



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PAULO ROGER LOPES ALVES

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE AGROTÓXICOS EM
Eisenia andrei (OLIGOCHAETA) E *Folsomia candida*
(COLLEMBOLA)**

Londrina
2010

PAULO ROGER LOPES ALVES

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE AGROTÓXICOS EM
Eisenia andrei (OLIGOCHAETA) E *Folsomia candida*
(COLLEMBOLA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

Orientador(a): Prof. Dr. Amarildo Pasini
Co- Orientador(a): Profa. Dra. Elke J. B. N. Cardoso

Londrina
2010

PAULO ROGER LOPES ALVES

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE AGROTÓXICOS EM
Eisenia andrei (OLIGOCHAETA) E *Folsomia candida*
(COLLEMBOLA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Agronomia.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Elke J. B. N. Cardoso
ESALQ/USP

Dr. Alexandre Martins Martines

Dr. Daniel Ricardo Sosa-Gomez
EMBRAPA

Londrina, 15 de Dezembro de 2010.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Antonio Pardo Alves e Maria Antonia Lopes Alves, pelo exemplo de vida, sempre ensinando e apoiando com muito amor, além da paciência para me orientar durante a trajetória. Aos irmãos Robson Lopes Alves e Vitor Hugo Lopes Alves, pela cumplicidade e companheirismo de sempre, além dos ensinamentos diários. À minha avó Antonia Pardo Alves, pelo carinho e amor sempre demonstrados, além dos ensinamentos para a vida toda, “in memoriam”, com saudades.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pois através dele obtive perseverança, saúde e sabedoria para cumprir esta etapa.

Ao meu orientador professor doutor Amarildo Pasini não só pela constante orientação neste trabalho, sobretudo pela sua amizade e apoio nas dificuldades cotidianas.

À minha co-orientadora professora doutora Elke Jurandy Bran Nogueira Cardoso, pela excelente orientação, receptividade, amizade, e pela confiança depositada durante o período do estudo.

Ao doutor Alexandre Martin Martines, pela oportunidade oferecida, confiança depositada, ensinamentos repassados, além da amizade criada.

Aos professores doutores José Paulo Sousa e Rui Ribeiro da Universidade de Coimbra pelo apoio, ensinamentos repassados, e pelas sugestões para a dissertação.

Aos professores Maurício Ursi Ventura e Ayres de Oliveira Menezes Jr., pelos ensinamentos prestados e sugestões para a melhoria do trabalho.

Aos pesquisadores doutor Marcos Garcia e Julia Niemeyer pelas contribuições para a melhoria do trabalho.

À Fundação AGRISUS pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos colegas Jamil de Moraes Pereira, Daniel Bini, André Shigueyoshi Nakatani, Rafael Vasconcellos, Thiago Gumiere, Carlos Marcelo Ribeiro, Fábio Akio Shiraishi, Mylène Calciolari Pinheiro da Silva, Marina Yumi Horta Miyauchi, Joice Andrade Bonfim, Julia Corá Segat, Aline Passos, Sara Ruiz Hirata, Cristiane Alcântara dos Santos e Aline Figueiredo, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de

Queiroz” (ESALQ/USP), pela importante amizade, auxílio, ensinamentos, e acolhimento no laboratório.

Aos colegas Mateus Gimenez Carvalho, Luciana Costa, Beatriz Kraemer, Ruben Silva, Orcial Bortoloto, Marie Bartz, e Adriano Thibes pelo companheirismo, amizade e incentivo durante esta etapa de minha vida.

Aos técnicos Luis Fernando Baldesin e Denise Mescolotti do laboratório de Microbiologia do Solo, do Departamento de Ciência do Solo, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP), pelos ensinamentos, amizade e pela importante contribuição no decorrer do trabalho.

Ao técnico Davi Tramontina do laboratório de entomologia da Universidade Estadual de Londrina, pela amizade, ensinamentos, e contribuição no trabalho.

Aos meu pais, Antonio Pardo Alves e Maria Antonia Lopes Alves que me deram apoio, não só nessa, mas em todas as fases da vida, sempre com muito amor, respeito e compreensão.

Aos meus irmãos Robson Lopes Alves e Vitor Hugo Lopes Alves, pelo companheirismo, apoio durante os momentos difíceis e conhecimentos de vida sempre repassados.

À minha avó Antonia Pardo Alves “in memoriam”, por sempre acreditar no meu potencial e me apoiar em todas as decisões com muito amor.

Às minhas cunhadas Eliane Martinez Alves e Carina Bezerra da Silva, pela presença importante na família, que a tornou mais forte e unida.

Ao meu sobrinho Guilherme Martinez Alves por alegrar meus dias e me dar força para continuar.

Às minhas amigas Jussara de Lima, Marcia Tiemi Murate e aos amigos Lucas Fraga, Daniel Migliorini, Luciano Fernandes Koyashiki, André Nagaya, Leandro Chiarotti, Alex Rezende, Guilherme Gouveia, Raphael Borghesi, Diego Alfieri, Pedro Henrique Lopes Rosa, Hugo Favoreto, Roberto Delicato pela grande amizade e pelos bons momentos proporcionados, essenciais para a descontração e crescimento pessoal.

A todos os meus familiares que sempre me apoiaram e incentivaram durante a caminhada acadêmica.

"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."

Martin Luther King

ALVES L., Paulo Roger. **Avaliação Ecotoxicológica de Agrotóxicos em *Eisenia andrei* (Oligochaeta) e *Folsomia candida* (Collembola)**. 2010. 118 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar, por meio de testes ecotoxicológicos, as influências de três inseticidas e dois fungicidas em *Eisenia andrei* (Oligochaeta), e *Folsomia candida* (Collembola), seguindo-se padrões ISO e OECD. Foram investigados os inseticidas fipronil, thiametoxam e imidacloprid, e os fungicidas captan e carboxin + thiram. Observaram-se mortalidades significativas de *F. candida*, ao fim de 14 dias, para todas as substâncias químicas avaliadas. Considerados tóxicos, imidacloprid e fipronil apresentaram LC₅₀ de 20,96 e 59,62 mg de ingrediente ativo/kg de solo seco, respectivamente. Para minhocas observaram-se mortalidades significativas apenas por imidacloprid, que apresentou LC₅₀ de 25,53 mg.kg⁻¹. Após 28 dias de exposição, a reprodução dos colêmbolos foi reduzida por imidacloprid (EC₅₀ de 0,006 mg.kg⁻¹), carboxin+ thiram (EC₅₀ 6,09 mg.kg⁻¹) e thiametoxam (EC₅₀ 39,08 mg.kg⁻¹). Também se constatou efeito negativo de imidacloprid (EC₅₀ 4,07 mg.kg⁻¹) e carboxin + thiram (EC₅₀ 56,38 mg.kg⁻¹) para minhocas. Captan demonstrou moderado efeito neste teste de toxicidade crônica (EC₅₀ 334,84 mg.kg⁻¹) e, os inseticidas fipronil (EC₂₀ 23,16 mg.kg⁻¹) e thiametoxam (EC₅₀ 791,99 mg.kg⁻¹) apresentaram leve efeito de toxicidade na reprodução de *E. andrei*. Nenhum dos produtos avaliados, nos testes de fuga, apresentou repelência de *F. candida*, no período de 48 horas. Pelo contrário, houve efeito de atração destes artrópodes pelos sítios contaminados. *E. andrei* apresentou efeito de repelência aos substratos contaminados com imidacloprid (EC₅₀ 0,11 mg.kg⁻¹), captan (EC₅₀ 33,54 mg.kg⁻¹), carboxin + thiram (EC₅₀ 60,32 mg.kg⁻¹) e thiametoxam. Imidacloprid teve efeito tóxico significativo em concentrações inferiores às que são comercialmente recomendadas para o tratamento de sementes.

Palavras-chave: Minhocas. Colêmbolos. Ecotoxicologia. Inseticidas. Fungicidas.

ALVES, L. Paulo Roger. **Ecotoxicological evaluation of insecticides and fungicides used on seed dressing.** 2010. 118 f. Thesis (Master's Degree in Agronomy) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

The aim of this study was evaluate through ecotoxicological tests, the impact of three insecticides and two fungicides on *Eisenia andrei* (Oligochaeta) and *Folsomia candida* (Collembola), following the standards ISO and OECD. We investigated the insecticide Fipronil, Imidacloprid and Thiametoxam, and fungicides Captan, Carboxin + Thiram. Significant mortalities were observed in *F. candida*, after 14 days, for all active ingredients. Considered highly toxic, Imidacloprid and Fipronil had LC₅₀ of 20.96 and 59.62 mg a.i. / kg dry soil, respectively. For earthworms significant mortalities were observed only for Imidacloprid, which showed LC₅₀ of 25.53 mg / kg. After 28 days of exposure, reproduction of springtails has been greatly reduced by Imidacloprid, with EC₅₀ value of 0.006 mg / kg, and moderately by Carboxin Thiram (EC₅₀ 6.09 mg / kg) and Thiametoxam (EC₅₀ 39.08 mg / kg). We also observed the strong effect of Imidacloprid (EC₅₀ 4.07 mg / kg) and Carboxin + Thiram (EC₅₀ 56.38 mg / kg) for earthworms. Captan showed moderate chronic effects in this test (EC₅₀ 334.84 mg / kg), and the insecticide Fipronil (EC₂₀ 23.16 mg / kg) and Thiametoxam (EC₅₀ 791.99 mg / kg) had a slight effect on reproduction toxicity of *E. andrei*. Any i.a. evaluated in the avoidance test showed repellency of the *F. candida* in 48 hours. Instead of avoidance behavior, there was attraction effect of these arthropods by contaminated sites. Earthworms have a strong repellency effect to the substrates contaminated by Imidacloprid (EC₅₀ 0.11 mg / kg). Individuals of *E. andrei* showed moderate repellent SAT contaminated by the fungicide Captan (EC₅₀ 33.54 mg / kg) and Thiram Carboxin (EC₅₀ 60.32 mg / kg.), and slight effect observed by Thiametoxam. Imidacloprid had a significant effect at concentrations below those which are commercially recommended for seed treatment.

Keywords: Earthworms. Collembola. Ecotoxicology. Pesticides. Fungicides.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 3.1 –	Mortalidade (%) de <i>E. andrei</i> em solo artificial contaminado com imidacloprid	49
Figura 3.2 –	Redução de biomassa corporal (% do peso inicial) de <i>E. andrei</i> em contato com diferentes concentrações de imidacloprid em solo artificial (28 dias de exposição).	50
Figura 3.3 –	Número de juvenis de <i>E. andrei</i> encontrados em solo artificial contaminado com Imidacloprid.	51
Figura 3.4 –	Redução de biomassa corporal (% do peso inicial) de <i>E. andrei</i> em contato com diferentes concentrações de Fipronil.	51
Figura 3.5 –	Redução de biomassa corporal (% do peso inicial) de <i>E. andrei</i> em contato com diferentes concentrações de carboxin + thiram.	52
Figura 3.6 –	Resposta de fuga ou atração de <i>E. andrei</i> às diferentes concentrações de captan (mg de ingrediente ativo.kg ⁻¹ de solo seco) em solo artificial (média de resposta e barras de erro padrão).	55
Figura 3.7 –	Resposta de fuga ou atração de <i>E. andrei</i> às diferentes concentrações de carboxin + thiram (mg de ingrediente ativo.kg ⁻¹ de solo seco) em solo artificial (média de resposta e barras de erro padrão).	57
Figura 3.8 –	Alteração morfológica (A), e morte de minhocas (B) (<i>E. andrei</i>) expostas a solos contaminados com o inseticida imidacloprid em teste de toxicidade aguda.	59
Figura 3.9 –	Resposta de fuga ou atração de <i>E. andrei</i> às diferentes concentrações de imidacloprid (mg de ingrediente ativo.kg ⁻¹ de solo seco) em solo artificial (média de resposta e barras de erro padrão).	60
Figura 3.10 –	Resposta de fuga ou atração de <i>E. andrei</i> às diferentes concentrações de fipronil (mg de ingrediente ativo.kg ⁻¹ de solo seco) em solo artificial (média de resposta e barras de erro padrão).	62

Figura 4.11 – Resposta de fuga ou atração de <i>E. andrei</i> às diferentes concentrações de thiametoxam (mg de ingrediente ativo.kg ⁻¹ de solo seco) em solo artificial (média de resposta e barras de padrão).....	64
Figura 4.1 – Mortalidade (%) de <i>F. candida</i> em solo artificial contaminado com imidacloprid ou fipronil.....	79
Figura 4.2 – Número de juvenis de <i>F. candida</i> encontrados em solo artificial contaminado com carboxin + thiram.	80
Figura 4.3 – Número de juvenis de <i>F. candida</i> encontrados em solo artificial contaminado com imidacloprid.....	80
Figura 4.4 – Número de juvenis de <i>F. candida</i> encontrados em solo artificial contaminado com Thiametoxam.	81
Figura 4.5 – Porcentagem de fuga (+) ou atração (-) de <i>F. candida</i> às diferentes concentrações de imidacloprid em solo artificial (média de resposta e barras de erro padrão).....	84
Figura 4.6 – Porcentagem de fuga (+)/atração (-) de <i>F. candida</i> às diferentes concentrações de fipronil em solo artificial (média de resposta e barras de erro padrão).....	85
Figura 4.7 – Porcentagem de fuga (+)/atração (-) de <i>F. candida</i> às diferentes concentrações de thiametoxam em solo artificial (média de resposta e barras de erro padrão).....	87
Figura 4.8 – Porcentagem de fuga (+) ou atração (-) de <i>F. candida</i> às diferentes concentrações de captan em solo artificial (média de resposta e barras de erro padrão).....	88
Figura 4.9 – Porcentagem de fuga (+)/atração (-) de <i>F. candida</i> às diferentes concentrações de carboxin + thiram em solo artificial (média de resposta e barras de erro padrão).	90

LISTA DE TABELAS

- Tabela 3.1** – Cálculo do volume estimado de agrotóxicos (ingredientes ativos), sob recomendação comercial, expostos por kg de solo, considerando os 5 primeiros cm do solo e as exigências para a cultura da soja.....45
- Tabela 3.2** – Concentração letal (LC50) do teste de toxicidade aguda; concentração estimada (EC50, EC20) dos testes de toxicidade crônica e de fuga; maior concentração testada sem efeito observado (NOEC), e menor dose testada com efeito observado (LOEC) com minhocas *E. andrei*, expostas aos agrotóxicos utilizados no tratamento químico de sementes (mg de i.a./kg de solo seco).....53
- Tabela 4.1** – Volume dos agrotóxicos calculados por kg de solo, considerando os 5 primeiros cm do solo, e as recomendações de plantio na cultura da soja.....75
- Tabela 4.2** – Dados de concentração letal (LC50) do teste de toxicidade aguda; concentração estimada (EC50, EC20) dos testes crônico e de fuga; maior concentração testada sem efeito observado (NOEC), e menor dose testada com efeito observado (LOEC) em *F. candida*, expostos aos agrotóxicos utilizados no tratamento químico de sementes (valores em mg de i.a/kg).82

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 TRATAMENTO DE SEMENTES COM AGROTÓXICOS	20
2.2 INSETICIDAS.....	22
2.2.1 Fipronil.....	23
2.2.2 Thiametoxam.....	24
2.2.3 Imidacloprid.....	26
2.3 FUNGICIDAS.....	27
2.3.1 Captan.....	28
2.3.2 Carboxin + Thiram.....	29
2.4 ECOTOXICOLOGIA.....	30
2.5 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS	31
2.5.1 Teste de Toxicidade Aguda.....	33
2.5.2 Teste de Toxicidade Crônica	35
2.5.3 Teste de fuga	38
2.6 EFEITOS DE AGROTÓXICOS EM ORGANISMOS NÃO ALVO	41
2.7 ORGANISMOS BIOINDICADORES DE QUALIDADE DO SOLO	45
2.7.1 Minhocas	47
2.7.1.1 <i>Eisenia andrei</i>	49
2.7.2 Colêmbolos	51
2.7.2.1 <i>Folsomia candida</i>	53
3 ARTIGO A: AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE AGROTÓXICOS EM <i>Eisenia andrei</i> (OLIGOCHAETA)	40
3.1 RESUMO E ABSTRACT.....	40
3.2 INTRODUÇÃO.....	41
3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	43
3.3.1 Organismos Teste	43
3.3.2 Solo Artificial e Contaminantes.....	44
3.3.3 Teste de Toxicidade Aguda	45
3.3.4 Testes de Toxicidade Crônica	46

3.3.5 Testes de Fuga	46
3.3.6 Análises dos Dados.....	47
3.4 RESULTADOS	48
3.4.1 Validação dos Testes	48
3.4.2 Resposta Aguda, ou Mortalidade de <i>E. andrei</i> Resultados	49
3.4.3 Resposta Crônica na Reprodução de <i>E. andrei</i>	50
3.4.4 Resposta Comportamental ou de Fuga de <i>E. andrei</i>	52
3.5 DISCUSSÃO...	53
3.5.1 Efeitos de Captan em <i>E. andrei</i>	53
3.5.2 Efeitos de Carboxin + thiram em <i>E. andrei</i>	55
3.5.3 Efeitos de Imidacloprid em <i>E. andrei</i>	57
3.5.4 Efeitos de Fipronil em <i>E. andrei</i>	60
3.5.5 Efeitos de Thiametoxam em <i>E. andrei</i>	62
3.6 CONCLUSÕES...	64
3.7 REFERÊNCIAS.....	65

4 ARTIGO B: AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE AGROTÓXICOS EM <i>Folsomia candida</i> (COLLEMBOLA).	70
4.1 RESUMO E ABSTRACT.....	70
4.2 INTRODUÇÃO.....	71
4.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	73
4.3.1 Organismos Teste	73
4.3.2 Solo Artificial e Contaminantes.....	73
4.3.3 Teste de Toxicidade Aguda	75
4.3.4 Testes de Reprodução	76
4.3.5 Testes de Fuga	76
4.3.6 Análises dos Dados.....	77
4.4 RESULTADOS	78
4.4.1 Validação dos Testes	78
4.4.2 Resposta Aguda, ou Mortalidade de <i>F. candida</i>	78
4.4.3 Resposta Crônica na Reprodução de <i>F. candida</i>	79
4.4.4 Resposta Comportamental ou de Fuga de <i>F. candida</i>	81
4.5 Discussão.....	82
4.5.1 Efeitos de Imidacloprid em <i>F. candida</i>	82

4.5.2 Efeitos de Fipronil em <i>F. candida</i>	84
4.5.3 Efeitos de Thiametoxam em <i>F. candida</i>	86
4.5.4 Efeitos de Captan em <i>F. candida</i>	87
4.5.5 Efeitos de Carboxin + thiram em <i>F. candida</i>	89
4.6 CONCLUSÕES.....	90
4.7 REFERÊNCIAS.....	91
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	96
6 CONCLUSÕES GERAIS.....	97
REFERÊNCIAS.....	98

1 INTRODUÇÃO

Sementes podem carregar fungos, bactérias e vírus em sua superfície e em seu interior, alguns podem causar doenças nas plantas. Além disso, os solos, com excessão dos fumigados ou esterilizados, apresentam naturalmente fungos e outros organismos que também podem causar injúrias em sementes e plântulas (MUNKVOLD et al., 2006).

Insetos também podem causar grandes danos às sementes. Uma vez semeadas, insetos praga podem causar destruição das sementes e de plântulas, em particular, quando as condições do meio estão desfavoráveis à rápida germinação e emergência (PAULSRUD et. al., 2001)

Injúrias em sementes e plântulas ocasionam redução do stand (número de plantas/m²) no campo, havendo, na maioria das vezes a necessidade da ressemeadura, prática extremamente cara, que gera sérios prejuízos aos agricultores. No entanto, esta pode ser evitada ou minimizada com uso preventivo do tratamento químico de sementes (MUNKVOLD et al., 2006; DHINGRA, 1985). Este tratamento tem sido uma prática comum, que visa reduzir perdas no estabelecimento das culturas. Ele se dá pela aplicação de agrotóxicos (fungicidas, inseticidas, nematicidas, entre outros) na superfície da semente, os quais vão servir tanto para reduzir e controlar, quanto para repelir os insetos e outros organismos que atacam as sementes e plântulas. É um método simples, e de menor custo, comparado aos demais. No Brasil, estima-se que 100% das sementes de soja são tratadas com fungicidas e 30% com inseticidas (BAUDET; PESKE, 2006).

Este e outros manejos utilizados na agricultura moderna, apesar dos benefícios citados, podem ter efeitos negativos. O uso intenso de agrotóxicos é um risco direto de toxicidade aos aplicadores, bem como aos demais organismos vivos que estão expostos ao contato. No caso dos produtos utilizados na proteção de sementes, o ingrediente ativo fica em contato direto com os constituintes do solo, dentre estes, a argila e a matéria orgânica, as quais têm grande capacidade de reter químicos (GARCIA, 2004), expondo assim os organismos não alvo da fauna do solo às contaminações.

Sabe-se que nos ecossistemas terrestres os invertebrados e os micro-organismos são responsáveis por diversos processos biológicos e bioquímicos importantes, participando estes dos ciclos do carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre, por meio da mineralização da matéria orgânica morta. Esta ciclagem dos elementos químicos tem o fundamental papel de suprir as demandas de nutrientes das plantas. Desta forma a poluição gerada pelo constante uso de agrotóxicos pode promover o desequilíbrio deste sistema edáfico (CORTET et al., 1999) e conseqüentemente, comprometer sua sustentabilidade do sistema.

Resultados da literatura apontam efeitos negativos em organismos da fauna edáfica, pela presença de resíduos no solo de produtos químicos utilizados na agricultura. Como é o exemplo de artrópodes, microartrópodes, e oligoquetas (CORTET et al., 2002; DANFA *et al.*, 2002) dos quais alguns tem importante papel de predação (MOSER; OBRYCKI, 2009), efeitos semelhantes podem ser observados na microbiota edáfica, afetando a atividade desses micro-organismos no solo (MALKOMES, 1993).

Tal efeito colateral do tratamento de sementes tem preocupado os órgãos ambientais, visto que em países europeus diversas diretrizes já foram estabelecidas para prevenir e regular os efeitos de produtos químicos na fauna do solo (EUROPEAN UNION, 1997, 2002).

Tais efeitos são investigados considerando uma ligação entre ecologia, toxicologia e química, em uma ciência chamada ecotoxicologia (RÖMBKE; MOLTMANN, 1996) que, por meio de testes ecotoxicológicos, já vem sendo aplicada internacionalmente e no qual já foram estabelecidos os padrões para testes com invertebrados do solo, inclusive com a proposta de solo artificial (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 1984) e organismos padrões pela Internacional Organization for Standardization (ISO).

Desta forma, a maioria dos trabalhos ecotoxicológicos relacionados a invertebrados do solo utilizam minhocas, colêmbolos, enquitreídeos (EDWARDS, 1989; EDWARDS et al., 1995; RÖMBKE et al., 1996), pois os mesmos atendem aos critérios essenciais tais como: ter importante papel ecológico no solo; estão largamente distribuídos em várias regiões geográficas; estar em freqüente contato com o substrato e, assim, expostos aos efeitos dos químicos; possuir alta taxa de

reprodução em curto período, além de serem relativamente fáceis de manter culturas em laboratório.

Sabe-se que as minhocas influenciam as condições do meio e também afetam as propriedades físicas químicas e biológicas dos solos. A sua atividade no solo cria canais e galerias, interferindo na porosidade, estrutura e oxigenação do solo e na drenagem de água. Como se alimentam de matéria orgânica no solo, suas ações influem na decomposição e proteção da matéria orgânica intra e interagregados, afetando também a ciclagem e disponibilidade de nutrientes (especialmente N e P) para o desenvolvimento e a produção vegetal (BROWN et al., 2004a).

Os organismos afetados indiretamente pela atividade das minhocas incluem micro-organismos (bactérias e fungos), a mesofauna (ácaros, colêmbolos e enquitreídeos), outros membros da macrofauna invertebrada do solo (larvas de mariposas, besouros, piolhos de cobra e tatuzinhos) e as raízes das plantas (BROWN, 1995; BROWN; DOUBE, 2004).

Minhocas são consideradas “engenheiras”, pois sua atividade no solo é determinante na estrutura das comunidades edáficas, regulando o fluxo de recursos usados por várias outras espécies vivendo no solo (JONES et al., 1994).

Os colêmbolos são os mais numerosos, e mais largamente distribuídos artrópodes terrestres, normalmente encontrados sob alta densidade por metro quadrado. Apesar de não contribuírem fortemente com a biomassa e respiração total, possuem um papel muito importante como reguladores do processo de decomposição através da predação da microfauna (JÄNSCH; RÖMBKE, 2003). Por alimentar-se de matéria orgânica morta e de micro-organismos do solo, colêmbolos tem significativa influência na ecologia microbiana do solo e na fertilidade, assim, através da sua influência sobre micro-organismos, decomposição e ciclagem de nutrientes, são considerados importantes habitantes do solo em todo o mundo (CULIK et al., 2003). São conhecidos também pela sua contribuição na quebra da matéria orgânica morta em solos ácidos, onde minhocas e diplópodes estão ausentes (WILE; KROGH, 1998). Colêmbolos são uma parte integral do ecossistema do solo e são vulneráveis a efeitos de contaminação neste ambiente. Devido a sua abundância e diversidade, estes organismos têm sido amplamente

usados para avaliar os impactos ambientais gerados por uma grande gama de poluentes no solo (FOUNTAIN; HOPKIN, 2005).

No Brasil ainda são incipientes as informações sobre o efeito do tratamento de sementes em minhocas e colêmbolos. Por isso, este trabalho teve o objetivo de avaliar a mortalidade, reprodução e o comportamento de fuga das espécies da minhoca *Eisenia andrei* e do colêmbolo *Folsomia candida*, frente à exposição a diferentes doses de inseticidas e fungicidas comumente utilizados no tratamento de sementes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 TRATAMENTO DE SEMENTES COM AGROTÓXICOS

O termo “sementes tratadas”, diz respeito a sementes nas quais se deu alguma aplicação de pesticidas ou que foram sujeitas a determinados processos para redução, controle, ou repelência de organismos causadores de doenças, insetos, ou outras pragas que atacam sementes e plântulas. Esta definição ainda inclui o controle de pragas que atacam as sementes armazenadas, após a colheita (MUNKVOLD et al., 2006). Essa prática, se adequadamente realizada, pode reduzir o número de aplicações foliares, que muitas vezes precisam ser iniciadas logo após à emergência das plântulas (MENTEN, 1991).

Os primeiros relatos do uso de sementes tratadas são de 60 A.D., quando vinho e folhas de ciprestes trituradas foram colocadas junto a sementes, para protegê-las de insetos. No entanto apenas em 1750 Tillet comprovou cientificamente a eficiência de uma solução de sal e limão no controle do carvão do trigo. No início dos anos 1800, uma solução de sulfato de cobre se mostrou mais eficiente no controle desta doença, mas esta solução logo foi substituída por carbonato de cobre nos anos de 1920 (MUNKVOLD et al., 2006; PAULSRUD et al., 2001).

Na década de 1930, o tratamento de sementes com compostos organo-mercuriais teve grande sucesso no controle de um bom número de doenças ligadas às sementes (PAULSRUD et al., 2001). O alto risco de acidentes por contaminação destes compostos em seres humanos levou à proibição destes e, assim, novos fungicidas sistêmicos e de contato foram adotados, de acordo com as necessidades específicas (MUNKVOLD et al., 2006).

A aplicação destes agrotóxicos (fungicidas, inseticidas, nematicidas, entre outros) na superfície das semente, tornou-se uma prática muito comum, de forma que o tratamento de sementes com fungicidas, oferece garantia adicional ao estabelecimento da lavoura e custos reduzidos (menos de 0,5% do custo de instalação da lavoura) (HENNING, 2005). Assim, esta ferramenta já foi muito

disseminada na agricultura nacional e é estimado que, no Brasil, 100% das sementes de soja são tratadas com estes produtos, e apenas 30% com inseticidas Baudet e Peske (2006)

O tratamento de sementes com agrotóxicos tende a evitar ou minimizar os danos causados no início das culturas, mantendo assim um maior estado de plantas com qualidade no campo (DHINGRA, 1985). As sementes que normalmente são tratadas com um ou mais produtos são as de milho, algodão, soja, sorgo, amendoim, girassol, alguns cereais (cevada, aveia, centeio, trigo e arroz), gramíneas, beterraba, dentre outras.

Os fungicidas têm sua eficiência comprovada cientificamente, visto que existem vários trabalhos apontando reduções significativas dos danos causados em plantas por micro-organismos patogênicos, devido ao uso do tratamento químico e sementes (GOULART, 1988; LENZ et al., 2008; GIESLER; ZIEMS, 2008). Todas as sementes comercializadas de milho e sorgo passam pelo tratamento com fungicidas e, algumas vezes, os mesmos são aplicados em conjunto com algum inseticida (MUNKVOLD et al., 2006; PAULSRUD et al., 2001; LIPPS et al., 1988).

O crescente uso de inseticidas para este fim também já é evidente em um panorama global, onde é conhecido um aumento das vendas globais de sementes tratadas, de 560 milhões de Euros em 1994, para 780 milhões de Euros em 1999. Grande parte deste aumento das vendas, é em função do maior emprego de inseticidas nas sementes (HICKS, 2000).

Este aumento está ligado à suplementação da produção no campo, como já foi observado por Leonel et al. (2009) e Ceccon (2004) que, ao avaliar os efeitos de inseticidas empregados no tratamento de sementes de milho, constataram incremento na produtividade desta cultura. Outros trabalhos evidenciam o efeito de controle, redução e repelência de pragas em função desta prática (PICININI, E.C.; FERNANDES, 2003; ÁVILA, 2003; VERNON et al., 2009).

Em paralelo com os benefícios já destacados, o acréscimo da aplicação destes químicos também evidenciam os efeitos negativos que este tratamento traz, como é o caso de envenenamentos acidentais por animais e crianças, exposição dos manipuladores a riscos de intoxicação, resíduos nos alimentos, fitotoxicidade em plantas, além de contaminações do solo, água e ar,

pelos resíduos deixados no ambiente (DHINGRA, 1985; PAULSRUD et al., 2001; VAN STRAALLEN, 2002b).

Alguns estudos têm se preocupado com a presença de resíduos de pesticidas em solos agrícolas devido ao seu excessivo uso (VAN STRAALLEN, 2002a). Organismos não alvo, os quais são benéficos tanto à cadeia trófica, quanto ao sistema ecológico, também estão expostos aos efeitos dos agrotóxicos empregados no tratamento de sementes, como é o caso da espécie *Harmonia axyridis* (Coleoptera: Coccinellidae), inseto predador que, em testes realizados por Moser e Obrycki (2009), sofreu sintomas neurotóxicos além de mortalidade larval, quando expostos a plântulas provindas de sementes tratadas com inseticidas da classe dos neonicotinóides. Malkomes (1993), também observou, em laboratório, certa redução na atividade microbiana do solo, causada pela aplicação de fungicidas utilizados no tratamento de sementes de batata.

2.2 INSETICIDAS

Os inseticidas sintéticos foram desenvolvidos durante e após a Segunda Guerra Mundial e, inicialmente foram eficazes e baratos. Assim os agricultores tornaram-se dependentes destes novos métodos de controle de pragas, os quais rapidamente substituíram os outros métodos químicos, culturais, e de controles biológicos. Nas décadas de 1950 e 1960, foi o ápice do uso de inseticidas na agricultura, entretanto, o uso continuou aumentando e, até hoje o principal meio de controle de pragas é feito pela aplicação destes compostos (GULAN; CRANSTON, 1994). Alguns dos melhores estudos sobre os benefícios dos pesticidas estimam os prejuízos gerados pela proibição do uso de inseticidas (DELAPLANE, 2000), devido à redução na produtividade causada por pragas.

O uso preventivo de inseticidas no tratamento químico de sementes é uma alternativa que proporciona maior uniformidade de plantas no campo, pois reduz o número de danos causados por pragas de solo e da parte aérea nas sementes e nas plântulas no início da cultura (AZENHA, 2003).

Os inseticidas usados em tratamento de sementes diferenciam-se de outros tipos de inseticidas pela sua ação sistêmica. Após a semeadura desprendem-se das sementes e, devido a sua baixa pressão de vapor e solubilidade em água, são lentamente absorvidos pelas raízes, conferindo à planta um adequado período de proteção contra insetos do solo e da parte aérea (SILVA, 1998).

O grupo de inseticidas considerado mais importante é o de organosintéticos. Este inclui os organoclorados, organofosforados e carbamatos, além de um número de outras classes, como por exemplo piretróides e neonicotinóides (MUNKVOLD et al., 2006; PAULSRUD et al., 2001).

O excessivo uso destes inseticidas provoca a seleção de organismos geneticamente resistentes aos princípios ativos e envolve alto poder destrutivo de agentes de controle biológico, em especial de parasitóides, além de prejudicar outros organismos não alvo, incluindo polinizadores e artrópodes do solo (GULAN; CRANSTON, 1994; RESH; CARDÉ, 2003).

2.2.1 Fipronil

O inseticida fipronil (5-amino-1-[2,6-dicloro-4-(trifluormetil) fenil]-4-[(trifluormetil) sulfinil]-1H-pirazol-3-carbonitrila) foi desenvolvido em 1985-87, e sua comercialização iniciou em 1993. Este é um membro da relativamente nova e pequena classe dos fenilpirazóis, a qual é altamente eficiente contra um grande número de insetos, pois age de forma sistêmica e de contato. Está disponível em uma variedade de formulações, incluindo grânulos dispersíveis em água (WG), micro granulados (RG), sólidos fluidos (FS), solução concentrada (SC) e ultra baixo volume (UBV) (TINGLE et al., 2000).

