.1. Curva de calibração de cipermetrina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A análise da quantidade de cipermetrina presente nos extratos e nas soluções do composto formulado foram feitas por comparação com uma curva-padrão com diferentes concentrações do inseticida cipermetrina grau técnico em metanol (0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 e 15 $\mu\text{g mL}^{-1}$), cujas áreas dos picos foram determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Utilizou-se cromatógrafo líquido com bomba LC-10AD, com detector UV/visível SPD 10 AV, forno CTO 10A, da marca Shimadzu. A coluna utilizada foi Spherex C18 com dimensões de 250 \times 3,2 mm e tamanho de partícula de 5 μm (Phenomenex). Utilizou-se também módulo de integração CBM 20A com “software LC solution” e injetor Reodyne com *loop* de 20 μL . As condições cromatográficas foram adaptadas de Willis e Ling (2004), utilizando-se como fase móvel metanol:água ultra-pura (MilliQ) (85:15 v/v) a um fluxo de 0,8 mL^{-1} e as amostras foram visualizadas em comprimento de onda de 230 nm. Nessas condições, o tempo de retenção do cipermetrina foi de aproximadamente 10 minutos (Figura 3).

As concentrações das amostras experimentais foram determinadas por intermédio de comparação das áreas obtidas com as áreas das diferentes concentrações da curva-padrão do cipermetrina e por meio do método de Meier e Zünd (1993).

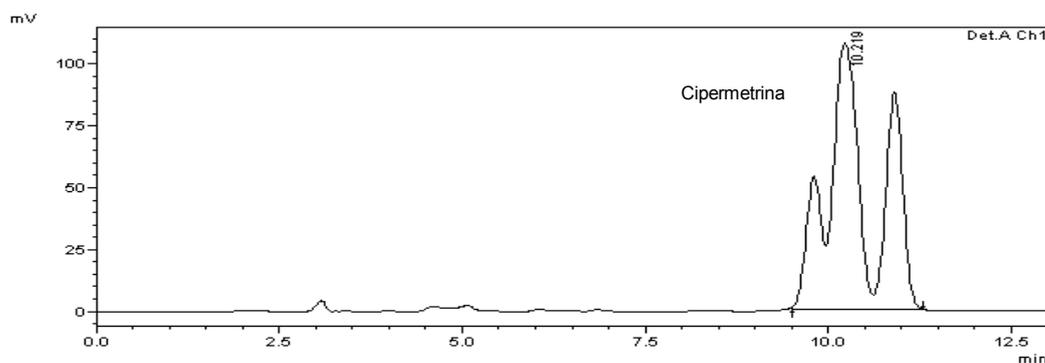


Figura 3. Cromatograma típico do cipermetrina grau técnico

4.6. Testes de toxicidade em papel de filtro

Para escolha da dose de cipermetrina a ser utilizada no tratamento dos solos e para determinar a sensibilidade de minhocas *E. andrei* ao cipermetrina, realizou-se teste de toxicidade por contato de minhoca com papel filtro tratado com solução de cipermetrina, conforme adaptação de metodologia da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico - OECD (OECD, 1984). Quarenta minhocas previamente selecionadas pela maturidade sexual e peso maior que 300 mg, de acordo com o protocolo 207 da OECD (OECD, 1984), foram lavadas em água corrente, pesadas e mantidas por três horas sobre papel filtro umedecido para esvaziamento do conteúdo intestinal e aclimação no laboratório (Figura 4a).

O tratamento consistiu de três doses de cipermetrina grau técnico: 12,2 µg, 32,6 µg e 340 µg e uma dose de 35 µg de cipermetrina comercial (pó molhável) que foram colocadas sobre o papel de filtro que forrava a superfície interna de frascos de vidro com 9 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro (Figura 4b). Para cada dose de tratamento, incluindo o controle (com 400 µL apenas de metanol), utilizaram-se dez replicatas.

Os frascos permaneceram em capela sob exaustão durante uma hora para evaporação do solvente. Em seguida, o papel de filtro de cada frasco foi umedecido com 1,5 mL de água de torneira; cada frasco recebeu uma minhoca e todos foram vedados com filme plástico com pequenos orifícios e papel de pano poroso, para possibilitar a troca gasosa e a respiração das minhocas (Figura 4c). O conjunto foi mantido no escuro por 48 horas. Após este período, os frascos foram abertos para verificação da mortalidade das minhocas.

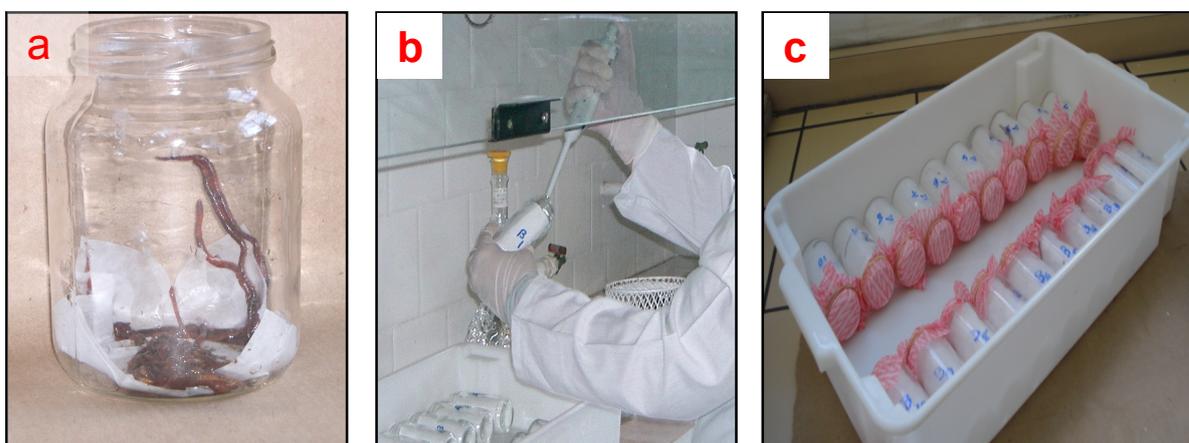


Figura 4. Teste de toxicidade em papel filtro: (a) minhocas durante aclimação em papel de filtro umedecido; (b) aplicação do cipermetrina sobre o de papel filtro; (c) frascos de vidros vedados com papel de pano poroso após tratamento e adição das minhocas

4.7. Testes de recuperação por extração do cipermetrina de tecido de minhocas

Para determinar a melhor metodologia de extração de cipermetrina, foram realizados testes prévios nos quais se selecionaram 10 minhocas de acordo com os padrões do protocolo 207 da OECD (OECD, 1984), já descritos. As minhocas foram lavadas e colocadas em congelador (-18° C) para sedação, por três horas e, em seguida tratadas com 1,0 mL da solução de ^{14}C -cipermetrina (15 μg de cipermetrina e 3,39 kBq de ^{14}C -cipermetrina mL^{-1} metanol), cortadas em pedaços de aproximadamente 1 cm e homogeneizadas por 20 minutos sob exaustão para evaporação do solvente.

O tecido das minhocas foi subdividido em três amostras de aproximadamente 3 g, e transferido para frascos de vidro nos quais se adicionou 15 mL de metanol (ANDRÉA; PAPINI, 2005; PAPINI et al., 2006). Esses frascos foram colocados sobre o prato giratório do aparelho de micro-ondas (Panasonic 1600 W; Figura 5a) e submetidos a 20 ou 25 ciclos de 160 W de potência de micro-ondas com duração de 25 segundos cada ciclo, ou também a 30 ciclos de 160 W com duração de 15 segundos cada, sempre intercalados com banho de gelo para evitar superaquecimento das amostras (Figura 5b).

Os extratos foram então filtrados em papel de filtro e o volume recuperado de cada amostra foi anotado para os cálculos de recuperação do ^{14}C -cipermetrina.

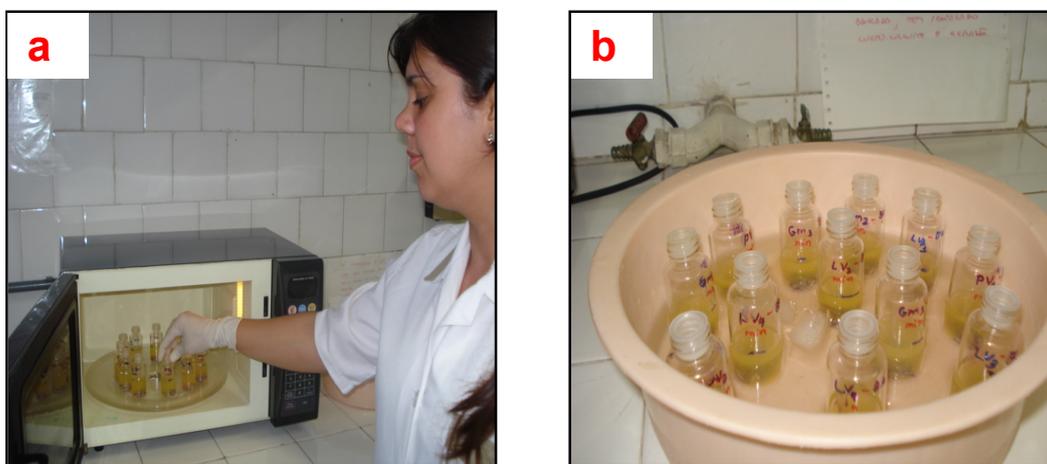


Figura 5. Extração de cipermetrina de tecido de minhoca por meio de energia de micro-ondas: (a) disposição dos frascos sobre o prato giratório do aparelho; (b) banho de gelo

4.8. Testes de recuperação por extração do cipermetrina de solo

A melhor metodologia de extração de cipermetrina de solo foi determinada por comparação de dois processos de extração: por energia de micro-ondas e por agitação

mecânica. Triplicatas de 3,0 g de peso seco de cada tipo de solo foram tratadas com 3,5 µg de cipermetrina e 3,2 kBq de ^{14}C -cipermetrina, a partir de solução em metanol.