É um inseticida utilizado no controle de pragas de solo, extremamente ativo, e atua no sistema nervoso central do inseto inibindo o receptor do ácido gama aminobutírico (GABA). O sistema receptor-GABA é responsável pela inibição da atividade neural anormal e previne o estímulo excessivo dos nervos (COUTINHO et al., 2005). O inseticida apresenta-se ativo principalmente por ingestão, determina paralisia espástica, morte e eliminação dos insetos sensíveis. O

fipronil apresenta ainda a vantagem de controlar biótipos resistentes a outros produtos (BOARETTO; FORTI, 1997; HENNING, 2005).

A molécula de fipronil possui característica hidrofóbica, demonstrando boa resistência à chuva (TINGLE et al., 2002), garantindo assim que o produto permaneça ativo no solo por mais tempo. E, de acordo com World Health Organization (2010) é classificado como substância “Moderamente Perigosa” (classe II).

Embrapa (2002a) avaliou a eficiência de diferentes inseticidas no tratamento de sementes de soja em *Sternechus subsignatus* (Coleoptera: Curculionidae), e concluiu que Fipronil foi o tratamento mais eficiente no controle de adultos, redução de danos nas plantas, redução do número de larvas resultando em maior rendimento de grãos. Silva et al. (2009) verificaram o aumento de acúmulo de fitomassa seca de raiz, caule e folha, quando sementes de milho tratadas com este produto foram submetidas ao estresse de altas profundidades de semeadura. Na cultura do arroz, o tratamento nas dosagens de 25, 37,5, 50 e 62,5 g i.a. 100 kg⁻¹ de sementes, teve eficiência superior a 90% no controle de *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) (GRUTZMACHER et al., 2003). Além destes, existem diversos trabalhos demonstrando a eficiência do tratamento de sementes de inúmeras culturas com fipronil, no controle de pragas (STEVENS et al. 1998; WILDE et al., 2004; NAULT et al., 2006; VERNON et al., 2009).

2.2.2 Thiametoxam

O Thiametoxam (3-(2-cloro-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-[1,3,5]oxadiazinan-4-ilideno-N-nitroamina) foi sintetizado pela primeira vez em 1991. Após muitos exames laboratoriais e de campo, na busca por neonicotinóides, foi identificado como um dos melhores compostos preparados e, posteriormente, foi selecionado para seu desenvolvimento. É o primeiro representante da segunda geração de neonicotinóides e pertence à subclasse thia-nicotinyl, sendo comercializado pela primeira vez em 1998 (MAIENFISCH et al., 2001a).

É um inseticida sistêmico muito usado no Brasil no controle de diversas pragas, sendo recomendado para várias culturas, como tomate, pastagens, citros, café, cana-de-açúcar e fumo, entre outras (EMBRAPA, 2002a). É empregado tanto em aplicações foliares, no solo, quanto para o tratamento de sementes (MAIENFISCH et al., 2001b).

Classificado toxicologicamente por World Health Organization, (2010) como pouco tóxico (classe III), seu modo de ação está relacionado estrutural e funcionalmente à nicotina, que atua sobre os receptores nicotínicos da acetilcolina dos insetos, onde mimetiza o mensageiro químico acetilcolina e se liga ao seu sítio receptor, prejudicando irreversivelmente o sistema nervoso e, eventualmente, levando à morte do inseto (STENERSEN, 2004; NATIONAL REGISTRATION AUTHORITY, 2001).

Na literatura, o tratamento de sementes com Thiametoxam conta com descrições de eficiência de controle das pragas iniciais das culturas. Esta afirmação é comprovada por Wilde et al. (2001) que, utilizando este tipo de tratamento em sementes de trigo, verificaram alta eficácia no controle de duas espécies de pulgão do trigo, em período outonal. Significativo controle de *Dichelops sp.* (Hemiptera: Pentatomidae), na cultura do milho, também foi observado por Martins et al. (2006), quando comparado à testemunha. Ainda, no cultivo de milho, há relatos de excelente e duradoura atividade de controle de *Agriotes sp.*, *Melanotus sp.* (Coleoptera: Elateridae), e *Somaticus sp.* (Coleoptera: Tenebrionidae), além dos trabalhos com o mesmo objetivo sobre outras pragas, nas culturas de canola, algodão, cana de açúcar, entre outras (MAIENFISCH et al., 2001b).

Thiametoxam é degradado no solo e pode ser ainda mineralizado, mas sua meia vida depende principalmente da natureza e da biota do solo. O metabolismo anaeróbico de degradação é muito eficaz, e a fotodegradação, contribui para as substâncias localizadas na superfície. No entanto, em solos aeróbios, Thiametoxam produz vários metabólitos, incluindo o CGA 322704, que pode atingir níveis de até 35,6% do volume total de thiametoxam presente no solo. Estes metabólitos não afetam a respiração e nitrificação dos micro-organismos quanto, por outro lado, as minhocas demonstram sensibilidade tanto ao thiametoxam, quanto ao metabólito CGA 322704 (EC, 2007).

2.2.3 Imidacloprid

Imidacloprid [1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-2-nitroimino-imidazolidine] é um inseticida sintético, cloro-nicotinyl, da classe dos neonicotinóides. Este produto foi registrado e aprovado para uso pela primeira vez em 1994 (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2010; BACEY, 2001). É comercializado nas seguintes formulações: pó, emulsão concentrada, concentrado solúvel, granulado, líquido, granulado/peletes, grânulos dispersíveis em água e pó molhável (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2010), sendo os produtos comerciais Admire, Condifor, Gaucho, Premier, Premissa, Provado e Marathon os que contêm imidacloprid como o ingrediente ativo (EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK, 1996a).

É amplamente empregado no controle de insetos sugadores, como pulgões, tripses e mosca-branca, e no solo, para cupins e alguns outros insetos picadores. Pode ser usado no tratamento de sementes, do solo e aplicações foliares em diferentes culturas, incluindo o arroz, algodão, cereais, milho, soja, beterraba, batata, legumes, frutas cítricas, maçãs e peras, entre outras (EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK, 1996a; BUFFIN, 2003). É um inseticida sistêmico, quimicamente relacionado à nicotina. Funciona através do bloqueio dos receptores do sistema nervoso dos insetos, que são mais suscetíveis aos efeitos tóxicos do imidacloprid do que os de animais de sangue quente (BUFFIN, 2003). Este bloqueio leva ao acúmulo de acetilcolina, um neurotransmissor importante, resultando em paralisia do inseto, podendo levar à morte. É eficaz tanto por ação de contato, quanto pela via sistêmica (KIDD; JAMES, 1991). De acordo com a classificação de World Health Organization (2010), é considerada uma substância “Moderamente Perigosa” (classe II).

Embrapa (2002b) relacionaram o uso deste agrotóxico, quando aplicado em sementes de arroz, ao aumento de produtividade, e verificaram significativo acréscimo, comparando à sementes sem tratamento. Barbosa et al. (2002) também atribuíram aumentos na produtividade da cultura do feijão, devido à menor incidência da doença mosaico-dourado, pelo controle do inseto transmissor *Bemisia argentifoli* (Homoptera: Auchenorrhyncha: Aleyrodidae), através do mesmo manejo realizado nas sementes. Nesta mesma cultura foi visto ainda o controle de

93 – 99% de *Liriomyza sp.* (Diptera: Agromyzidae), utilizando o mesmo inseticida aplicado às sementes (SILVA et al., 1993). Numerosos trabalhos relatam a eficiência do uso de Imidacloprid no tratamento de sementes contra diversas pragas de diferentes culturas (HARVEY et al., 1998; NAUEN et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2008; MUNKVOLD et al., 1996; SLODERBECK et al., 1996).

2.3 FUNGICIDAS

Fungicidas sintéticos têm sido amplamente utilizados para a proteção das culturas agrícolas desde a II Guerra Mundial. Antes deles, eram usados os de contato, à base de enxofre, cobre e mercúrio (HOND et al., 2003). Entretanto, sua eficácia depende da completa distribuição do composto sobre as folhas e caules de plantas, e assim não foram totalmente eficientes a algumas doenças, especialmente após a ocorrência da infecção (PLIMMER et al., 2003).

Diferente dos fungicidas de contato, os sistêmicos são absorvidos pela cultura e distribuídos por transporte ativo em todas as partes da planta, incluindo as partes não-tratadas, novos brotos e folhas, proporcionando total proteção da planta contra o ataque, e ainda erradicando infecções já existentes (HOND et al., 2003). O uso agrícola de fungicidas sintéticos foi incrementado quando no final da década de 1960 se iniciou a sua comercialização, surgindo os benzimidazoles, carboxamidas, morfollinas, 2-amino-pirimidinas, organofosforados entre outros (PLIMMER et al., 2003).

Na década de 1970 surgiu a segunda geração dos fungicidas sintéticos: dicarboxinidas, fenilamidas, triazóis e fosetil-alumínio. E após 15 anos, surgiram novas classes, compreendendo anilinopirimidinas, fenilpirrol e ainda o grupo das estrobilurinas, que têm amplo espectro de ação sobre as principais classes de fungos patogênicos (PLIMMER et al., 2003).

Os fungicidas são parte integrante da produção agrícola mundial. Sem eles, as perdas seriam consideravelmente maiores (WALTERS, 2009). Dentre as formas de uso está a aplicação nas sementes, que oferece garantia adicional ao estabelecimento da lavoura a custos reduzidos. Deste modo, o tratamento de

sementes com fungicidas é uma prática que tem sido cada vez mais adotada pelos agricultores. Este aumento já foi percebido em determinadas regiões, partindo de menos de 5% em 1992, para 93% de sementes de soja tratadas com estes produtos (HENNING, 2005) em 2002.

O tratamento fungicida de sementes pode ser caracterizado de três formas, dependendo da natureza e finalidade: (LIPPS et al., 1988; MUNKVOLD et al. 2006), sendo: a) Desinfecção: é a eliminação de um patógeno que penetrou em células vivas da semente, infectou e estabeleceu-se. b) desinfestação: é o controle de esporos e outras formas de organismos patogênicos encontrados na superfície da semente. c) proteção: é um tratamento químico preventivo, para defender as sementes e mudas jovens de organismos patogênicos presentes no solo.

O uso contínuo dos fungicidas com os mesmos mecanismos de ação pode gerar o desenvolvimento de resistência das populações dos patógenos (WALTERS, 2009). Além desta característica negativa, já são conhecidos efeitos fitotóxicos em plântulas (GOULART, 1993) e efeitos prejudiciais a organismos não alvo, como organismos terrestres (RÖEMBKE et al., 2007), peixes, animais selvagens, e ao meio ambiente (MUNKVOLD et al., 2006).

2.3.1 Captan

Captan (N-(triclorometiltio)cicloex-4-eno-1,2-dicarboximida), é um fungicida ftalimida não sistêmico, de amplo espectro do grupo dos dicarboximidas. Utilizado na proteção de quase todas as principais doenças fúngicas observadas em plantas, tem efeito de preventivo e curativo (MUNKVOLD et al., 2006; PAULSRUD et al., 2001; MARRS; BALLANTYNE 2004). Foi introduzido em 1949, e se tornou um dos mais populares e versáteis fungicidas para tratamento foliar de culturas frutíferas, verduras e plantas ornamentais, tratamento de sementes e do solo (WAXMAN, 1998).

Captan é um protetor de sementes relativamente satisfatório, pois oferece bom controle contra o apodrecimento e deterioração das sementes e contra danos relacionados às plântulas (damping-off). Também é comercializado em

conjunto com molibdênio e uma série de outros fungicidas e inseticidas (MUNKVOLD et al., 2006). Pode ser encontrado nas formulações de emulsão concentrada, líquidos concentrados solúveis, sólido, grânulos dispersíveis em água, pó, e pó molhável (REGISTRATION ELIGIBILITY DECISION, 1999).

A ação fungicida de Captan resulta da porção tóxica ou do grupo de átomos N-S-CCl₃, que produz o efeito tóxico. Estudos sugerem que este fungicida interage com os grupos sulfidrilas dentro de células de fungos para produzir tiofosgênio. Este produto químico reage com sulfidrilas livres, grupos amino e hidroxilas de enzimas e provoca a inibição de processos metabólicos (WAXMAN, 1998). Segundo a classificação de World Health Organization (2010), o mesmo não apresenta risco agudo em uso normal (classe U).

Existe um grande número de trabalhos avaliando o emprego de Captan no tratamento de sementes e seus efeitos no controle e redução de patógenos de plantas. Pinto (2000) testou a eficiência de captan, entre outros fungicidas, no tratamento de sementes e, contra o ataque de *Rhizoctonia solani* em sementes de milho e observou que este produto foi o mais eficaz. O uso associado deste produto a outros fungicidas é uma prática comum, e Lisker e Meiri (1992) relatam que essa associação com outros fungicidas também se mostrou eficiente no controle de *Rhizoctonia solani* em campos de algodão. Inúmeros trabalhos respaldam esta idéia, demonstrando significativos resultados no controle de patógenos em diversas culturas (WILSON et al., 1993; FRAZIER et al., 1998; MUELLER et al., 1999).

2.3.2 Carboxin + Thiram

Fungicidas do grupo carboxamida tornaram-se conhecidos em 1966, com a descoberta de carboxina (5,6-diidro-2methyl-N-fenil-1,4-oxathiin-3-carboxamida), o qual começou nova fase na terapia química de doenças de plantas (MATOLCSY et al., 1988). Este atua de forma sistêmica e, nas aplicações em sementes é absorvido, controlando doenças fúngicas em seu interior (MUNKVOLD et al., 2006). As propriedades fungicidas de Carboxin e dos carboxanilidas

relacionados, são devidas à inibição do metabolismo oxidativo da glicose e do acetato, e da síntese de RNA e DNA, embora isto possa ser causado por falta de energia celular, devido à inibição da respiração (WAXMAN, 1998).

Thiram (dissulfeto tetrametiluram) é um fungicida de contato, do grupo dos ditiocarbamatos, um dos mais importantes grupos de fungicidas para o controle de doenças de plantas. Este grupo de fungicidas pode interferir no metabolismo dos fungos por diferentes caminhos, através do íon ditiocarbamato (WAXMAN, 1998). É registrado exclusivamente para usos agrícolas, sendo amplamente empregado no tratamento de sementes de grama ou de flores, bem como sobre bulbos e tubérculos para controlar a deterioração e o apodrecimento de mudas. Thiram também é eficiente para o controle de contaminações externas nas sementes e é comercializado em conjunto com muitos fungicidas, bem como com alguns inseticidas (MUNKVOLD et al., 2006).

O produto comercial Vitavax® é um dos agrotóxicos que englobam a mistura dos dois fungicidas vistos anteriormente, algumas formulações contam com 38.7% de Carboxin, e 37.5% de Thiram, desta forma tem-se a ação sistêmica e de contato no mesmo produto (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2004a). Esta composição é comumente utilizada no tratamento de sementes, e tem demonstrado bons resultados, tanto na eliminação de patógenos das sementes (LOBO, 2008), quanto no controle de inóculos de fungos fitopatogênicos (GOULART, 2006), além de outros relatos da eficiência no aumento da emergência de plântulas no campo (GOULART, 2001).

2.4 ECOTOXICOLOGIA

O termo “ecotoxicologia” foi mencionado pela primeira vez em 1969 por R. Truhaut, que a definiu como uma ciência que descreve os efeitos tóxicos de vários agentes em organismos vivos, especialmente sobre as populações e comunidades nos ecossistemas. A essência da ecotoxicologia encontra-se em duas áreas principais: estudo do ambiente com origens na ciência da ecologia, e estudo das interações das substâncias químicas tóxicas com organismos vivos individuais

(a toxicologia). No entanto, deve ser considerada uma ciência multidisciplinar, ligando a toxicologia, ecologia e, ainda, a química, farmacologia e epidemiologia, com a compreensão das origens e destinos dos produtos químicos no ambiente (CONNELL et al., 1999).

Atualmente, a ecotoxicologia consiste no estudo dos princípios e métodos científicos que tornam possível identificar e avaliar a interferência causada pelas substâncias introduzidas no meio ambiente pela atividade humana (MARKERT et al., 2003). Esta definição pode ser expandida como a ciência que prevê os efeitos de agentes potencialmente tóxicos sobre os ecossistemas naturais e organismos não alvo (HOFFMAN et al., 2003).

Os efeitos adversos relacionados aos seres humanos e ao ambiente são de grande preocupação. As principais formas de contaminação ambiental por substâncias químicas se dão através do crescimento industrial, crescente utilização de veículos, e da intensiva exploração da agropecuária, silvicultura e mineração (AZEVEDO; CHASIN, 2003). Dentre estas, as práticas agrícolas modernas têm grande potencial de promover perturbações no sistema agro-ecológico, assim limitando a sustentabilidade da produção agrícola. Neste caso podem ser tomados os exemplos do desmatamento, queimadas, compactação do solo e a contaminação por agrotóxicos, os quais podem alterar as comunidades de invertebrados que vivem no solo e, conseqüentemente, os seus fundamentais papéis no bom funcionamento do sistema edáfico (CADIOLI, 2010).

Neste contexto, a ecotoxicologia terrestre é o segmento da ecotoxicologia que investiga, avalia e quantifica, através de testes, os efeitos dos agrotóxicos que chegam ao solo, sobre a diversidade e funcionalidade da biota presente (GARCIA, 2004).

2.5 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS

A ecotoxicologia foi desenvolvida primeiro para os ecossistemas aquáticos e mais tarde para ecossistemas terrestres. Durante este desenvolvimento da ecotoxicologia aquática, vários experimentos foram realizados e, há relatos de

testes de toxicidade aguda em organismos aquáticos desde 1865, devidos à preocupação com os produtos químicos tóxicos em efluentes industriais (HOFFMAN et al., 2003). Foram desenvolvidos métodos padronizados internacionalmente para ensaios com invertebrados aquáticos, peixes e algas na década de 1970 e ainda, uma grande base de dados de toxicidade foi desenvolvida mais cedo para os organismos aquáticos do que para os do solo (VAN STRAALLEN, 2002a).

Apesar de se conhecerem as essenciais funções dos invertebrados do solo e sua utilidade como bioindicadores dos efeitos ecológicos, causados por produtos químicos (SCHÜÜRMAN; MARKERT, 1997), até 1995 apenas um método internacionalmente aceito estava disponível para os organismos do solo, o teste com minhocas em solo artificial (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 1984). Um conjunto de novos métodos foi desenvolvido em anos 1995-2000 e, conseqüentemente, a base de dados de solo foi acrescida consideravelmente (VAN GESTEL et al. 1997; LØKKE; VAN GESTEL, 1998).

Segundo Kapanen e Itavaara (2001) os testes de toxicidade podem ser classificados de acordo com o tempo de exposição (agudo ou crônico), o efeito observado (morte, afetando o crescimento ou reprodução) ou a resposta efetiva (letal ou subletal). Nestes testes, os produtos químicos a serem avaliados são adicionados ao substrato em diferentes concentrações e seus efeitos agudos, crônicos, biológicos e comportamentais para os organismos invertebrados do solo (minhocas, enquitreídeos, colêmbolos e ácaros predadores) são medidos (JÄNSCH et al., 2005a).

Desta forma, a finalidade dos testes de ecotoxicidade é gerar informações quantitativas ou qualitativas sobre os efeitos indesejados de xenobióticos para sua devida regulamentação, tal como solicitado por numerosas autoridades reguladoras mundiais, para estimar a concentração aceitável de poluentes na água, solo, alimentos, para o estabelecimento de limites de exposição permitidos para agricultores, e para proteger a biota (SHUGART, 2009).

2.5.1 Teste de Toxicidade Aguda

Existem muitos métodos para se realizar ensaios de toxicidade de produtos químicos, incluindo a aplicação localizada, alimentação forçada e testes de imersão (KULA; LARINK, 1997). Entretanto, para avaliar a toxicidade aguda e determinar as concentrações adequadas para o ensaio dos efeitos subletais, são contemplados bioensaios de acordo com a orientação das normas padrões internacionais OECD nº 207 (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 1984), e ISO-11268-1 (ISO, 1993).

Estes protocolos globais descrevem a metodologia para se determinar a toxicidade aguda das espécies de minhocas *Eisenia fetida* e *Eisenia andrei* através da exposição dermal e alimentar, utilizando substrato artificial. O teste preconiza manter minhocas adultas (com clitelo aparente) em uma composição de areia, caulim e pó de fibra de coco (Solo Artificial Tropical - SAT) misturado com uma gama de concentrações da substância teste (ISO, 1993). O período que as minhocas permanecem no substrato contaminado é de 14 dias, sendo que aos 7 e 14 dia após a aplicação, a mortalidade é avaliada através de leve estímulo mecânico na parte frontal do animal, considerando vivos aqueles que responderem. Ainda pode-se aferir o peso corporal, alterações morfológicas e comportamentais. Para a validação do teste, é essencial que não haja mortalidade superior a 10% no tratamento controle (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 1984).

Além de protocolos para testes de toxicidade aguda com minhocas, existem padrões determinados internacionalmente para outros invertebrados do solo, um exemplo é do artrópode *Folsomia candida*, o qual tem uma orientação metodológica própria criada pela International Organization for Standardization (ISO) número 11267, para se realizar testes prévios de toxicidade aguda (ISO, 1999a). Enquitrédeos também contam com um mesmo padrão de normativa para estes testes ecotoxicológicos (ISO, 2004). No entanto, ambos utilizam como substrato um solo artificial proposto pela Organisation For European Economic Cooperation and Development (OECD). A essência dos testes é semelhante a dos bioensaios das minhocas, entretanto, com diferenciações que atendem às demandas biológicas de

cada organismo. Apesar da maioria dos testes desta classe serem realizados em organismos já padronizados, alguns autores extrapolam e adaptam a metodologia para o uso de novos bioindicadores (JÄNSCH et al., 2005b; FÖRSTER et al., 2006).

A determinação da concentração do produto que causa mortalidade, é normalmente feita a partir de um teste preliminar (“range-finding”), que é realizado com as concentrações 0.01, 0.1, 1.0, 10, 100, 1000 mg de ingrediente ativo/kg de substrato seco. Este procedimento auxilia na escolha da faixa de concentrações definitivas que serão testadas. Quando nos testes preliminares não houver mortalidade, ou a concentração letal média for igual ou maior a 1000 mg.kg^{-1} , deve ser realizado apenas o “teste limite”, isto é, realiza-se apenas o controle e a concentração de 1000 mg.kg^{-1} , com quatro repetições cada. Segundo a Organization for Economic Co-operation and Development (1984), nenhuma substância deve ser testada em concentrações superiores a esta.

As interpretações estatísticas usadas para avaliar alguns valores críticos são, a LC50 (concentração da substância química que mata 50% durante o período de teste) ou NOEC (maior concentração sem efeitos observados). Elas são designadas para contribuir com a predição dos efeitos de produtos químicos nos agro-ecossistemas e devem avaliar, sob condições padronizadas, as conseqüências biológicas nocivas de produtos químicos (RIDA; BOUCHÉ, 1997).

Apesar do solo artificial OECD ser amplamente utilizado nestes casos, muitos testes também são praticados em solos naturais, ou em comparação com os dois tipos. Existe um solo natural padrão para algumas regiões da Europa, o LUFA 2.2 (ISO, 2003), o qual é um solo arenoso, e está comercialmente disponível. Kula; Larink, (1997) observaram em teste de toxicidade aguda com *E. fetida*, que a LC50 nestes solos naturais é normalmente menor do que a encontrada em solos artificiais. Isto poderia ser explicado por uma maior biodisponibilidade dos agrotóxicos no LUFA 2.2, devido ao menor teor de C orgânico (2,3%) em sua composição.

Diversos testes de toxicidade agudos já foram realizados com distintos organismos considerados bioindicadores da qualidade do solo, bem como com diversas substâncias químicas potencialmente poluentes. Dentre estes estão fungicidas (ANTON et al., 1990; RÖEMBKE et al., 2007), herbicidas (STOJANOVIĆ et al., 2007), inseticidas (KULA; LARINK, 1997; GOMEZ-EYLES et al., 2009; KOLAR

et al., 2008) e metais pesados em minhocas (LOCK; JANSSEN, 2001; LANGDON et al., 2005), inseticidas (SAN MIGUEL et al., 2008) e metais pesados (Fountain; Hopkin, 2001) em colêmbolos, além de quase todas estas classes de contaminantes para enquitreídeos (DIDDEN; RÖMBKE, 2001).

2.5.2 Teste de Toxicidade Crônica

Os testes de toxicidade aguda, a curto prazo são úteis para identificar compostos químicos altamente tóxicos, entretanto eles não avaliam os principais eventos da vida dos organismos teste, durante os quais a sensibilidade às substâncias tóxicas pode ser aumentada (RIDA; BOUCHÉ, 1997). Em contraste a isto, testes de toxicidade crônica são realizados a médio prazo, para determinar os efeitos subletais de compostos nocivos para a reprodução, crescimento e comportamento, devido a perturbações fisiológicas e bioquímicas (HOFFMAN et al., 2003).

Para se estudar a toxicidade crônica na presença de poluentes, da mesma forma vista com os testes de toxicidade aguda, protocolos internacionais descrevem metodologias padrões a serem realizadas. Estes estão disponíveis para alguns dos principais invertebrados não alvo comumente empregados na ecotoxicologia terrestre, incluindo artrópodes da ordem Collembola ISO:11267 (ISO, 1999a), e oligoquetas como *Enchytraeus sp.* ISO 16387 (ISO, 2004) e *E. fetida* e *E. andrei* OECD n°.222 (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2004) e ISO :11268-2 (ISO, 1998). O objetivo é o mesmo para os diferentes grupos de bioindicadores do solo, apesar de que cada teste é adaptado de acordo com as características reprodutivas de cada organismo.

Neste tipo de avaliação, organismos adultos são expostos a uma gama de concentrações da substância teste, sendo esta misturada ao solo, ou aplicada sobre sua superfície em uma única aplicação. O método de aplicação é específico para a finalidade do teste. O espectro de concentrações do ensaio é selecionado a partir de experimentos prévios, concentrações subletais de testes de toxicidade aguda, ou ainda baseado na literatura, para abranger aquelas passíveis

de causar tanto efeitos prejudiciais à reprodução, quanto nas características morfológicas (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2004).

Nos testes de toxicidade crônica com minhocas, também são empregados apenas adultos, e os procedimentos para a instalação do bioensaio são basicamente os mesmos do teste de toxicidade aguda. Contudo, as características avaliadas são distintas, e o período total é de 56 dias, sendo os efeitos no crescimento dos organismos adultos determinados depois de quatro semanas de exposição. Após este primeiro período, os adultos são removidos do solo, e os efeitos sobre a reprodução são avaliados após mais quatro semanas através da contagem do número de descendentes presentes no solo (ISO, 1998). Este teste é considerado válido apenas se a taxa de produção de juvenis for no mínimo de 30 indivíduos por réplica do controle e o coeficiente de variação não pode ser maior do que 30%, sendo que a mortalidade dos adultos de colêmbolos deve ser $\leq 10\%$.

Os testes de toxicidade crônica com colêmbolos utiliza-se apenas indivíduos padronizados com 10-12 dias de idade. A metodologia de realização do bioensaio é semelhante a do teste de toxicidade aguda, diferindo apenas no processo bem como do período de avaliação que, deste que é maior (28 dias). Neste caso, depois de quatro semanas do início do teste é aferido o número de juvenis provindos da geração F1 dos adultos. Para a validação destes bioensaios a taxa de reprodução precisa alcançar no mínimo 100 juvenis por réplica no controle, o coeficiente de variação ser no máximo de 30% e a mortalidade dos adultos ser menor que 20% (ISO, 1999a).

Ao fim dos ensaios de toxicidade crônica, o potencial de reprodução dos indivíduos expostos à substância é comparado ao do controle, e assim determina-se a maior concentração sem efeito observado (NOEC) e a menor concentração que causa efeito estatisticamente significativo (LOEC). Preferencialmente, os dados também devem ser analisados usando-se um modelo de regressão, para se conhecer a concentração estimada (EC) que causaria redução de X% no potencial reprodutivo, ou seja, ECX (EC10, EC50) (ISO, 1998; ISO, 1999a; ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2003).

Esta classe de teste ecotoxicológico também utiliza solo artificial OECD (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT,

2004), e o solo natural LUFA 2.2 (ISO, 2003) como substrato. A comparação do uso destes dois solos foi feita por Kula e Larink (1997), que adotaram *E. fetida* como bioindicador da contaminação de cobre. Os autores afirmam que baixas concentrações no solo artificial promoveram leve aumento no número de juvenis, e diminuição apenas com elevadas densidades do metal. Em contrapartida, nas aplicações em solo natural, concentrações baixas já demonstraram redução significativa do número de juvenis.

Apesar das normas padronizadas para testes ecotoxicológicos crônicos serem relativamente novas (ISO, 1998, 1999a; 2004), o número de testes baseados nestas metodologias tem crescido muito. Crouau et al. (2002) avaliaram a influência de lodo de esgoto, entre outros resíduos, em *F. candida*, e observaram que este não causou efeito significativo na mortalidade. Entretanto houve redução na reprodução sob os diversos resíduos testados. Comparando diferentes vias para avaliar a influência de contaminantes distintos nestes organismos, Crouau e Moia (2006) afirmam que a reprodução é um parâmetro levemente mais sensível do que o crescimento. Ainda com este organismo, foi relatado que as avaliações de contaminantes no solo podem ser influenciadas pelo tipo de substrato utilizado no teste de reprodução, visto que o EC50 de cobalto para estes bioindicadores foi de 1480 mg Co/kg de substrato artificial seco (OECD), e 409 mg Co/kg de solo natural seco (LUFA 2.2) (LOCK et al., 2004).

Röembke et al. (2007) em estudos ecotoxicológicos de toxicidade crônica mais recentes, utilizando minhocas *E. fetida* para avaliar os efeitos do fungicida Benomyl, verificaram os efeitos de diminuição da reprodução destes oligoquetas. Verificaram que houve maior redução do número de juvenis em condições tropicais do que em temperadas, possivelmente devido às altas temperaturas. Bioensaios para identificar os efeitos da contaminação por óleo mineral no solo, realizados com *F. candida* e *E. fetida*, demonstraram maior sensibilidade em testes de toxicidade crônica do que de avaliações de toxicidade aguda (VAN GESTEL et al., 2001).

2.5.3 Teste de Fuga

O teste de reprodução é aplicado para detectar os efeitos resultantes de concentrações subletais. No entanto, o teste de reprodução é muito trabalhoso e demorado, necessitando de longos períodos de incubação, e os resultados são obtidos somente após 56 dias em bioensaios com minhocas (ISO, 1998). O teste de toxicidade aguda, além de demorar em torno de 14 dias para minhocas (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 1984), segundo Hund-Rinke et al. (2003), é consideravelmente menos sensível do que o teste comportamental de fuga.

Como o período e o trabalho despendido determinam os custos de um determinado teste, é preferível obter os resultados dentro de um menor período e um elevado nível de sensibilidade (ISO, 2008a). O uso dos testes de comportamento de fuga, utilizando invertebrados do solo como indicadores de condições desfavoráveis, tem se tornado mais comum, pois permitem uma avaliação preliminar de solos contaminados em um curto período (NATAL-DA-LUZ et al., 2008a) comparado aos testes de toxicidade, e são ecologicamente relevantes, devido ao alto grau de sensibilidade, especialmente para a avaliação dos solos remediados (SHUGART, 2009).

Além de serem rápidos, econômicos e ecologicamente relevantes, os testes de fuga foram propostos para complementar a análise química convencional. Apoiando-se nos resultados obtidos nos ensaios de toxicidade crônica, os bioensaios de fuga (fuga) podem ser usados como uma primeira ferramenta de triagem na avaliação da função habitacional dos solos (HUND-RINKE et al., 2003). De acordo com Yearcley et al., (2006), estes bioensaios têm grande valor, pois expressam resultados que outros teste de toxicidade não demonstram. Entretanto, segundo Heupel (2002), a adição deste tipo de avaliação aos testes de toxicidade aguda e crônica pode fornecer informações mais detalhadas sobre o impacto dos agrotóxicos e outras substâncias nocivas sobre colêmbolos.

Mudanças no comportamento podem ser utilizadas para quantificar os efeitos do estresse sobre os indivíduos e as populações (MARKERT et al., 2003). Considerando o fato de que a resposta de evasão de invertebrados do solo varia

entre as espécies, devido à sua sensibilidade distinta para os contaminantes e os modos de exposição, o uso dos oligoquetas se baseia no fato de que essa classe de animais possui quimiorreceptores altamente sensíveis a produtos químicos em seu ambiente (EDWARDS; BOHLEN, 1996).

Em adição aos protocolos internacionais padronizados para os testes de fuga com minhocas ISO 17512-1 (*E. fetida* ou *E. andrei*) (ISO, 2008a), existe um documento semelhante para colêmbolas (*F. candida*) ISO 17512-2 (ISO, 2008b), e alguns trabalhos já foram realizados com outros bioindicadores sem esta regulamentação internacional (AMORIM et al., 2008a; NIEMEYER et al., 2006a). Entre eles, Amorim et al. (2008b) propõem uma metodologia para padronizar o teste de fuga com enquitreídeos, de forma semelhante ao que é feito atualmente para minhocas e colêmbolos pela ISO.

O princípio do teste é parecido para os dois organismos padrões, pois consiste em expor dez minhocas adultas (espécie *E. fetida* ou *E. andrei*), ou 20 colêmbolos (*F. candida*) com idade entre 10-12 dias, simultaneamente, em um mesmo recipiente, contendo em sua metade solo contaminado com determinada concentração da substância química, e do outro um controle apenas com água misturada ao solo. O substrato normalmente utilizado para estas análises é o solo artificial OECD, mas também há usos de solos naturais (NATAL-DA-LUZ et al., 2004). Assim, os organismos são colocados na intersecção dos tratamentos (contaminado/controle) e, após o período de 48 horas, é quantificado o número de indivíduos em cada seção (ISO, 2008^a, 2008b).

O teste tem como objetivo a detecção de efeitos subletais, e um dos motivos que o invalidam é a mortalidade e/ou desaparecimento maior que 10% de minhocas, e maior que 20% em colêmbolos (ISO, 2008^a, 2008b). Por isso recomenda-se fazer o teste preliminar (“range-finding”) (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 1984), para determinar a faixa de concentrações que não causam mortalidade. Outra característica que deve ser respeitada é o controle da distribuição homogênea dos organismos. Para isto deve ser realizado um controle duplo, isto é, um tratamento deve ser preenchido com o mesmo solo (tratado apenas com água) em ambas as seções (com quatro repetições) e, a distribuição dos organismos neste controle precisa estar na faixa de 60%: 40%, assim, comprovando que não houve preferência significativa por um dos

lados. A orientação dos recipientes dentro da sala de testes deve ser a mesma e, de forma aleatória, para se reduzir variações entre as réplicas em casos de exposições a luz (ISO, 2008a, 2008b).

De acordo com ISO, (2008b), ao fim de 48 horas, é quantificado o número de organismos presentes em cada seção do recipiente. Se houver apenas uma concentração teste, o número médio de indivíduos é comparado com a média do número de indivíduos no solo controle através de análise estatística para a comparação de médias. Resultados com médias menores, estatisticamente significativas ($p < 0,05$) do número médio de colêmbolos no solo teste, em relação aos do solo controle, indicam uma resposta de fuga do solo contaminado, sugerindo que a função do habitat do solo contendo essas substâncias é limitada. Para o cálculo do efeito percentual de várias concentrações da substância, o número de organismos no solo contaminado é comparado com o número no solo controle de acordo com uma equação e assim utilizam-se os dados para determinar qualquer concentração efetiva (ECx), bem como o efeito percentual desejado (EC50 ou EC20) e seus limites de confiança associados podem ser calculados (ISO, 2008a).

Natal-da-Luz et al. (2004), avaliaram os efeitos de quatro diferentes solos poluídos por metais sobre o comportamento de fuga de *E. andrei* e *F. candida*, e afirmaram que os dois organismos diferem quanto à sensibilidade, sendo a minhoca o bioindicador mais indicado para tal. Contudo, os resultados gerais destes autores revelam que ambos têm o potencial para ser utilizado como ferramentas de triagem na avaliação de risco em solos contaminados. Neste sentido, Niemeyer et al. (2010) confirmam o uso destes bioindicadores numa primeira etapa em uma avaliação de risco ecológico (ERA), demonstrando Garcia et al. (2008) que a sensibilidade de minhocas no teste de fuga com agrotóxicos é quase a mesma dos ensaios de reprodução.

Apesar de diversos trabalhos confirmarem a eficiência deste tipo de avaliação com minhocas (KOBETICOVÁ et al., 2010; SISINNO et al., 2006; SCHAEFER M., 2004), Yearcley et al., (2006) constataram que o teste não pode ser empregado para todos os contaminantes, pois nem todos são irritantes, visto que o composto 2-cloroacetamida, que causou 100% de mortalidade, não evidenciou efeito de fuga. Desta forma, há o risco de ensaios utilizando compostos com efeitos narcóticos não promoverem efeitos. Langdon et al. (2005) relataram que possíveis

adaptações fisiológicas ligadas ao modo de vida dos oligoquetas podem estar associadas às baixas sensibilidades de três diferentes espécies de minhocas, quando expostas a amplas faixas de Pb no solo.

2.6 Efeitos de Agrotóxicos em Organismos Não Alvo

Poluentes podem causar efeitos nos ecossistemas em níveis de moléculas, tecidos, órgãos, indivíduos, populações e comunidades inteiras (SCHÜÜRMAN; MARKERT, 1997).

A qualidade ambiental é comprometida quando os organismos não alvo são negativamente afetados. Sabe-se que a fauna é uma importante parte dos ambientes terrestres e está envolvida em muitos aspectos, inclusive na decomposição de matéria orgânica, na regulação parcial da atividade microbiana, na ciclagem de nutrientes e na estruturação dos solos. Por isto, perturbações causadas por poluentes no solo resultam, em termos qualitativos e quantitativos, em mudanças na fauna, que afetam o funcionamento do solo (CORTET et al., 1999).

Os agrotóxicos podem afetar os organismos não alvo de duas maneiras: podem causar lesões através do contato direto com o organismo, como ocorre com polinizadores, parasitóides e predadores benéficos, entre outros. A outra forma que desfavorece os organismos não alvo é atribuída ao poder residual de alguns agrotóxicos, tanto nas plantas quanto no ambiente, que mais tarde podem prejudicar a fauna local (WAXMAN, 1998).

Muitos inseticidas matam insetos por efeitos sobre o sistema nervoso e esta especificidade também atinge os organismos não alvo, os quais tem relativamente a mesma acessibilidade do sistema nervoso do inseto (MARRS; BALLANTYNE, 2004). Quanto ao uso dos fungicidas, estes agem também sobre organismos não alvo, os quais podem incluir organismos não-patogênicos que são funcionalmente importantes nas transformações de nutrientes, e também antagonistas e supressores de patógenos que podem influenciar no controle de doenças (WALTERS, 2009).

Sabe-se que vários taxons já foram investigados para a detecção e avaliação dos efeitos subletais de produtos químicos no solo, entre eles estão os principais grupos de invertebrados que vivem no solo, compreendendo Lumbricidae, Enchytraeidae, Nematoda, Collembola, Oribatida, Gamasida, Isopoda, Diplopoda, Chilopoda e Staphylinidae (KULA; LARINK, 1997). Ao selecionar organismos para testes ecotoxicológicos, alguns autores consideram critérios relevantes, tais como o importante papel ecológico do organismo no solo; a ampla distribuição geográfica; o fato de estar em intenso contato com o substrato para garantir a exposição aos químicos, e a alta taxa de reprodução que a espécie deve ter em pequeno período de tempo, além de permitir que se realizem criações massais com facilidade (HOPKIN, 1993).

O uso repetido desses bioindicadores em programas de monitoramento pode ser útil para detectar mudanças ambientais numa fase precoce ou avaliar a eficácia das medidas tomadas para melhorar a qualidade ambiental (VAN STRAALLEN, 1998). Neste contexto, inúmeros trabalhos relacionando a fauna edáfica não alvo a contaminações têm sido publicados.

San Miguel et al. (2008) observaram que o inseticida fipronil induziu uma redução significativa na produção de juvenis de *F. candida* (Collembola), e ainda observaram que, sob condições naturais, este efeito parece ser fraco, devido à sua elevada capacidade de evitar zonas contaminadas, e certa tolerância a esta classe de inseticidas. Cortet et al. (2002) também observaram alta redução populacional de colêmbolas e ácaros oribatídeos em solos com presença de fipronil. Empregando o mesmo ingrediente ativo para controlar gafanhotos, Peveling et al. (2003) observaram significativa redução de cupins e de alguns predadores vertebrados endêmicos. Contudo, Balança e Visscher (1997) afirmam que, sob baixas doses deste produto, pode-se obter um bom controle de gafanhotos, sem maiores danos aos invertebrados não alvo.

Predadores da família Carabidae, amplamente conhecidos como bioindicadores, também tiveram significativa redução populacional em solos contaminados com fipronil (DANFA et al., 2003). Além destes, são conhecidos efeitos negativos deste inseticida sobre organismos não alvo aquáticos, por exemplo *Simulium vittatum*, (Diptera: Simuliidae) (OVERMYER et al., 2005), *Procambarus sp.* (SCHLENK et al., 2001), *Ceriodaphnia dubia* (WILSON et al., 2008).

Empregando imidacloprid para avaliar os efeitos na fauna não alvo do solo, Capowiez e Berard (2006) observaram redução no comportamento de escavação de duas espécies de minhocas (*Aporrectodea nocturna* e *Allolobophora icterica*) em solos contaminados com o inseticida. Luo et al. (1999), em testes bioquímicos de toxicidade, verificaram que concentrações mais baixas de imidacloprid (<0,2 mg / l) e do inseticida RH-5849 (<25mg / l) inibem a atividade da celulase em minhocas da espécie *E. fetida*. Em testes com minhocas da família Megascolecidae do gênero *Pheretima*, visando avaliar a mortalidade e biomassa de minhocas, com cinco produtos inseticidas (ciflutrina, carbaril, clorpirifós, fipronil e imidacloprid), observou-se que apenas carbaril e chlorpyrifos promoveram a mortalidade nos organismos. Nenhum inseticida influenciou na biomassa, no entanto, carbaril, ciflutrina e imidacloprid tiveram um efeito negativo significativamente maior do que o fipronil, clorpirifós, e o tratamento controle, no 14° e 21° de avaliações (MOSTERT et al., 2000). Outros relatos sobre os efeitos deste produto sobre minhocas são vistos na literatura (GOMEZ-EYLES et al., 2009), inclusive em oligoquetas aquáticos (SARDO; SOARES, 2010).

Kreutzweiser et al. (2009) destacam que folhas contaminadas com concentrações usuais de imidacloprid podem causar efeitos adversos sub-letais em invertebrados decompositores e assim inibir a decomposição da serapilheira. O uso desses neonicotinóides para controle de pragas de gramados tem relatos de efeitos negativos na abundância de outros insetos não alvo das ordens Hemiptera, Thysanoptera, Coleoptera e Collembola (PECK, 2009). Assim, são investigados os efeitos negativos deste químico também para outras classes de bioindicadores do solo, como é o exemplo de isópodes (DROBNE et al., 2008), e em organismos aquáticos (PESTANA et al., 2009), incluindo os microcrustáceos *Daphnia magna* (PESTANA et al., 2010; JEMEC et al., 2007).

Na mesma classe dos neonicotinóides, thiametoxam também foi avaliado por Kilpatrick et al. (2005), apresentando efeito negativo aos artrópodes não alvo, quando aplicado no controle de pragas da cultura do algodão. Moser e Obrycki (2009) avaliaram os efeitos do tratamento de sementes com este inseticida sobre o predador *Harmonia axyridis* e concluíram que o uso destes neonicotinóides podem ter efeitos prejudiciais sobre esta espécie. Em relação à toxicidade aos

organismos não alvo aquáticos, Barbee e Stout (2009) afirmam que a LC50 de thiametoxam para *Procambarus clarkii* (Crustacea) foi de 967 µg de i.a./litro.

Resultados de pesquisa evidenciam que a utilização sucessiva do fungicida captan, e do bactericida oxitetraciclina em solos podem afetar negativamente microrganismos não alvo do solo e suas atividades (PIOTROWSKA-SEGET et al., 2008). De acordo com Ingham et al. (1991), um efeito indireto da redução da biomassa fúngica causada por captan resultou num decréscimo, a curto prazo, no número de nematóides que se alimentam de fungos. Com os recursos alimentares limitados, este grupo de predadores foi reduzido. Reduções significativas do número de bactérias e nematóides não alvos foram observados por Colinas et al. (1994), quando avaliaram os efeitos deste produto na aplicação em solos florestais. As minhocas *E. fetida* dos testes padronizados OECD/ISO, também foram alvo de testes de toxicidade aguda na presença de solos contaminados com este fungicida do grupo Dicarboxinida (ANTON et al., 1990).

Outros fungicidas também foram relacionados a *E. fetida*, em solos de duas regiões (tropical e temperada), e Römcke et al. (2007) destacam que, sob condições de região tropical, o produto benomyl afetou menos o organismo do que sob condições de região temperada. Isto pode ser devido a um aumento da degradação de benomyl em altas temperaturas.

Além dos pesticidas, têm sido observados efeitos negativos provocados por herbicidas em minhocas (PEREIRA et al., 2009; HEUPEL, 2002). Garcia et al. (2008), avaliando os efeitos dos herbicidas glifosato e oxadiazon em *E. fetida*, em condições tropicais, constataram que a formulação comercial destes produtos não é tóxica a esta espécie. No entanto, concentrações sub-letais desses herbicidas tem influenciado negativamente o crescimento de juvenis destes organismos. Glifosato tem também evidências de reduzir a biomassa de isópodos terrestres (NIEMEYER et al., 2006b). Stojanović et al., (2007), ao avaliarem os efeitos dos herbicidas Alahlor+Atrazine e do inseticida carbaryl sobre minhocas da mesma espécie, verificaram que ambos os tratamentos promoveram redução no número deste oligoquetas, além de redução da biomassa destas.

2.7 ORGANISMOS BIOINDICADORES DE QUALIDADE DO SOLO

Segundo Pankhurst et al. (1997), bioindicadores consideram propriedades ou processos biológicos de um bioma para indicar algum estado do ecossistema. São usados para indicar ou mostrar a causa de um efeito. Bioindicadores, às vezes chamados de biomarcadores, são respostas de organismos vivos, que podem simplesmente significar exposição a contaminantes, podem prever danos futuros devido à exposição, ou unicamente sofrer os efeitos prejudiciais (HOFFMAN et al., 2003).

De acordo com Van Straalen (1998), a bioindicação é uma análise científica das informações ecológicas coletadas a campo, com o objetivo de fazer inferências sobre a qualidade do meio ambiente no local sob investigação. Os organismos bioindicadores estão associados direta ou indiretamente a algum fator ou um complexo de fatores que eles podem indicar. Os autores relacionam este fato ao funcionamento de um barômetro, que indica a pressão do ar.

Estudos com bioindicadores são realizados desde o século passado, mas só recentemente, com a crescente preocupação com o manejo e a conservação dos recursos naturais, tornaram-se importantes para a avaliação de ambientes degradados (PAOLETTI et al., 1991). O objetivo do uso de indicadores de qualidade é avaliar os efeitos e/ou transformações no uso dos sistemas, através de componentes vivos (uma ou um conjunto de espécies) que estão presentes no ambiente sob estudo. Podem ainda, ser usados para monitorar ambientes em processo de recuperação (PAOLETTI; BRESSAN, 1996; PAOLETTI, 1999).

Os bioindicadores precisam estar presentes em diversos ecossistemas para permitir a comparação entre os mesmos, estar em contato com vários fatores de estresse e, portanto, interagir com os processos físicos, químicos e biológicos do solo e possuir funções no sistema edáfico (EDWARDS et al., 1995; STENBERG, 1999). O indicador biológico deve também ser de medição simples e baixo custo, para viabilizar as amostragens e avaliações, além de sensíveis aos manejos edafoclimáticos, mas não a ponto de se extinguirem, e ter importância ecológica e variações naturais conhecidas (EDWARDS et al., 1995; STENBERG, 1999).

Também em aplicações atuais, bioindicadores podem ser úteis se algum fator de impacto não é facilmente mensurável. Por exemplo, em agroecossistemas, os efeitos de agrotóxicos, como o piretróide sintético deltametrina, são facilmente observados na fauna invertebrada epigéia, enquanto que a determinação química do resíduo é mais difícil (EVERTS et al., 1989; KROGH, 1994). Enquanto os testes de toxicidade são elaborados para ajudar a prever os possíveis impactos imediatos de contaminantes liberados no meio ambiente, os métodos de biomonitoramento são projetados para avaliar por longos períodos, considerando mudanças nas condições, além de impactos de estressores ou contaminantes já presentes no meio ambiente (OEHHA, 2008).

Dentre as espécies de invertebrados com potencial de uso como indicadoras da qualidade dos solos estão: besouros (KROMP, 1999), formigas (LOBRY DE BRUYN, 1999), aranhas (MARC et al., 1999), ácaros (KOEHLER, 1999), colêmbolos (Cortet et al., 1999), enquitreídeos (DIDDEN; RÖMBKE, 2001), nematóides (YEATES; BONGERS, 1999) e minhocas (BLAIR et al., 1996; PAOLETTI et al., 1991; PAOLETTI, 1999). Estes invertebrados são utilizados como bioindicadores de baixo custo, devido à facilidade de avaliação e inexistência de restrições ao uso (PANKHURST et al., 1997).

Numa situação utópica, mas ideal, todos os produtos químicos deveriam ser testados em todos os animais antes de serem liberados para o ambiente. No entanto, esta é uma tarefa impossível. Assim, um acordo foi alcançado pelo qual espécies representativas são utilizadas como ferramentas de triagem, com o objetivo de destacar as substâncias que são particularmente tóxicas. Para os solos, as minhocas (*Eisenia sp.*), os enquitreídeos (*Enchytraeus sp.* *Cognettia sp.*) e colêmbolos (*Folsomia sp.*) foram os grupos mais amplamente utilizados devido à sua facilidade de cultivo em laboratório e os tempos de geração relativamente curtos, nas temperaturas ambiente (FOUNTAIN; HOPKIN, 2005; ACHAZI et al., 1997; RONDAY; HOUX, 1996).

2.7.1 Minhocas

As minhocas são os mais importantes componentes da biota do solo em termos de formação e manutenção da estrutura do solo e da fertilidade. Apesar de não serem numericamente dominantes, seu grande tamanho os torna um dos principais contribuintes para a biomassa de invertebrados no solo. Suas atividades são importantes para a manutenção da fertilidade do solo em uma variedade em florestas, pastagens e agroecossistemas (EDWARDS, 2004).

Segundo Righi (1999), o principal papel desempenhado pelas minhocas na natureza é o processamento e a incorporação da matéria orgânica ao solo mineral. Conseqüentemente, elas influem nas propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo, bem como nos aspectos pedogenéticos e paisagísticos. Considerando o ato de comer e cavar continuamente e por formarem a maior biomassa animal do solo, as minhocas são os agentes mais decisivos na decomposição, homogeneização e incorporação dos restos orgânicos ao solo mineral e na movimentação e revolvimento do solo.

O solo é uma mistura heterogênea de componentes abióticos e de vida, incluindo uma série muito complexa de organismos que vivem no solo. As funções básicas dos solos dependem da integridade estrutural e funcional e dos impactos das perturbações sobre estas funções (EDWARDS, 2004). Vasta gama de indicadores de qualidade e da vida do solo tem sido sugerida, mas tem se tornado cada vez mais claro que é essencial que os indicadores devem incluir componentes biológicos do solo, porque esta é uma entidade dinâmica (BLAIR et al., 1996).

Em relação aos fatores ambientais que limitam a sobrevivência destes organismos, a umidade do solo é considerada o fator primário. De acordo com Lee (1985), estes organismos requerem grandes quantidades de água por causa do sistema de respiração cutânea e eliminação de nitrogênio, sendo que a falta da mesma no sistema edáfico induz a estivação, processo pela qual as minhocas reduzem o metabolismo e ficam protegidas em pequenas câmaras para evitar a desidratação.

As espécies exóticas, que são mais adaptadas às mudanças climáticas e edáficas, são beneficiadas pela ocorrência de perturbações antrópicas

em sistemas agrícolas, podendo ser dominantes nestas áreas. É o caso de *Pontoscolex corethrurus*, das diversas Megascolecidae (*Amyntas*, *Pheretima*, *Metaphire*) e Acanthodrilidae (*Dichogaster* spp.), que predominam nestes sistemas (FRAGOSO et al., 1999; BROWN et al., 2004b).

Há um consenso entre os ecologistas do solo e a maioria dos agricultores, que as minhocas podem ser um dos melhores indicadores disponíveis da qualidade do solo (DOUBE; SCHMIDT, 1997). Elas são relativamente fáceis de se amostrar e de identificar, e são importantes indicadores da vida e da qualidade do solo, visto que as populações são extremamente afetadas por muitas das principais práticas agrícolas, em especial, os cultivos, fertilizantes, pesticidas e rotações de culturas exercem efeitos importantes sobre as comunidades e atividades das minhocas (EDWARDS, 2004).

A consideração básica da utilização de biomarcadores é que os organismos vivos oferecem o melhor reflexo do estado atual dos ecossistemas e das mudanças nele esperadas. Para isto, oligoquetas são geralmente considerados bioindicadores altamente adequados pois, além de serem invertebrados ecologicamente dominantes, as minhocas estão presentes em diferentes solos, regiões e climas, e têm indiscutível importância nas cadeias alimentares. Aliado ao fato de que são fáceis de manusear e de criar em laboratório, tem possibilitado muitos estudos para determinar o efeito de acumulação de produtos químicos no solo (SHUGART, 2009; CASTELLANOS; HERNANDEZ, 2007).

Existem poucos relatos de diferentes espécies de minhocas indicadoras da qualidade ambiental, devido à complexidade de eleger grupos de bioindicadores; isso porque ocorrem variações tanto entre grupos de organismos quanto dentro de um grupo, com relação ao tempo de resposta às perturbações ocorridas em um ambiente. O ideal é trabalhar com quatro ou mais espécies, ou pelo menos duas, para a avaliação de um sistema (BROWN, 1997).

Embora várias espécies de minhocas tenham sido utilizadas em testes toxicológicos, relativamente poucas têm sido empregadas em ampla escala e pesquisadas adequadamente. Entre as espécies mais comumente usadas se incluem: *E. fetida* e *E. andrei*, *Eudrilus eugeniae*, *Lumbricus rubellus*, *Dendrobaena veneta*, *Perionyx excavatus* e *Perionyx hawayana* (EDWARDS, 2004). Sobretudo, apenas duas espécies foram incluídas na norma ISO e nos protocolos de testes da

OECD (JÄNSCH et al., 2005a), sendo estas as espécies *E. fetida* e *E. andrei* que, segundo a Organization for Economic Co-operation and Development (2004), são consideradas representantes da fauna do solo, mais especificamente das minhocas.

Neste contexto, vários trabalhos são direcionados para a avaliação de substâncias químicas no solo e seu risco ambiental, utilizando minhocas como indicadores da qualidade biológica (ANTON, et al., 1990; CASTELLANOS; HERNANDEZ, 2007; GARCIA, et al., 2008).

2.7.1.1 *Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*

André (1963) distinguiu *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) e *Eisenia andrei* (BOUCHÉ, 1972) em duas formas (uma clara listrada e uma colorida uniforme), nomeando var. típica e var. unicolor. Bouché (1972) deu-lhes o status de subespécie (*E. fetida fetida* e *E. fetida andrei*). Historicamente foram consideradas a mesma espécie, devido a sua semelhante aparência e, exigências ecológicas e freqüente associação (JÄNSCH et al., 2005a), porém a agências internacionais que propõe os teste ecotoxicológicos as consideram como espécies diferentes (ISO, 2008a).

Não são espécies típicas da maioria dos solos, ocorrendo apenas em solos ricos em matéria orgânica. Em condições ideais, têm um ciclo de vida curto (variando de 45 a 51 dias), partindo-se do casulo recém depositado, até as minhocas adultas, sexualmente maduras (com presença de clitelo), estando prontas para a deposição da próxima geração de casulos. O tempo para os juvenis alcançarem a maturidade sexual varia entre 21 e 30 dias. São muito prolíficas, sendo que cada casulo viável produz de dois a cinco juvenis, dependendo da temperatura, e a expectativa de vida máxima é de quatro anos e meio a cinco anos. (EDWARDS, 2004).

Estreitamente relacionadas, *E. fetida* e *E. andrei* são as espécies mais comumente usadas para o manejo de resíduos orgânicos através da vermicompostagem. São preferidas por serem peregrinas e onipresentes, com distribuição global, além disto, muitos resíduos orgânicos se tornam naturalmente

colonizados por elas, têm boa tolerância à temperatura e podem viver em resíduos orgânicos com uma variedade de conteúdos de umidade. Permitem serem manuseadas facilmente nas culturas misturadas com outras espécies e, geralmente, se tornam dominantes (EDWARDS, 2004). Estão comercialmente disponíveis e podem ser produzidas em uma ampla variedade de resíduos orgânicos. Os casulos podem ser adquiridos comercialmente ou distribuídos a partir de uma fonte central para garantir que a mesma cepa é utilizada (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 1984).

De acordo com Jänsch et al. (2005a), as minhocas *E. fetida* e *E. andrei* são os organismos mais utilizados para testes ecotoxicológicos terrestres, pois estes oligoquetas tornaram-se o modelo de organismos para avaliar os efeitos dos produtos químicos sobre invertebrados saprotróficos terrestres (SPURGEON et al., 2003). Estas espécies são consideradas representantes da fauna edáfica, em especial das minhocas, pois sua susceptibilidade aos produtos químicos é semelhante à das espécies que vivem no solo (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 1984; MARKERT et al., 2003).

Na maioria dos primeiros testes realizados com estas espécies, adotava-se apenas a diretriz 207 da OECD, avaliando principalmente os efeitos agudos (ISO, 1993, ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 1984). Em testes mais recentes também se investiga outros parâmetros, incluindo o crescimento, reprodução (ISO, 1998, ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2004), e o comportamento de fuga (ISO, 2008a). Em complemento às análises laboratoriais, métodos para investigar os efeitos dos pesticidas sobre a abundância, biomassa e composição de espécies de minhocas também são empregados (ISO, 1999b). Jänsch et al., (2005a) afirmam que os resultados dos testes com o solo artificial com *E. andrei* e *E. fetida*, não podem ser extrapolados para o campo.

A literatura a respeito de testes ecotoxicológicos relacionando diversas fontes de contaminação do solo com estas espécies é bastante extensa (ESPINOZA-NAVARRO; BUSTOS-OBREGÓN, 2004; REINECKE; REINECKE, 2007; SCHAEFER, 2004; RÖEMBKE et al., 2007; STOJANOVIĆ et al., 2007), inclusive trabalhos com as mais recentes avaliações de comportamento (NATAL-DA-

LUZ et al., 2008a; NATAL-DA-LUZ et al., 2008b; PEREIRA et al., 2009; KOBETICOVÁ et al., 2010).

2.7.2 Colêmbolos

Colêmbolos (Ordem: Collembola) constituem um dos grupos de artrópodes terrestres mais diversificados e abundantes. Sabe-se que, por exemplo, um metro quadrado de solo de floresta temperada pode conter mais de 100 mil indivíduos (ANDERSON, 1978). Possuem distribuição universal e ocorrem em todos os biomas, desde trópicos até os árticos, e das florestas até pastagens, desertos e ao longo do perfil do solo, exceto nos oceanos abertos e áreas mais profundas de grandes lagos (RESH; CARDÉ, 2003; COLEMAN et al., 2004).

De acordo com Fountain e Hopkin (2005), os colêmbolos certamente representam uma linhagem monofilética que era inicialmente de um ramo fora da linha que levou aos insetos superiores. Pertencentes à subclasse Apterigota, juntamente com Diplura, Protura e Thysanura, possuem um táxon muito diverso, com 21 famílias e vinte mil espécies descritas atualmente (LAVELLE; SPAIN, 2003). No entanto, sete famílias ocorrem nos solos: Entomobryidae, Hypogastruridae, Isotomidae, Neelidae, Onychiuridae, Poduridae e Sminthuridae (ACL, 2003).

Conhecidos também por "springtails", derivado de springing (que significa "saltando", em inglês), pelo fato de que muitas espécies são capazes de saltar por meio de um aparato fixado na parte inferior do abdômen (COLEMAN et al., 2004). Os adultos destes hexápodes são ápteros, seu tamanho varia de 0,4 a mais de 10 mm de comprimento, podendo ser coloridos. Entretanto, os habitantes das camadas mais profundas do solo normalmente não possuem pigmentação, nem olhos (PETERSEN, 2002). Enquanto a maioria se alimenta de fungos, bactérias e vegetação em decomposição, alguns são carnívoros, outros são herbívoros, e um número se alimenta de fluidos. Existem espécies comensais, mas não há formas parasitárias. Eles compreendem as espécies mais comuns ao longo do perfil superior do solo e da serapilheira, mas muitos vivem em vegetação litorânea, nas

superfícies das águas, cavernas, campos de gelo ou geleiras (RESH; CARDÉ, 2003).

Apesar do efeito direto de colêmbolos nos processos do ecossistema (tais como no fluxo de energia) parecerem reduzidos devido à sua baixa contribuição para a biomassa e a respiração do solo (COLEMAN et al., 2004; JÄNSCH et al., 2005a), estes organismos têm influência significativa sobre a ecologia microbiana e a fertilidade solo pois, através da alimentação com matéria orgânica morta e dos micro-organismos do solo, são reguladores dos processos de decomposição e ciclagem de nutrientes (CULIK; ZEPPELINI, 2003).

Filser (2002) reforça esta idéia, demonstrando que essa classe de artrópodes exerce importantes impactos (indiretos) na mineralização do nitrogênio, respiração do solo, lixiviação de carbono orgânico dissolvido e no crescimento de plantas. Desta forma, o valor potencial como indicadores biológicos da qualidade de vida no solo é cada vez mais reconhecido (STORK; EGGLETON, 1992; VAN STRAALLEN, 1997). Conhecimentos a respeito desta ordem podem ser úteis no desenvolvimento de estratégias de conservação e monitoramento de áreas naturais e impactadas.

A distribuição das espécies de colêmbolos e ácaros tem sido utilizada com sucesso em vários estudos como indicadores da vida no solo, particularmente em relação ao pH, relação C/N, e contaminação do solo (PANKHURST et al., 1997). Análises das comunidades mostraram-se mais úteis do que em nível de espécies, para indicar mudanças na vida do solo.

Segundo Fountain e Hopkin, (2005), as atividades antrópicas e a necessidade de controles mais rigorosos de resíduos e emissões de químicos no ambiente têm levado à busca de espécies para testes biológicos. Colêmbolos fazem parte integrante dos ecossistemas do solo e são vulneráveis aos efeitos da contaminação do solo. A abundância e diversidade destes artrópodes têm sido amplamente utilizada para avaliar impactos ambientais causados por manejos (BARETTA et al., 2008) ou poluentes nos solos (LOCK et al., 2004), entretanto, em nível de campo, essas determinações precisam ser feitas no contexto de um sistema não perturbado, e pode-se esperar variações com a temperatura, umidade, estação do ano, e interações com outros membros da biota (COLEMAN et al., 2004). Contudo, os efeitos observados no campo são difíceis de reproduzir em laboratório.

Respostas destes organismos aos produtos químicos em laboratório podem ser usadas para avaliar o estresse, e informar aos processos legislativos os riscos ecológicos (VAN STRAALLEN, 2002b). Neste sentido, a espécie de colêmbolos regularmente empregada na avaliação de risco de poluentes em testes de toxicidade é *F. candida* (PHILLIPS et al., 2002), mas diversas outras espécies têm sido testadas, tais como *Hypogastrura assimilis* (FOLKER-HANSEN et al., 1996), *Isotoma viridis*, ou *Orchesella cincta*, além de comparações entre as espécies *Sinella communis*, *Proisotoma minuta*, *Lepidocyrtus sp. pallidus*, *Orthonychiurus folsomi*, *Ceratophysella denticulata*, *Hypogastrura assimilis* e *F. candida*, feitas por Greenslade e Vaughan (2003), para avaliar novos indicadores para testes de toxicidade em solos da Austrália.

Com base nestes conhecimentos, o uso dos colêmbolos como indicadores da vida e da qualidade edáfica vem se destacando, e o processo de avaliação de impactos no solo tem crescido recentemente, com inúmeros relatos efetuados (NATAL-DA-LUZ et al., 2009; FILSER et al., 2000; SAN MIGUEL et al., 2008; CROUAU; MOIA, 2006).

2.7.2.1 *Folsomia candida*

Folsomia candida Willem 1902, da Ordem Collembola, família Isotomidae, é um artrópode comum que aparece de forma generalizada nos solos de todo o mundo. Esta espécie não possui olhos e é despigmentada (JÄNSCH et al., 2005a). Populações de *F. candida* são compostas exclusivamente por fêmeas partenogenéticas. Quando atinge a idade de 20 dias (a 20°C em laboratório), os indivíduos medem cerca de dois milímetros de comprimento e estão sexualmente maduros quando atingem o sexto instar. Cerca de 30 a 50 ovos são colocados em cada lote, que têm 7 a 10 dias para eclodir. Os ovos são brancos a amarelados (quando maduros), e esféricos (FOUNTAIN; HOPKIN, 2005).

A maioria dos colêmbolos se alimenta de hifas fúngicas, *F. candida* apresenta fortes preferências por determinadas espécies de fungos. Normalmente essa espécie é classificada como microsaprófago, mas pode também se alimentar

de nematóides (HOPKIN, 1997). É amplamente distribuída em toda a Europa e embora não seja comum na maioria dos solos naturais, muitas vezes ocorre apenas em locais ricos em húmus, em número muito elevado (WILES; KROGH, 1998).

Segundo Fountain e Hopkin (2005), *F. candida* tem sido utilizado como um organismo de teste "padrão" por mais de 40 anos para estimar os efeitos dos pesticidas e poluentes ambientais sobre artrópodes não alvo do solo. No entanto, também tem sido empregado como modelo de investigação de numerosos outros fenômenos, como tolerância ao frio, a qualidade como presa, efeitos em fungos patogênicos e fungos micorrízicos de raízes. Esta espécie mostra diferentes características vantajosas para ser um organismo teste do ambiente terrestre: é fácil de manter, tem um tempo de geração curto e uma alta taxa de reprodução, além de ser simples de cultivar em laboratório com uma dieta de fermento seco granulado (MARKERT et al., 2003; CROUAU et al., 2002).

Além das referidas características, bem como por ter demonstrar uma sensibilidade distinta a vários contaminantes, *F. candida* foi selecionada como espécie padrão a ser usada em testes de toxicidade aguda, crônica (ISO, 1999a) e comportamentais da ISO (ISO, 2008b). Por isto, os efeitos de agrotóxicos (SAN MIGUEL et al., 2008; FÖRSTER et al., 2006; KOLAR et al., 2008), metais (LOCK; JANSSEN, 2001; CROUAU; MOIA, 2006; FOUNTAIN; HOPKIN, 2001) e outros resíduos (NATAL-DA-LUZ et al., 2009) tem sido investigados mundialmente em testes ecotoxicológicos.