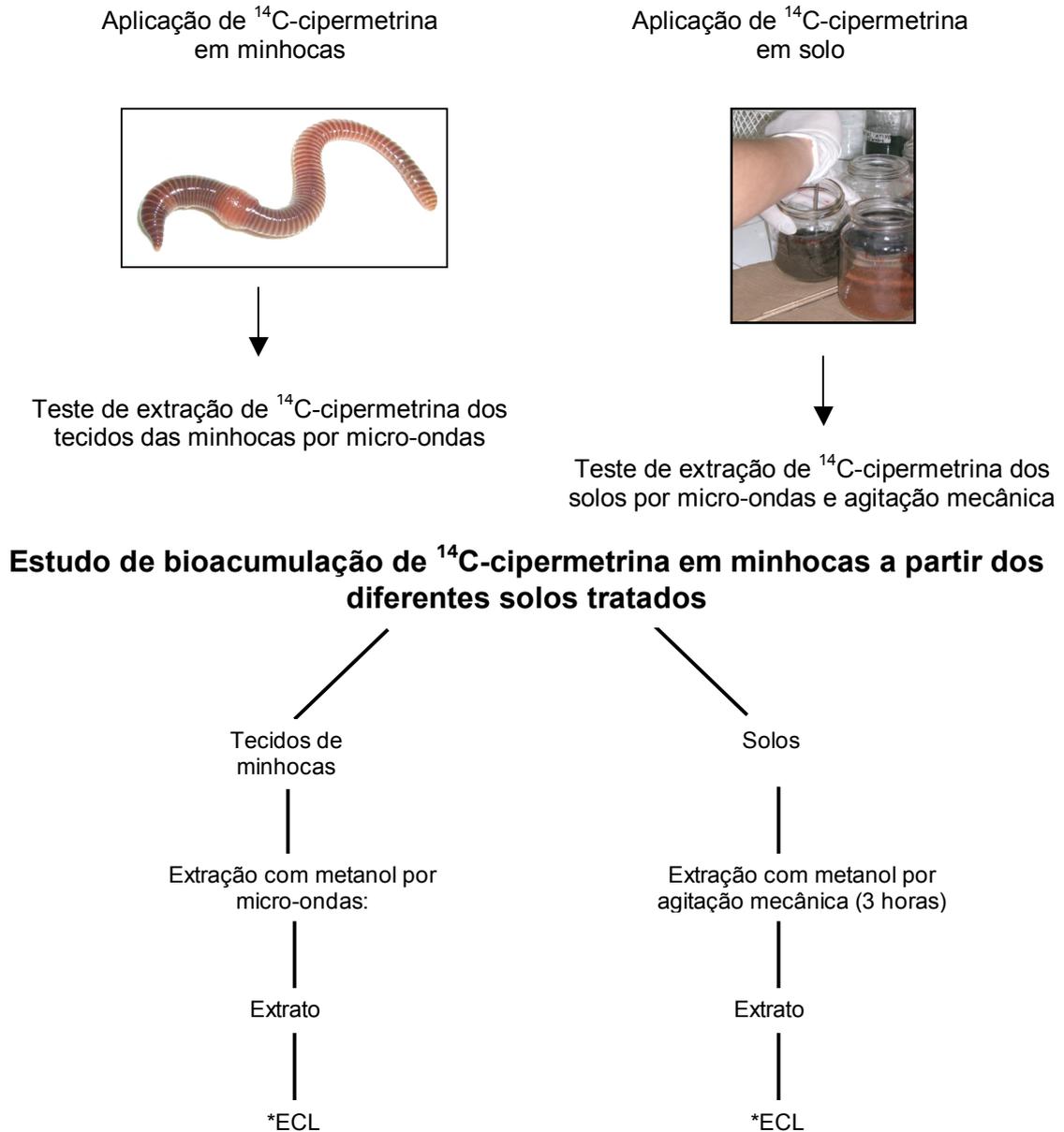
- **Extração por micro-ondas:** Após homogeneização durante 20 minutos sob exaustão, as amostras foram transferidas para frascos de vidro onde se adicionaram 15 mL de metanol para extração. Os frascos foram submetidos a: ou 20 ciclos de 160 W de energia de micro-ondas, cada ciclo com duração de 25 segundos; ou 25 ciclos de 25 segundos, ou ainda 30 ciclos de 15 segundos cada ciclo, sempre intercalados com banho de gelo para evitar superaquecimento das amostras (ANDRÉA; PAPINI; NAKAGAWA, 2001). Em seguida, os extratos foram filtrados em papel de filtro e o volume recuperado de cada amostra foi anotado para os cálculos de recuperação do ^{14}C -cipermetrina.

- **Extração por agitação mecânica:** Neste teste de extração foram testados também os solventes metanol e hexano. As triplicatas de 3,0 g de peso seco de cada tipo de solo tratado também foram homogeneizadas por 20 minutos sob exaustão e transferidas para frascos cônicos graduados com tampa rosqueável onde receberam 15 mL de metanol ou 15 mL de hexano. Em seguida, foram agitadas mecanicamente por um período de três horas. Após repouso para decantação do solo, os extratos foram filtrados em papel de filtro e o volume recuperado de cada amostra foi anotado para os cálculos de recuperação do ^{14}C -cipermetrina.

A porcentagem de recuperação de cada teste e cada condição foi verificada por Espectrometria de Cintilação em Líquido (ECL - equipamento Packard-1600 TR) de duas alíquotas de 2,0 mL de cada extrato, após mistura com 5,0 mL de líquido cintilador (MESQUITA; RÜEGG, 1984) e comparação com a quantidade inicialmente aplicada.

4.9. Bioacumulação de ^{14}C -cipermetrina em minhocas

A Figura 6 apresenta um diagrama esquemático dos procedimentos realizados no estudo de bioacumulação, onde se visualiza que primeiramente se determinaram as melhores condições de extração do ^{14}C -cipermetrina das minhocas e dos solos. Em seguida, montou-se o estudo propriamente dito que teve a duração de 14 dias.



*ECL : Espectrometria de Cintilação em Líquido para quantificação do radiocarbono

Figura 6. Diagrama esquemático do estudo de bioacumulação

Sete replicatas de 100 g de cada um dos três tipos de solos foram colocadas em vidros de 500 mL de capacidade, onde tiveram a atividade microbiana reativada por umedecimento a 60% da CMRA uma semana antes do tratamento com o inseticida.

Quatro replicatas de cada tipo de solo foram tratadas com 0,05 mg de cipermetrina grau técnico e 0,056 kBq de ^{14}C -cipermetrina em acetona g^{-1} de solo e as replicatas restantes serviram de controle e foram tratadas apenas com 400 μL de acetona (Figura 7a).

Esta dose de tratamento baseou-se se na dose utilizada pelos fabricantes do produto comercial e por Liu et al. (2008); Hartnik, Sverdrup e Jensen, (2008) e Zhou et al. (2008), pois as doses utilizadas no teste de toxicidade em papel filtro não causaram mortalidade sobre as minhocas. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas com bastão de vidro (Figura 7b) e permaneceram durante uma hora sob exaustão em capela, para evaporação da acetona.

Porções de aproximadamente 3 g de cada solo tratado foram retiradas para monitoramento do pH. Para isso, essas porções foram colocadas em tubos de vidro e misturadas com 9,0 mL de água destilada, para determinação do pH em peagâmetro (Quimis - Q400MT).

Paralelamente, grupos de cinco minhocas selecionadas conforme o protocolo 207 da OECD (OECD, 1984) foram pesados e colocados em cada frasco (Figura 7c). O peso de cada sistema completo (solo + minhoca) foi anotado e o conteúdo de água foi corrigido por adição de água toda vez que se fez necessária a correção do peso do conjunto. Os frascos foram tampados com filme plástico com pequenos orifícios para possibilitar a troca de ar e respiração das minhocas, e colocados em câmara de temperatura controlada a $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (Figura 7d).

Ao fim dos 14 dias desse estudo, os sistemas foram desmontados, alíquotas de 6 g de cada tipo de solo foram retiradas para monitoramento do pH, e para combustão, quando a recuperação do radiocarbono do solo como resíduos extraíveis estivesse abaixo de 50%.

Baseando-se em Papini (2003), as cinco minhocas de cada frasco foram lavadas, pesadas e levadas à geladeira (4°C) por um período de 24 horas em frasco de vidro contendo papel filtro umedecido com água de torneira e trocado a cada 12 horas, para esvaziamento do conteúdo intestinal. Os animais de cada grupo foram sacrificados por meio de congelamento a -18°C por três horas antes da extração por micro-ondas, a partir do resultado do teste descrito no item 4.7. Paralelamente, amostras de 10 g de solo de cada frasco foram extraídas por agitação mecânica, a partir do resultado do teste descrito no item 4.8.

A bioacumulação foi avaliada de acordo com Andréa e Papini (2005); Papini et al. (2006) e Buratini e Brandelli (2006), por meio do Fator de Bioacumulação (FBA), calculado a partir da fórmula: $\text{FBA} = \text{Ctm}/\text{Cs}$, onde: FBA = fator de bioacumulação; Ctm = Concentração de ^{14}C nos tecidos de minhocas (kBq g^{-1}); Cs = Concentração de ^{14}C nos solos (kBq g^{-1}).

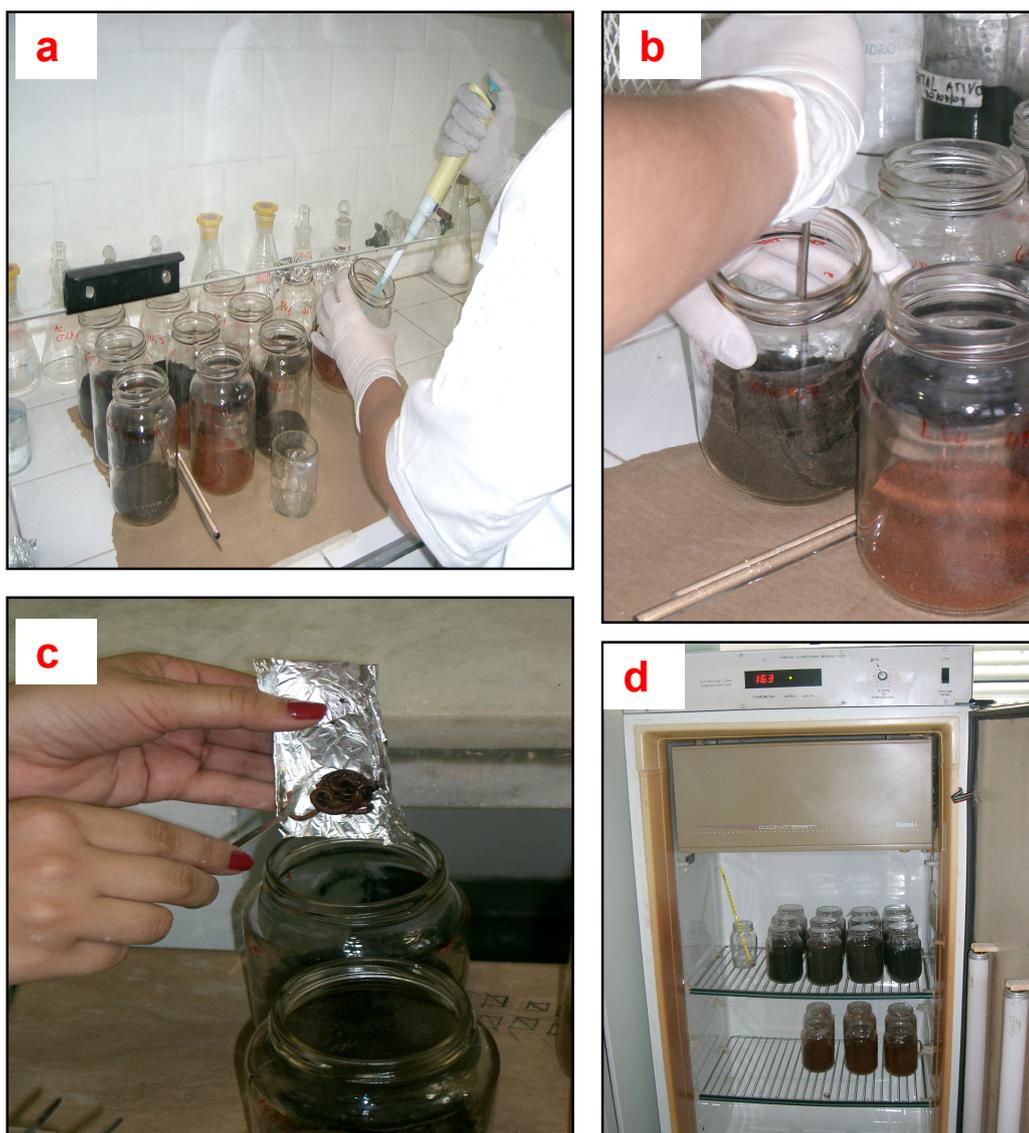


Figura 7. Bioacumulação de ^{14}C -cipermetrina em minhocas: (a) aplicação de ^{14}C -cipermetrina nos solos; (b) homogeneização com bastão de vidro; (c) colocação das minhocas; (d) acondicionamento dos solos em câmara de temperatura controlada