3 ARTIGO A: AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE AGROTÓXICOS EM *Eisenia andrei* (OLIGOCHAETA).

3.1 RESUMO E ABSTRACT

Resumo

Objetivou-se avaliar o impacto causado pelos inseticidas imidacloprid, fipronil, thiametoxam, e dos fungicidas captan e carboxin + thiram, utilizados no revestimento de sementes, sobre *Eisenia andrei* (Oligochaeta). Para isto foram utilizados testes padronizados internacionalmente (ISO) de ecotoxicidade aguda, crônica e fuga em solo artificial, com uma modificação na matéria orgânica do solo artificial OECD, nomeado Solo Artificial Tropical (SAT). No final dos 14 dias do teste de toxicidade aguda, observaram-se mortalidades significativas de *E. andrei* para imidacloprid, que apresentou LC₅₀ de 25,53 mg de i.a./kg de solo seco. O número de juvenis gerados foi altamente reduzido após 28 dias de exposição em SAT contaminado com imidacloprid (EC₅₀ 4,07 mg.kg⁻¹) e carboxin + thiram (EC₅₀ 56,38 mg.kg⁻¹). Captan demonstrou moderado efeito neste teste de toxicidade crônica (EC₅₀ 334,84 mg.kg⁻¹), e os inseticidas fipronil (EC₂₀ 23,16 mg.kg⁻¹) e thiametoxam (EC₅₀ 791,99 mg.kg⁻¹) apresentaram leve efeito de toxicidade na reprodução das minhocas. Nos testes de fuga, as minhocas apresentaram forte efeito de repelência aos substratos contaminados com imidacloprid (EC₅₀ 0,11 mg.kg⁻¹). *E. andrei* demonstrou repelência moderada ao SAT contaminado com os fungicidas captan (EC₅₀ 33,54 mg.kg⁻¹) e carboxin + thiram (EC₅₀ 60,32 mg.kg⁻¹), além de leve efeito observado por thiametoxam. Apesar de apenas imidacloprid apresentar efeitos agudos significativos, os demais agrotóxicos demonstram-se tóxicos a *E. andrei* nos testes de toxicidade crônica e de fuga, entretanto, sob concentrações superiores às recomendadas comercialmente.

Palavras-chave: Minhocas. Tratamento de sementes. Ecotoxicologia. Agrotóxicos.

Abstract

We assess the impact caused by the products used in seed coating on *Eisenia andrei* (Oligochaeta). The insecticides imidacloprid, fipronil, thiametoxam, and fungicides captan and carboxin + thiram were investigated. Tests were carried using the internationally standardized (ISO) ecotoxicity acute, chronic and avoidance tests in artificial soil. However with a change in soil organic matter artificial OECD, called Tropical Artificial Soil (TAS). At the end of 14 days on the acute tests there were significant mortalities of *E. andrei* by imidacloprid, showed the LC₅₀ of 25.53 mg a.i. / kg dry soil. The number of juveniles produced was greatly reduced on exposure of 28 days in contaminated SAT by imidacloprid (EC₅₀ 4.07 mg / kg) and thiram carboxin (EC₅₀ 56.38 mg / kg). Captan showed moderate chronic effects in this test (EC₅₀ 334.84 mg / kg), fipronil (EC₂₀ 23.16 mg / kg) and thiametoxam (EC₅₀ 791.99 mg /

kg) had a slight effect on reproduction toxicity of earthworms. In avoidance tests, the worms have showed a strong repellency effect to the contaminated substrates by imidacloprid (EC50 0.11 mg / kg). *E. andrei* showed moderate repellent to contaminated SAT by the fungicides captan (EC50 33.54 mg / kg) and carboxin + thiram (EC50 60.32 mg / kg.), and slight effect observed by thiametoxam. Although only imidacloprid had significant acute effects, the other pesticides shown being toxic to *E. andrei* on chronic and avoidance tests, however in concentrations over those recommended by the industry.

Keywords: Earthworms. Seed dressing. Ecotoxicology. Pesticides.

3.2 INTRODUÇÃO

O intenso uso de agrotóxicos oferece um risco direto de toxicidade aos aplicadores, bem como aos demais organismos vivos que estão expostos ao contato. Pesquisadores tem se preocupado com a presença de resíduos destas substâncias em solos agrícolas devido ao excessivo uso (VAN STRAALLEN, 2002a).

No caso dos produtos utilizados na proteção de sementes (fungicidas, inseticidas, nematicidas, entre outros), o ingrediente ativo fica em contato direto com os constituintes do solo, dentre estes estão: argila e a matéria orgânica, as quais têm grande capacidade de reter compostos químicos (GARCIA, 2004), expondo assim organismos não alvo da fauna do solo às contaminações.

Sabe-se que nos ecossistemas terrestres os invertebrados e os micro-organismos, são responsáveis por diversos processos biológicos, bioquímicos e estruturais importantes do solo. Desta forma a poluição gerada pelo constante uso de agrotóxicos pode promover o desequilíbrio deste sistema edáfico (CORTET et al., 1999) e, conseqüentemente, comprometer a sustentabilidade do sistema.

Resultados da literatura apontam efeitos negativos em organismos da fauna edáfica, os quais estão relacionados à presença de resíduos de produtos químicos utilizados na agricultura no solo, como é o exemplo de artrópodes, microartrópodes, e minhocas (CORTET, 2002; DANFA et al., 2002).

Os efeitos colaterais dos agrotóxicos têm preocupado os órgãos ambientais, visto que, em países europeus, diversas diretrizes já foram estabelecidas para prevenir e regular os efeitos de químicos na fauna do solo (EUROPEAN UNION, 1997, 2002).

Para a avaliação em laboratório dos efeitos destes xenobióticos no solo, utilizam-se testes padronizados pela OECD e ISO, dos quais as minhocas são consideradas bons indicadores de toxicidade aguda (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 1984), crônica (ISO, 1998) e comportamental, através de testes de fuga (ISO, 2008a).

As espécies de minhocas padrão para estes testes são *Eisenia fetida* e *E. andrei*, as quais já vem sendo utilizadas em diversos trabalhos para avaliar os efeitos negativos destes produtos fitossanitários no solo (ESPINOZANAVARRO; BUSTOS-OBREGÓN, 2004; REINECKE; REINECKE, 2007; RÖEMBKE et al., 2007; STOJANOVIĆ et al., 2007).

Dentre os agrotóxicos utilizados no tratamento químico de sementes, foram selecionados os fungicidas captan e Vitavax® (carboxin + thiram). Este primeiro já foi avaliado em *E. fetida* por Anton et al. (1990) em testes de toxicidade aguda. Em relação aos inseticidas, Gomez-Eyles et al., (2009) verificaram alterações do peso corporal, e do número de casulos de *E. fetida* expostas a solos contaminados com imidacloprid. Já fipronil conta com relatos sobre minhocas do grupo *Feretima*, avaliando a toxicidade em exposição de sete dias (MOSTERT et al., 2002).

Já thiametoxam, que possui poucos relatos em testes com minhocas (NATIONAL REGISTRATION AUTHORITY, 2001; EC, 2007) e algumas descrições sobre efeitos em artrópodes predadores (KILPATRICK et al., 2005; MOSER; OBRYCKI, 2009).

O objetivo deste estudo avaliar a ecotoxicidade aguda, efeitos no comportamento, reprodução e na biomassa de *E. andrei*, quando exposta a agrotóxicos (fungicidas e inseticidas) comumente utilizados no tratamento químico de sementes. Para tanto, foram utilizados protocolos padronizados, que permitem uma básica avaliação de risco ambiental.

3.3 MATERIAL E METODOS

3.3.1 Organismos Teste

Para a realização dos ensaios ecotoxicológicos com minhocas, estabeleceu-se uma criação estoque com a espécie *E. andrei* (Lumbricidae) de origem européia. Esta cultura foi adaptada da norma ISO 11268-2 (1998).

O substrato para a criação de minhocas consistiu na mistura de duas partes de esterco seco (equino) peneirado, uma parte de pó de fibra de coco (Amafibra® - Golden Mix, tipo 80) (2:1, p/p) e, 10% do peso dos dois primeiros de areia fina (granulometria 90/100). Todo o material foi misturado por cerca de uma hora em uma betoneira e, após este período, separou-se uma alíquota da amostra para medir o pH, este foi corrigido com CaCO₃ para manter o pH entre 6 e 7 (quando necessário).

Para eliminar possíveis organismos presentes na mistura do substrato, utilizou-se um processo nomeado desfauna, o qual consistiu em congelar o material por dois dias, e descongelar até a temperatura ambiente por dois dias, repetindo este ciclo três vezes, totalizando uma seqüência de 12 dias para estar pronto para o uso.

Em cada caixa de 9 litros, colocou-se aproximadamente 1 kg do substrato seco, já desfaunado (com pH corrigido). Sendo adicionado aproximadamente 2.200 mL de água deionizada, misturou-se a massa para que o umedecimento fosse homogêneo. Em cada caixa foram acondicionadas entre 100 - 150 indivíduos de *E. andrei*. As minhocas foram alimentadas semanalmente com aveia em flocos grossos e água (2:1 v/v).

Os organismos das criações, bem como todos os bioensaios foram mantidos em sala climatizada, com temperatura de 20 ± 2°C e iluminação contínua, com fotofase de 12h:00h. Assim, num período de no mínimo 24 horas antes do início de qualquer bioensaio as minhocas foram acondicionadas no substrato teste, utilizando-se apenas adultos (com clitelo aparente), e massa corporal entre 250 e 600 mg.

3.3.2 Solo Artificial e Contaminantes

O substrato padrão de estudos ecotoxicológicos terrestres é o solo artificial OECD (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 1984), o qual é constituído por uma mistura de 70% de areia industrial (fina), 20% de argila caulínica, e 10% de turfa (moída e seca). No entanto, neste trabalho utilizou-se uma versão modificada deste substrato, chamada solo artificial tropical (SAT), o qual teve sua fração de matéria orgânica adequada para disponibilidade de material das regiões tropicais, neste caso, 10% de pó da casca de coco (seca e peneirada) foram utilizados como substituto (GARCIA, 2004). O material foi misturado, e o pH do SAT foi corrigido para $6 \pm 0,5$ através da adição de CaCO_3 .

Os fungicidas Captan® (captan - 480g de i.a. L^{-1}), e Vitavax® (38.7% de carboxin + 37.5% de thiram - 200g de i.a. L^{-1}), os inseticidas Gaucho® (imidacloprid - 600g de i.a. L^{-1}), Standak® (fipronil - 250g de i.a. L^{-1}), e Cruiser® (thiametoxam - 35 g de i.a. L^{-1}) foram aplicados ao SAT por via líquida imediatamente antes do início dos testes, e agitados até a homogeneização entre a água e o produto. As concentrações foram escolhidas a partir de testes preliminares, e o tratamento controle utilizou apenas água deionizada. As aliquotas da suspensão líquida contaminada e controle foram aplicadas em volumes determinados para manter a umidade em no máximo 60% da capacidade de retenção de água do solo.

Os pHs dos solos já contaminados foram medidos para todas as concentrações dos tratamentos, no início dos experimentos, e estes não foram mais corrigidos após a aplicação dos tóxicos.

O cálculo estimado de volume de produto expostos ao solos de acordo com as doses comercialmente usadas foram obtidos a partir do número de sementes por hectare (ha), associado à recomendação do volume de cada produto/kg de semente, determinando-se a quantidade de produto/ha.

Considerando um solo de densidade igual a um, onde as sementes permanecem nas camadas de 0 - 5 cm do solo, obtem-se uma massa de 500.000 kg de solo/ha, que pode ser considerada suscetível à contaminação. E desta forma se pode extrapolar o volume de cada produto ou i.a./kg solo (Tabela 3.1)

Fórmula utilizada para o cálculo do número de sementes por hectare (EMBRAPA, 1999):

$$\text{N}^\circ \text{ sementes/ha} = \frac{\text{Q} \cdot (1.000 \cdot \text{P} \cdot \text{D})}{\text{G} \cdot \text{E}}$$

Onde:

Q = quantidade de semente necessária por hectare (kg/ha);

P = peso de 100 sementes em grama (g);

D = n° de plantas que se deseja por metro linear (n°/m);

E = espaçamento utilizado (cm);

G = porcentagem de emergência em campo (%).

Tabela 3.1 – Cálculo do volume estimado de agrotóxicos (ingredientes ativos), sob recomendação comercial, expostos por kg de solo, considerando os 5 primeiros cm do solo e as exigências para a cultura da soja.

Produto	Ingrediente ativo (i.a.)	I.a. (%)	mg de i.a./kg solo
			0-5 cm
CAPTAN 480 SC	captan	48%	0,229
VITAVAX 200 SC	carboxin + thiram	20%	0,115
CRUISER 350 FS	thiamtoxam	35%	0,201
STANDAK 250 SC	fipronil	25%	0,096
GAUCHO 600 FS	imidacloprid	60%	0,229

3.3.3 Teste de Toxicidade Aguda

Para avaliar o efeito de mortalidade dos agrotóxicos em *E. fetida*, foram realizados testes de toxicidade aguda de acordo com a norma OECD número 207 (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 1984). Recipientes plásticos foram preenchidos até aproximadamente 5 - 7 cm de altura, com 500g de solo artificial (peso seco) e suspensão contaminada ou controle. Além disso foram adicionadas 10 minhocas adultas em cada recipiente teste, com peso adequado, no início do bioensaio. Os recipientes foram fechados com tampas perfuradas, para permitir trocas gasosas.

No 14º dia foram avaliadas as características de mortalidade e redução da biomassa corporal. Para todas as substâncias testadas foram realizados testes preliminares com as concentrações de 1, 10, 100, 500, e 1000 mg de i.a./kg de solo seco, através dos quais se determinaram cinco novas de concentrações, próximas das que promoveram o efeito negativo e então foi realizado um teste definitivo com quatro repetições por tratamento.

Nos tratamentos em que não se observou efeito de mortalidade na maior concentração testada, foi realizado apenas um teste limite com concentração única, também com o valor de 1000 mg.kg solo⁻¹ e, o mesmo número de réplicas do anterior.

3.3.4 Testes Toxicidade Crônica

O sistema para a determinação dos efeitos dos produtos tóxicos na reprodução das minhocas, foi baseado no teste de toxicidade crônica descrito na diretriz ISO:11268-2 (ISO, 1998).

A instalação dos testes foi idêntica à de toxicidade aguda, diferindo apenas na duração e na avaliação do bioensaio. Os adultos foram retirados 28 dias após do início, determinando-se a mortalidade e biomassa.

Após 56 dias do início do teste foi contabilizado o número de juvenis gerados no período que os adultos estavam presentes. Semanalmente foi oferecido esterco de cavalo como alimento, e a umidade do SAT corrigida por diferença de peso, com água deionizada. As “doses” das substâncias teste misturadas ao SAT foram baseadas nas concentrações subletais obtidas nos testes de toxicidade aguda, tendo estes também quatro repetições por tratamento.

3.3.5 Testes de Fuga

Avaliações comportamentais foram realizadas a partir do teste de fuga/fuga, seguindo as recomendações do protocolo ISO:17512-1 (ISO, 2008a).

Testes preliminares com as concentrações de 1, 10, 100, e 1000 mg de i.a./kg de solo seco determinaram as faixas doses de cada produto que foi testada. Assim, cada substância foi avaliada com cinco concentrações e cinco repetições por tratamento.

Em caixas plásticas retangulares (23,3 x 16,7 cm área, e 7,7 cm de altura) foram inseridos anteparos plásticos transversalmente, dividindo estes recipientes ao meio, onde em uma seção foi preenchida até 5 cm de altura, com 900g de SAT (peso úmido) contaminado, e na outra o mesmo volume de SAT isento de tratamento (controle). Em seguida um separador plástico foi removido, e 10 adultos de *E. fetida* foram colocados sobre a linha de separação.

Os recipientes foram fechados com tampas perfuradas com orifícios que permitiram trocas gasosas, e mativeram-se em sala climatizada no escuro, com temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Os animais não foram alimentados durante o período do teste. Ao fim do período de 48 horas foi inserido novamente o anteparo plástico na divisão entre os solos, separando cuidadosamente o solo controle do contaminado, e o número de indivíduos em cada seção da caixa foi contado.

As minhocas que se encontravam na linha de divisão entre as duas seções do recipiente foram contabilizadas como 0,5 para cada lado. Foi considerado o efeito de fuga para os organismos que desapareceram ou morreram dos recipientes durante o período do teste.

3.3.6 Análises dos Dados

As diferenças significativas da comparação entre as médias dos resultados de mortalidade, reprodução e perda de biomassa foram testadas através da ANOVA ($P < 0,05$), sob a aplicação dos métodos de Tukey e/ou Student-Newman-Keuls por meio do software Sisvar® 5.1.

Apenas as médias do teste de fuga foram comparadas por “Fisher exact test” de acordo com Agresti (1992). Análises de probit foram executadas no software PriProbit® 1.63, para se obter as LC_{50} do teste de toxicidade aguda, e EC_{50}

do teste de fuga. Regressões não lineares foram feitas com o programa computacional STATISTICA® 7.0 para os EC₅₀ dos testes de toxicidade crônica.

Quando não foi possível se obter os valores de EC₅₀, foram utilizados os valores de EC₂₀, bem como os NOEC e LOEC.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Validação dos Testes

De acordo com a diretriz da OECD número 207 (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 1984), a mortalidade das minhocas adultas nos controles deve ser $\leq 10\%$ para considerar um teste de toxicidade aguda como válido. Este critério de mortalidade foi observado em todos os tratamentos, servindo ainda para os testes de toxicidade crônica, de acordo com a norma ISO:11268-2 (ISO, 1998), além disso, o número de juvenis no controle deve permanecer ≥ 30 indivíduos/tratamento. Ainda no teste de reprodução o coeficiente de variação (cv) deve ser $\leq 30\%$.

Em relação aos testes comportamentais, a orientação da ISO:17512-1 (ISO, 2008a) é que para a validação do teste, o número de minhocas mortas ou desaparecidas no teste de fuga deve ser $\leq 10\%$ por tratamento, e a distribuição dos organismos neste duplo controle precisa estar na faixa de 60%: 40%, assim, comprovando que não houve preferência significativa por um dos lados

Todos essas determinações foram seguidas. Além disso, realizou-se um teste de toxicidade crônica, com cinco concentrações e quatro repetições, utilizando carbendazim como substância referência para testes com minhocas, onde se observou o valor de EC₅₀ de 1,390 ($0,906 < x > 1,874$) de redução do número de juvenis gerados, confirmando que estes oligoquetas estavam sensíveis, pois nesta concentração o efeito prejudicial para estes organismos é comprovado (ISO, 1998).

3.4.2 Resposta de Toxicidade Aguda, ou Mortalidade de *E. andrei*

Imidacloprid apresentou efeito de mortalidade em minhocas, demonstrando este produto diferenças significativas (teste *t*, $P < 0,05$) em relação ao controle a partir da concentração de 25 mg.kg^{-1} (Figura 3.1) e atingindo o valor de LC_{50} calculado em $25,53 \text{ mg.kg}^{-1}$ ($24,44 < x > 26,69$) (Tabela 3.2). Na LOEC deste mesmo i.a. foram observadas alterações morfológicas em minhocas, que posteriormente morreram (Figura 4.7). Nenhum dos demais produtos avaliados apresentou efeito de mortalidade em *E. andrei*.

Reduções na biomassa corporal no período de 14 dias foram significativas apenas para Imidacloprid (Figura 4.2).

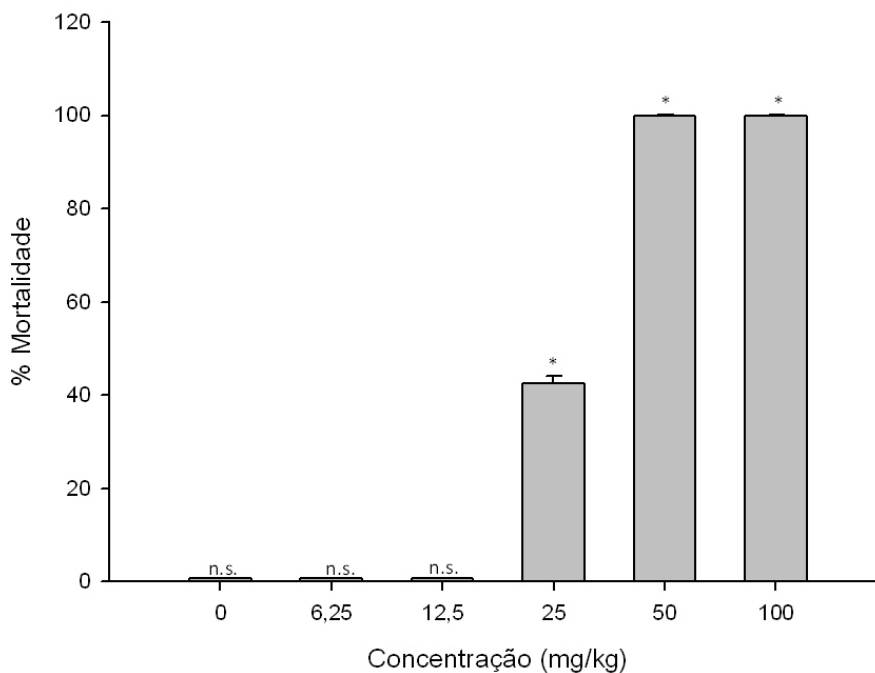


Figura 3.1 – Mortalidade (%) de *E. andrei* em solo artificial contaminado com imidacloprid

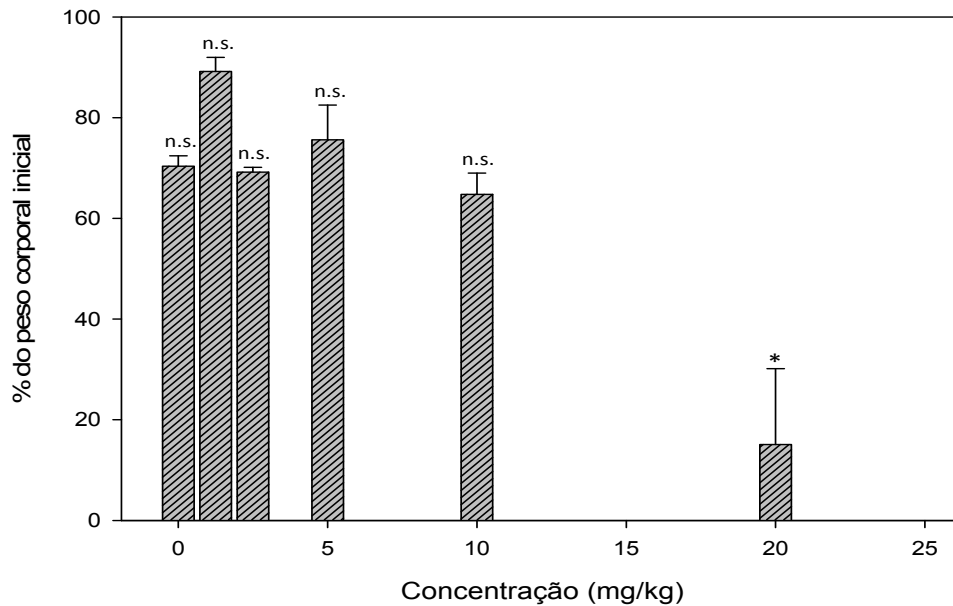


Figura 3.2 – Redução de biomassa corporal (% do peso inicial) de *E. andrei* em contato com diferentes concentrações de imidacloprid em solo artificial (28 dias de exposição).

3.4.3 Resposta de Toxicidade Crônica na Reprodução de *E. andrei*

Todas as minhocas expostas ao confinamento com SAT contaminado se reproduziram. No entanto, houve redução do número de juvenis encontrados em todos os tratamentos.

Imidacloprid foi o composto químico que apresentou efeito significativo na menor dose (LOEC) (Figura 3.3), a qual é comercialmente recomendada no tratamento de sementes (Tabela 3.1), seguido de carboxin + thiram, fipronil, captan e, por fim, o produto que teve efeito somente na concentração mais alta foi thiametoxam (Tabela 3.2).

Com exceção de thiametoxam, todos os demais tratamentos promoveram a redução da biomassa dos adultos de *E. andrei* durante os 28 dias de exposição aos químicos, sendo que imidacloprid (20 mg.kg^{-1}) e captan (400 mg.kg^{-1} solo) diferiram do controle apenas nas maiores concentrações investigadas, já fipronil e carboxin + thiram (Figura 3.4 e 3.5) apresentaram variações nos valores apresentados.

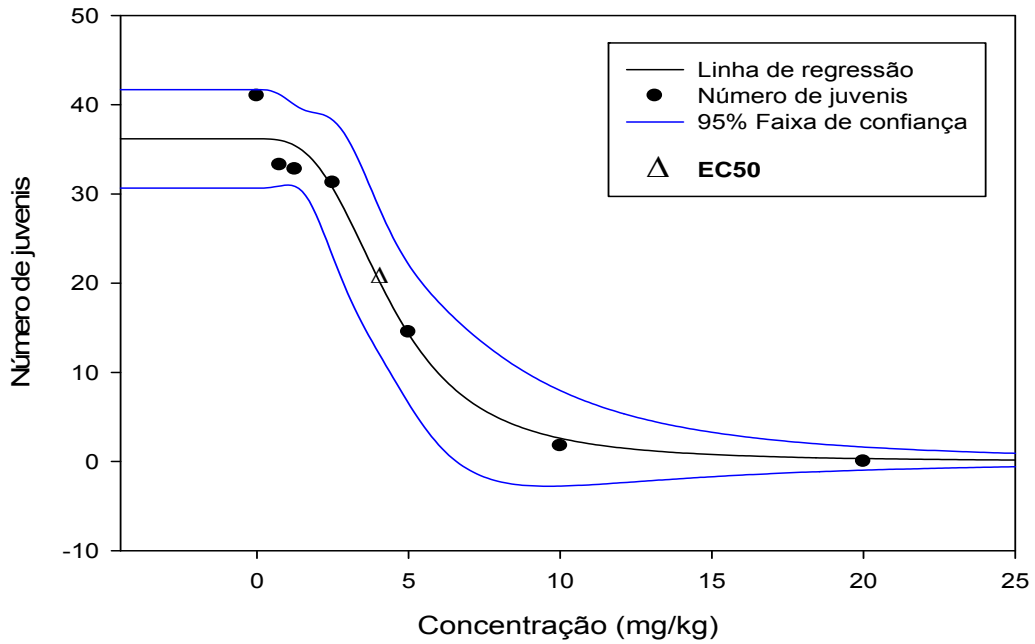


Figura 3.3 – Número de juvenis de *E. andrei* encontrados em solo artificial contaminado com Imidacloprid.

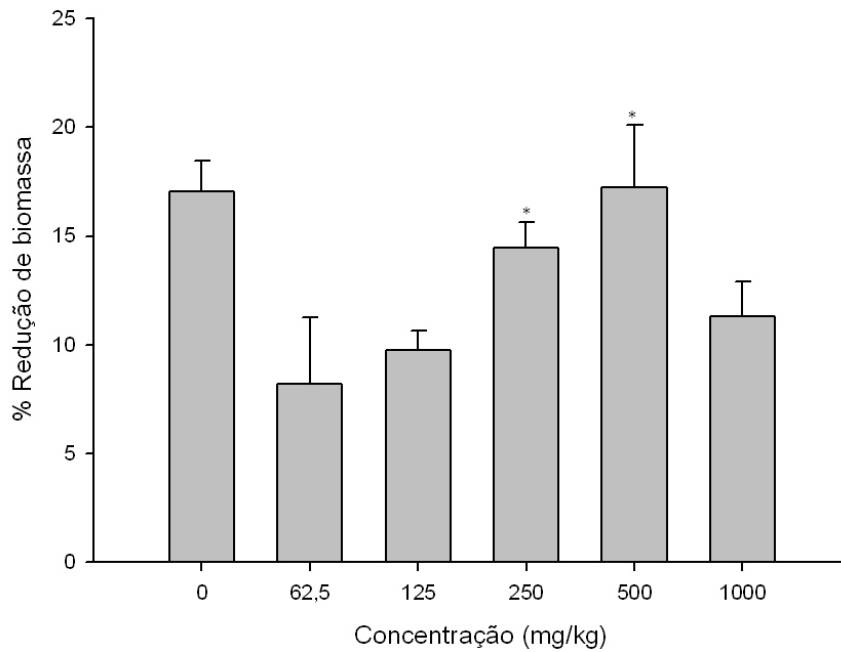


Figura 3.4 – Redução de biomassa corporal (% do peso inicial) de *E. andrei* em contato com diferentes concentrações de Fipronil.

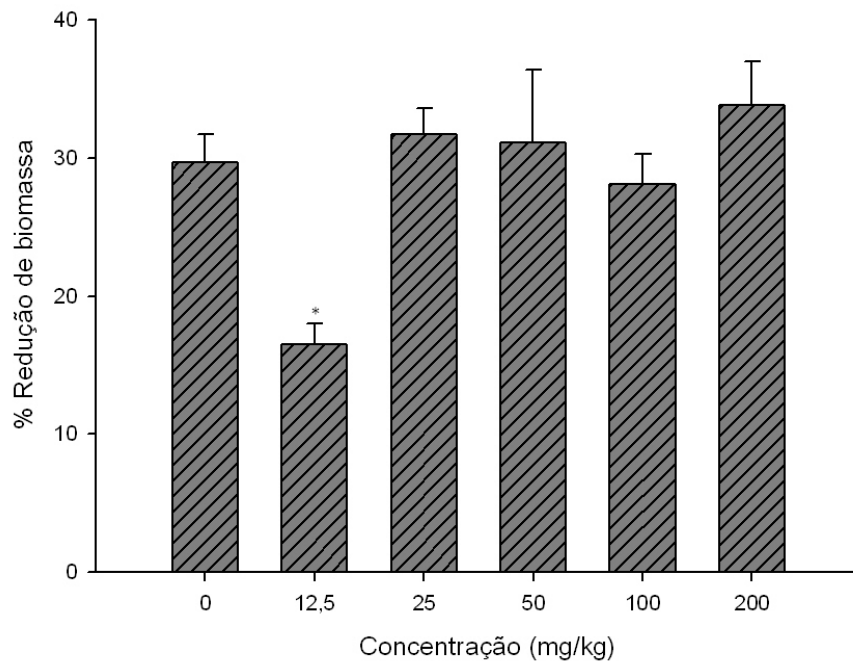


Figura 3.5 – Redução de biomassa corporal (% do peso inicial) de *E. andrei* em contato com diferentes concentrações de carboxin + thiram.

3.4.4 Resposta Comportamental ou de Fuga de *E. andrei*

O comportamento de fuga dos substratos foi observado com significância de $P < 0,01$ (teste t) para os tratamentos imidacloprid (Figura 3.9), captan (Figura 3.6) e carboxin + thiram (Figura 3.7), sendo que nestes dois últimos, os substratos com doses mais baixas foram mais atrativos e, posteriormente, com o aumento da concentração, foi observado o comportamento de fuga.

Nos inseticidas fipronil (Figura 3.10) e thiametoxam (Figura 3.11) também foi visualizado este efeito de atração, porém com o aumento da concentração, apenas thiametoxam causou repelência nas minhocas ($P < 0,05$).

Os valores de EC_{50} para os tratamentos que apresentaram repelência do SAT contaminado estão disponíveis na Tabela 4.2.

Tabela 3.2 – Concentração letal (LC50) do teste de toxicidade aguda; concentração estimada (EC50, EC20) dos testes de toxicidade crônica e de fuga; maior concentração testada sem efeito observado (NOEC), e menor dose testada com efeito observado (LOEC) com minhocas *E. andrei*, expostas aos agrotóxicos utilizados no tratamento químico de sementes (mg de i.a./kg de solo seco).

Químico	Teste de toxicidade aguda			Teste de toxicidade crônica				Teste de Fuga		
	LC50	NOEC	LOEC	EC50	EC20	NOEC	LOEC	EC50	NOEC	LOEC
Captan	>1000	1000	>1000	334,84	n.i.	100	200	33,54	16,88	50.625
Carboxin+Thiram	>1000	1000	>1000	56,38	n.i.	12,5	25	60,32	20	80
Imidacloprid	25,53	12,5	25	4,07	n.i.	<0,75	0,75	0,108	<10	0,125
Fipronil	>1000	1000	>1000	>500	23,16	1	62,5	>10	10	>10
Thiametoxam	>1000	1000	>1000	791,99	n.i.	250	500	>20	2,5	5

n.i., significa que o valor não foi estimado.

3.5 DISCUSSÃO

3.5.1 Efeitos de Captan em *E. andrei*

Os resultados encontrados nos testes de toxicidade aguda de *E. andrei* expostas ao i.a. captan, nos quais não se observou mortalidade nem redução de biomassa (14 dias) na maior dose recomendada para o “limit test” (1000 mg.kg⁻¹), reforçam as observações feitas por Anton et al. (1990), de que estes efeitos negativos sobre *E. feida* também não foram significativos.

No entanto estas informações podem ser insuficientes para se concluir que o produto é atóxico a estas espécies. Assim, os resultados de reprodução, redução da biomassa (28 dias) e do comportamento de fuga forneceram informações complementares para o estudo.

Através destes testes adicionais notou-se a limitação na reprodução a partir da concentração de 200 mg.kg⁻¹ ($P < 0,05$), sendo a estimativa de redução de 50 % do número de juvenis com 334,83 mg.kg⁻¹.

Sabendo-se que as minhocas se alimentam da matéria orgânica presente no solo, e que o contaminante fica em contato com esta, é evidente que, além da exposição dérmica, as minhocas terão uma exposição alimentar ao agrotóxico. Esta hipótese é corroborada por Luo et al. (1999), afirmando que, em

testes com solo artificial, as minhocas absorvem a maior parte dos agrotóxicos através do intestino.

Esta é uma das possíveis explicações para os efeitos observados, pois, segundo Registration Eligibility Decision (1999), a maior parte do metabolismo de captan ocorre no trato gastrointestinal. Tetrahidroftalimida é o maior metabólito de captan (REIGART; ROBERTS, 1999), podendo ser o responsável deste fungicida por interagir dentro das células com os grupos sulfidríla, amino e hidroxilas de enzimas, provocando assim a inibição de processos metabólicos (WAXMAN, 1998).

Já em relação ao comportamento nos testes de fuga, houve certo efeito de atração nas concentrações baixas que, com o aumento, demonstraram resposta nula e, somente na maior dosagem houve repelência do solo contaminado (Figura 3.6).

Este fraco efeito de repelência pode estar associado à alta relação do ingrediente ativo com o carbono da matéria orgânica (ALEXANDER; ALEXANDER, 2000).

Poucos trabalhos relacionam a toxicidade de captan aos organismos de solo, principalmente às minhocas. Entretanto, alguns autores já investigaram os efeitos diretos (COLINAS et al., 1994) e indiretos (INGHAM et al., 1991) sobre nematóides, além de alguns micro-organismos não alvo (PIOTROWSKA-SEGET et al., 2008).

Apesar dos resultados demonstrarem efeitos negativos, estes são significativos apenas em concentrações muito superiores às encontradas nas recomendações agrícolas.

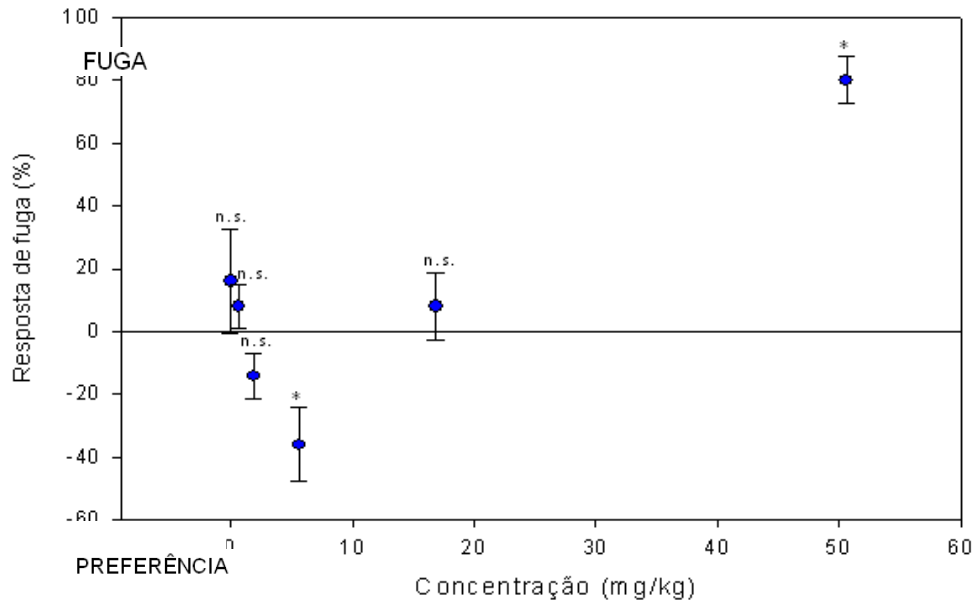


Figura 3.6 – Resposta de fuga ou atração de *E. andrei* às diferentes concentrações de captan (mg de ingrediente ativo.kg⁻¹ de solo seco) em solo artificial (média de resposta e barras de erro padrão).

3.5.2 Efeitos de Carboxin + Thiram em *E. andrei*

Semelhante ao fungicida captan, os valores encontrados nos testes de toxicidade aguda de *E. andrei* exposta a carboxin + thiram, demonstram que não houve mortalidade (Tabela 3.2) nem redução de biomassa corporal significativa no final dos 14 dias de teste.

Poucos são os relatos na literatura a respeito dos efeitos agudos de Carboxin + Thiram em invertebrados do solo. No entanto, para *Daphnia magna* (organismo aquático), os ingredientes ativos demonstraram efeito leve (Carboxin), e altamente tóxico (Thiram), segundo (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2004a, 2004b).

Röembke et al. (2007), utilizando também SAT contaminado com o fungicida Benomyl, considerado muito tóxico a *E. andrei*, observaram uma LC₅₀ de 633 mg.kg⁻¹. Contudo, o mesmo teste em solo natural LUFA (ISO, 2003) teve a LC₅₀ de 66,8 mg.kg⁻¹. Analisando os dados destes autores, se pressupõe que o uso do Solo Artificial Tropical ocultou parcialmente os efeitos negativos dos fungicidas.

No período do teste de toxicidade crônica, não houve redução da média de peso corporal das minhocas em relação ao controle, porém o EC_{50} da reprodução foi calculado em $56,38 \text{ mg.kg}^{-1}$, sendo este valor muito inferior ao relatado por Toxiclin (2001), o qual afirma que a EC_{50} para organismos do solo é $1178,42 \text{ mg.kg}^{-1}$, sem se referir à espécie avaliada.

Outra característica observada, é de que as minhocas, quando submetidas ao teste de fuga, tiveram valor LOEC de 80 mg.kg^{-1} , seis vezes maior do que o LOEC do teste de toxicidade crônica (25 mg.kg^{-1}). Pode-se deduzir que, apesar do produto ter a ação de contato, além da sistêmica (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2004a), o efeito de irritação nas minhocas não é tão pronunciado, visto que, para o fungicida, captan, os valores dos LOEC dos testes de fuga e crônico foram 50.62 e 200 mg.kg^{-1} respectivamente. Observou-se que no caso do fungicida Vitavax® os organismos fugiram em concentrações 4 vezes menores do que as que afetaram a reprodução (Figura 3.7). Isto indica que a capacidade destas minhocas evitarem locais contaminados com carboxin + thiram é menos evidente.

Embora tenham sido verificados efeitos de redução do número de juvenis de minhocas nos testes de toxicidade crônica e de fuga dos substratos contaminados, quando se observam os valores de LOEC para os bioensaios realizados neste estudo (Tabela 3.2), observa-se que em nenhum deles a concentração é \leq a das comercialmente estimadas.

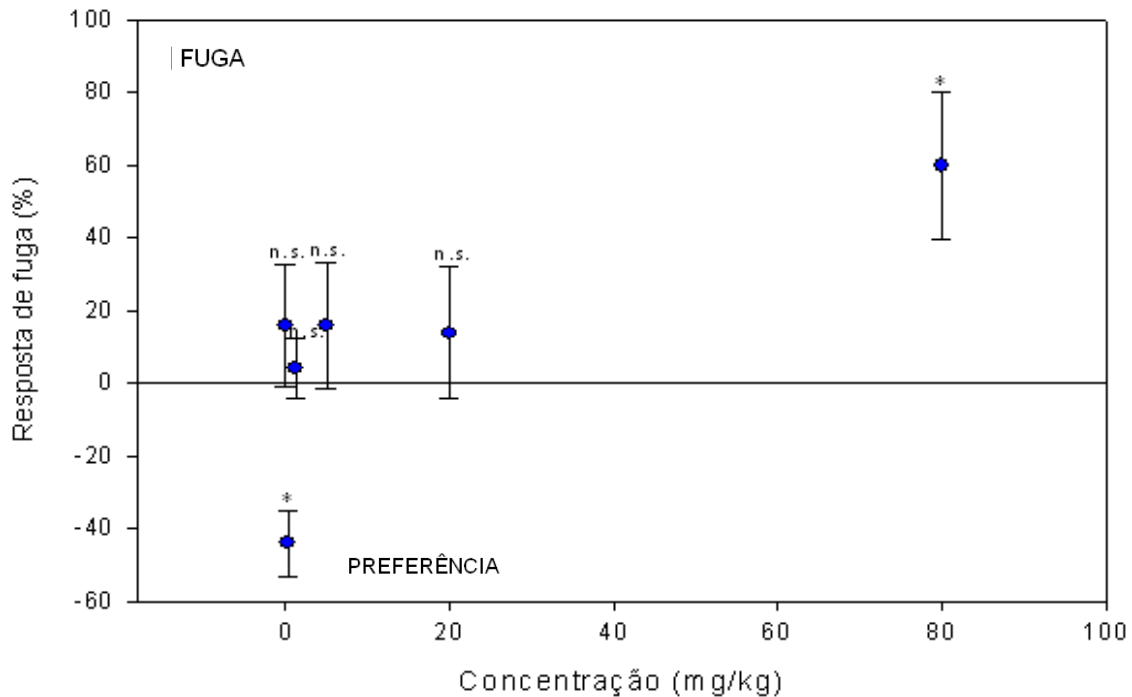


Figura 3.7 – Resposta de fuga ou atração de *E. andrei* às diferentes concentrações de carboxin + thiram (mg de ingrediente ativo.kg⁻¹ de solo seco) em solo artificial (média de resposta e barras de erro padrão).

3.5.3 Efeitos de Imidacloprid em *E. andrei*

Dentre os produtos avaliados, imidacloprid foi o único que apresentou efeitos significativos de mortalidade (LC₅₀ = 25,53 mg.kg⁻¹), e na redução da massa corporal de *E. andrei*, sob a concentração de 25 mg.kg⁻¹ (14 dias) e 20 mg.kg⁻¹ (28 dias), confirmando-se os valores de 25 mg.kg⁻¹ (mortalidade), e 14 mg.kg⁻¹ (redução de peso), encontrados por Kreuzweiser et al. (2008).

Entretanto, para Buffin (2003), a LC₅₀ deste i.a para a espécie de minhoca em questão está entre 2 e 4 mg.kg⁻¹, resultados estes, próximos aos encontrados por Luo et al. (1999), que, no teste de toxicidade aguda com *E. fetida* em solo OECD, encontraram 2,30 mg.kg⁻¹ e, ainda, Gomez-Eyles et al. (2009), em solos naturais com adição de M.O. observaram o valor de LC₅₀ de 2,36 mg.kg⁻¹ e efeitos de perda de peso a 1,91 mg.kg⁻¹ (28 dias).

Capowiez et al. (2005) também observaram redução no peso de minhocas das espécies *Allolobophora icterica* e *Aporrectodea nocturna* com a

concentração de 1 mg.kg^{-1} . As diferenças encontradas entre os resultados deste estudo e os observados na literatura podem ser influenciadas pelos diferentes substratos utilizados, visto que estes variam em sua composição de M.O., na textura (GOMEZ-EYLES et al., 2009), bem como nas espécies de minhocas utilizadas (CAPOWIEZ et al., 2005). Kula e Larink, (1997) observaram em teste de toxicidade aguda com *E. fetida*, que a LC50 nestes solos naturais é normalmente menor do que a encontrada em solos artificiais.

Capowiez e Berard (2006) sugerem que a redução de peso pode estar ligada ao fato de que na presença de imidacloprid houve uma redução na atividade de escavação, assim as minhocas que escavam menos, possuem menor conteúdo intestinal. Este efeito de perda de biomassa também pode estar relacionado à redução alimentar, pois estes autores observaram redução na ingestão de esterco pelas minhocas. Também não se pode descartar possíveis efeitos diretos gerados na fisiologia do animal, como, por exemplo, inibições enzimáticas que reduzam a eficiência na metabolização dos alimentos.

Luo et al. (1999) constataram que em concentrações baixas ($0,1 \text{ mg/l}$ durante quatro horas em SAT) houve redução da atividade da enzima celulase, sendo este efeito pronunciado com o aumento do tempo e dose. Os autores sugerem que este pode ser o motivo de morte, através da autólise das minhocas. Esta afirmação é coerente com as alterações morfológicas vistas neste estudo (Figura 3.8). Outra possibilidade para o efeito letal está ligada ao bloqueio dos receptores do sistema nervoso. Apesar de serem mais suscetíveis nos insetos (BUFFIN, 2003), este bloqueio leva ao acúmulo de acetilcolina, um neurotransmissor importante, resultando em paralisia, podendo levar à morte (KIDD; JAMES, 1991).

Efeitos na reprodução tiveram um LOEC de $0,75 \text{ mg.kg}^{-1}$ (teste $t P < 0,01$) e, a redução de 50% do número de juvenis foi estimada na concentração de $4,07 \text{ mg.kg}^{-1}$, assim como a diminuição do número de casulos produzidos foi vista por Gomez-Eyles et al. (2009) com valor de $EC_{50} = 3,23 \text{ mg.kg}^{-1}$. Estas limitações na reprodução provavelmente estão ligadas ao aumento no número de anomalias encontradas na formação dos espermatozoides, pois já foi visto que imidacloprid a partir da concentração de $0,2 \text{ mg.Kg}^{-1}$ de solo promoveu danificados significativos no número de espermatozoides em relação ao controle (LUO et al., 1999).

Quando Capowiez e Berard (2006) avaliaram a fuga de outras espécies de minhocas, imidacloprid não demonstrou efeito de repelência (1 mg.kg^{-1}), talvez pelo fato desses animais, ao invés de migrar das áreas contaminadas, diminuíram a atividade no solo. No presente trabalho verificaram resultados diferentes, demonstrando *E. andrei* efeito de fuga dos substratos contaminados (Figura 3.9), suspeitando-se que este produto tenha algum composto irritante à espécie.

Observando os resultados anteriores, pode-se inferir que o tratamento de sementes com Imidacloprid é prejudicial à *E. andrei* em condições laboratoriais, mesmo em doses baixas (comercialmente usadas).

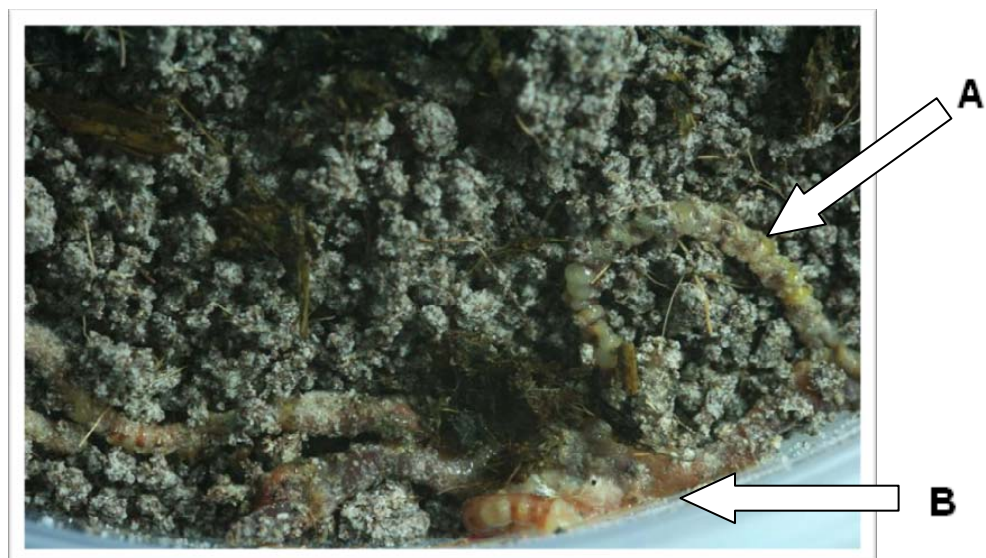


Figura 3.8 – Alteração morfológica (A), e morte de minhocas (B) (*E. andrei*) expostas a solos contaminados com o inseticida imidacloprid em teste de toxicidade aguda.

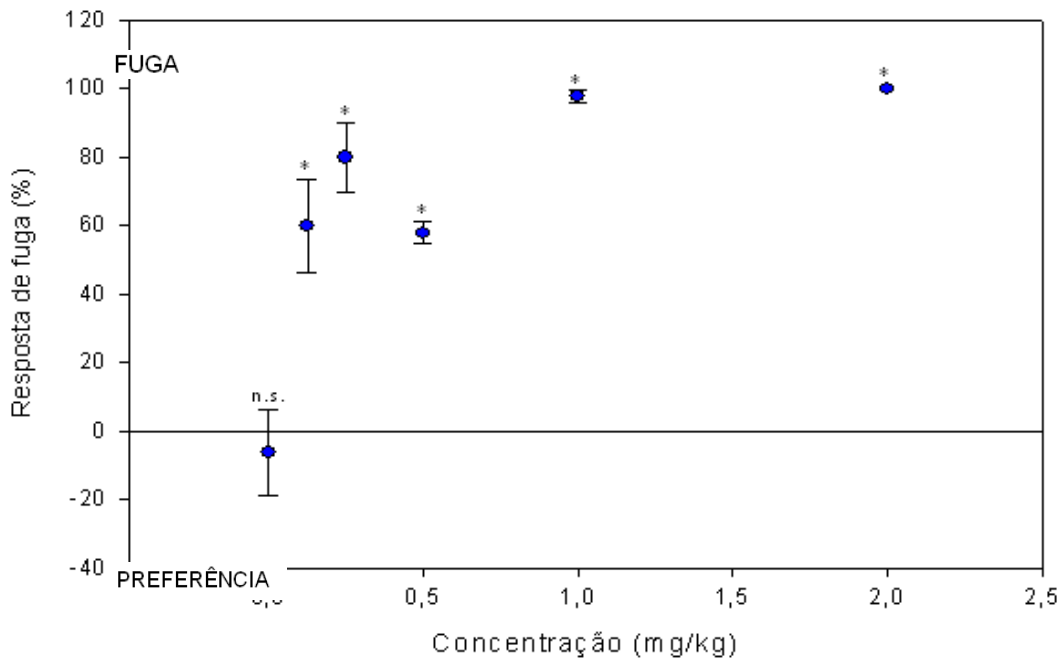


Figura 3.9 – Resposta de fuga ou atração de *E. andrei* às diferentes concentrações de imidacloprid (mg de ingrediente ativo.kg⁻¹ de solo seco) em solo artificial (média de resposta e barras de erro padrão).

3.5.4 Efeitos de Fipronil em *E. andrei*

O inseticida fipronil da mesma forma que os fungicidas, não apresentou efeito de mortalidade, nem redução do peso de *E. andrei* exposta durante os 14 dias do teste de toxicidade aguda (Tabela 3.2).

Mostert et al. (2002) avaliando durante sete dias o efeito deste i.a. sobre minhocas do grupo Feretima, o classificaram como não tóxico, pois o LOEC também foi >1000 mg.kg⁻¹.

Devido à ausência de trabalhos relacionando este ingrediente ativo a minhocas, comparou-se os resultados com os demais invertebrados do solo, como é o caso das altas mortalidades observadas em colônias de *Coarctotermes clepsydra* (Isoptera) (PEVELING et al., 2003).

Fipronil apresenta-se ativo principalmente por ingestão, onde determina paralisia espástica, e morte e eliminação dos insetos sensíveis. Atua no sistema nervoso central do inseto inibindo o receptor do ácido gama aminobutírico (GABA), que é responsável pela inibição da atividade neural anormal, prevenindo o

estímulo excessivo dos nervos (COUTINHO et al., 2005). Esta ligação ao GABA não é tão forte, permitindo assim que o inseticida tenha a seletividade observada (TINGLE et al., 2000).

Em relação aos efeitos na reprodução, não foi possível ser calculado o EC_{50} através da curva de regressão, sendo o valor mais alto entre os produtos aqui testados $>500 \text{ mg.kg}^{-1}$. Assim estimou-se o EC_{20} de $23,16 \text{ mg.kg}^{-1}$.

Alterações de peso não foram encontradas com a concentração limite (1000 mg.kg^{-1}). Em estudo semelhante à este, o efeito de fipronil utilizado no tramanto de sementes demonstrou efeito de redução na reprodução de *Folsomia candida*, outro importante bioindicador de qualidade do solo (SAN MIGUEL et al., 2008).

Já nos testes comportamentais, foram observados efeitos de atração das minhocas às seções que continham SAT contaminado com doses de até 10 mg.kg^{-1} ($P < 0,01$) (Figura 3.10). Bem diferente da ação excludente dos cupins em áreas agrícolas tratadas com este inseticida (ROULAND et al., 2003).

Estas diferenças podem estar ligadas à seletividade do químico, demonstrando assim reduzido efeito negativo apenas para *E. andrei*. Raveton et al. (2007) afirmam que os resíduos do tratamento de sementes com Fipronil em girassol, foram encontrados no solo após seis meses do cultivo com os valores de $3,24 \text{ mg.kg}^{-1}$.

Baseando-se nestes valores residuais de doses recomendadas, Fipronil não teve efeito negativo sobre as minhocas. Pelo contrário, houve atração de *E. andrei* aos substratos contaminados.

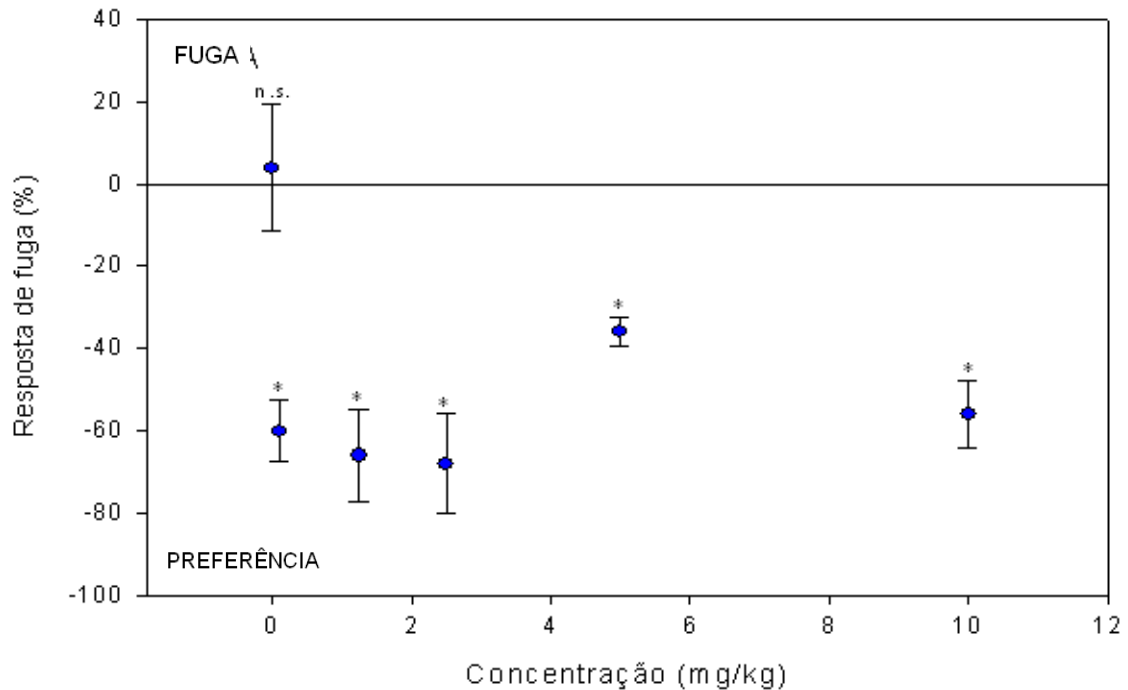


Figura 3.10 – Resposta de fuga ou atração de *E. andrei* às diferentes concentrações de fipronil (mg de ingrediente ativo.kg⁻¹ de solo seco) em solo artificial (média de resposta e barras de erro padrão).

3.5.5 Efeitos de Thiametoxam em *E. andrei*

O ingrediente ativo thiametoxam foi considerado não tóxico para as características de mortalidade, e redução de biomassa corporal das minhocas *E. andrei*, visto que os valores de LC₅₀ e LOEC_{biomassa} foram >1000 mg.kg⁻¹.

National Registration Authority (2001) encontraram valores semelhantes para a mortalidade para minhocas em testes de toxicidade aguda. Embora tenham observado redução de peso dos organismos durante os 14 dias de exposição do teste.

Estes valores de mortalidade em minhocas também foram relatados por EC (2007). Entretanto, neste estudo observou-se uma LC₅₀ de 5.93 mg de CGA 322704 por kg de solo seco. CGA 322704 é um importante metabólito formado a partir de thiametoxam no solo, o qual pode atingir níveis de até 35,6% de sua composição.

Outros estudos relacionam o efeito de mortalidade deste inseticida em cupins (ACDA, 2007) e artrópodes predadores não alvo do solo (KILPATRICK et al., 2005; MOSER; OBRYCKI, 2009). Tais observações podem ser explicadas pelo fato de que thiametoxam atua sobre os receptores nicotínicos da acetilcolina dos insetos, onde, mimetiza o mensageiro químico acetilcolina, e se liga ao seu sítio receptor, assim prejudicando irreversivelmente o sistema nervoso e, eventualmente, levando à morte do inseto (NATIONAL REGISTRATION AUTHORITY, 2001).

Nos testes de ecotoxicidade crônica também não houve redução da biomassa corporal, no entanto foram encontrados valores significativos para LOEC e EC_{50} da reprodução (Tabela 3.2).

EC (2007) relata que a reprodução de minhocas também foi reduzida na presença de thiametoxam e do metabólito CGA 322704, com valores NOEC de 0,68 e 0,60 $mg.kg^{-1}$, respectivamente. Diferenças significativas no comportamento de fuga foram relatadas a partir da LOEC de 5 $mg.kg^{-1}$ (Figura 3.11).

Efeitos no comportamento de aumento na escavação, foram vistos por National Registration Authority (2001), no entanto, estes sob concentração única de 1000 $mg.kg^{-1}$.

Observando os resultados obtidos com imidacloprid, e fazendo a comparação com thiametoxam, verifica-se que, apesar de serem do mesmo grupo de inseticidas, este segundo teve menor efeito em todas as características observadas.

De acordo com Maienfisch et al. (2001b), todos os inseticidas desta classe atuam sobre os receptores nicotínicos da acetilcolina. Porém, eles sugerem que há diferenças no modo de ação.

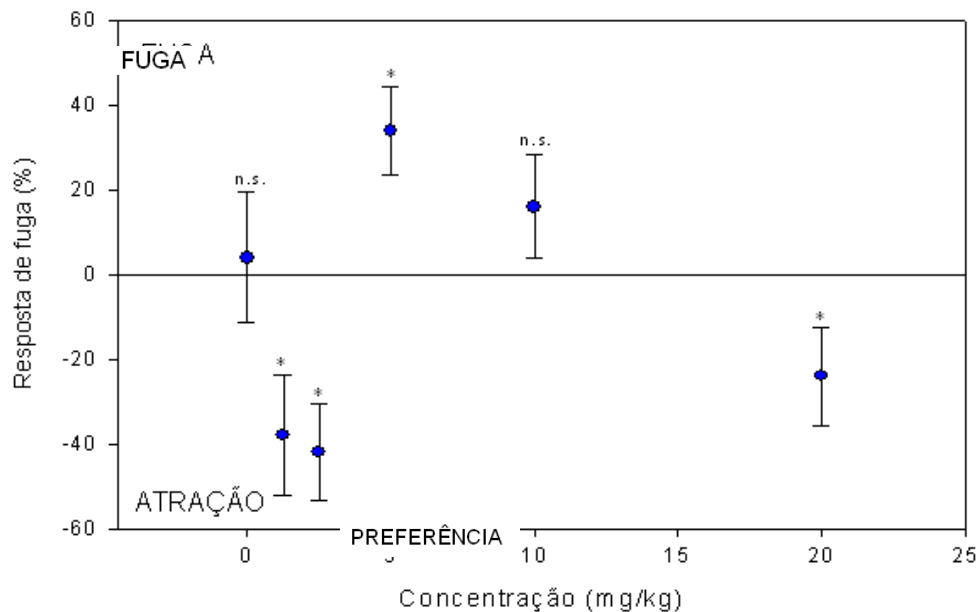


Figura 3.11 – Resposta de fuga ou atração de *E. andrei* às diferentes concentrações de thiametoxam (mg de ingrediente ativo.kg⁻¹ de solo seco) em solo artificial (média de resposta e barras de padrão).

3.6 CONCLUSÕES

1. Apenas o produto comercial com o ingrediente ativo imidacloprid, causa mortalidade em *Eisenia andrei*. Os demais i.a. não apresentam tais efeito nas concentrações limite.
2. Os ingredientes ativos Imidacloprid, fipronil, thiametoxam, captan e carboxin + thiram reduzem o número de juvenis gerados por *E. andrei*.
3. Imidacloprid, thiametoxam, captan e carboxin + thiram promovem repelência de *E. andrei* aos solos contaminados. Fipronil é atraente para esta espécie de minhocas.

3.7 REFERÊNCIAS

- ACDA, M.N. Toxicity of Thiametoxam against Philippine subterranean termites. **Journal of Insect Science**, n. 26, v. 7, 66 p., 2007. Disponível online em: <www.insectscience.org/7.26>.
- ALEXANDER, R.R.; ALEXANDER, M. Bioavailability of genotoxic compounds in soils. **Environmental Science & Technology**, v.34, n.8, p.1589-1593, abr. 2000.
- ANTON, F.; LABORDA, E.; LABORDA, P. Acute Toxicity of the Fungicide Captan to the Earthworm *Eisenia fetida* (Savigny). **Bulletin Environmental of Contamination and Toxicology**, New York, v. 45, p. 82-87, 1990.
- BUFFIN D. Imidacloprid. **Pesticides News**, n. 62, p. 22-23, dez. 2003.
- CADIOLI, M. C. **Aplicação de *Paecilomyces lilacinus* sobre *Folsomia candida* e *Enchytraeus crypticus* e a interação no desenvolvimento de *Meloidogyne paranaensis***. 2010. 123 f. Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.
- CAPOWIEZ, Y. et al. Lethal and sublethal effects of imidacloprid on two earthworm species (*Aporrectodea nocturna* and *Allolobophora icterica*). **Biol. Fertil. Soils**, v. 41, p. 135–143, 2005.
- CAPOWIEZ, Y.; BERARD, A.; Assessment of the effects of imidacloprid on the behavior of two earthworm species (*Aporrectodea nocturna* and *Allolobophora icterica*) using 2D terraria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 198–206, 2006.
- COLINAS, C.; INGHAM, E.; MOLINA, R. Population responses of target and nontarget forest soil organisms to selected biocides. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 41-47, jan. 1994.
- CORTET, J. et al. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. **European Journal of Soil Biology**, França, v. 35, n. 3, p. 115-134, jul./set. 1999.
- CORTET J. et al. Effects of pesticides on organic matter recycling and microarthropods in a maize field : use and discussion of the litter-bag methodology. **European Journal of Soil Biology**, v.38, p. 261-265, 2002.
- COUTINHO, C. F. B. et al. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: ecotoxicol. e meio ambiente**, Curitiba, v. 15, p. 65-72, jan./dez. 2005.
- DANFA, A. Effects of chlorpyrifos and fipronil on soil macrofauna in a Sahelian savanna ecosystem. "pesticides in non-target agricultural environments, environmental and economic implications". **Joint European Southern African International Conference**. Cape Town, South Africa, p.21-23, jan, 2003.

DECOURTYE, A. et al. Ecotoxicity of Neonicotinoid Insecticides to Bees. **Insect Nicotinic Acetylcholine Receptors- Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 683, p. 85-95, 2010.

EC - COMMISSION REGULATION. No 1451/2007 of 4 December 2007 on the second phase of the 10-year work programme referred to in Article 16(2) of Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. **Official Journal**, L 325, dez, 2007, p. 3.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Cuidados básicos para o plantio mecanizado de soja em Rondônia. Dez., 1999. Disponível em <<http://www.cpafrro.embrapa.br/embrapa/infotec/soja.PDF>>, acessado em 20 de dezembro de 2010.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Registration Eligibility Decision for Carboxin, list A case 0012**. EPA 738-R-04-015, Washington, Sep., 2004a. 84p.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Registration Eligibility Decision for Carboxin, list A case 0122**. EPA 738-R-04-012, Washington, Sep., 2004b. 260p.

ESPINOZA-NAVARRO, O.; BUSTOS-OBREGÓN, E. Sublethal doses of malathion alter male reproductive parameters of *Eisenia fetida*. **Int. J. Morphol.**, v.22, n.4, p. 297-302, 2004.

EUROPEAN UNION (EU). **Doc. 397L0057. Council Directive 97/57/EC of 22 September 1997 establishing Annex VI to Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market**. Official Journal L265:0087–109, 1997.

EUROPEAN UNION (EU). **Guidance Document on Terrestrial Ecotoxicology Under Council Directive 91/414/EEC. Draft Working Document. Chapter I – General Introduction 12 SANCO/10329/2002 rev 2 final**. Brussels, Belgium, EU (DG Health and Consumer Protection), 2002.

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

GOMEZ-EYLES, J. L. et al. Measuring and modeling mixture toxicity of imidacloprid and thiacloprid on *Caenorhabditis elegans* and *Eisenia fetida*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 71–79, 2009.

INGHAM, E. R. et al. Reduction of microbial and faunal groups following application of streptomycin and captan in Georgia no-tillage agroecosystems. **Pedobiologia**, v. 35, n. 5, p. 297-304, 1991.

ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION). **ISO-11268-2: Soil quality - Effects of pollutants on earth-worms (*Eisenia fetida*) – Part 2: Method for the determination of effects on reproduction.** Genève, Switzerland, 1998, 36p.

ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION). **ISO 15799:2003: Soil quality -- Guidance on the ecotoxicological characterization of soils and soil materials.** Genève, Switzerland, 2003, 33p.

ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION). **ISO 17512-1: Soil quality -- Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behavior -- Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*).** Genève, Switzerland, 2008a, 25p.

KIDD, H.; JAMES, D. R. **The Agrochemicals Handbook, Third Edition.** Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK, 1991.

KILPATRICK, A. L. et al. Activity of selected neonicotinoids and dicotophos on nontarget arthropods in cotton: Implications in insect management. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, n.3, p. 814-820, jun. 2005.

KREUTZWEISER, D.P. et al. Effects on litter-dwelling earthworms and microbial decomposition of soil-applied imidacloprid for control of wood-boring insects. **Pest Management Science**, v.64, n.2, p.112-118, fev. 2008.

KULA, H.; LARINK, O. Development and standardization of test methods for the prediction of sublethal effects of chemicals on earthworms. **Soil Biol. Biochem.** v. 29, n. 3/4, p. 635-639, 1997.

LUO, Y. et al. Toxicological study of two novel pesticides on earthworm *Eisenia fetida*. **Chemosphere [S.I.]**, v. 39, n. 13, p. 2347-2356, dec., 1999.

MAIENFISCH, P. et al. Chemistry and biology of thiametoxam: a second generation neonicotinoid. **Pest Manag**, v.57, p.906-913, 2001b.

MOSTERT, M.A., SCHOEMAN, A.S., VAN DER MERWE, M. The relative toxicities of insecticides to earthworms of the *Pheretima* group (Oligochaeta). **Pest Management Science**, v.58, n.5, p. 446–450. 2002.

MOSER S. E.; OBRYCKI, J. J.; Non-target effects of neonicotinoid seed treatments; mortality of Coccinellid larvae related to zoophytophagy. **Biological Control**. Lexington, USA, v.51, p. 487–492, set, 2009.

NATIONAL REGISTRATION AUTHORITY (NRA). Agricultural and Veterinary Chemicals. **Evaluation of the new active thiametoxam in the product Cruiser 350FS insecticide seed treatment.** Canberra, Australia, 2001.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guideline for Testing of Chemicals No. 207.** Earthworm Acute Toxicity Test. Paris, 1984, 9p.

PEVELING, R. et al. Impact of locust control on harvester termites and endemic vertebrate predators in Madagascar. **Journal of Applied Ecology** [S.I.], v. 40, n. 4, p. 729-741, aug. 2003.

PIOTROWSKA-SEGET, Z. et al. Successive soil treatment with captan or oxytetracycline affects non-target microorganisms. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** [S.I.], v. 24, n. 12, p. 2843-2848, dec. 2008.

RAVETON, M. et al. Soil distribution of fipronil and its metabolites originating from a seed-coated formulation. **Chemosphere**, v. 69, p. 1124–1129, 2007.

REGISTRATION ELIGIBILITY DECISION (RED). **Captan; EPA-738-R-99-015**; U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Washington, DC, U.S. Government Printing Office, p.2-49, nov. 1999.

REIGART, J. R.; ROBERTS, J. R. Organophosphate Insecticide. Recognition and Management of Pesticide Poisonings, 5th ed.; **EPA 735-R-98-003**; U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances, U.S. Government Printing Office: Washington DC, 1999; p. 45.

REINECKE, S. A.; REINECKE, A. J. Biomarker response and biomass change of earthworms exposed to chlorpyrifos in microcosms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, p. 92–101, 2007.

RÖMBKE, J ; GARCIA, M.V.B. ; SCHEFFCZYK, A. . Effects of the fungicide benomyl on earthworms in laboratory tests under tropical and temperate conditions. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, p. 590-598, 2007.

ROULAND, C. et al. Experimental manipulation of termites (Isoptera, Macrotermitinae) foraging patterns in a Sahelo-Sudanese savanna: effect of litter quality. **Insect. Soc.**, v.50, p.309–316, 2003.

SAN MIGUEL, A. et al. Phenylpyrazoles impact on *Folsomia candida* (Collembola). **Soil Biology & Biochemistry**, v.40, p. 2351–2357, 2008.

STOJANOVIĆ, M.; KARAMAN S.; MILUTINOVIĆ, T. Herbicide and pesticide effects on the earthworm species *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) (Oligochaeta, Lumbricidae). **Archives of Biological Sciences** [S.I.], v. 59, n. 2, p. 25P-26P, 2007.

TINGLE, C. C. D. et al. Health and environmental effects of fipronil. **Pesticide Action Network UK**, briefing AI1, nov. 2000.

TOXICLIN. Ficha de informações de segurança de produto químico - **Vitavax® Thiram 200 SC. FISPQ – AG 05/02**, revisão n. 1, 9p., 2001.

VAN STRAALLEN, N. M. Assessment of soil contamination: a functional perspective. **Biodegradation**, v. 13 p.41–52, 2002a.

WALTERS, D. **Disease control in crops:** biological and environmentally friendly approaches. Edinburgh: Blackwell Publishing Ltd., 2009. 266 p.

WAXMAN, M. F. **Agrochemical and pesticides safety handbook.** Boca Raton: Lewis Publishers, 1998. 1040p.

4 ARTIGO B: AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE AGROTÓXICOS EM *Folsomia candida* (COLLEMBOLA).

4.1 RESUMO E ABSTRACT

Resumo

O objetivo foi avaliar o impacto dos inseticidas imidacloprid, fipronil, thiametoxam, e dos fungicidas captan e carboxin + thiram, utilizados no revestimento de sementes, sobre *Folsomia candida* (Collembola). Para isto foram utilizados testes padronizados internacionalmente (ISO) de ecotoxicidade aguda, crônica e fuga em solo artificial. Entretanto, foi introduzida uma modificação na matéria orgânica do solo artificial OECD, nomeado Solo Artificial Tropical (SAT). Foram observadas mortalidades significativas de *F. candida*, ao fim de 14 dias, para todos os ingredientes ativos avaliados. Considerados tóxicos, imidacloprid e fipronil apresentaram LC₅₀ de 20,96 e 59,62 mg de i.a./kg de solo seco, respectivamente. O inseticida thiametoxam e os fungicidas captan e carboxin + thiram também se mostraram tóxicos nos testes de mortalidade. Após 28 dias de exposição, a reprodução dos colêmbolos foi reduzida por imidacloprid (EC₅₀ de 0,006 mg.kg⁻¹), carboxin + thiram (EC₅₀ 6,09 mg.kg⁻¹) e thiametoxam (EC₅₀ 39,08 mg.kg⁻¹). Entretanto captan e fipronil não afetaram a reprodução destes organismos. Nenhum dos i.a. avaliados no teste de fuga apresentou repelência de *F. candida* no período de 48 horas. Pelo contrário, houve efeito de atração destes artrópodes pelos sítios contaminados. Apesar dos efeitos negativos observados na mortalidade e reprodução dos colêmbolos, deve-se considerar que apenas imidacloprid, no teste de toxicidade crônica, teve efeito significativo em concentrações ≤ às estimadas que sejam expostas ao solo nas recomendações comerciais.

Palavras-chave: Colêmbolos. Tratamento de sementes. Ecotoxicologia. Agrotóxicos.

Abstract

Chemical treatment of seeds is important in start protection of crops. The aim of this study was evaluate the impact of the seed coating with the insecticides Imidacloprid, Fipronil, Thiametoxam, and the fungicides Captan and Carboxin + Thiram on *Folsomia candida* (Collembola). The tests followed the internationally standardized (ISO) to the ecotoxicity acute, chronic and avoidance tests in artificial soil. However with a change in soil organic matter artificial OECD, named Solo Artificial Tropical (SAT). Significant mortalities were found in *F. candida* after 14 days to all active ingredients evaluated. Imidacloprid and Fipronil had LC₅₀ of 20.96 and 59.62 mg a.i. / kg dry soil respectively, so it was considered highly toxic. The insecticide Thiametoxam, it was shown being moderately toxic to mortality and fungicides Captan and Carboxin+ Thiram slightly toxic. After 28 days of exposure, the

reproduction of springtails was greatly reduced by Imidacloprid, with EC_{50} value of 0.006 mg / kg, and moderately by Carboxin + Thiram (EC_{50} 6.09 mg / kg) and Thiametoxam (EC_{50} 39.08 mg / kg). However Captan and Fipronil did not affect the reproduction of these organisms. Any i.a. evaluated in the avoidance test showed repellency of the *F. candida* in 48 hours. Instead of avoidance behavior, there was attraction effect of these arthropods by contaminated sites. Despite the negative effects observed on collembolans mortalities and reproduction, must be considered that just Imidacloprid in chronic test, had a significant effect at concentrations near those commercially recommended. Although field tests are required to prove these statements on the agricultural reality.

Keywords: Colembolans. Seed dressing. Ecotoxicology. Pesticides.

4.2 INTRODUÇÃO

Sementes podem carregar fungos, bactérias e vírus na superfície, e em seu interior, os quais podem causar doenças nas plantas. Além disso, os solos naturalmente apresentam fungos e outros organismos que também podem causar injúrias em sementes e plântulas (MUNKVOLD et al., 2006). Uma vez semeadas, insetos praga podem causar destruição das sementes e de plântulas, em particular, quando as condições do meio estão desfavoráveis à rápida germinação e emergência (PAULSRUD et. al., 2001).

O tratamento químico de sementes é uma prática comum, que visa reduzir perdas no estabelecimento das culturas. Ele se dá pela aplicação de agrotóxicos na superfície da semente, os quais vão servir tanto para reduzir, controlar, quanto para repelir os insetos e outros organismos que atacam as sementes e plântulas. É um método simples, e de menor custo, comparado aos demais. No Brasil, estima-se que 100% das sementes de soja são tratadas com fungicidas e 30% com inseticidas (BAUDET; PESKE, 2006).

Apesar dos benefícios, o aumento do uso destes agrotóxicos pode trazer efeitos negativos. Como é o caso de intoxicações, resíduos nos alimentos, fitotoxicidade em plantas, além de contaminações do solo, água e ar, pelos resíduos deixados no ambiente (DHINGRA, 1985; PAULSRUD et al., 2001; VAN STRAALLEN, 2002b). Preocupa-se com a presença de resíduos de agrotóxicos em solos agrícolas devido ao excessivo uso (VAN STRAALLEN, 2002a), pois estes poluentes podem

influenciar moléculas, tecidos, órgãos, indivíduos, populações e comunidades inteiras (SCHÜRMAN; MARKERT, 1997).

Segundo Fountain e Hopkin, (2005), as atividades antrópicas e a necessidade de controle das emissões de químicos no ambiente têm levado à busca de espécies para testes biológicos. Colêmbolos fazem parte dos ecossistemas do solo, e são vulneráveis aos efeitos da contaminação destes. Apesar da baixa contribuição para biomassa e respiração do solo (COLEMAN et al., 2004; JÄNSCH et al., 2005a), estes artrópodes influenciam significativamente na ecologia microbiana e a fertilidade solo, sendo reguladores dos processos de decomposição e ciclagem de nutrientes (CULIK; ZEPPELINI, 2003). Respostas destes organismos aos produtos químicos em laboratório podem ser usadas para avaliar o estresse (VAN STRAALLEN, 2002b). Neste sentido, diversas espécies têm sido testadas para o uso como indicadores em testes de toxicidade em solos (FOLKER-HANSEN et al., 1996; GREENSLADE; VAUGHAN, 2003) No entanto, a espécie regularmente empregada é *Folsomia candida* (ISO, 1999a; PHILLIPS et al., 2002). O processo de avaliação de impactos no solo tem crescido recentemente, com inúmeros relatos comprovando a sensibilidade de organismos não alvos a contaminantes (CROUAU; MOIA, 2006; SAN MIGUEL et al., 2008; NATAL-DA-LUZ et al., 2009).

Dentre os inseticidas comumente utilizados, imidacloprid já foi avaliado sobre a espécie *Onychiurus armatus* (Collembola) (HEIJBROEK; HUIJBREGTS, 1995), além de existirem estudos com outras espécies desta ordem por Peck (2009). O uso de fipronil no tratamento de sementes também foi investigado por San Miguel et al. (2008) em *F. candida*, além disso, o impacto deste produto sobre colêmbolos foi avaliado por Cortet e Poinot-Balaguer (2000). Entretanto, o inseticida thiametoxam não conta com relatos de danos a colêmbolos, porém, existem algumas descrições sobre efeitos negativos em artrópodes predadores (KILPATRICK et al., 2005; MOSER; OBRYCKI, 2009). Dentre os fungicidas avaliados apenas carboxin + thiram tem relatos de toxicidade sobre colêmbolos (LARINK; SOMMER, 2002). Captan possui apenas descrições de testes com minhocas (ANTON et al., 1990).

Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar a ecotoxicidade aguda, comportamental, e crônica de *F. candida* expostos a agrotóxicos (fungicidas e inseticidas) recomendados para o tratamento químico de sementes. Tais estudos

permitem uma análise básica do risco ambiental, sendo utilizados protocolos padronizados, que permitem uma avaliação inicial dos possíveis impactos.

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Organismos Teste

Para a criação estoque foram utilizados colêmbolos da espécie *F. candida* (Collembola) de origem europeia. A metodologia para a reprodução destes organismos em laboratório foi adaptada da norma ISO 11268-2 (1999a). Em recipientes plásticos (diâmetro, 10,5 x altura 3,5 cm), foi adicionado o substrato de criação, sendo este uma mistura homogênea de carvão ativado, gesso e água deionizada (1:11:7, p/p). Semanalmente os organismos foram alimentados com fermento biológico e a umidade do meio foi corrigida com água deionizada. Os organismos das criações, bem como todos os bioensaios foram mantidos em sala climatizada, com temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e iluminação contínua, com ciclos de claro/escuro de 12h:00h. Para os experimentos foram utilizados indivíduos adultos, sincronizados com idade entre 10 – 12 dias de vida.

4.3.2 Solo Artificial e Contaminantes

O substrato padrão de estudos ecotoxicológicos terrestres é o solo artificial OECD (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 1984), o qual é constituído por uma mistura de 70% de areia industrial (fina), 20% de argila caulinítica, e 10% de turfa (moída e seca). No entanto, neste trabalho, utilizou-se uma versão modificada deste substrato, chamada solo artificial tropical (SAT), o qual teve sua fração de matéria orgânica adequada para disponibilidade de material das regiões tropicais. Neste caso, 10% de pó da casca de coco (seca e peneirada) foram utilizados como substituto à turfa proposta pela OECD (GARCIA, 2004). O material foi misturado, e o pH do SAT foi corrigido para $6 \pm 0,5$ através da adição de CaCO_3 .

Dentre os agrotóxicos avaliados estão os fungicidas Captan® (Captan - 480g de i.a. L⁻¹), e Vitavax® (38.7% de Carboxin + 37.5% de Thiram - 200g de i.a. L⁻¹), os inseticidas Gaucho® (Imidacloprid - 600g de i.a. L⁻¹), Standak® (Fipronil - 250g de i.a. L⁻¹), e Cruiser® (Thiametoxam - 35 g de i.a. L⁻¹).

Todos foram aplicados ao SAT via solução aquosa, imediatamente antes do início dos testes, e agitados até a homogeneização entre a solução e os sólidos. As concentrações foram escolhidas a partir de testes preliminares, e o tratamento controle utilizou apenas água deionizada. As alíquotas de solução contaminada e controle foram aplicadas em volumes determinados para manter a umidade em no máximo 60% da capacidade de retenção de água do solo.

Os valores de pH dos solos já contaminados, foram medidos para todas as concentrações dos tratamentos no início, e no fim dos experimentos, porém estes não foram mais corrigidos após a aplicação dos tóxicos.

De acordo com as recomendações da indústria dos agrotóxicos realizou-se um cálculo estimado das concentrações de cada produto expostas ao solo. Estes foram obtidos a partir do número de sementes por hectare (ha), associado à recomendação do volume de cada produto/kg de semente, assim chegando à quantidade de produto/ha. Considerando um solo de densidade igual a 1, e que as sementes permanecem nas camadas de 0 - 5 cm do solo, obtem-se uma massa de 500.000 kg de solo.ha⁻¹, que pode ser considerada suscetível à contaminação. Desta forma pode-se extrapolar o volume de cada produto ou i.a./kg solo seco (Tabela 4.1)

Fórmula utilizada para o cálculo do número de sementes por hectare:

$$\text{N}^\circ \text{ sementes/ha} = \frac{\text{Q} \cdot (1.000 \cdot \text{P} \cdot \text{D})}{\text{G} \cdot \text{E}}$$

Onde:

Q = quantidade de semente necessária por hectare (kg/ha);

P = peso de 100 sementes em grama (g);

D = n° de plantas que se deseja por metro linear (n°/m);

E = espaçamento utilizado (cm);

G = porcentagem de emergência em campo (%).

Tabela 4.1 – Volume dos agrotóxicos calculados por kg de solo, considerando os 5 primeiros cm do solo, e as recomendações de plantio na cultura da soja.

Produto	Ingrediente ativo (i.a.)	i.a. (%)	mg de i.a./kg solo
			0-5 cm
CAPTAN 480 SC	Captan	48%	0,229
VITAVAX 200 SC	Carboxin + Thiram	20%	0,115
CRUISER 350 FS	Thiametoxam	35%	0,201
STANDAK 250 SC	Fipronil	25%	0,096
GAUCHO 600 FS	Imidacloprid	60%	0,229

4.3.3 Teste de Toxicidade Aguda

Para avaliar o efeito de mortalidade dos agrotóxicos em *F. candida*, foram realizados testes de toxicidade aguda de acordo com a orientação da norma internacional ISO:11267 (ISO, 1999a). Recipientes cilíndricos (diâmetro, 3,5 x altura 11,5 cm) foram preenchidos com 30g de solo artificial (peso úmido), estando o SAT já contaminado com a solução de agrotóxicos, ou com água deionizada (controle), e fechados hermeticamente. No início do biensaio, foram adicionados 10 colêmbolos, com as idades sincronizadas em cada recipiente teste.

Para todas as substâncias testadas foram realizados testes preliminares com as concentrações de 1, 10, 100, 500, e 1000 mg de i.a./kg de solo seco, através dos quais se determinaram cinco novas de concentrações, próximas das que promoveram o efeito negativo. Com as novas concentrações realizou-se o teste definitivo, com cinco repetições por tratamento, totalizando 25 tratamentos e um controle com um número total de 1300 colêmbolos com idade entre 10 – 12 dias para o teste de toxicidade aguda, sendo 250 organismos para a avaliação de cada produto. Nos produtos onde não houve efeito sob a concentração de 1000 mg (teste prévio), foi realizado um teste limite, com concentração única, sendo apenas repetida esta maior dose, também com cinco repetições.

A mortalidade foi avaliada após 14 dias de teste, de forma que os recipientes teste foram esvaziados sob outro reservatório, e estes foram preenchidos com água, para que os organismos vivos flutuassem. Foi adicionada tinta de caneta para aumentar o contraste entre os colêmbolos e o meio, permitindo assim a contagem do número de adultos.

4.3.4 Testes de Toxicidade Crônica

Os bioensaios ecotoxicológicos crônicos com colêmbolos foram realizados de acordo com a orientação da norma internacional ISO: 11267 (ISO, 1999a).

A instalação dos testes foi idêntica ao de toxicidade aguda, diferindo apenas na duração e na avaliação do bioensaio. Semanalmente os recipientes eram abertos para facilitar a aeração, e a umidade do SAT foi corrigida pela diferença de peso.

Os organismos foram alimentados logo no início e após decorridos 14 dias, através da adição de fermento biológico. As concentrações das substâncias misturadas ao SAT basearam-se nas doses subletais obtidas nos testes de toxicidade aguda, tendo este também cinco repetições. Após 28 dias do início do teste, foram determinados o número de juvenis e a mortalidade dos adultos de forma idêntica ao teste de toxicidade aguda, por flutuação dos colêmbolos. No entanto para contabilizar o número de organismos provenientes da geração F₁, fotografou-se em vista superior (alta resolução), para contagem posteriormente com auxílio de um programa computacional.

4.3.5 Testes de Fuga

Avaliações comportamentais foram realizadas a partir do teste de fuga/fuga, seguindo as recomendações do protocolo ISO:11268-2 (ISO, 2008b).

Testes preliminares com as concentrações de 1, 10, 100, e 1000 mg de i.a./kg de solo seco determinaram as faixas doses de cada produto para um experimento definitivo. Com estas determinadas, no teste definitivo cada substância foi testada sob cinco concentrações e cinco repetições por tratamento, totalizando 25 tratamentos e um controle com um número total de 2600 colêmbolos para o teste de fuga, sendo necessários 500 organismos para a avaliação de cada produto.

Em recipientes plásticos circulares foram inseridos anteparos plásticos transversalmente, dividindo estes recipientes ao meio, onde uma seção foi preenchida com 60g de SAT contaminado (peso úmido), e outra o mesmo volume

de SAT isento de tratamento (controle). Em seguida o separador plástico foi removido, e 20 adultos com idade entre 10 – 12 dias de *F. candida* foram colocados sobre a linha de separação entre os dois lados. Os recipientes foram fechados com tampas perfuradas.

Os animais não foram alimentados durante o período do teste. Ao fim do período de 48 horas foi inserido novamente o anteparo plástico na divisão entre os solos, separando cuidadosamente o solo controle do contaminado, e o número de indivíduos em cada seção da caixa foi contado da mesma forma que nos testes de toxicidade aguda. Foi considerado o efeito de fuga para os organismos que desapareceram ou morreram.

4.3.6 Análises dos Dados

As diferenças significativas da comparação entre as médias dos resultados de mortalidade, reprodução e perda de biomassa foram testadas através da ANOVA ($P < 0,05$), sob a aplicação dos métodos de Tukey e/ou Student-Newman-Keuls por meio do software Sisvar® 5.1.

Apenas as médias do teste de fuga foram comparadas por “Fisher exact test” de acordo com Agresti (1992). Análises de probit foram executadas no software PriProbit® 1.63, para se obter as LC_{50} do teste de toxicidade aguda, e EC_{50} do teste de fuga. Regressões não lineares foram feitas com o programa computacional STATISTICA® 7.0 para os EC_{50} dos testes de toxicidade crônica.

Quando não foi possível se obter os valores de EC_{50} , foram utilizados os valores de EC_{20} , bem como os NOEC e LOEC.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Validação dos Testes

De acordo com a norma internacional ISO: 11267 (ISO, 1999a), a mortalidade dos colêmbolos adultos nos controles deve ser $\leq 20\%$ no final do teste, para se considerar um teste de toxicidade aguda como válido. O critério a mortalidade foi cumprido para todos os tratamentos. O critério para validação dos testes de toxicidade crônica de acordo com a diretriz ISO: 11267 (ISO, 1999a), é de que o número de juvenis no controle deve permanecer ≥ 200 indivíduos/tratamento. Para ambos os testes o coeficiente de variação (cv) deve ser $\leq 30\%$.

Em relação aos testes comportamentais, a orientação da ISO:11268-2 (ISO, 2008b) é que para serem considerados válidos, o número de colêmbolos mortos/desaparecidos deve ser $\leq 20\%$ por tratamento, e a distribuição dos organismos no controle, deve estar entre 60% : 40%.

Todos essas determinações foram seguidas, além disso, realizou-se um teste de toxicidade aguda com cinco concentrações e quatro repetições, utilizando parathion como substância referência para teste com colêmbolos, onde se observou o valor LC_{50} de $5,15 \text{ mg.kg}^{-1}$ para a mortalidade de adultos, confirmando que estes artrópodes estavam sensíveis, pois nesta concentração o efeito prejudicial para estes organismos é comprovado (ISO, 1999a).

4.4.2 Resposta Aguda, ou Mortalidade de *F. candida*

Todos os produtos aplicados ao SAT onde os colêmbolos foram expostos, demonstraram efeito significativo (teste $t P < 0,05$) de mortalidade em relação ao controle (Tabela 4.2).

Entretanto apenas os inseticidas imidacloprid e fipronil atingiram níveis de mortalidade suficientes para o cálculo do valor estimado de mortalidade de 50% da população, tendo estes seus LC_{50} de 20,96 e 59,62 mg de i.a./kg de solo seco respectivamente, sendo estas as substâncias químicas que afetaram *F. candida* sob as menores concentrações (Tabela 4.1).

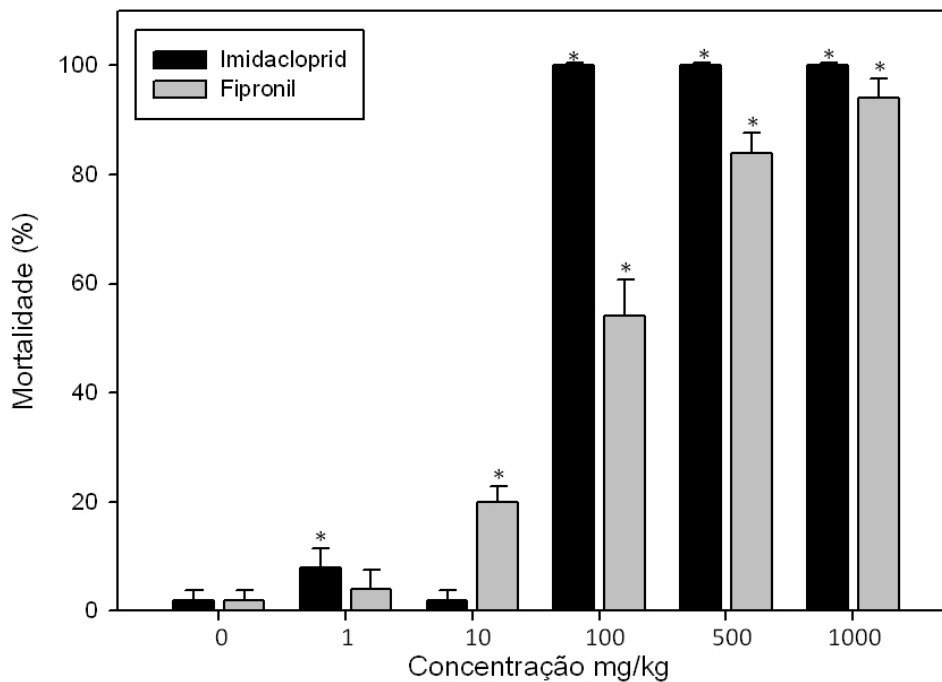


Figura 4.1 – Mortalidade (%) de *F. candida* em solo artificial contaminado com imidacloprid ou fipronil.

4.4.3 Resposta Crônica, na Reprodução de *F. candida*

Todos os adultos de *F. candida* expostos ao confinamento com SAT contaminado se reproduziram. No entanto houveram reduções significativas ($P < 0,05$) do número de juvenis encontrados em três tratamentos, em relação ao controle. Sendo estes, o fungicida carboxin + thiram (Figura 4.2) que apresentou LOEC de 100 mg.kg^{-1} , e os inseticidas Imidacloprid (Figura 4.3) com LOEC de $0,25 \text{ mg.kg}^{-1}$, e thiametoxam (Figura 4.4) que teve a sua menor concentração com efeito de 500 mg.kg^{-1} . Estas também foram as únicas substâncias que atingiram valores satisfatórios para os cálculos da estimação LC_{20} (Tabela 4.2).

O fungicida captan, e o inseticida fipronil não demonstraram efeitos de redução na reprodução dos colêmbolos, visto que para ambos, o valor LOEC foi superior à maior concentração avaliada (1000 mg.kg^{-1}).

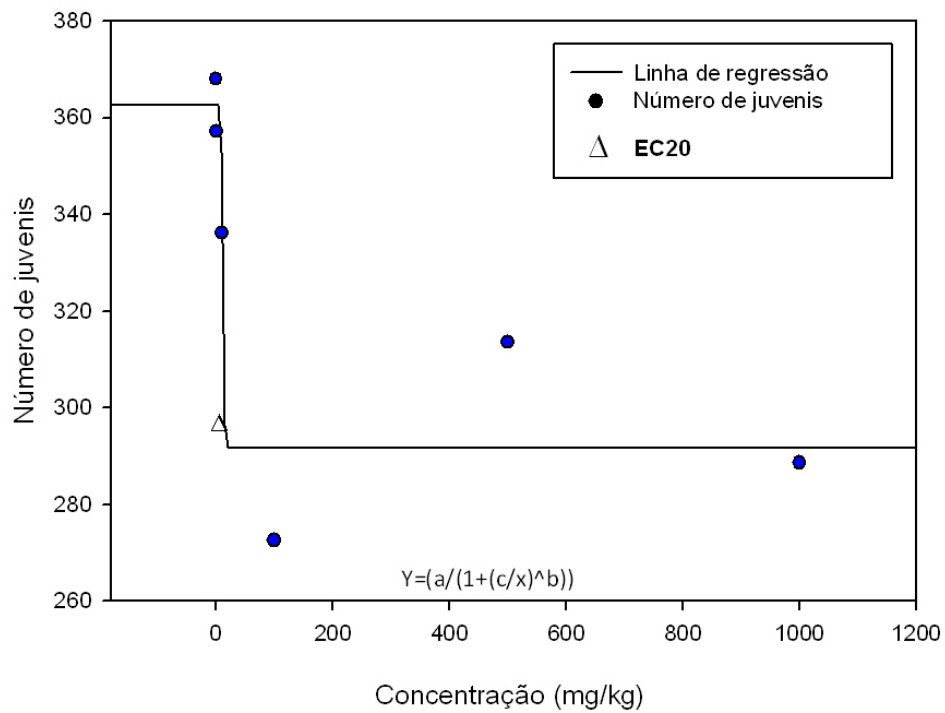


Figura 4.2 – Número de juvenis de *F. candida* encontrados em solo artificial contaminado com carboxin + thiram.

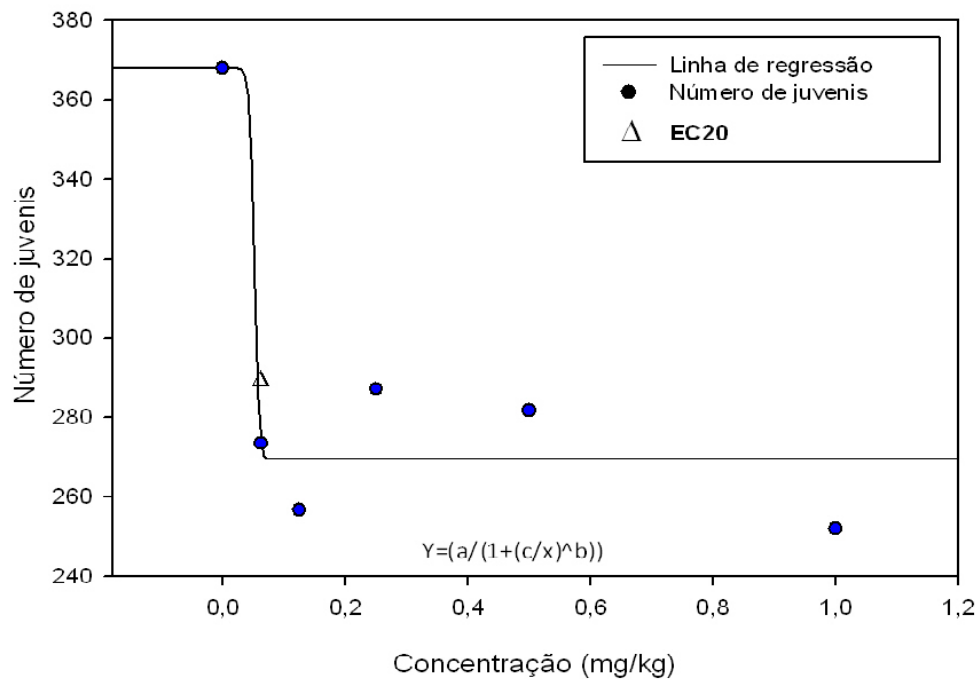


Figura 4.3 – Número de juvenis de *F. candida* encontrados em solo artificial contaminado com imidacloprid.

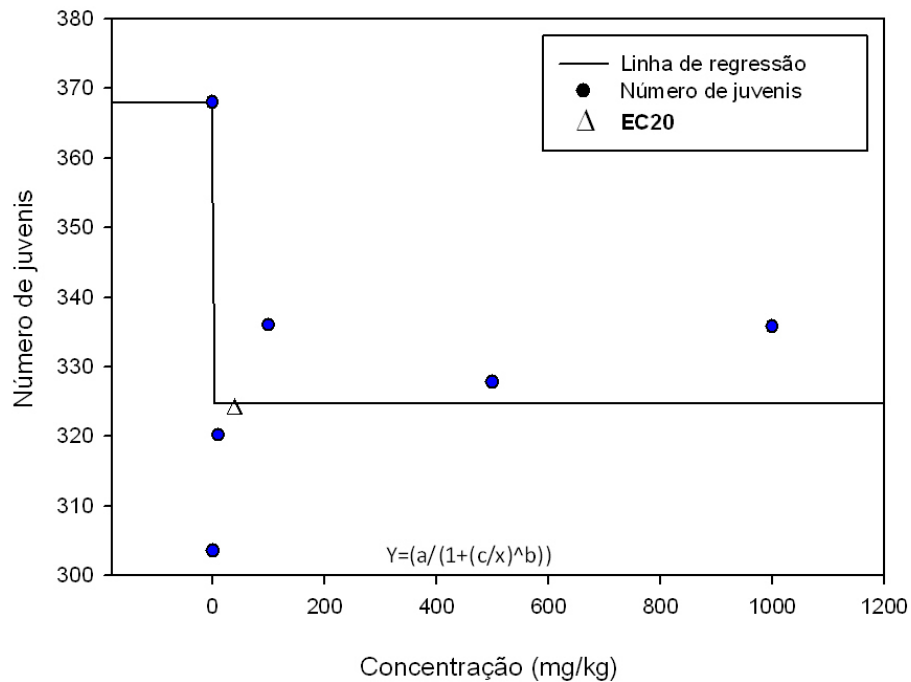


Figura 4.4 – Número de juvenis de *F. candida* encontrados em solo artificial contaminado com Thiametoxam.