4.10. Quantificação do radiocarbono nos extratos de minhocas e de solos

A radioatividade proveniente do ^{14}C -cipermetrina também foi avaliada em duas alíquotas de 2,0 mL de extrato de cada amostra, conforme previamente descrito em 4.8.

A porcentagem de radiocarbono recuperado nos extratos foi determinada por comparação com a quantidade de radiocarbono presente na solução de tratamento com ^{14}C -cipermetrina.

4.11. Determinação de ¹⁴C-cipermetrina aplicado e de ¹⁴C-resíduos não extraíveis ou ligados nos tecidos dos animais e solo

Para confirmar a radioatividade colocada como tratamento no estudo de bioacumulação, sub-amostras de 500 mg de cada amostra de solo tratado e ainda não extraído foram submetidas à combustão por 12 minutos em aparelho “Biological Oxidizer” (R.J. Harvey OX 600), e a quantidade de radiocarbono foi determinada por ECL conforme ANDRÉA et al. (1997).

Além disso, conforme Andréa (1992), além da quantidade de resíduos que é extraível com solventes, há uma determinada quantidade do composto aplicado que pode permanecer ligada à matriz mesmo após extração exaustiva. Estes resíduos-ligados só podem ser detectados por combustão de sub-amostras quando se utiliza compostos radiomarcados. Por isso, para determinação da quantidade total de radiocarbono proveniente do tratamento com ¹⁴C-cipermetrina, também se realizou combustão de amostras de 500 mg dos solos já extraídos e secos, e de todo o tecido de minhocas restante após a extração.

4.12. Quantificação do cipermetrina nos extratos de tecido de minhoca e de solos

Os extratos de tecidos de minhoca foram concentrados até secura e ressuspendidos em 5,0 mL de metanol. Esses extratos de minhocas e os extratos de solos foram submetidos à CLAE, conforme descrito no item 4.5.1, para quantificação do cipermetrina presente após o período de estudo.

4.13. Rejeição de minhocas ao cipermetrina grau técnico e cipermetrina pó molhável

O estudo de rejeição de minhocas ao cipermetrina foi conduzido basicamente de acordo com o protocolo do teste da Organização Internacional para Padronização - ISO (ISO 17512-1, 2007), utilizando-se cipermetrina grau técnico e cipermetrina formulado como pó molhável.

Câmaras quadradas (13 cm × 13 cm × 5 cm de altura) com 500 mL de capacidade foram divididas em duas partes (Figura 8) e 100 g de cada solo já umedecido a 60% da CMRA foram colocados em cada lado da câmara.



Figura 8. Câmaras utilizadas no estudo de rejeição

Cada 100 g de solo de um lado de cada câmara serviu de controle e foi tratado apenas com solvente (C0) e o outro lado recebeu o tratamento com as diferentes concentrações do cipermetrina (C1, C2 e C3 – Figura 9). Tanto o controle, como o tratamento com cada concentração foi realizado em triplicatas.

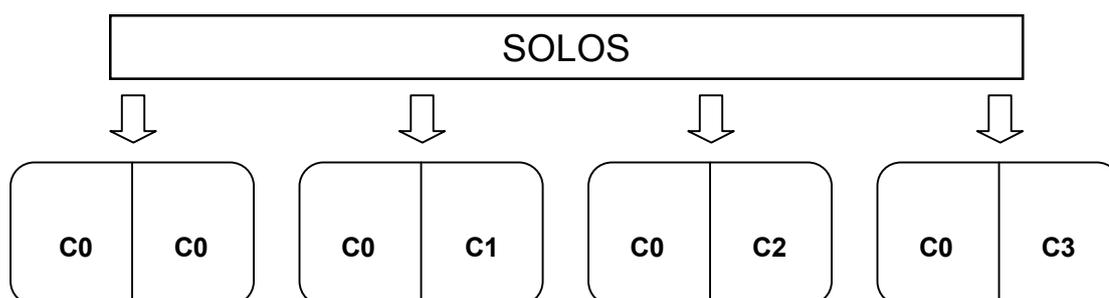


Figura 9. Diagrama esquemático dos tratamentos realizados no estudo de rejeição

As doses de tratamento com cipermetrina grau técnico foram: 15 μg em C1; 30 μg em C2 e 60 μg cipermetrina g^{-1} de solo em C3, a partir de soluções de cipermetrina em acetona. As 100 g de solo controle de cada concentração receberam o mesmo volume de acetona equivalente ao usado para tratamento de cada concentração. Cada 100 g de solo da câmara contendo somente o controle nas duas parcelas (C0-C0) recebeu 360 μL de acetona.

Para o tratamento com o cipermetrina pó molhável, as doses em C1, C2 e C3 foram, respectivamente, de 15, 25 e 35 μg cipermetrina g^{-1} de solo, a partir de soluções de cipermetrina em etanol. O solo controle de cada concentração também recebeu o volume de etanol equivalente ao utilizado para tratamento com cada concentração e as duas porções de 100 g de solo da câmara controle (C0-C0) receberam, cada uma, 5 mL de etanol.

As vinte e quatro câmaras contendo os solos tratados com cipermetrina grau técnico e pó molhável ficaram sob exaustão por doze horas para evaporação total do solvente, e então, as divisórias foram retiradas para colocação de seis minhocas ao mesmo tempo no centro de cada câmara (Figura 10a). As câmaras foram vedadas com filme plástico perfurado para respiração das minhocas (Figura 10b) e mantidas por 48 horas a aproximadamente 22°C sob luz contínua.

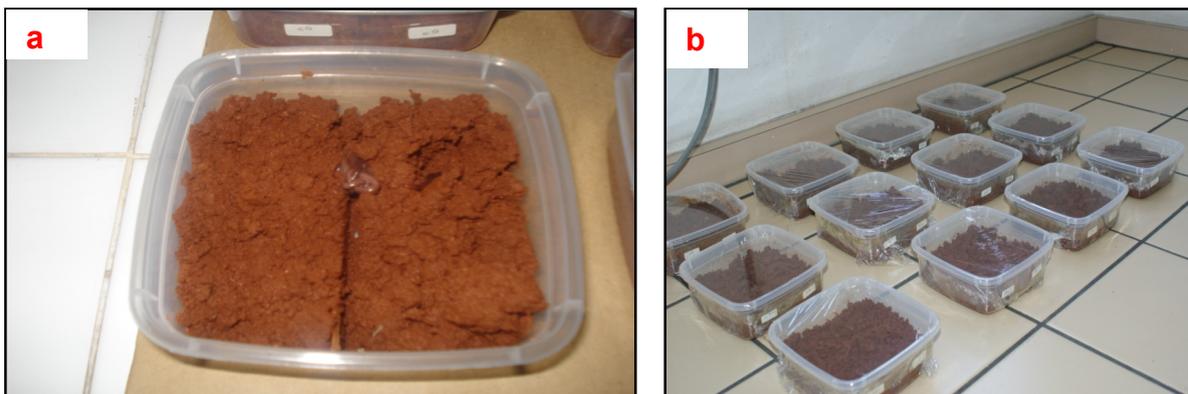


Figura 10. Colocação das minhocas e vedação das câmaras do estudo de rejeição: (a) Minhocas no centro da câmara. (b) Câmaras vedadas com filme plástico

Ao final de dois dias, os sistemas foram abertos e efetuou-se a contagem das minhocas em cada parcela de 100 g de solo com os diferentes tratamentos. A porcentagem de rejeição aos solos tratados (C1, C2 e C3) em relação aos solos controle (CO) foi calculada por meio da seguinte fórmula: $R(\%) = [(C-T) / N] \times 100$, onde R = rejeição; C = número de indivíduos na condição controle; T = número de indivíduos naquela concentração de tratamento (ISO 17512-1, 2007).

Antes da colocação das minhocas nas câmaras e após a desmontagem dos sistemas, alíquotas de aproximadamente 3 g dos solos tratados foram retiradas para monitoramento do pH, conforme descrito no item 4.9, para verificação de possíveis mudanças que poderiam influenciar nas respostas das minhocas.

4.14. Influência do cipermetrina sobre a reprodução de minhocas

De acordo com adaptação do protocolo 222 da OECD (OECD, 2004), seis replicatas de 200 g de cada tipo de solo previamente umedecidos a 60% da CMRA foram colocadas em frascos de vidro com capacidade de 500 mL uma semana antes do início do estudo, para reativação da atividade microbiana. Após esse período, aplicou-se 0,02 mg de cipermetrina grau técnico g^{-1} de solo, baseando-se na dose utilizada por Zhou et al. (2008)

em 3 replicatas de cada tipo de solo. As outras 3 replicatas foram tratadas apenas com 400 µL de metanol e serviram de controle. O solvente de todas as amostras foi evaporado por exaustão durante uma hora.

Paralelamente selecionou-se grupos de 5 minhocas com clitelo e peso mínimo de 300 g que foram lavadas em água de torneira, para colocação em cada frasco. Em seguida, cada frasco também recebeu 2,0 g de esterco de cavalo, colocados na superfície dos solos, que foram umedecidos com mais 2,0 mL de água. Os sistemas foram então pesados e seus valores anotados, para checagem e correção do conteúdo de umidade dos solos à cada dois dias. Os frascos foram vedados conforme já descrito e mantidos em câmara de temperatura controlada a $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e condições controladas de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, durante 28 dias. A adição de esterco, como alimento, foi efetuada uma vez por semana.

Ao término desse período de 28 dias, o solo de cada frasco foi colocado em papel alumínio e as minhocas adultas foram retiradas, lavadas e pesadas para verificação de ganho ou perda de peso dos animais. Os solos foram recolocados nos seus frascos, o alimento foi administrado pela última vez e os frascos voltaram às mesmas condições na câmara de temperatura controlada por mais um período de 28 dias.

Aos 56 dias do início do estudo, colocaram-se os recipientes contendo os solos em banho-maria a uma temperatura inicial de 40 °C que foi sendo aumentada lentamente até 60 °C em até 20 minutos, para que os animais juvenis subissem à superfície dos solos, fossem removidos e contados. O efeito do tratamento foi avaliado pela comparação do número de indivíduos juvenis coletados nas amostras controle e nas amostras tratadas com cipermetrina.

4.15. Análise estatística

O estudo de bioacumulação de ^{14}C -cipermetrina em minhocas comparou as porcentagens médias de radiocarbono recuperado de solos e das minhocas como resíduos extraíveis e resíduos ligados entre os diferentes solos, pelo teste de Tukey, com nível de significância de 0,05.

Para comparar o FBA entre os três solos também utilizou-se o teste de Tukey e para avaliar a associação entre o conteúdo de matéria orgânica (MO) de cada solo e a porcentagem de resíduos ligados recuperados nos solos; a associação entre a quantidade de resíduos extraíveis nos solos com a quantidade de radiocarbono recuperado nas minhocas e a associação entre o Fator de Bioacumulação (FBA) e o conteúdo de matéria orgânica (MO) de cada solo realizou-se Testes de Correlação de Spearman, com nível de

significância de 0,05.

A análise da rejeição de minhocas aos solos tratados com cipermetrina pó molhável e com grau técnico foi realizada por meio do teste exato de Fisher ($p \leq 0,05$). As frequências de minhocas nos diferentes tratamentos na C1, C2 e C3 foram comparadas com a situação controle (C0) em cada tipo de solo, além disso, comparou-se também a frequência das minhocas em cada concentração para verificar se a rejeição aumentava conforme o aumento da concentração. As diferenças foram consideradas significativas quando a probabilidade (p) da ocorrência do evento foi inferior a 5% ($p < 0,05$).

Todos os testes foram realizados utilizando *software* Bioestat 5.0®.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Pureza radioquímica do ^{14}C -cipermetrina

As cromatografias em camada delgada do ^{14}C -cipermetrina comprovaram pelo deslocamento (R_f) de 0,67 no sistema de solvente (a)- hexano: tolueno: ácido acético (3:15:2 v/v/v) e 0,21 no sistema de solvente (b)- tolueno: acetato de etila: ácido acético (75:25:1 v/v/v) os 98% de pureza radioquímica do composto radiomarcado, confirmando os dados fornecidos pelos fabricantes.

5.2. Curva de calibração do cipermetrina

A curva de diferentes concentrações do inseticida cipermetrina grau técnico obtida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) apresentou coeficiente de correlação $r = 0,997$ (Figura 11). Por meio desta curva de calibração e conforme o método de Meier e Zünd (1993) foi possível efetuar os cálculos das concentrações presentes nas soluções e nos extratos de solo e de tecidos de minhocas.

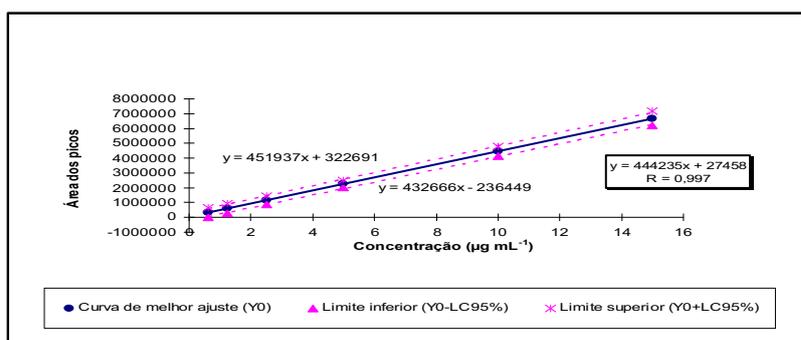


Figura 11. Curva de diferentes concentrações de cipermetrina por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE

5.3. Toxicidade em papel filtro

As minhocas não foram sensíveis ao cipermetrina grau técnico, pois as doses de 12,2 e 32,6 μg de cipermetrina e, até mesmo a dose dez vezes maior que o valor recomendado comercialmente, isto é, 340 μg de cipermetrina, não provocaram qualquer efeito ou mortalidade de minhocas. Isto já era esperado a partir dos dados de INGLESFELD (1984), que verificou ausência de mortalidade de minhocas com tratamentos de até 100 mg de cipermetrina kg^{-1} de solo. Os dados da EPA (2006) apontam LC_{50} por contato em papel de mais que 26 g cm^{-2} , que é muito maior do que as doses aqui utilizadas. Por esse motivo as doses utilizadas para tratamento dos solos nos estudos de bioacumulação e reprodução foram de 0,05 mg e 0,02 mg mg g^{-1} solo, respectivamente, e se basearam nas utilizadas por outros autores (LIU et al., 2008; HARTNIK; SVERDRUP; JENSEN, 2008; ZHOU et al., 2008) e que variaram entre 0,01 e 0,15 mg g^{-1} solo.

Entretanto, o teste de toxicidade aguda em papel filtro utilizando 35 μg de cipermetrina formulado como pó molhável provocou 100% de mortalidade das minhocas. Este resultado mostra a importância de se efetuar o teste de toxicidade em papel de filtro e com formulação do agrotóxico, pois Zhou et al. (2008) acharam mortalidade de minhocas em solo artificial a partir da dose de 62,5 $\mu\text{g g}^{-1}$ de cipermetrina grau técnico. Além disso, a dose que provocou mortalidade em papel de filtro serviu de base para a maior dose aplicada no teste de rejeição, quando se utilizou o composto formulado.

Conforme protocolo internacional que descreve este teste para registro de moléculas de agrotóxicos (OECD, 1984), o teste de toxicidade aguda em papel de filtro indica o efeito imediato de substâncias por contato com as minhocas, mas ainda não é requerido no Brasil. Entretanto, conforme os resultados aqui obtidos, este teste forneceu respostas diferentes para o composto grau técnico e formulado, além de fornecer respostas rápidas.

Verificou-se também que o curto espaço de tempo de contato com o produto comercial formulado foi suficiente para provocar hemorragia e morte em todos os espécimes (Figura 12). Como isto não ocorreu com nenhuma dose do produto grau técnico, verifica-se a influência e a importância de se pesquisar também os efeitos da formulação do agrotóxico na toxicidade para as minhocas.



Figura 12. Toxicidade aguda de 35 µg de formulação de cipermetrina como pó molhável para minhocas *Eisenia andrei*

5.4. Recuperação do cipermetrina de tecido de minhocas

Metanol e todas as condições usadas para extração de cipermetrina de tecidos de minhocas foram capazes de extrair o composto, mas verificou-se que as recuperações foram maiores quanto maior o número de ciclos de micro-ondas. Isto é, somente 34,1 % \pm 2,4% da quantidade de ^{14}C -cipermetrina aplicada foi recuperada quando os extratos foram submetidos a 20 ciclos. Quando se aumentou o número de ciclos para 25, a recuperação também aumentou para 62,4% \pm 6,1% e, ao se aumentar para 30 ciclos, a recuperação mostrou-se satisfatória, com 99,3% \pm 10,8% de recuperação (Tabela 2). Portanto, a melhor combinação de número e tempo dos ciclos de micro-ondas foi a que utilizou 30 ciclos de 160 W de energia de micro-ondas, sendo cada ciclo de 15 segundos, que recuperou 99,3 % \pm 10,8 % da quantidade aplicada como ^{14}C -cipermetrina (Tabela 2) foi a adotada para os estudos.

Tabela 2. Recuperação de ^{14}C -cipermetrina dos tecidos de minhocas por diferentes condições de extração por energia de micro-ondas (% média \pm d.p. e CV(%) = coeficiente de variação)

Condições da extração por micro-ondas: número de ciclos – tempo (seg) de cada ciclo	Recuperação de ^{14}C - cipermetrina (% g ⁻¹)	CV (%)
20 - 25	34,15 \pm 2,36	6,91
25 - 25	62,39 \pm 6,15	9,86
30 - 15	99,30 \pm 10,85	10,93

5.5. Recuperação de ¹⁴C-cipermetrina de solo

Para os solos, verificou-se que a extração realizada com metanol por energia de micro-ondas não se mostrou eficiente, visto que a maior porcentagem de ¹⁴C-cipermetrina recuperado foi de 74,8 % ± 11,2 % ao se submeter as amostras a 30 ciclos de 160 W e 15 segundos cada (Tabela 3).

Mas, o método que utilizou agitação mecânica com metanol como solvente de extração mostrou-se satisfatoriamente eficiente, com recuperação de 88,3% ± 9,1 % (Tabela 3). Por outro lado, o solvente hexano não se mostrou eficiente para extração de cipermetrina, nem por agitação, tendo recuperado no máximo 53%. Desta forma, o método mais eficiente foi adotado para as amostras provenientes dos estudos.

Tabela 3. Recuperação de ¹⁴C-cipermetrina por diferentes métodos de extração de amostras de solo (% média ± d.p. e CV(%) = coeficiente de variação)

Método e Condições de Extração	Recuperação de ¹⁴ C-cipermetrina (% g ⁻¹)	CV (%)
Metanol - Micro-ondas (número de ciclos – tempo de cada ciclo)		
20 - 25 segundos	38,56 ± 2,37	6,15
25 - 25 segundos	39,20 ± 2,56	6,53
30 - 15 segundos	74,78 ± 11,19	14,96
Agitação mecânica (solvente)		
Hexano	53,17 ± 12,84	24,15
Metanol	88,29 ± 9,12	10,33

5.6. Bioacumulação de cipermetrina em minhocas

Antes da extração e verificação da quantidade de ¹⁴C-cipermetrina acumulada nos organismos, verificou-se que não houve perda de peso nem mortalidade de minhocas durante os 14 dias deste estudo. Apesar do curto espaço de tempo, pôde-se verificar que as minhocas ganharam peso (Tabela 4), demonstrando que as condições experimentais estavam adequadas e que o desenvolvimento das minhocas não foi afetado pela presença

de cipermetrina nos solos.