4.4.4 Resposta Comportamental ou de Fuga de *F. candida*

O comportamento de fuga dos indivíduos de *F. candida* aos sítios contaminados não foi observado em nenhum dos tratamentos, não havendo diferenças ($P < 0,05$) entre nenhuma concentração testada e o controle. Assim os valores de NOEC foram definidos nas maiores doses avaliadas (Tabela 4.2).

Por outro lado, todas as substâncias demonstraram efeito de atração dos colêmbolos pela seção do recipiente onde estavam os substratos contaminados, sendo este evento observado em todas as concentrações do fungicida carboxin + thiram (Figura 3.4.1), e do inseticida thiametoxam (Figura 3.4.2).

Entretanto, para captan (Figura 4.8), imidacloprid (Figura 4.5) e fipronil (Figura 4.6), verificou-se que com o aumento da concentração, este efeito foi se tornando nulo, e a distribuição dos organismos, dentro do recipiente teste, não demonstrou diferenças.

Tabela 4.2 – Dados de concentração letal (LC50) do teste de toxicidade aguda; concentração estimada (EC50, EC20) dos testes crônico e de fuga; maior concentração testada sem efeito observado (NOEC), e menor dose testada com efeito observado (LOEC) em *F. candida*, expostos aos agrotóxicos utilizados no tratamento químico de sementes (valores em mg de i.a/kg).

Químico	Teste de toxicidade aguda			Teste de toxicidade crônica			Teste de Fuga		
	LC50	NOEC	LOEC	EC20	NOEC	LOEC	EC50	NOEC	LOEC
Captan	>1000	500	1000	>1000	1000	>1000	>50,62	50,62	>50,62
Carboxin+Thiram	>1000	100	500	6,095	10,0	100	>20	20	>20
Imidacloprid	20,96	<1	1	0,006	<0.25	0.25	>5	5	>5
Fipronil	59,62	1	10	>1000	1000	>1000	>10	10	>10
Thiametoxam	>1000	500	1000	39,083	100	500	>50	50	>50

4.5 DISCUSSÃO

4.5.1 Efeitos de Imidacloprid em *F. candida*

Dentre os agrotóxicos avaliados, Imidacloprid foi um dos únicos que promoveu a morte dos colêmbolos que ficaram confinados em SAT contaminado.

O valor da concentração letal de 50% dos adultos no teste de toxicidade aguda foi calculado (Tabela 4.2) e a concentração mais baixa que demonstrou mortalidade significativa ($P < 0,05$) em relação ao controle foi de 1 mg.kg⁻¹. Observou-se que, com valores baixos do produto exposto ao solo, efeitos altamente negativos já podem ser observados para *F. candida*.

Avaliando o efeito do tratamento de sementes com este mesmo i.a., Heijbroek e Huijbregts (1995) observaram que este produto também possui efeito de redução para a espécie *Onychiurus armatus* de colêmbolos. Peck (2009) afirma que houve supressão do número de colêmbolos em solos tratados com imidacloprid.

Em relação a minhocas, Buffin (2003) encontrou uma LC₅₀ entre 2 e 4 mg.kg⁻¹. Foram investigados os efeitos de toxicidade deste químico também para outras classes de bioindicadores do solo, como é o exemplo de isópodes (DROBNE et al., 2008), nematóides (GOMEZ-EYLES et al., 2009), além de organismos aquáticos (PESTANA et al., 2009) incluindo o microcrustáceo *Daphnia magna* (PESTANA et al., 2010; JEMEC et al., 2007).

Uma possível causa para o efeito letal está ligada ao bloqueio dos receptores de acetilcolina no sistema nervoso, este bloqueio leva ao acúmulo deste importante neurotransmissor, resultando em paralisia, podendo levar à morte (KIDD; JAMES, 1991). O número de juvenis provenientes da geração F₁ dos adultos expostos à contaminação foi altamente reduzido na presença de Imidacloprid (Figura 4.3), sendo a EC₂₀ desta substância estimada em 0,006 mg.kg⁻¹. Estes resultados sugerem que, sob concentrações muito baixas, inferiores às recomendadas no tratamento de sementes (Tabela 4.1), a fauna de colêmbolos do solo pode ser reduzida, bem como os processos biológicos promovidos por eles. Esta afirmação pode ser reforçada com o estudo de Kreutzweiser et al. (2009), que afirmam que este produto, sob doses subletais, pode causar efeitos adversos em colêmbolos, e, conseqüentemente, afetar o processo de decomposição da serrapilheira.

Possíveis efeitos diretos na fisiologia dos colêmbolos, como por exemplo, alterações enzimáticas que interferem no metabolismo, também podem ser responsáveis por tais efeitos. Como é o caso da redução da atividade da enzima celulase em minhocas, que chega a causar mortalidade nos animais (LUO et al., 1999). Os mesmos autores afirmam que baixas concentrações aumentaram o número de anomalias na formação dos espermatozoides de minhocas. Estas afirmações podem estar relacionadas aos efeitos de redução na reprodução dos colêmbolos.

Larink e Sommer (2002) observaram efeitos de repelência de colêmbolos e enquitreídeos em solos contaminados com imidacloprid, utilizando a metodologia de “bait lamina” para avaliar a influência do tratamento de sementes com este ingrediente ativo. No presente estudo tal efeito não foi observado. Pelo contrário, houve atração dos colêmbolos os substratos contaminados (Figura 4.5). Capowiez e Berard (2006) avaliaram a fuga de minhocas, e imidacloprid também não demonstrou efeito de repelência (1 mg.kg⁻¹). Talvez pelo fato desses animais, ao invés de promover uma migração das áreas contaminadas, diminuíram a atividade no solo.

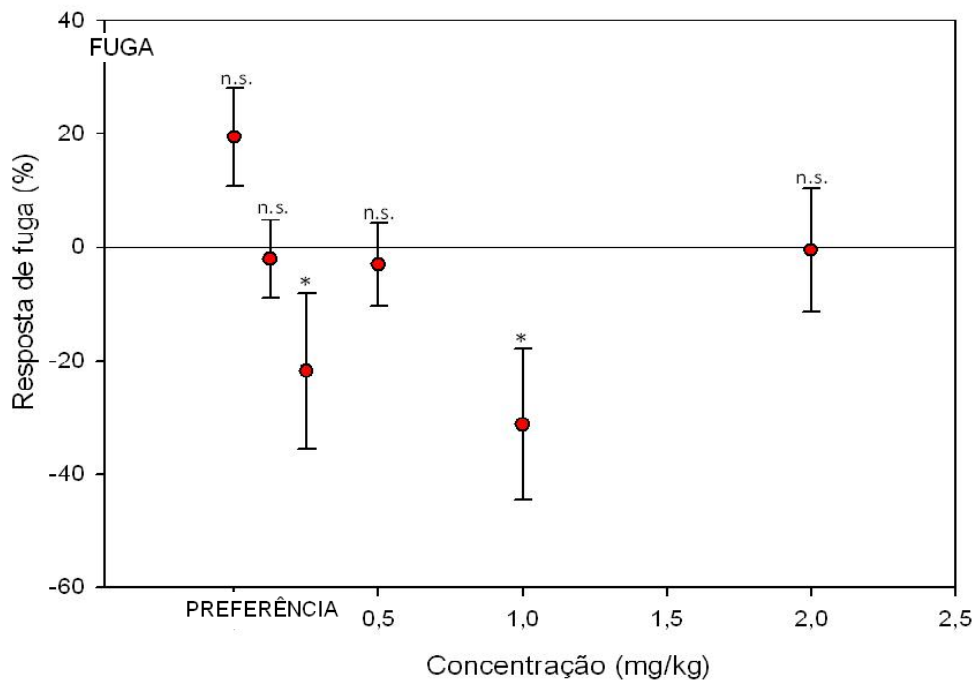


Figura 4.5 – Porcentagem de fuga (+) ou atração (-) de *F. candida* às diferentes concentrações de imidacloprid em solo artificial (média de resposta e barras de erro padrão).

4.5.2 Efeitos de Fipronil em *F. candida*

Fipronil também causou alta mortalidade em colêmbolos (Tabela 4.2), sendo a sua CL_{50} , esta foi estimada em $59,62 \text{ mg.kg}^{-1}$. A CL_{50} deste i.a. também foi determinada por San Miguel et al. (2008), onde em exposição a uma solução aquosa com fipronil durante 96 horas, o valor foi de $379,49 \text{ } \mu\text{g/litro}$.

Cortet et al. (2002) observaram redução na abundância de colêmbolos na aplicação de fipronil no solo, onde relacionados à esta redução, também houve diminuição da decomposição da matéria orgânica. Altas mortalidades também foram observadas em colônias de *Coarctotermes clepsydra* (Isoptera) (PEVELING et al., 2003). Fipronil apresenta-se ativo principalmente por ingestão, onde determina paralisia espástica, morte e eliminação dos insetos sensíveis. Atua no sistema nervoso central do inseto inibindo o receptor do ácido gama aminobutírico (GABA). Trata-se de um neurotransmissor responsável pela regulação da excitabilidade neuronal, prevenindo o estímulo excessivo dos nervos, e

consequentemente a moste (COUTINHO et al., 2005). Não houve redução do número de juvenis de *F. candida* durante o período do teste, visto que na maior concentração testada a média do número de juvenis não diferiu estatisticamente do controle (Tabela 4.2). Contudo, em um estudo semelhante a este, o efeito de fipronil utilizado no tratamento de sementes reduziu a reprodução de *F. candida*. No entanto, isto ocorreu em altas concentrações (SAN MIGUEL et al., 2008).

Nos testes comportamentais foram observados efeitos de atração dos colêmbolos para o sítio contaminado com fipronil (Figura 4.6), ao invés do efeito de fuga esperado. Rouland et al. (2003), porém, observaram a ação de exclusão de cupins em áreas agrícolas tratadas com este inseticida.

Os efeitos visualizados no presente estudo ocorreram em concentrações superiores à aquelas encontradas por Raveton et al. (2007), nas proximidades das sementes. Apesar da toxicidade observada, tais resultados não podem ser extrapolados para a realidade agrícola. Este fato é confirmado por Balança e Visscher (1997), que sob baixas doses deste produto, obtiveram um bom controle de pragas, sem maiores danos aos invertebrados não alvo.

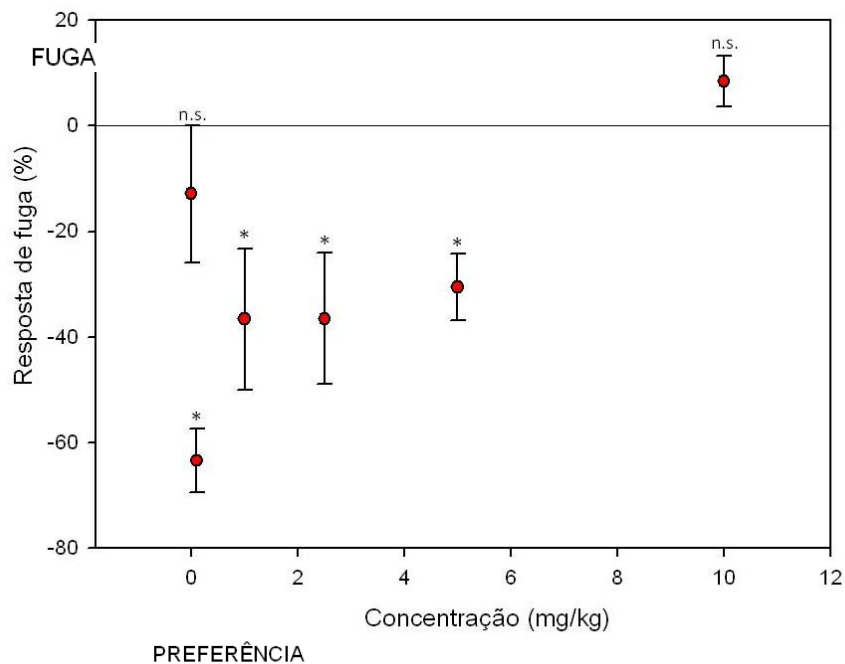


Figura 4.6 – Porcentagem de fuga (+)/atração (-) de *F. candida* às diferentes concentrações de fipronil em solo artificial (média de resposta e barras de erro padrão).

4.5.3 Efeitos de Thiametoxam em *F. candida*

Nos testes de toxicidade aguda com o produto contendo thiametoxam, este foi caracterizado com pouco tóxico a *F. candida*, pois somente foi verificada diferença entre a mais alta concentração testada com o controle (Tabela 4.2). Em solos com a presença deste inseticida também foram observadas mortalidades de cupins (ACDA, 2007) e de artrópodes não alvo, predadores da fauna do solo (KILPATRICK et al., 2005; MOSER; OBRYCKI, 2009).

Tais resultados são atribuídos à atuação de thiametoxam sobre os receptores nicotínicos da acetilcolina dos insetos, onde, o i.a. mimetiza o mensageiro químico acetilcolina, e se liga ao seu sítio receptor, assim prejudicando irreversivelmente o sistema nervoso, e eventualmente levando à morte do inseto (NATIONAL REGISTRATION AUTHORITY, 2001).

Além do efeito agudo observado, thiametoxam demonstrou redução na reprodução de *F. candida*, sendo estimado o valor de 39,08 mg.kg⁻¹ para a redução de 20% do número de juvenis gerados. A reprodução de minhocas também foi afetada por um metabólito chamado CGA 322704, proveniente da transformação de thiametoxam no solo (EC, 2007). Assim este produto pode ser considerado tóxico aos organismos não alvo do solo, em especial colêmbolos (presente estudo), e minhocas (EC, 2007). Porém, de acordo com as recomendações do tratamento químico de sementes, em concentrações \leq às consideradas comerciais thiametoxam não foi tóxico (Tabela 4.1).

Também não foram observados efeitos de fuga, semelhante aos outros inseticidas. Na verdade observou-se atração dos colêmbolos para os substratos contaminados (Figura 4.7), e neste caso, o efeito se manteve com o aumento da concentração. Acda (2007) também não observou efeito de repelência de cupins aos sítios contaminados. No entanto destaca que estes insetos tiveram um comportamento de deterrência, pois houve redução na alimentação dos mesmos.

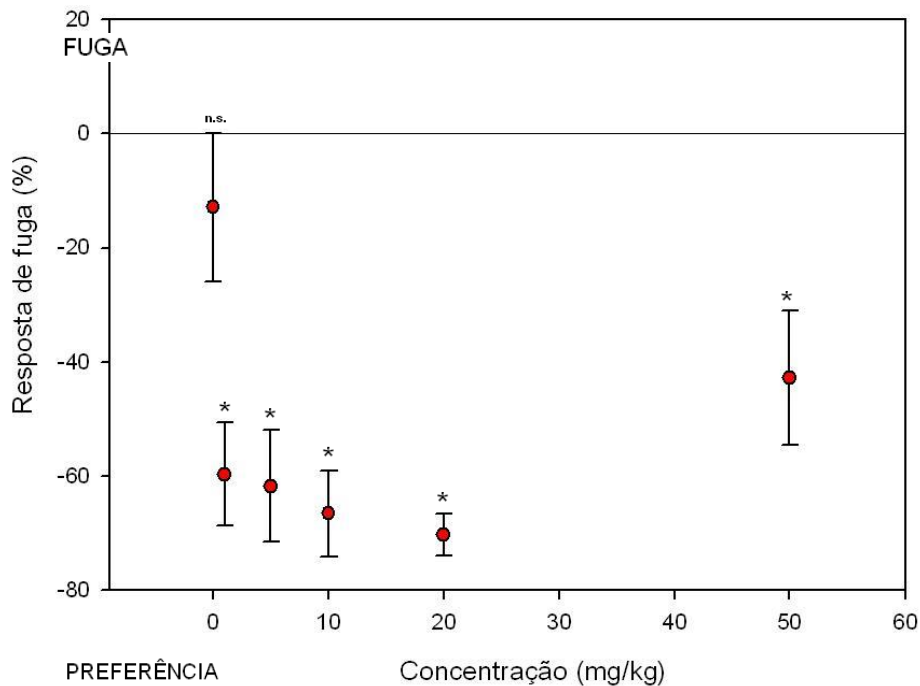


Figura 4.7 – Porcentagem de fuga (+)/atração (-) de *F. candida* às diferentes concentrações de thiametoxam em solo artificial (média de resposta e barras de erro padrão).

4.5.4 Efeitos de Captan em *F. candida*

O fungicida captan, em testes de toxicidade aguda, foi considerado levemente tóxico para *F. candida*, visto que só apresentou efeito significativo ($P < 0,05$) na concentração limite (1000 mg.kg^{-1}), tendo os seus valores de LC_{50} estimados acima deste (Tabela 4.2).

Frampton (2002) verificou que, a longo prazo, houve redução da abundância de colêmbolos em solos agrícolas tratados com fungicidas, verificando inclusive o desaparecimento total de algumas espécies. Estudos com minhocas já foram realizados para captan. No entanto, este fungicida não foi considerado tóxico para a sobrevivência destes oligoquetas (ANTON et al., 1990).

Poucos trabalhos relacionam a toxicidade de captan aos invertebrados do solo. Entretanto, alguns autores já investigaram os efeitos diretos (COLINAS et al., 1994) e indiretos (INGHAM et al., 1991) em nematóides, além de alguns organismos aquáticos (REGISTRATION ELIGIBILITY DECISION, 1999), e micro-organismos não alvo (PIOTROWSKA-SEGET et al., 2008).

Tetrahidroftalimida é o maior metabólito de Captan (REIGART; ROBERTS, 1999), podendo ser o responsável por este fungicida interagir dentro das células com os grupos sulfidríla, amino e hidroxilas de enzimas, provocando assim a inibição de processos metabólicos (WAXMAN, 1998).

Se, para a mortalidade de colêmbolos Captan foi considerado pouco tóxico, os efeitos crônicos não demonstraram nenhuma redução na reprodução dos adultos expostos ao i.a., pois houve diferenças com o controle sob as concentrações mais altas testadas (Tabela 4.2).

Já em relação ao comportamento nos testes de fuga, os colêmbolos foram atraídos para os substratos expostos a concentrações baixas. Porém com o aumento da dose, a resposta foi nula. Todavia, não foi observado efeito de repelência em nenhuma das concentrações avaliadas (Figura 4.8).

A ausência do efeito de crônico, bem como de repelência pode estar associada à alta relação do ingrediente ativo ao carbono da matéria orgânica, onde os efeitos da substância podem ser reduzidos (ALEXANDER; ALEXANDER, 2000).

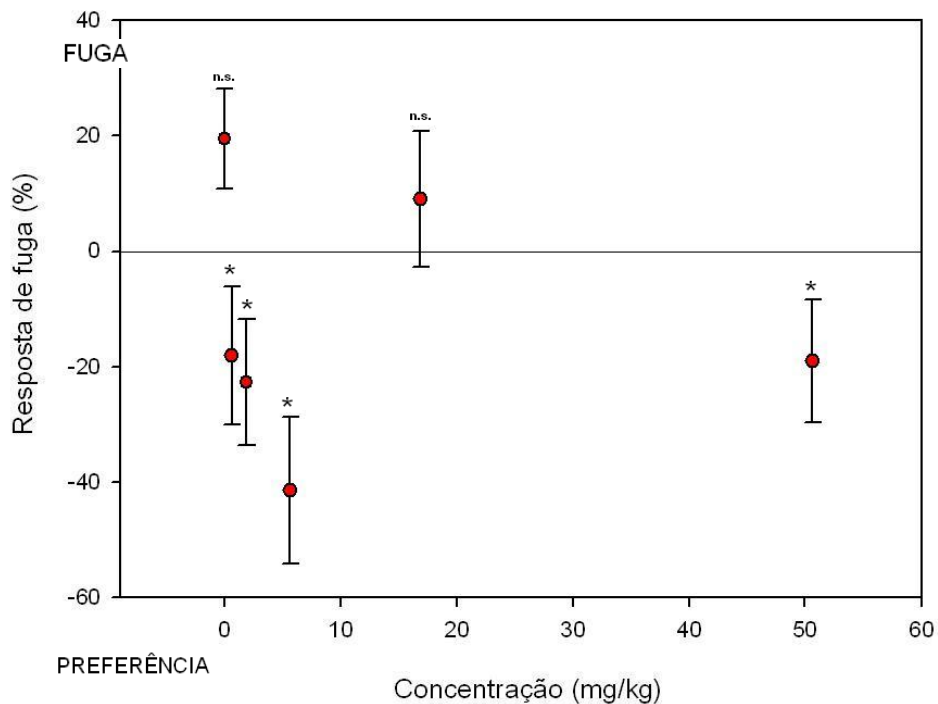


Figura 4.8 – Porcentagem de fuga (+) ou atração (-) de *F. candida* às diferentes concentrações de captan em solo artificial (média de resposta e barras de erro padrão).

4.5.5 Efeitos de Carboxin + Thiram em *F. candida*

Conforme já observado na exposição ao fungicida Captan, os indivíduos da espécie *F. candida* apresentaram mortalidades significativas ($P < 0,05$) quando expostos ao SAT contaminado com carboxin + thiram, sendo o valor mínimo que causou efeito 500 mg.kg^{-1} (Tabela 4.2).

Efeitos de toxicidade aguda com este i.a. também foram observados em abelhas, tendo uma LC_{50} de $2 \mu\text{g/abelha}$ (EPA, 2004a).

Existem estudos nos quais se identificaram os efeitos tóxicos separadamente aos indivíduos aquáticos, como é o caso de *Daphnia magna*, onde Carboxin demonstrou efeito leve, e thiram altamente tóxico, segundo Environmental Protection Agency (2004a,2004b). Pode haver a possibilidade de apenas uma, das duas substâncias contidas neste produto, causarem efeito negativo aos colêmbolos. Porém a concentração na qual se obsevou a toxicidade é muito maior do que os valores calculados para exposição no solo (Tabela 4.1).

Este tipo de constatação já foi feito por Coja et al. (2006), que também avaliaram o efeito letal de agrotóxicos em *F. candida*. Eles determinaram que o valores que causaram efeito negatvo, estavam acima do valor encontrado nos solos, ou seja, não oferecendo riscos.

O número de indivíduos da geração F_1 , descendentes dos adultos de *F. candida* expostos à contaminação deste produto foi reduzido (Figura 4.2), com valores estimados para a redução de 20% de juvenis em $6,095 \text{ mg.kg}^{-1}$. A reprodução destes colêmbolos também já foi altamente afetada na presença de outros agrotóxicos (SAN MIGUEL et al., 2008), sendo estes considerados mais sensíveis do que minhocas e enquitreídeos (LOCK et al., 2001).

Se relacionarmos os valores aqui encontrados, com os vistos por Toxiclin (2001), que afirma que a EC_{50} para organismos do solo é $1178,42 \text{ mg.kg}^{-1}$, mas não refere a espécie avaliada, podemos classificar carboxin + thiram como um fungicida altamente tóxico à *F. candida*. Porém estes valores também são superiores aos da realidade agrônômica (Tabela 4.1).

Não foram observados efeitos de repelência dos colêmbolos aos sítios contaminados com o fungicida carboxin + thiram (Tabela 4.2). Ao invés de fugirem das áreas contaminadas, preferiram permanecer nelas. Larink e Sommer

(2002) avaliando os efeitos do tratamento de sementes com Thiram também não observaram efeito de repelência de colêmbolos, visto que em alguns casos, a atividade de alimentação foi aumentada.

Então, há uma hipótese de que apesar do produto ter a ação de contato, além da sistêmica, estas substâncias podem não apresentar efeitos irritantes, visto que os organismos são afetados nas características de mortalidade e reprodução, porém não evitam as áreas contaminadas com estes tóxicos.

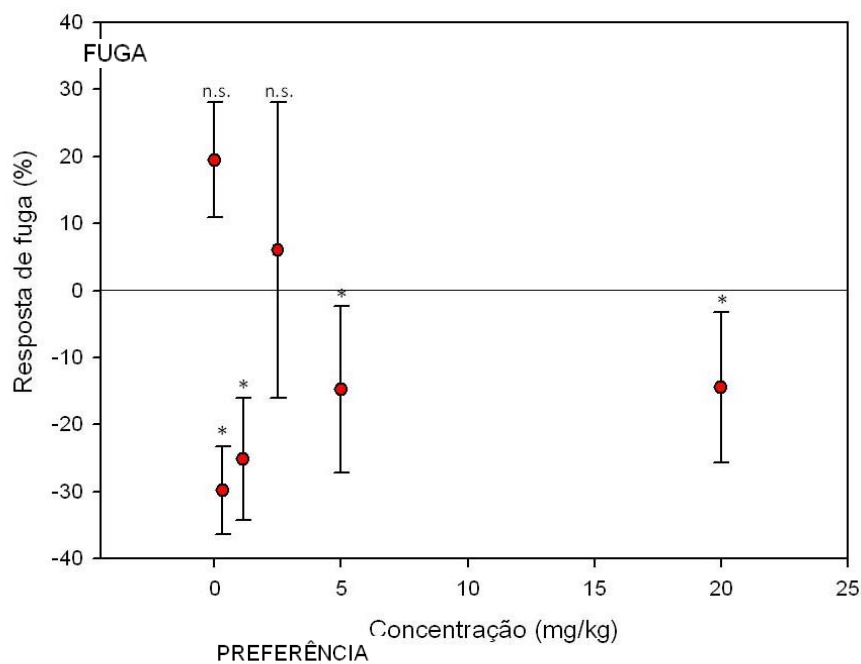


Figura 4.9 – Porcentagem de fuga (+)/atração (-) de *F. candida* às diferentes concentrações de carboxin + thiram em solo artificial (média de resposta e barras de erro padrão).

4.6 CONCLUSÕES

1. Os ingredientes ativos imidacloprid, fipronil, thiametoxam, captan e carboxin + thiram promovem mortalidade em *Folsomia candida*, porém alguns deles apenas em altas concentrações.

2. Carboxin + thiram, imidacloprid e thiametoxam reduzem o número de juvenis gerados por *F. candida* em teste com solo artificial.
3. Nenhum destes i.a promove repelência destes artrópodes aos solos contaminados.

4.7 Referências

ACDA, M. N. Toxicity of Thiametoxam against Philippine subterranean termites. **Journal of Insect Science**, n. 26, v. 7, 66p., 2007. Disponível em: <www.insectscience.org/7.26>.

AGRESTI A. A Survey of Exact Inference for Contingency Tables, **Statistical Science**, v.7, p.131-153, 1992.

ALEXANDER, R.R.; ALEXANDER, M. Bioavailability of genotoxic compounds in soils. **Environmental Science & Technology**, v.34, n.8, p.1589-1593, abril 2000.

ANTON, F.; LABORDA, E.; LABORDA, P. Acute Toxicity of the Fungicide Captan to the Earthworm *Eisenia fetida* (Savigny). **Bulletin Environmental of Contamination and Toxicology**, New York, v.45, p. 82-87, 1990.

BALANÇA, G.; VISSCHER M. N. Effects of very low doses of Fipronil on grasshoppers and non-target insects following field trials for grasshopper control. **Crop Protection**, v. 16, n. 6, p. 553-564, 1997.

BAUDET, L.; PESKE, S. T. A logística do tratamento de sementes. **Seed News**. v.10 n. 1, 2006.

BUFFIN D. Imidacloprid. **Pesticides News**, n. 62, p. 22-23, dez. 2003.

CAPOWIEZ, Y.; BERARD, A.; Assessment of the effects of Imidacloprid on the behavior of two earthworm species (*Aporrectodea nocturna* and *Allolobophora icterica*) using 2D terraria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 198–206, 2006.

COJA, T; IDINGER, J; BLUMEL, S. Effects of the benzoxazolinone BOA, selected degradation products and structure related pesticides on soil organisms. **Ecotoxicology**, v.15, n.1, p.61-72, feb. 2006.

COLEMAN, D. C.; CROSSLEY, D. A.; HENDRIX, P. F. **Fundamentals of Soil Ecology**, 2nd ed. Athens, Georgia: Elsevier Inc., 2004. 502p.

COLINAS, C.; INGHAM, E.; MOLINA, R. Population responses of target and nontarget forest soil organisms to selected biocides. **Soil Biology & Biochemistry**, v.26, n.1, p. 41-47, jan. 1994.

CORTET, J; POINSOT-BALAGUER, N. Impact of phytopharmaceutical products on soil microarthropods in an irrigated maize field: the use of the litter bag method. **Canadian Journal of Soil Science**, v.80, n.2, p.237-249, May., 2000.

CORTET, J. et al. Effects of pesticides on organic matter recycling and microarthropods in a maize field : use and discussion of the litter-bag methodology. **European Journal of Soil Biology**, v.38, p. 261-265. 2002.

COUTINHO, C. F. B. et al. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: ecotoxicol. e meio ambiente**, Curitiba, v. 15, p. 65-72, jan./dez. 2005.

CROUAU, Y.; MOIA, C. The relative sensitivity of growth and reproduction in the springtail, *Folsomia candida*, exposed to xenobiotics in the laboratory: An indicator of soil toxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 115–121, 2006.

CULIK, M. P.; ZEPPELINI, D. Diversity and distribution of Collembola (Arthropoda: Hexapoda) of Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 12, p. 1119–1143, 2003

DHINGRA, O. D. Importância e Perspectivas do Tratamento de Sementes no Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 7, n. 1, p. 133-138. 1985.

DROBNE, D. et al. Toxicity of Imidacloprid to the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). **Chemosphere**, [S.l.], v. 71, n. 7, p. 1326-1334, abr. 2008.

EC - COMMISSION REGULATION. No 1451/2007 of 4 December 2007 on the second phase of the 10-year work programme referred to in Article 16(2) of Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. **Official Journal**, L 325, Dez., 2007, p. 3.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Cuidados básicos para o plantio mecanizado de soja em Rondônia. Dez., 1999. Disponível em <<http://www.cpafrro.embrapa.br/embrapa/infotec/soja.PDF>>, acessado em 20 de dezembro de 2010.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Registration Eligibility Decision for Carboxin, list A case 0012**. EPA 738-R-04-015, Washington, Sep., 2004a. 84p.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Registration Eligibility Decision for Carboxin, list A case 0122**. EPA 738-R-04-012, Washington, Sep., 2004b. 260p.

FOLKER-HANSEN, P.; KROGH, P. H.; HOLMSTRUP, M. Effect of dimethoate on body growth of representatives of the soil living mesofauna. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.33, p. 207–216, 1996.

FOUNTAIN, M.T.; HOPKIN, S. P. *Folsomia candida* (Collembola): A "Standard" Soil Arthropod. **Annu. Rev. Entomol.** v. 50, p.201–22, 2005.

FRAMPTON, G.K. Long-term impacts of an organophosphate-based regime of pesticides on field and field-edge Collembola communities. **Pest Management Science**, v.58, n.10, p.991-1001, oct., 2002.

GOMEZ-EYLES, J. L. et al. Measuring and modeling mixture toxicity of Imidacloprid and thiacloprid on *Caenorhabditis elegans* and *Eisenia fetida*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p. 71–79, 2009

GREENSLADE, P.; VAUGHAN, G. T. A comparison of Collembola species for toxicity testing of Australian soils. **Pedobiologia**, v. 47, p. 171-179, 2003.

HEIJBROEK, W.; HUIJBREGTS, A.W.M. Fungicides and insecticides applied to pelleted sugar-beet seeds .3. Control of insects in soil. **Crop protection**, v.14, n.5, p. 367-373, aug. 1995.

INGHAM, E. R. et al. Reduction of microbial and faunal groups following application of streptomycin and Captan in Georgia no-tillage agroecosystems. **Pedobiologia**, v.35, n.5, p. 297-304, 1991.

ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION). **ISO-11267: Soil Quality - Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants**. Genève, Switzerland, 1999a, 20p.

ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION). **ISO/DIS 17512-2: Soil quality -- Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behavior -- Part 2: Test with collembolans (*Folsomia candida*)**, Genève, Switzerland, 2008b, 13p.

JÄNSCH, S.; AMORIM, M. J.; RÖMBKE, J. Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. **Environ. Rev.**, v.13, p. 51–83, 2005a.

JEMEC, A. et al. Comparative toxicity of Imidacloprid, of its commercial liquid formulation and of diazinon to a non-target arthropod, the microcrustacean *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v.68, p. 1408–1418, 2007.

KIDD, H.; JAMES, D. R. **The agrochemicals handbook**. 3. ed.. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry Information Services, 1991.

KILPATRICK, A. L. et al. Activity of selected neonicotinoids and dicofos on nontarget arthropods in cotton: Implications in insect management. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, n. 3, p. 814-820, jun. 2005.

KREUTZWEISER, D. P.; THOMPSON, D. G.; SCARR, T. A. Imidacloprid in leaves from systemically treated trees may inhibit litter breakdown by non-target invertebrates. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1053–1057, 2009.