Tabela 4. Peso total dos cinco espécimes de minhocas *Eisenia andrei* no início e término do estudo de bioacumulação

Solos	Dias	
	0	14
	Peso (g)	
PV1	1,88	1,90
PV2	1,72	1,77
PV3	1,81	1,83
PV4	1,76	1,75
PV5 (Controle)	1,64	1,69
PV6 (Controle)	1,79	1,78
PV7 (Controle)	1,70	1,76
LV 1	1,65	1,67
LV 2	1,74	1,70
LV 3	1,79	1,82
LV 4	1,62	1,65
LV 5 (Controle)	1,86	1,88
LV 6 (Controle)	1,71	1,76
LV 7 (Controle)	1,70	1,73
GM 1	1,65	1,69
GM 2	1,53	1,59
GM 3	1,79	1,78
GM 4	1,97	1,98
GM 5 (Controle)	1,65	1,67
GM 6 (Controle)	1,71	1,76
GM 7 (Controle)	1,84	1,85

Ao final dos 14 dias do estudo detectou-se apenas $17,2 \% \pm 1,4 \%$ de radiocarbono como resíduo extraível proveniente do ^{14}C -cipermetrina no solo PV; $18,3 \% \pm 1,4 \%$ no solo LV e $16,4 \% \pm 2,4 \%$ no solo GM, sendo que essas quantidades não foram estatisticamente diferentes entre os três solos, conforme verificado pelo teste de Tukey ao nível de significância de 0,05, $p=0,03$ e $n=3$. (Tabela 5). Entretanto, a combustão dos solos extraídos detectou mais $32,0 \% \pm 2,0 \%$ de radiocarbono como resíduos ligados no solo PV;

31,9 % \pm 3,8 % no solo LV e 40,6 % \pm 6,6 % no solo GM. A dissipação de aproximadamente 30% do cipermetrina aplicado, em apenas 14 dias também já era esperada, pois desde 1981 Chapman et al. (1981) e depois Jones (1991) já tinham apontado meia-vida de cipermetrina em solos de 15 a 30 dias. Recuperações maiores foram detectadas neste trabalho: aproximadamente de 69% a 74% (Tabela 5), e se devem à detecção e quantificação também de resíduos não extraíveis ou ligados, por meio da sensibilidade da técnica radiométrica. Verifica-se ainda que no curto espaço de tempo do estudo, as quantidades de ^{14}C -resíduos ligados formados em todos os solos foram maiores do que os ^{14}C -resíduos extraíveis que são os resíduos detectados pelas outras técnicas convencionais. Isto demonstra que dados que indicam baixa persistência do cipermetrina, assim como ocorre para outros agrotóxicos (ANDRÉA, 1992; ANDRÉA et al., 2007), podem estar incompletos, pois subestimam este tipo de resíduo que pode estar firmemente ligado aos solos.

Em apenas 14 dias, as minhocas além de absorverem ^{14}C -cipermetrina, retiveram este composto ou seus metabólitos na forma de ^{14}C -resíduos ligados, cujas quantidades detectadas nas minhocas foram muitas vezes maiores do que as quantidades de ^{14}C -resíduos extraíveis (Tabela 5). Como as minhocas estão na base de teias alimentares do solo, todos os outros organismos que as predam podem se contaminar, principalmente porque esses resíduos não são detectados normalmente pelas técnicas analíticas convencionais.

Segundo Weber, Wikerson e Reinhardt (2004) e Hongjian (2009) a matéria orgânica do solo pode fornecer mais locais para adsorção do agrotóxico, reduzindo sua extratibilidade. Resíduos ligados também são importantes para a indisponibilidade de agrotóxicos (ANDRÉA, 1992; ANDRÉA et al., 2007) e, no solo com maior conteúdo de matéria orgânica (GM), além da maior quantidade de radiocarbono detectada como resíduos ligados (aproximadamente 40%, comparada com cerca de 32% nos outros solos, Tabela 5), também se detectou menos resíduos extraíveis e ligados nas minhocas que ficaram neste solo.

Tabela 5. Radiocarbono recuperado de solos e de minhocas *Eisenia andrei* após 14 dias de contato com solos tratados com ^{14}C -cipermetrina (% média \pm d.p. e CV(%) = coeficiente de variação)

Tipo de Solo	^{14}C no solo				^{14}C nas minhocas				TOTAL RECUPERADO	CV (%)
	Extraível	CV (%)	Ligado	CV (%)	Extraível	CV (%)	Ligado	CV (%)		
PV	17,28 \pm 1,44 ^a	8,33	32,08 \pm 2,00 ^a	6,23	0,32 \pm 0,08 ^a	25	19,03 \pm 6,17 ^a	32,42	68,71 \pm 13,03	18,96
LV	18,34 \pm 1,47 ^a	8,01	31,92 \pm 3,85 ^a	12,06	0,32 \pm 0,03 ^a	9,37	23,63 \pm 3,04 ^b	12,86	74,31 \pm 13,37	17,99
GM	16,49 \pm 2,46 ^a	14,91	40,64 \pm 6,65 ^b	16,36	0,19 \pm 0,03 ^a	15,79	14,72 \pm 4,82 ^c	32,74	72,04 \pm 16,76	23,26

PV = Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico; LV = Latossolo Vermelho Distrófico Típico; GM = Gleissolo Melânico Alumínico Típico. [Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey]

A influência da matéria orgânica foi demonstrada pela análise estatística, pois as porcentagens de resíduos ligados apresentaram correlação positiva com o conteúdo de matéria orgânica dos três solos ($r_s = 0,9$) e o teste de Tukey demonstrou que a porcentagem de radiocarbono recuperado como resíduos ligados nos solos diferiu entre GM ($40,6\% \pm 6,6\%$) e PV ($32,0\% \pm 2,0\%$) e entre os solos GM ($40,6\% \pm 6,6\%$) e LV ($31,9\% \pm 3,8\%$), porém a média de resíduos ligados recuperados dos solos LV ($31,9\% \pm 3,8\%$) e PV ($32,0\% \pm 2,0\%$) não diferiu significativamente ($p=0,0798$). As características do cipermetrina e as propriedades do solo GM podem ter influenciado para que houvesse uma maior ligação do composto às partículas do solo GM do que dos solos LV e PV, pois como foi observado por Chapman et al. (1981), a persistência do cipermetrina foi maior em solos com alto teor de matéria orgânica.

A análise estatística por meio do teste de Tukey não demonstrou diferença significativa entre a quantidade de radiocarbono extraída das minhocas provenientes dos solos PV ($0,32\% \pm 0,08\%$) e LV ($0,32\% \pm 0,03\%$) em relação ao solo GM ($0,19\% \pm 0,03\%$ - Tabela 5) – $p=0,03$, $n=3$. Entretanto, o radiocarbono recuperado como resíduo ligado proveniente dos tecidos das minhocas foi estatisticamente diferente entre os solos LV e GM, LV e PV e entre PV e GM (Tabela 5) – $p=0,03$, $n=3$.

A quantidade de radiocarbono extraível nos solos apresentou correlação com a quantidade de radiocarbono recuperado nas minhocas ($r_s = 0,9$), ou seja, a menor quantidade recuperada como resíduo extraível foi no solo GM ($16,4\% \pm 2,46\%$) e as menores quantidades de radiocarbono ligado ($0,19\% \pm 0,03\%$) e extraível ($14,72\% \pm 4,82\%$) também foram nas minhocas que estavam neste solo. Esses resultados indicam que menos ^{14}C -cipermetrina esteve disponível para elas (Tabela 5).

Os valores de fator de bioacumulação (FBA) mostraram que as minhocas bioacumularam cipermetrina a partir dos três tipos de solos, pois o FBA foi de $3,52 \pm 1,09$ no solo PV, $3,73 \pm 0,37$ no solo LV e $2,11 \pm 0,73$ no solo GM (Tabela 6). Novamente no solo GM observou-se menor bioacumulação, provavelmente porque menos radiocarbono aplicado como ^{14}C -cipermetrina estava biodisponível neste solo. Hartnik e Styrihave (2008) não detectaram bioacumulação de cipermetrina, mas não utilizaram técnicas radiométricas e, portanto, podem ter subestimado os valores de resíduos-ligados tanto dos solos quanto das minhocas.

Tabela 6. Distribuição do radiocarbono nas minhocas *Eisenia andrei* e no solos e fatores de bioacumulação de ^{14}C -cipermetrina (FBA)

Tipo de Solo	Tecidos de minhocas		Solo	FBA
	kBq g ⁻¹			
PV	0,098 ± 0,036		0,027 ± 0,003	3,52 ± 1,09 ^a
LV	0,104 ± 0,003		0,028 ± 0,002	3,73 ± 0,37 ^a
GM	0,066 ± 0,018		0,031 ± 0,004	2,11 ± 0,73 ^b

PV = Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico; LV = Latossolo Vermelho Distrófico Típico; GM = Gleissolo Melânico Aluminico Típico. [Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo Teste de Tukey]

O teste de Tukey demonstrou que o FBA foi significativamente diferente entre os solos LV e GM e entre PV e GM (Tabela 6). Entretanto, não se detectou diferença estatística entre os FBA dos solos LV e PV – $p=0,03$. Apesar da diferença estatística entre o FBA dos solos LV e GM e PV e GM, o FBA não apresentou correlação positiva com o conteúdo de matéria orgânica, nos três solos ($r_s = -0,9$).

As análises cromatográficas dos extratos dos solos mostraram que 4,8; 4,6 e 3,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo foram ainda recuperados, respectivamente, nos solos LV, PV e GM 14 dias após o início do estudo. Segundo Extoxnet (2009), o cipermetrina não é volátil, mas está sujeito à degradação microbiana em solo sob condições aeróbicas, por isso, como as condições aqui utilizadas são favoráveis à atividade microbiana, elas podem ter favorecido também o metabolismo da microbiota.

A quantidade de resíduos extraíveis de cipermetrina nas minhocas foi tão pequena que não foi possível detectá-las por CLAE, pois estavam abaixo do limite de detecção do método. Isto demonstra mais uma vez, a importância da utilização da técnica radiométrica, sempre que possível, devido à sua sensibilidade.

5.7. Rejeição de minhocas ao cipermetrina

As boas condições experimentais, conforme orientações do protocolo 17512-1 (ISO, 2007) para aplicação do teste de rejeição de minhocas a solos tratados com agrotóxicos, devem obedecer a dois critérios para validação dos resultados de teste de rejeição: 1- a mortalidade

dos animais não pode ultrapassar 10%, esse critério foi cumprido nos três solos; 2- a distribuição das minhocas deve ser de 40% a 60% nas câmaras em que houver o duplo-controle (C0-C0), ou seja, nesse duplo-controle a distribuição das minhocas deve ser ao acaso para que seu comportamento não seja confundido com comportamento de rejeição. A distribuição das minhocas *E. andrei* na condição C0-C0 foi de 50% em cada parcela dos solos PV e GM, e 60% e 40% no solo LV, evidenciando distribuição praticamente equitativa no solo sem tratamento nos dois lados da câmara e comprovando as boas condições experimentais.

O comportamento de rejeição de minhocas já foi verificado em solos naturais tratados com os inseticidas clorpirifós e carbofuran (DE SILVA; VAN GESTEL, 2009); pela presença dos metais Cu e Zn (LUKKARI; HAIMI, 2005); em solos tratados com os fungicidas carbendazim e benomil, e o inseticida dimetoato, além de sulfato de cobre (LOUREIRO; SOARES; NOGUEIRA, 2005) e, até mesmo a solo artificial tratado com cipermetrina em doses de 5 a 60 mg kg⁻¹ (ZHOU et al., 2008). Portanto, este é um comportamento que tem sido explorado com minhocas para a presença de poluentes.

Verificou-se rejeição em todos os solos tratados com cipermetrina grau técnico desde a dose mais baixa (C1 = 15 µg g⁻¹ de solo – Tabela 7). Além disso, a análise pelo teste exato de Fisher mostrou que o número de minhocas na condição controle (C0) do teste realizado com cipermetrina grau técnico foi significativamente maior do que o número de minhocas nas condições de tratamento (C1, C2 e C3), nos três solos (p < 0,05) (Tabela 7) indicando comportamento de rejeição das minhocas aos solos tratados com o cipermetrina.

Para verificar se o aumento da dose de tratamento nos solos influenciou na rejeição, a frequência de minhocas em cada concentração foi comparada pelo teste de Fisher duas a duas (C1 x C2; C1 x C3 e C2 x C3), nos três solos. O teste estatístico demonstrou que não houve diferença estatística entre a porcentagem de rejeição e o aumento da dose de tratamento no solo PV (C1 x C2: p= 0,4857; C1 x C3: p=0,4857 e C2 x C3: p = 1,0000), no solo LV (C1 x C2: p= 1,0000; C1 x C3: p=1,0000 e C2 x C3: p = 1,0000) e no solo GM (C1 x C2: p= 0,3333; C1 x C3: p=0,3333 e C2 x C3: p = 1,0000). Isso demonstra que conforme verificaram Zhou et al. (2008) o aumento de dose de tratamento dos solos com cipermetrina não influenciou na rejeição.

Tabela 7. Rejeição de minhocas aos solos PV, LV e GM tratados com diferentes concentrações de cipermetrina grau técnico

Câmara	Controle (C0) X Concentração Teste (C1, C2 e C3)		
	C0-C1	C0-C2	C0-C3
PV – repetição 1	4 2	6 0	6 0
PV – repetição 2	5 1	5 1	6 0
PV – repetição 3	6 0	6 0	5 1
Total (n)	15 3	17 1	17 1
R %	66,6	88,8	88,8
LV – repetição 1	6 0	6 0	6 0
LV – repetição 2	4 2	5 1	5 1
LV - repetição 3	6 0	6 0	6 0
Total (n)	16 2	17 1	17 1
R %	77,7	88,8	88,8
GM – repetição 1	5 1	6 0	6 0
GM – repetição 2	6 0	6 0	6 0
GM – repetição 3	5 1	6 0	6 0
Total (n)	16 2	18 0	18 0
R %	77,7	100	100

Solos: PV = Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico; LV = Latossolo Vermelho Distrófico Típico; GM = Gleissolo Melânico Aluminoso Típico. C0 – controles. C1 - 15 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo. C2 – 30 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo. C3 – 60 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo. 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.

Verificou-se também rejeição das minhocas a todos os solos tratados com o cipermetrina pó molhável (Tabela 8), pois o número de minhocas na condição controle (C0) foi sempre significativamente maior ($p < 0,05$) do que nas concentrações C1, C2 e C3.

Assim como ocorreu com o cipermetrina grau técnico, o cipermetrina formulado como pó molhável não causou aumento da rejeição de acordo com o aumento da dose de tratamento. O teste de Fisher demonstrou que a frequência de minhocas nas diferentes concentrações não diferiu significativamente com o aumento da concentração nos três solos: PV (C1 x C2: $p =$

1,0000; C1 x C3: $p=0,0801$ e C2 x C3: $p= 0,2063$), LV (C1 x C2: $p= 0,3333$; C1 x C3: $p=0,3333$ e C2 x C3: $p= 1,0000$) e GM (C1 x C2: $p= 1,0000$; C1 x C3: $p=0,1000$ e C2 x C3: $p= 0,3333$).

Tabela 8. Rejeição de minhocas aos solos PV, LV e GM tratados com diferentes concentrações de cipermetrina formulado como pó molhável

Câmara	Controle (C0) X Concentração Teste (C1, C2 e C3)		
	C0-C1	C0-C2	C0-C3
PV – repetição 1	6 0	3 3	6 0
PV – repetição 2	4 2	6 0	5 1
PV – repetição 3	3 3	5 1	6 0
Total (n)	13 5	14 4	17 1
R %	44,4	55,5	88,8
LV – repetição 1	6 0	6 0	6 0
LV – repetição 2	4 2	6 0	6 0
LV - repetição 3	6 0	6 0	6 0
Total (n)	16 2	18 0	18 0
R %	77,7	100	100
GM – repetição 1	4 2	6 0	6 0
GM – repetição 2	6 0	5 1	6 0
GM – repetição 3	5 1	5 1	6 0
Total (n)	15 3	16 2	18 0
R %	66,6	88,8	100

Solos: PV = Argissolo Vermelho Eutroférico Chernossólico; LV = Latossolo Vermelho Distrófico Típico; GM = Gleissolo Melânico Aluminico Típico. C0 – controles. C1 - $15 \mu\text{g g}^{-1}$ de solo. C2 – $25 \mu\text{g g}^{-1}$ de solo. C3 – $35 \mu\text{g g}^{-1}$ de solo. 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.

Como o pH dos solos se manteve igual antes (Tabela 1) e após o tratamento: GM (4,2), PV (6,2) e LV (4,6), verifica-se que os efeitos observados podem ter sido causados pelo inseticida.

Zhou et al. (2008) também verificaram o comportamento de rejeição das minhocas ao

cipermetrina, mesmo utilizando solos artificiais. Assim, verifica-se que as minhocas são sensíveis também a este inseticida e sua rejeição é alta, mas depende do tipo de solo e da substância utilizada no ensaio (Garcia et al., 2008).

5.8. Influência do cipermetrina sobre reprodução de minhocas

Segundo as orientações do protocolo 222 da OECD (2004) para que o estudo da influência do inseticida cipermetrina sobre a reprodução de minhocas *E. andrei* seja considerado válido, a mortalidade dos adultos nas quatro primeiras semanas do teste não deve ser \geq a 10%; o coeficiente de variação de reprodução deve ser \leq a 30% e cada replicata contendo 05 minhocas deve produzir um número \geq a 15 juvenis no final do teste.

Neste estudo utilizou-se apenas 200 g de cada solo por replicata e 05 minhocas por frasco de vidro e não se verificou mortalidade de minhocas nas condições-controle, isto é, sem tratamento, nem nas amostras dos diferentes solos tratados com cipermetrina. Porém, embora espécimes juvenis tenham sido produzidos nas amostras-controle dos três solos 56 dias após o início do teste, o número de juvenis produzidos nos solos controle não atingiu o mínimo recomendado para que o teste fosse considerado válido (Tabela 9). Isso pode ter ocorrido devido às condições utilizadas no presente estudo, que diferiram das utilizadas no protocolo 222 da OECD: 500 g de solo/10 minhocas (OECD, 2004). Mesmo nas condições utilizadas, os adultos não perderam peso ou apresentaram quaisquer mudanças morfológicas no final do teste.

Não houve produção de juvenis no solo LV e GM tratados com o cipermetrina, somente no solo PV (Tabela 9) e mesmo não se tendo atingido o número de juvenis para que o estudo fosse considerado válido, percebe-se que o inseticida cipermetrina parece influenciar a reprodução das minhocas, pois a produção de juvenis ocorreu nos três solos sem tratamento com cipermetrina. Já a pequena dose de tratamento com 0,02 mg de cipermetrina g^{-1} solo foi tóxica, de tal forma, que não houve produção de juvenis nos solos GM e LV.

Os efeitos de cipermetrina sobre a reprodução e o crescimento de minhocas adultas e juvenis também foram estudados por Zhou et al. (2008) em solo artificial tratado com cipermetrina com concentrações de 5 a 60 mg kg^{-1} solo. A dose de 10 mg kg^{-1} causou impacto negativo sobre o crescimento das minhocas juvenis, enquanto que a partir da dose de 20 mg kg^{-1} já se observou efeitos negativos sobre a reprodução das minhocas adultas, como diminuição no número de casulos e de juvenis.

Tabela 9. Número de espécimes de juvenis de minhocas *Eisenia andrei* detectados nos solos PV, GM e LV com e sem tratamento de cipermetrina

Solo	Número de juvenis	
	Controle	Tratamento
PV1	01	-
PV2	-	-
PV3	01	07
GM1	03	-
GM2	02	-
GM3	-	-
LV1	-	-
LV2	6	-
LV3	-	-

Entretanto, como os resultados obtidos não validaram as condições aqui utilizadas para recomendar o teste de reprodução juntamente com a utilização dos três solos selecionados pelo IBAMA, as condições do teste devem ser novamente estudadas e reavaliadas.

6. CONCLUSÕES

- Aplicações de até 340 µg do cipermetrina grau técnico em papel de filtro não causaram mortalidade nas minhocas *Eisenia andrei*. Por outro lado, a dose de 35 µg de cipermetrina formulado como pó molhável provocou 100% de mortalidade e hemorragia nas minhocas. Isto indica a importância de se estudar os efeitos dos agrotóxicos também na sua formulação comercial.

- As minhocas bioacumularam cipermetrina a partir dos três solos recomendados pelo IBAMA. Entretanto, o fator de bioacumulação (FBA) do cipermetrina nas minhocas não teve correlação

positiva com o conteúdo de matéria orgânica dos solos, pelo contrário, foi inversamente proporcional, isto é, LV (3,73) > PV (3,52) > GM (2,11).

- Como ¹⁴C-resíduos não extraíveis ou ligados de ¹⁴C-cipermetrina foram detectados nos tecidos de minhocas, aponta-se para o perigo de contaminação persistente, que pode ser passada ao longo das cadeias tróficas e teias alimentares, e que não é normalmente detectada pelas técnicas analíticas convencionais.

- As minhocas não morreram, mas foram sensíveis e rejeitaram os três solos tratados desde as doses mais baixas de cipermetrina grau técnico e em pó molhável. Mas, a rejeição não aumentou conforme a concentração do tratamento, tanto utilizando a formulação em pó molhável como o produto grau técnico.

- Como se detectou reprodução de *E. andrei* nos três solos e efeito de dose muito pequena sobre a reprodução em pelo menos dois solos (GM e LV) nas condições estabelecidas neste estudo, verifica-se o potencial de bioindicação deste teste e, por isso, recomenda-se que novas avaliações sobre as condições de condução do teste sejam feitas.

- O estudo demonstrou que os solos brasileiros com as propriedades selecionadas pelo IBAMA podem ser utilizados para realização dos testes de rejeição de minhocas, que além de ter apresentado respostas claras, é um teste de curta duração. Entretanto, novas avaliações devem ser feitas em relação ao teste de reprodução das minhocas nesses solos, de tal forma que se estabeleça claramente se os solos podem ser usados também para este teste ecotoxicológico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S.Y.M. **Avaliação de neurotoxicidade em ratos, do praguicida piretróide fenvalerato em modelos comportamentais de ansiedade**. 1994. 57 f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 1994.

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

AMORIM, M.J.B; RÖMBKE, J.; SOARES, A.M.V.M. Avoidance behaviour of *Enchytraeus albidus*: Effects of benomyl, carbendazim, phenmedipham and different soil types. **Chemosphere**, v. 59, p. 501–510, 2005.

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.; 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. Contaminação do solo por pesticidas. **Arquivos Instituto Biológico**, São Paulo, v.60, n.2, p.63-65, 1998.

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.; 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**, 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, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, v. B40, p.55 - 58, 2005.

ANDREA, M. M., TOMAS, ARG, VAMPRE, TM, BARRETO, OJS, LUCHINI, LC . Bioaccumulation and retention of ¹⁴C-hexachlorobenzene (HCB): I. The marine tropical mussel *Perna perna*. **Environmental Bioindicators** , v.2, p.219 - 228, 2007.

ANDRÉA, M. M. Bioindicadores ecotoxicológicos de agrotóxicos. Instituto Biológico [internet]. Disponível em: http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=83. 2008. Acesso em: 26 jan. 2009.

AQUINO, A. M. DIONÍSIO, J.A. RESSETTI, R.R. CORREIA, M.E.F. NUNES, D.H. PASINI, A. Minhocas: Aspectos Gerais e Ecológicos em Sistemas Agrícolas. **Documentos EMBRAPA**, ISSN 1517-8498, Rio de Janeiro, 2005.

Associação Brasileira de Normas Técnicas - ABNT. Norma Brasileira. **Ecotoxicologia terrestre - Ecotoxicidade aguda - Método de ensaio com minhocas**. ABNT NBR 15537: 2007. 11 p.

BELFROID, A.; SIKKENK, M.; SEINEN, W.; HERMENS, J.; VAN GESTEL, K. The toxicokinetic behavior of chlorobenzenes in earthworm (*Eisenia andrei*) experiments in soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 13, Issue 1, p. 93-99, jan. 1994.

BORGES, A.; SCOTTI, L. V.; SIQUEIRA, D. R.; ZANINI, R.; AMARAL, F.; JURINITZ, D. F.; WASSERMANN, G. F. Changes in hematological and serum biochemical values in jundiá *Rhamdia quelen* due to sub-lethal toxicity of cypermethrin. **Chemosphere**, v. 69, p. 920–926, 2007.

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.

BRITISH COLUMBIA GOVERNMENT (BCG). Ministry of Agriculture and Land - Environmental protection – Environmental fate. P.W. 2009. [Internet]. Disponível em: <http://www.agf.gov.bc.ca/pesticides>. Acesso em: 25 nov. 2009.

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

BURATINI, S. V.; BRANDELLI, A. Bioacumulação. In: ZAGATTO, P. A; BERTOLETTI, (Eds). **Ecotoxicologia Aquática**: São Carlos: Editora Rimma, 2006. Capítulo 04. p.56-88.

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

CASIDA, J.E.; QUISTAD, G.B. Golden age of insecticide research: past, present, or future? **Annual Review of Entomology**, v. 43, p.1–16, 1998.

CHAPMAN, R. A.; TU, C. M.; HARRIS, C. R.; COLE, C. Persistence of five pyrethroid insecticides in sterile and natural, mineral and organic soil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 26, p. 513-519, 1981.

COLLINS, P.; CAPELLO, S. Cypermethrin toxicity to aquatic Life: Bioassays for the freshwater prawn *Palaemonetes argentinus*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 51, p. 79–85, 2005.

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

DÍEZ-ORTIZ, M.; GISKA, I.; GROOT, M.; BORGMAN, E.M.; VAN GESTEL, C.A.M. Influence of soil properties on molybdenum uptake and elimination kinetics in the earthworm *Eisenia andrei*. **Chemosphere**, v. 80, n.9, p. 1036-1043, 2010.
EDWARDS, P.J., COULSON, J.M. Choice of earthworms species for laboratory tests. In:

GREIG-SMITH, P., BECKER, H., EDWARDS, P., HEIMBACH, F. (Eds.), **Ecotoxicology of Earthworms**. Intercept, Hants, UK, p. 36–43, 1992.

EDWARDS, C.A., BOHLEN, P.J. **Biology and Ecology of Earthworms**. Chapman & Hall, London, p. 85, 1996.

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. 3-11.

ENVIRONMENTAL PROTECT AGENCY (EPA). **Document for the Chlorinated Aliphatics Listing Determination**. 299 p.,1999.

ENVIRONMENTAL PROTECT AGENCY (EPA). **Reregistration eligibility decision for cypermethrin**. 2006. Disponível em: http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDS/cypermethrin_red.pdf. Acesso em: 15 jun. 2010.

EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK (EXTOXNET). 2009. **Cypermethrin**. Oregon State University. EXTOXNET [Internet]. Disponível em: <http://extoxnet.orst.edu/pips/cypermet.htm>. Acesso em: 10 jul. 2010.

FARIA, A. B. C. Revisão sobre alguns grupos de inseticidas utilizados no manejo integrado de pragas florestais. **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, v.5, n.2, p. 345- 358, 2009.

FRIGHETTO, R. T. S.; VALARINI, P. J. Indicadores Biológicos e Bioquímicos da Qualidade do Solo, **Manual Técnico Embrapa**, p. 37-40, 2000.

FURUZAWA, K.; MIKAMI, N.; YAMADA, H.; MIYAMOTO, J. Metabolismo f the pyrethroid insecticide cypermethrin in cabbages. **Journal of Pesticide Science**, v. 11, p. 253-260, 1986.

GALERA, M. M.; VIDAL, J. L. M.; FRENICH, A. G.; GARCIA, M.D.G. Determination of cypermethrin, fenvalerate and *cis*- and *trans*-permethrin in soil and groundwater by high-performance liquid chromatography using partial least-squares regression. **Journal of Chromatography A**, v. 727, p. 39-46, 1996.

GARCIA, M.; RÖMBKE, J.; BRITO, M.T.; SCHEFFCZYK, A. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. **Environmental Pollution**, v. 153, p. 450-456, 2008.

GARG, U. K.; PAL, A. K.; JHA, G. J.; JADHA, S. B. Haemato-biochemical and immunopathophysiological effects of chronic toxicity with synthetic pyrethroid, organophosphate and chlorinated pesticides in broiler chicks. **International Immunopharmacology**, v. 4, p.1709–1722, 2004.

HAIMI, J.; SALMINEN, J.; HUHTA, V.; KNUUTINEN, J.; PALM, H. Bioaccumulation of

organochlorine compounds in earthworms. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 24, Issue.12, p. 1699-1703, dez. 1992.

HARTNIK, T.; SVERDRUP, L. E.; JENSEN, J. Toxicity of the pesticide alpha-cypermethrin to four soil nontarget invertebrates and implications for risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, p. 1408–1415, 2008.

HARTNIK, T.; STYRISHAVE, B. Impact of biotransformation and bioavailability on the toxicity of the insecticides r-cypermethrin and chlorfenvinphos in earthworm. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 11057-11064, 2008.

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

HONGJIAN, G. Bioaccumulation of hexachlorobenzene in *Eisenia foetida* at different aging stages. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, p. 948–953, 2009.

HUND-RINKE, K., WIECHERING, H. Earthworm avoidance test for soil assessment. **Journal Soils Sediments 1**, p. 15–20, 2001.

INGLESFIELD, C. Toxicity of the pyrethroid insecticides cypermethrin and WL85871 to the earthworm, *Eisenia foetida* Savigny. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 33, p. 568-570, 1984.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. IBAMA [Internet]. PORTARIA NORMATIVA IBAMA Nº 84, DE 15 DE OUTUBRO DE 1996. Art. 4º, § 5º. Disponível em:<http://servicos.ibama.gov.br/ctf/manual/html/Portaria_84.pdf>. Acesso em: 10 fev. 2010.

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.

JONES, D. **Environmental fate of cypermethrin**. Environmental Monitoring & Pest Management. Department of Pesticide Regulation, 1991. 10 p.

KAUFMAN, D. D.; RUSSELL, B. A.; HELLING, C. S.; KAYSER, A. J. Movement of cypermethrin, decamethrin, permethrin, and their degradation products in soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 29, p. 239-245, 1981.

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

KUMAR, A.; SHARMA, B.; PANDEY, R.S. Preliminary evaluation of the acute toxicity of

cypermethrin and *k*-cyhalothrin to *Channa punctatus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 79, p. 613–616, 2007.

LI, X.; PING, X.; XIUMEI, S.; ZHENBIN, W.; LIGIANG, X. Toxicity of cypermethrin on growth, pigments, and superoxide dismutase of *Scenedesmus obliquus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 188–192, 2005.

LIU, J.; XIE, J.; CHU, Y.; SUN, C.; CHEN, C.; WANG, Q. Combined effect of cypermethrin and copper on catalase activity in soil. **Journal of Soils and Sediments**, v. 8, p. 327–332, 2008.

LOPES, N. P.; QUEIROZ, M. E. L. R.; NEVES, A. A.; ZAMBOLIM, L. Influência da matéria orgânica na adsorção do fungicida triadimenol pelo solo. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 544-547, 2002.

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; 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, p. 27-44, 2002.

LUKKARI, T.; AATSINKI, M.; VÄISÄNEN, A.; HAIMI, J. Toxicity of Copper and Zinc assessed with three different earthworm tests. **Applied Soil Ecology**, v. 30, p.133–146, 2005.

LUKKARI, T.; HAIMI, J. Avoidance of Cu- and Zn-contaminated soil by three ecologically different earthworm species. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, p. 35–41, 2005.

LUO, Y.; ZANG, Y.; ZHONG, Y.; KONG, Z. Toxicological study of two novel pesticides on earthworm *Eisenia foetida*. **Chemosphere**, v. 39, n.13, p. 2347-2356, 1999.

LUO, Y.; WANG, S. H.; YUN, M. X.; LI, X. Y.; WANG, J.; SUN, Z. J. The toxic effects of ionic liquids on the activities of acetylcholinesterase and cellulase in earthworms. **Chemosphere**, v. 77, p. 313–318, 2009.

MALERI, R. A.; FOURIE, F.; REINECKE, A. J.; REINECKE, S. A. Photometric application of the MTT- and NRR-assays as biomarkers for the evaluation of cytotoxicity *ex vivo* in *Eisenia andrei*. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 1040–1048, 2008.

MAUND, S. J.; HAMER, M. J.; LANE, M. C. G.; FARRELLY, E.; RAPLEY, J. H.; GOGGIN, U. M.; GENTLE, W. E. Partitioning, bioavailability, and toxicity of the pyrethroid insecticide cypermethrin in sediments. **Environmental Toxicology Chemistry**, v. 21, p. 9–15, 2002.

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 tenso-ativos na detecção da radiação beta. **Ciência e Cultura**, v. 36, p. 446-450, 1984.
- MIYAMOTO, J. Environmental and health issues. **Pure and Applied Chemistry**, v. 68, p. 737-748, 1996.
- NATAL-DA-LUZ, L. T.; AMORIM, M. J. B.; ROMBKE, J.; SOUSA, J. P. Avoidance tests with earthworms and springtails: Defining the minimum exposure time to observe a significant response. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, p. 545-551, 2008.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD Nº 301**. Ready Biodegradability. 1981. 9p.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD Nº 207**. Earthworm, Acute Toxicity Tests. 1984. 9p.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD Nº 216**. Guideline for the testing of chemicals. Soil Microorganisms: nitrogen transformation test. 2000 a. 10p.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD Nº 217**. Guideline for the testing of chemicals. Soil microorganisms: carbon transformation test. 2000 b. 10p.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD Nº 222**. Guideline for the testing of chemicals. Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida* *Eisenia andrei*). 2004. 18p.
- OVIEDO, M. T. P.; TOLEDO, M. C. F.; VICENTE, E. Resíduos de agrotóxicos piretróides em hortaliças. Pesticidas. **Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 9-18, 2003.
- 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. Dissipação de simazina em solo por ação de minhocas (*Eisenia foetida*). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 25, p. 593-599, 2001.
- PAPINI, S. **Bioavaliação da degradação de agrotóxicos**. 2003. 108 f. Dissertação de Doutorado. Departamento de Ecologia Geral, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.
- PAPINI, S., LANGENBAH, T., LUCHINI, L.C., ANDREA, M. M. Influence of substrate on bioaccumulation of ¹⁴C-paraquat in Compost Worms *Eisenia foetida*. **Journal of Environmental Science and Health**. Part B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, v. B41, p. 523 - 529, 2006.

PASCUAL, J. A.; PERIS, S. J. Effects of forest spraying with two application rates of cypermethrin on food supply and on breeding success of the blue tit (*Parus caeruleus*). **Environmental Toxicology & Chemistry**, v.11, p.1271-1280, 1992.

RASCH, L. W.; JENSEN, U. F.; WOIN, P.; CHRISTOFFERSEN, K. Effects of the pyrethroid insecticide cypermethrin on a freshwater community studied under field conditions. Direct and indirect effects on the species composition. **Aquatic Toxicology**, v. 63, p. 373-389, 2003.

REDDY, N. C.; RAO, J. V. Biological response of earthworm, *Eisenia foetida* (Savigny) to an organophosphorous pesticide, profenofos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, p. 574–582, 2008.

REINECKE, A. J. A review of ecotoxicological test methods using earthworms. In: GREIG-SMITH, P.W.; BECKER, H.; EDWARDS, P.J.; HEIMBACH, F. (Eds). **Earthworm ecotoxicology**. Intercept, Andover, 1992. p. 7–19.

REINECKE, A.J., MABOETA, M.S., VERMEULEN, L.A., REINECKE, S.A. Assessment of lead nitrate and mancozeb toxicity in earthworms using the avoidance response. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 68, p. 779–786, 2002.

REINECKE, S. A.; REINECKE, A. J. The impact of organophosphate pesticides in orchards on earthworms in the Western Cape, South Africa. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, p. 244-251, 2007.

RIGHI, G. 1997. Minhocas da América Latina: diversidade, função e valor. **XXVI Congresso Brasileiro de Ciências do Solo**. Rio de Janeiro, 27 pp. CD-ROM.

RISSATO, S. R.; LIBÂNIO, M.; GIAFFERIS, G. P.; GERENUTTI, M. Determinação de pesticidas organoclorados em água de manancial, água potável e solo na região de bauru (SP). **Química Nova**, v. 27, n.5, p. 739-743, 2004.

SAHA, S.; KAVIRAJ, A. Acute toxicity of synthetic pyrethroid cypermethrin to some freshwater organisms. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 80, p. 49–52, 2008.

SANTOS, V. M. R.; DONNICI, C. L.; DA COSTA, J. B. N.; CAIXEIRO, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, v. 30, n.1, p. 159-170, 2007.

SARRAZIN, M.; DODARD, S. G.; SAVARD, K.; LACHANCE, B.; ROBIDOUX, P.Y.; KUPERMAN, R.G.; HAWARI, J.; AMPLEMAN, G.; THIBOUTOT, S.; SUNAHARA, G.I. Accumulation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine by the earthworm *Eisenia andrei* in a sandy loam soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 10, p. 2125–2133, 2009.

SCHAEFER, M. Behavioural endpoints in earthworm ecotoxicology. Evaluation of different test systems in soil toxicity assessment. **Journal Soils Sediments** 3, v.2, p.79–84, 2003.

SHIPITALO, M. J.; BAYON, R. C. Quantifying the effects of earthworms on soil aggregation and porosity. In: EDWARDS, C. A. (Ed). **Earthworm ecology**. 2. ed. Boca Raton, London, New York: CRC Press, 2004. p.183- 208.

SIEGFRIED, B. D. Comparative toxicity of pyrethroid insecticides to terrestrial and aquatic insects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.12, p. 1683-1689, 1993.

SINGH, R.P.; SINGH, R. Adsorption and movement of cypermethrin on Indian soils amended with Cationic, non-ionic and anionic surfactants. **Adsorption Science & Technology**, v. 22, n. 7, p. 553-564, agos. 2004.

SOUSA, A.; PEREIRA, R.; ANTUNES, S.C.; CACHADA, A.; PEREIRA, E.; DUARTE, A.C.; GONÇALVES, F. Validation of avoidance assays for the screening assessment of soils under different anthropogenic disturbances. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, p. 661-670, 2008.

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.

SPURGEON, D. J.; HOPKIN, S.P. Comparisons of metal accumulation and excretion kinetics in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to contaminated field and laboratory soils. **Applied Soil Ecology**, v. 11, p. 227-243, 1999.

STEFANI, J. A. **Avaliação comparativa do efeito de compostos fungicidas sintético e natural por parâmetros biológicos do solo**. 2009. 71 f. Dissertação de Mestrado: Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios; Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. Instituto Biológico, São Paulo, 2010.

SUN, Y.; DIAO, X.; ZHANG, Q.; SHEN, J. Bioaccumulation and elimination of avermectin B1a in the earthworms (*Eisenia fetida*). **Chemosphere**, v. 60, p. 699–704, 2005.

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS (SUCEN). Manual/Normas do uso de pragas da SUCEN. 2009. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/down/segtrb/sequi1.pdf>. Acesso em: 29 mar. 2009.

TALLEY, J. W.; GHOSH, U.; TUCKER, S. G.; FUREY, J. S.; LUTHY, R. G. Particle-Scale understanding of the bioavailability of PAHs in sediment. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n.3, p. 477-483, 2002.

TALLUR, P. N.; MEGADI, V. B.; NINNEKAR, H. Z. Biodegradation of cypermethrin by *Micrococcus* sp. Strain CPN 1. **Biodegradation**, v. 19, p.77–82, 2008.

TAYLOR, K. S.; WALLER, G. D.; CROWDER, L. A. Impairment of classical conditioned response of the honey bee (*Apis mellifera* L.) by sublethal doses of synthetic

pyrethroid insecticides. **Apidologie**, v. 18, p. 243–252, 1987.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). 2006. **Pesticides: Reregistration: Cypermethrin**. 2006. USEPA [Internet]. Disponível em: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/reregistration/cypermethrin/>. Acesso em: 16 set. 2009.

VAMPRÉ, T. M.; FUCCILLO, R.; ANDRÉA, M. M. Oligoqueta *Eisenia andrei* como bioindicador de contaminação de solo por hexaclorobenzeno. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 59-66, 2010.

VAN GESTEL C.A.M. DIRVEN-VAN, B.; BAERSELMAN, R. Accumulation and elimination of Cadmium, Chromium and Zinc and effects on growth and reproduction in *Eisenia andrei* (Oligochaeta, Lumbricæ). **Science of the Total Environment**, Suppl., p. 585-597, 1993.

VAN GESTEL, C. A. M.; WEEKS, J. M. Recommendations of the 3rd International Workshop on Earthworm Ecotoxicology. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 57, p.100-105, 2004.

VIJVERBERG, H.P.M; BERCKEN, J. V. Neurotoxic effects and the mode of action of pyrethroids insecticides. **Toxicology**, v.21, p. 105-126, 1990.

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**. Elsevier Science Publishers, 1988. p.759-765.

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

YUDELMAN, M.; RATTA, A.; NYGAARD, D. Pest management and food production looking to the future. 1998. Disponível em <http://www.ifpri.org/sites/default/files/pubs/2020/dp/dp25.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2009.

WORTHING, C.R.; HANCE, R.J. **The Pesticide Manual**. 9th Ed. Surrey (R.U.): British Crop Protection Council, 1991. p. 208-209.

WEBER, J.B.; WIKERSON, G.G.; REINHARDT, C.F. Calculating pesticide sorption coefficients (Kd) using selected soil properties. **Chemosphere**, v. 55, p. 157–166, abril. 2004.

WEEKS, J.M., COMBER, D.W. Ecological risk assessment of contaminated soils. **Mineralogical Magazine**, v.69, p. 601–613, 2005.

WILLIS, K.J.; LING, N. Toxicity of the aquaculture pesticide cypermethrin to planktonic marine

copepods. **Agriculture Research**, v. 35, p. 263-270, 2004.

ZHANG, B.; PAN, X.; COBB, G. P.; ANDERSON, T. A. Uptake, bioaccumulation, and biodegradation of hexahydro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazine (RDX) and its reduced metabolites (MNX and TNX) by the earthworm (*Eisenia fetida*). **Chemosphere**, v. 76, p. 76–82, 2009.

ZHOU, S.; DUAN, C.; WANG, X.; WONG H. G. M.; YU, Z.; FU, H. Assessing cypermethrin-contaminated soil with three different earthworm test methods. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, p.1381–1385, 2008.

ZHU, L. S.; WANG, G. Z.; XU, Y. X. Effect and toxicity of fenpropathrin, phoxim and their mixture on bees. **Agricultural Environment Protection**, v.18, p.165–167, 1999.



SECRETARIA DE
AGRICULTURA E ABASTECIMENTO



GOVERNO DO ESTADO DE
SÃO PAULO
TRABALHANDO POR VOCÊ

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](#)