- LARINK, O.; SOMMER, R. Influence of coated seeds on soil organisms tested with bait lamina. **European Journal of Soil Biology**, v.38, p.287–290, 2002.
- LOCK, K.; DE SCHAMPHELAERE, K. A. C.; JANSSEN, C. R. The Effect of Lindane on Terrestrial Invertebrates. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v.42, p.217–221, 2002.
- LUO, Y. et al. Toxicological study of two novel pesticides on earthworm *Eisenia fetida*. **Chemosphere** [S.I.], v. 39, n. 13, p. 2347-2356, dec. 1999.
- MOSER S. E.; OBRYCKI, J. J.; Non-target effects of neonicotinoid seed treatments; mortality of Coccinellid larvae related to zoophytophagy. **Biological Control**. Lexington, USA, v.51, p. 487–492, set. 2009.
- MUNKVOLD, G. P.; SWEETS, L.; WINTERSTEEN, W. **Iowa Commercial Pesticide Applicator Manual**. Seed Treatment. Ames, Iowa. Iowa State University, 2006. 35p.
- NATAL-DA-LUZ, T. et al. The use of sewage sludge as soil amendment. The need for an ecotoxicological evaluation. **Journal of Soils and Sediments**, v. 9, n. 3, p. 246-260, 2009.
- NATIONAL REGISTRATION AUTHORITY (NRA). Agricultural and Veterinary Chemicals. **Evaluation of the new active Thiametoxam in the product Cruiser 350FS insecticide seed treatment**. Canberra, Australia, 2001.
- PAULSRUD, B. E. et al. **Oregon pesticide applicator training manual**. Seed Treatment. Urbana, Illinois. University of Illinois Board of Trustees, 2001. 28p.
- PECK, D. C. Long-term effects of Imidacloprid on the abundance of surface- and soil-active nontarget fauna in turf. **Agricultural and Forest Entomology**, v.11, p. 405–419, 2009.
- PESTANA, J. L. T. et al. Structural and functional responses of benthic invertebrates to Imidacloprid in outdoor stream mesocosms. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 2328–2334, 2009.
- PESTANA, J. L. T. et al. Pesticide exposure and inducible antipredator responses in the zooplankton grazer, *Daphnia magna* Straus. **Chemosphere**, v.78, p. 241–248, 2010.
- PEVELING, R. et al. Impact of locust control on harvester termites and endemic vertebrate predators in Madagascar. **Journal of Applied Ecology** [S.I.], v. 40, n. 4, p. 729-741, aug, 2003.
- PHILLIPS, C. T.; KUPERMAN, R. G.; CHECKAI, R. T. Toxicity of chemical-warfare agent HD to *Folsomia candida* in different soil types. **Eur. J. Soil Biol.**, V.38, p. 281–285, 2002.

PIOTROWSKA-SEGET, Z. et al. Successive soil treatment with Captan or oxytetracycline affects non-target microorganisms. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** [S.l.], v. 24, n. 12, p. 2843-2848, dec., 2008.

RAVETON, M. et al. Soil distribution of Fipronil and its metabolites originating from a seed-coated formulation. **Chemosphere**, v.69, p.1124–1129, 2007.

REGISTRATION ELIGIBILITY DECISION - RED. **Captan; EPA-738-R-99-015**; U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Washington, DC, U.S. Government Printing Office, p.2-49, nov. 1999.

REIGART, J. R.; ROBERTS, J. R. Organophosphate Insecticide. Recognition and Management of Pesticide Poisonings, 5th ed.; **EPA 735-R-98-003**; U.S. Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides, and Toxic Substances, U.S. Government Printing Office: Washington DC, 1999; p. 45.

ROULAND, C. et al. Experimental manipulation of termites (Isoptera, Macrotermitinae) foraging patterns in a Sahelo-Sudanese savanna: effect of litter quality. **Insect. Soc.**, v.50, p.309–316, 2003.

SAN MIGUEL, A. et al. Phenylpyrazoles impact on *Folsomia candida* (Collembola). **Soil Biology & Biochemistry**, v.40, p. 2351–2357, 2008.

SCHÜÜRMAN, G.; MARKERT, B. **Ecotoxicology : ecological fundamentals, chemical exposure, and biological effects**. New York, J. Wiley, 1997, 900p.

TOXICLIN. Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico - **Vitavax® Thiram 200 SC. FISPQ – AG 05/02**, revisão n. 1, 9p., 2001.

VAN STRAALLEN, N. M. Assessment of soil contamination – a functional perspective. **Biodegradation**, v. 13, p.41–52, 2002a.

VAN STRAALLEN, N.M. Theory of ecological risk assessment based on species sensitivity distributions. In: **Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology**. (Ed.) Posthuma, L.; Suter G. W.; Traas, T. P. CRC Press 2002, p. 37–48, 2002b.

WAXMAN, M. F. **Agrochemical and Pesticides Safety Handbook**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1998. 1040p.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O tratamento químico de sementes é uma ótima alternativa para o controle de pragas e patógenos no início da cultura, podendo ser mais eficiente, bem como economicamente vantajoso, em relação aos demais métodos. Entretanto, o constante uso destes agrotóxicos em várias culturas expõe o solo, bem como sua fauna aos impactos destes produtos. Estes manejos utilizados na agricultura moderna são realizados anualmente, incluindo casos em que várias vezes durante o ano estes tóxicos são depositados na superfície dos solos. Alguns impactos na fauna edáfica benéfica, causados por fungicidas e inseticidas, foram observados neste estudo, demonstrando efeitos de mortalidade, redução da taxa de reprodução, e comportamento de fuga. Porém, a extrapolação destes dados para os efeitos que ocorrem na natureza deve levar em consideração vários fatores, visto que os testes do presente estudo ocorrem sob condições controladas, solo artificial, e organismos padrão. Sabendo-se que as minhocas alimentam-se da matéria orgânica do solo, e que os contaminantes ficam em contato com esta, fica evidente que além da exposição dérmica, ocorre a exposição por ingestão. Este fato leva a crer que a quantidade de matéria orgânica dos solos é um dos fatores que implicam nos resultados dos testes. Além disso, as condições climáticas podem influenciar no período de decomposição da matéria orgânica do solo, bem como na degradação dos químicos, através das alterações térmicas, luminosidade, pluviosidade, dentre outro fatores que não aparecem em câmaras climáticas. Além destas variáveis, ainda se observa que espécies diferentes respondem de formas distintas aos contaminantes, pois apresentam mais ou menos suscetibilidade aos mecanismos de ação dos agrotóxicos. Assim se fazem necessários, para clareza dos efeitos no campo, testes em solos naturais, com organismos nativos e, se possível, nas condições ambientais naturais.

6 CONCLUSÕES GERAIS

1. Apenas o ingrediente ativo imidacloprid causou efeitos nos testes de toxicidade aguda, crônica e de fuga para *Eisenia andrei* e *Folsomia candida*, inclusive efeitos em concentrações mesmo abaixo das comercialmente estimadas. Os demais produtos não apresentam tais efeitos nas concentrações inferiores às encontradas na agricultura.

2. Os ingredientes ativos imidacloprid, thiametoxam e carboxin + thiram demonstraram redução significativa do número de juvenis gerados por *E. andrei* e *F. candida*.

3. Com exceção do i.a. fipronil, todos os demais promovem repelência de *E. andrei* aos solos contaminados. Porém, em *F. candida*, nenhum dos produtos causa fuga.

4. Apesar dos efeitos negativos observados, deve-se considerar que apenas imidacloprid teve efeito significativo em concentrações iguais ou inferiores às que são comercialmente recomendadas para o tratamento químico de sementes. Para confirmar estes efeitos na realidade agrícola, são necessários testes a campo.

REFERÊNCIAS

ACHAZI, R. K.; CHROSZCZ, G.; MIERKE, W. Standardization of test methods with terrestrial invertebrates for assessing remediation procedures for contaminated soils. **Eco-Inforna**, v.12, p.284–89, 1997.

ACL, S. M. **The Ecology of Soil Decomposition**. London, UK., CAB International, 2003. 350p.

AMORIM, M. J. et al. Avoidance test with *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae): Effects of different exposure time and soil properties. **Environmental Pollution**, v.155, p. 112 – 116, 2008a.

AMORIM, M. J. et al. *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae): a test organism in a standardised avoidance test? Effects of different chemical substances. **Environment International**, v. 34, p. 363–371, 2008b.

ANDERSON, J. M. Inter- and intrahabitat relationships between wood and Cryptostigmata species diversity and diversity of soil and litter micro-habitats. **Oecologia**, v. 32, p. 341–348, 1978.

ANDRÉ, F. Contribution a l'analyse experimentale de la reproduction des lombriciens. **Bull. Biol. Fr. Belg.**, v.81, p.1–101, 1963.

ANTON, F.; LABORDA, E.; LABORDA, P. Acute Toxicity of the Fungicide Captan to the Earthworm *Eisenia fetida* (Savigny). **Bulletin Environmental of Contamination and Toxicology**, New York, v.45, p. 82-87, 1990.

ÁVILA, C. J. Efeito de inseticidas aplicados nas sementes de soja, na presença do coró *Phyllophaga cuyabana* (Coleoptera: melolonthidae). In: REUNIÃO SUL - BRASILEIRA DE PRAGAS DE SOLO, 9., 2005, Camboriu, SC. **Anais e Ata**. Itajaí: EPAGRI, 2005. v. 1, p. 126-128.

AZENHA, A. C. Tratamento de sementes forrageiras. **Revista Sementes JC Maschietto**, Penápolis, n. 1, p. 9-11, 2003.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos – SP: Rima, 2003. 340p.

BACEY, J. Environmental Fate of Imidacloprid in Environmental Monitoring & Pest Management Branch, **Dept. Pest. Reg.**, Sacramento, CA, 2001, p.18. Disponível em: <<http://www.cdpr.ca.gov/docs/emprm/pubs/fatememo/imid.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2010.

BALANÇA, G.; VISSCHER M. N. Effects of very low doses of fipronil on grasshoppers and non-target insects following field trials for grasshopper control. **Crop Protection**, v. 16, n. 6, p. 553-564, 1997.

BARBOSA, F. R. et al. Efeito do controle químico da mosca-branca na incidência do vírus-do-mosaico-dourado e na produtividade do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, p. 879-883, 2002.

BARBEE, G. C.; STOUT, M.J. Comparative acute toxicity of neonicotinoid and pyrethroid insecticides to non-target crayfish (*Procambarus clarkii*) associated with rice-crayfish crop rotations. **Pest Management Science**, v.65, n.11, p. 1250-1256, nov. 2009.

BARETTA, D. et al. Colêmbolos (Hexapoda: Collembola) como bioindicadores de qualidade do solo em áreas com Araucária angustifolia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 2693-2699, 2008.

BAUDET, L.; PESKE, S. T. A logística do tratamento de sementes. **Seed News**. v.10 n. 1, 2006.

BLAIR, J.M., P.J. BOHLEN; D.W. FRECKMAN. Soil invertebrates as indicators of soil quality. In: Methods for Assessing Soil Quality, Doran, J.W.; Jones, A.J., Eds., **Soil Science Society of America Special Publication**, Madison, WI, v. 49, p. 273–291, 1996.

BOARETTO, M. A. C.; FORTI, L. C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série Técnica IPEF**, v. 11, n. 30, p. 31-46, 1997.

BOUCHÉ, M.B. **Lombriciens de France**: ecologie et systematique. Paris: INRA, 1972. p. 671.

BROWN, G. G. How do earthworms affect microfloral and faunal community diversity? **Plant and Soil**, v.170, p.209-231, 1995.

BROWN, G.G.; DOUBE, B.M. Functional interactions between earthworms, microorganisms, organic matter, and plants. In: EDWARDS, C.A. (Ed.). **Earthworm Ecology**. Boca Raton: CRC Press, 2004a. p.213-239.

BROWN, G.G. et al. **Biodiversidade das minhocas no estado de São Paulo, Brasil**. In: FERTBIO 2004, Lages: SBCS, 2004b.

BROWN JÚNIOR, K. S. Insetos como rápidos e sensíveis indicadores de uso sustentável de recursos naturais. In: **Indicadores ambientais**. Sorocaba: PUCC/Shell, 1997. p.143-155.

BUFFIN D. Imidacloprid. **Pesticides News**, n. 62, p. 22-23,dez. 2003.

CADIOLI, M. C. **Aplicação de *Paecilomyces lilacinus* sobre *Folsomia candida* e *Enchytraeus crypticus* e a interação no desenvolvimento de *Meloidogyne paranaensis***. 2010. 123 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

CAPOWIEZ, Y.; BERARD, A.; Assessment of the effects of imidacloprid on the behavior of two earthworm species (*Aporrectodea nocturna* and *Allolobophora icterica*) using 2D terraria. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 198–206, 2006.

CASTELLANOS, L. R.; HERNANDEZ J. C. S. Earthworm biomarkers of pesticide contamination: current status and perspectives. **Journal of Pesticide Science** [S.l.], v. 32, n. 4, p. 360-371, 2007.

CCME. Canadian Water Quality Guidelines : Imidacloprid. **Scientific Supporting Document**. Winnipeg, Canadian Council of Ministers of the Environment, 2007.

CECCON, G. et al. Efeito de inseticidas na semeadura sobre pragas iniciais e produtividade de milho safrinha em plantio direto. **Bragantia**, Campinas, v. 63, n. 2, p. 227-237, 2004.

COLEMAN, D. C.; CROSSLEY, D. A.; HENDRIX, P. F. **Fundamentals of Soil Ecology**. 2. ed. Athens, Georgia: Elsevier Inc., 2004. 502 p.

COLINAS, C.; INGHAM, E.; MOLINA, R. Population responses of target and nontarget forest soil organisms to selected biocides. **Soil Biology & Biochemistry**, v.26, n.1, p. 41-47, jan. 1994.

CONNELL, D. et al. **Introduction to Ecotoxicology**: an introduction to electronic and ionic materials. Blackwell Publishing Ltd., 1999. v. 4, 170p.

CORTET, J. et al. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. **European Journal of Soil Biology**, França, v.35, n. 3, p. 115-134, jul./set. 1999.

CORTET, J. et al. Effects of pesticides on organic matter recycling and microarthropods in a maize field : use and discussion of the litter-bag methodology. **European Journal of Soil Biology**, v. 38, p. 261-265. 2002.

COUTINHO, C. F. B. et al. Pesticidas: Mecanismo de Ação, Degradação e Toxidez. **Pesticidas: ecotoxicol. e meio ambiente**, Curitiba, v. 15, p. 65-72, jan./dez. 2005.

CROUAU, Y.; GISCLARD, C.; PEROTTI, P. The use of *Folsomia candida* (Collembola, Isotomidae) in bioassays of waste. **Applied Soil Ecology**, v.19, p.65–70, 2002.

CROUAU, Y.; MOIA, C. The relative sensitivity of growth and reproduction in the springtail, *Folsomia candida*, exposed to xenobiotics in the laboratory: an indicator of soil toxicity. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 64, p. 115–121, 2006.

CULIK M.P., DE SOUZA J.L.; VENTURA J.A. Collembola (Arthropoda: Hexapoda) biodiversity in tropical agricultural environments of Espírito Santo, Brazil. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENTOMOLOGY,21., 2000, Foz do Iguaçu. **Abstracts...**Londrina: Embrapa Soja, 2000. v. I, p.122.

CULIK, M. P.; ZEPPELINI, D. Diversity and distribution of Collembola (Arthropoda: Hexapoda) of Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 12, p. 1119–1143, 2003

DANFA, A. et al. Effects of chlorpyrifos and fipronil on soil macrofauna in a Sahelian savanna ecosystem. "pesticides in non-target agricultural environments, environmental and economic implications". **Joint European Southern African International Conference**. Cape Town, South Africa, p.21-23, jan. 2003.

DELAPLANE, K.S. Pesticide Usage in the United States: History, Benefits, Risks, and Trends. **Bulletin 1121**, Cooperative Extension Service, The University of Georgia College of Agricultural and Environmental Sciences, nov. 2000.

DHINGRA, O. D. Importância e perspectivas do tratamento de sementes no Brasil. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 7, n. 1, p. 133-138. 1985.

DIDDEN, W.; RÖMBKE, J. Enchytraeids as Indicator Organisms for Chemical Stress in Terrestrial Ecosystems. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.50, p. 25-43, 2001.

DOUBE, B.M.; SCHMIDT, O. Can the abundance or activity of soil macrofauna be used to indicate the biological health of soils. In: PANKHURST, C.E.; DOUBE B.M.; GUPTA, (Ed.) **Biological Indicators of Soil Health**. Wallingford: CAB International, 1997. p. 265-296.

DROBNE, D. et al. Toxicity of imidacloprid to the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). **Chemosphere** [S.I.], v. 71, n. 7, p. 1326-1334, apr. 2008.

EC - COMMISSION REGULATION. No 1451/2007 of 4 December 2007 on the second phase of the 10-year work programme referred to in Article 16(2) of Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. **Official Journal**, L 325, Dez., 2007, p. 3.

EDWARDS, C. A. Impact of herbicides of soil ecosystems. **Critical Rev. Plant Sci.**, v. 8, p. 221-257, 1989.

EDWARDS, C. A. et al. Essential criteria for selecting bioindicator species, processes, or systems to assess the environmental impact of chemicals on soil ecosystems. In: VAN STRAALLEN, N.M.; KRIVOLUTSKY, D.A. (Ed.). **Bioindicator systems for soil pollution**. Dordrecht: Kluwer, 1995. p.67-84.

EDWARDS, C. A. **Earthworm Ecology**. Boca Raton: CRC Press LLC., 2004. v. 3, 438 p.

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

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Cuidados básicos para o plantio mecanizado de soja em Rondônia**. 1999. Disponível em <<http://www.cpafr.embrapa.br/embrapa/infotec/soja.PDF>>. Acesso em: 20 dez. 2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Tratamento de sementes visando o controle de pragas que atacam o arroz na fase inicial da cultura . **Circular Técnica**, n.54, 2002b.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Documentos online**, N. 12 (parte 25), 2002a. Disponível em: <http://www.cnpt.embrapa.br/biblio/p_do12.htm/>. Acesso em: 28 abr. 2009.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Registration Eligibility Decision for Carboxin, list A case 0012**. EPA 738-R-04-015, Washington, Sep., 2004a. 84p.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Registration Eligibility Decision for Carboxin, list A case 0122**. EPA 738-R-04-012, Washington, Sep., 2004b. 260p.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA).. **Registration Review Case No. 7605 PC Code 129099. Imidacloprid Summary Document Registration Review: Initial Docket**, Dez., 2008, 13p. Disponível em: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/registration_review/imidacloprid/>. Acesso em: 20 set. 2010.

ESPINOZA-NAVARRO, O.; BUSTOS-OBREGÓN, E. Sublethal doses of malathion alter male reproductive parameters of *Eisenia fetida*. **Int. J. Morphol.**, v.22, n.4, p. 297-302, 2004.

EUROPEAN UNION (EU). **Doc. 397L0057. Council Directive 97/57/EC of 22 September 1997 establishing Annex VI to Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market**. Official Journal L265:0087–109, 1997.

EUROPEAN UNION (EU). **Guidance Document on Terrestrial Ecotoxicology Under Council Directive 91/414/EEC. Draft Working Document. Chapter I – General Introduction 12 SANCO/10329/2002 rev 2 final**. Brussels, Belgium, EU (DG Health and Consumer Protection), 2002.

EVERTS, J. W. et al. Side-effects of pesticides on ground-dwelling predatory arthropods in arable ecosystems. **Environmental Pollution**, v.59, p.203-225, 1989.

EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK (EXTOXNET). **Pesticide Information Profiles, Imidacloprid**, Oregon State University, 1996a. Disponível em: <<http://extoxnet.orst.edu/pips/imidaclo.htm>>. Acesso em: 10 ago. 2010.

EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK (EXTOXNET). **Pesticide Information Profiles, Captan**, Oregon State University, 1996b. Disponível em: <<http://extoxnet.orst.edu/pips/captan.htm>>. Acesso em: 10 ago. 2010.

FILSER, J.; WITTMANN, R.; LANG, A. Response types in Collembola towards copper in the microenvironment. **Environmental Pollution**, v.107, p. 71-78, 2000.

FILSER, J. The role of Collembola in carbon and nitrogen cycling in soil. **Pedobiologia**, v.46, p. 234–245, 2002.

FOLKER-HANSEN, P.; KROGH, P. H.; HOLMSTRUP, M. Effect of dimethoate on body growth of representatives of the soil living mesofauna. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.33, p. 207–216, 1996.

FÖRSTER, B. et al. Effects of carbendazim and lambda-cyhalothrin on soil invertebrates and leaf litter decomposition in semi-field and field tests under tropical conditions (Amazonia, Brazil). **European Journal of Soil Biology**, v.42, p. 171–179, jul., 2006.

FOUNTAIN, M.T.; HOPKIN, S. P. Continuous Monitoring of *Folsomia candida* (Insecta: Collembola) in a Metal Exposure Test. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 48, p. 275-286, 2001.

FOUNTAIN, M.T.; HOPKIN, S. P. *Folsomia candida* (Collembola): A “Standard” Soil Arthropod. **Annu. Rev. Entomol.** v.50, p.201–22, 2005.

FRAGOSO, C. et al. A survey of tropical earthworms: taxonomy, biogeography and environmental plasticity. In: LAVELLE, P.; BRUSSAARD, L.; HENDRIX, P. (Ed.). **Earthworm management in tropical agroecosystems**. Wallingford: CABI, 1999. P. 1-26.

FRAZIER, M.J. et al. Management of silver scurf (*Helminthosporium solani*) with fungicide seed treatments and storage practices. **American Journal of Potato Research**, v.75, n.3, p.129 -135, maio./jun. 1998.

GARCIA, M.V., Effects of pesticides on soil fauna: development of ecotoxicological test methods for tropical regions. **Ecology and Development Series**, n. 19, Zentrum für Entwicklungsforschung. University of Bonn, Germany, 281 p., 2004.

GARCIA, M. V. B. et al. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. **Environmental Pollution**, v. 153, n. 2, p. 450-456, maio 2008.

GIESLER, L. J.; ZIEMS, A. D.; Seed treatment fungicides for soybeans. **Plant Diseases Field Crops**. Nebraska-Lincoln, 2008.

GOULART, A. C. P. Eficiência de três fungicidas no tratamento de sementes de trigo (*Triticum aestivum*) visando o controle do fungo *Helminthosporium sativum* p.k. & b., em condições de laboratório. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 10, n. 1, p. 55-61, 1988.

GOULART, A. C. P. Tratamento de sementes de milho (*Zea mays L.*) com fungicidas. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 15, n.2, p. 165-169, 1993.

GOULART, A. C. P. Incidência e controle químico de fungos em sementes de soja em alguns municípios de Mato Grosso do Sul. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v.25, n.6, p.1467-1473, nov./dez., 2001.

GOULART, A. C. P. Efeito do tratamento de sementes de algodoeiro com fungicidas no controle do tombamento em relação á densidade de inoculo de *R. solani*. **Summa Phytopathologica**, v. 32, p. 360-366, 2006.

GREENSLADE, P.; VAUGHAN, G. T. A comparison of Collembola species for toxicity testing of Australian soils. **Pedobiologia**, v. 47, p. 171-179, 2003.

GRUTZMACHER, A. D. et al. Chemical control of *Oryzophagus oryzae* (Costa Lima, 1936) (Coleoptera: Curculionidae) on flooded rice by seed treatment. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas-RS, v. 9, n. 4, p. 379-382, 2003.

GULAN, P. J.; CRANSTON, P.S. **The Insects. An outline of entomology**. London, Chapman & Hall, 1994, 542p.

HARVEY, T. L.; SEIFERS, D. L.; MARTIN T. J. Effect of imidacloprid seed treatment on infestations of wheat curl mite (Acari : Eriophyidae) and the incidence of wheat streak mosaic virus. **Journal of Agricultural Entomology**, v.15, n. 1, p.75 - 81, jan., 1998.

HENNING, A. A. Patologia e tratamento de sementes: noções gerais. Londrina, Embrapa Soja, 2005, 52p. (Embrapa Soja, Documentos, 264.)

HEUPEL, K. Avoidance response of different collembolan species to Betanal. **European Journal of Soil Biology**, v. 38, p. 273–276, 2002.

HICKS B. Leading the way in seed treatments. **Pesticide Outlook**, v.11, p. 132 – 133, ago. 2000.

HOFFMAN, D. J. et al. **Handbook of Ecotoxicology**, London: Blackwell Scientific Publications, 2003. v. 2, 1290p.

HOND, F., GROENEWEGEN, P.; VAN STRAALLEN, N.M. **PESTICIDES: Problems, improvements, alternatives**. Oxford: Blackwell Science, 2003. 256 p.

HOPKIN, S.P. In situ biological monitoring of pollution in terrestrial and aquatic ecosystems. In: CALOW P. (Ed.). **Handbook of Ecotoxicology**. Blackwell Scientific Publications, 1993. p. 397-427.

HOPKIN, S.P. **Biology of springtails. Insecta: Collembola**. Oxford: Oxford University Press, 1997. p. 330.

HUND-RINKE, K. et al. Avoidance Test with *Eisenia fetida* as Indicator for the Habitat Function of Soils: Results of a Laboratory Comparison Test. **JSS – J Soils & Sediments**, v.3, n.1, p.7 – 12, 2003.

INGHAM, E. R. et al. Reduction of microbial and faunal groups following application of Streptomycin and Captan in Georgia no-tillage agroecosystems. **Pedobiologia**, v.35, n.5, p. 297-304, 1991.

ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION). **ISO-11268-1: Soil quality - Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) – Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate**. Genève, Switzerland, 1993, 39p.

ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION). **ISO-11268-2: Soil quality - Effects of pollutants on earth-worms (*Eisenia fetida*) – Part 2: Method for the determination of effects on reproduction**. Genève, Switzerland, 1998, 36p.

ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION). **ISO-11267: Soil Quality - Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants**. Genève, Switzerland, 1999a, 20p.

ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION). **No. 11268-3: Soil quality — effects of pollutants on earthworms. Part 3: Guidance on the determination of effects in field situations.** Genève, Switzerland. 1999b.

ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION). **ISO 15799:2003: Soil quality -- Guidance on the ecotoxicological characterization of soils and soil materials.** Genève, Switzerland, 2003, 33p.

ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION). **ISO-16387: Soil Quality - Effects of pollutants on Enchytraeidae (Enchytraeus sp.) Determination of effects on reproduction and survival.** Genève, Switzerland, 2004, 26p.

ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION). **ISO 17512-1: Soil quality -- Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behavior -- Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *E. andrei*).** Genève, Switzerland, 2008a, 25p.

ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION). **ISO/DIS 17512-2: Soil quality -- Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behavior -- Part 2: Test with collembolans (*Folsomia candida*),** Genève, Switzerland, 2008b, 13p.

JÄNSCH, S.; RÖMBKE, J. Ecological characterization of selected enchytraeid species (Enchytraeidae, Oligochaeta): a literature research. **Newsl. Enchytraeidae**, v. 8, p. 57–68, 2003.

JÄNSCH, S.; AMORIM, M. J.; RÖMBKE, J. Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. **Environ. Rev.**, v.13, p. 51–83, 2005a.

JÄNSCH, S.; GARCIA, M.; RÖMBKE, J. Acute and chronic isopod testing using tropical *Porcellionides pruinosus* and three model pesticides. **European Journal of Soil Biology**, v.41, p. 143–152, out. 2005b.

JEMEC, A. et al. Comparative toxicity of imidacloprid, of its commercial liquid formulation and of diazinon to a non-target arthropod, the microcrustacean *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v.68, p. 1408–1418, 2007.

JONES, C.G. et al. Organisms as ecosystems engineers. **Oikos**, v.69, p.373-386, 1994.

KAPANEN, A.; ITAVAARA, M. Ecotoxicity Tests for Compost Applications. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Finland, v. 49, p.1-16, 2001.

KIDD, H.; JAMES, D. R. **The Agrochemicals Handbook**. 3. ed. Cambridge: Royal Society of Chemistry Information Services, 1991.

KILPATRICK, A. L. et al. Activity of selected neonicotinoids and dicrotophos on nontarget arthropods in cotton: Implications in insect management. **Journal of Economic Entomology**, v. 98, n.3, p. 814-820, jun. 2005.

KOBETICOVÁ, K.; HOFMAN, J.; HOLOUBEK, I. Ecotoxicity of wastes in avoidance tests with *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus* and *Eisenia fetida* (Oligochaeta). **Waste Management**, v. 30, p. 558–564, 2010.

KOEHLER, H.H. Predatory mites (Gamasina, Mesostigmata). **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.74, p.395-410, 1999.

KOLAR, L. et al. Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. **Environmental Pollution**, v.151, p. 182-189, 2008.

KREUTZWEISER, D. P.; THOMPSON, D. G.; SCARR, T. A. Imidacloprid in leaves from systemically treated trees may inhibit litter breakdown by non-target invertebrates. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 1053–1057, 2009.

KROGH, P. H. **Microarthropods as bioindicators**. 1994. Thesis (PhD) – University of Arhus, Arhus, Denmark, 1994.

KROMP, B. Carabid beetles in sustainable agriculture: a review on pest control efficacy, cultivation impacts and enhancement. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.74, p.187-228, 1999.

KULA, H.; LARINK, O. Development and standardization of test methods for the prediction of sublethal effects of chemicals on earthworms. **Soil Biol. Biochem.** v. 29, n. 3/4, p. 635-639, 1997.

LANGDON, C. J. et al. Survival, Pb-uptake and behavior of three species of earthworm in Pb treated soils determined using an OECD-style toxicity test and a soil avoidance test. **Environmental Pollution**, v.138, p. 368-375, 2005.

LAVELLE P.; SPAIN, A. V. **Soil Ecology**. New York: Kluwer Academic Publishers, 2003. 682 p.

LEE, K.E. **Earthworms: their ecology and relationships with soils and land use**. London: Academic Press, 1985. 411p.

LENZ, G. et al. Fitotoxicidade de fungicidas aplicados em sementes de arroz (*Oryza sativa*). **Revista da FZVA**. Uruguiana, v.15, n.2, p.53-60, 2008.

LEONEL, T. Z. et al. Efeito de inseticidas em tratamento de sementes sobre as características agrônômicas e produtividade da cultura do milho. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 21., 2009, São José do Rio Preto. **Anais....** São José do Rio Preto : UNESP, 2009. v. 1, p. 1-4

LIPPS, P. E. et al. **Seed Treatment, Bulletin 638**. Ohio. The Ohio State University, 1988. 11p.

LISKER, N.; MEIRI, A. Control of *Rhizoctonia solani* damping-off in cotton by seed treatment with fungicides. **Crop Protection**, v.11, n.2, p.155-159, abr. 1992,

LOBO, V.L.D. Effects of chemical treatment of rice seeds on leaf blast control and physiological and sanitary quality of treated seeds. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.2, abr. 2008.

LOBRY DE BRUYN, L.A. Ants as bioindicators of soil function in rural environments. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.74, p.425-441, 1999.

LOCK, K. et al. Ecotoxicity of cobalt to the springtail *Folsomia candida*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v. 139 p. 195–199, 2004.

LOCK, K.; JANSSEN, C. R. Cadmium Toxicity for Terrestrial Invertebrates: Taking Soil Parameters Affecting Bioavailability into Account. **Ecotoxicology**, Gent, Belgium, v.10, p. 315–322, 2001.

LØKKE, H.; VAN GESTEL, C.A.M. **Handbook of Soil Invertebrate Toxicity Tests**. Chichester: John Wiley and Sons, 1998. 251p.

LUO, Y. et al. Toxicological study of two novel pesticides on earthworm *Eisenia fetida*. **Chemosphere [S.I.]**, v. 39, n. 13, p. 2347-2356, dec. 1999.

MAIENFISCH, P. et al. The discovery of thiametoxam: a second-generation neonicotinoid. **Pest Manag**, v.57, p.165-176, 2001a.

MAIENFISCH, P. et al. Chemistry and biology of thiametoxam: a second generation neonicotinoid. **Pest Manag**, v.57, p.906-913, 2001b.

MALKOMES, H. P. Effect of pesticides used for seed treatment of potatoes on microbial activities in soil. **Zentralblatt Fur Mikrobiologie**. Alemanha, v. 148, n.7, p. 497-504, 1993.

MARC, P.; CANARD, A.; YSNEL, F. Spiders (Araneae) useful for pest limitation and bioindication. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.74, p.229-273, 1999.

MARKERT, B.A.; BREURE, A.M.; ZECHMEISTER, H.G. **Bioindicators & Biomonitoring**: principles, concepts and applications. Michigan: Elsevier Science Ltd., 2003. v. 6, 997 p.

MARRS, T. C.; BALLANTYNE, B.. **Pesticide Toxicology and International Regulation**. Bradford, UK.: John Wiley & Sons, Ltd., 2004, 554p.

MARTINS, G. L. M. et al. Efeito de alguns inseticidas sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) e *dichelops sp.* (Pentatomidae) na fase inicial da cultura do milho. **Publicação Científica da Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal de Garça/Faef**, Ano V, N.09, Jun, 2006.

MATOLCSY, G.; NADASY, M.; ANDRISKA, V. **Pesticide Chemistry, Studies in Environmental Science**, v.32. Kultura, Hungarian, Elsevier Science Publishing Co., 1988, 806p.

MENTEN, J.O.M. Tratamento de sementes com inseticidas. In: SEMANA DE ATUALIZAÇÃO EM PATOLOGIA DE SEMENTES, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: ESALQ/USP, 1991. p.278-279.

MOSER S. E.; OBRYCKI, J. J. Non-target effects of neonicotinoid seed treatments; mortality of Coccinellid larvae related to zoophytophagy. **Biological Control**. Lexington, USA, v.51, p. 487–492, set. 2009.

MOSTERT, M. A.; SCHOEMAN, A. S.; VAN DER MERWE, M. The toxicity of five insecticides to earthworms of the *Pheretima* group, using an artificial soil test. **Pest Management Science** [S.I.], v. 56, n. 12, p. 1093-1097, dec. 2000.

MUELLER, D.S.; HARTMAN, G.L.; PEDERSEN, W.L. Development of sclerotia and apothecia of *Sclerotinia sclerotiorum* from infected soybean seed and its control by fungicide seed treatment. **Plant Disease**, v.83, n.12, p.113-1115, dez. 1999.

MUNKVOLD, G. P.; MCGEE, D.C.; ILES, A. Effects of imidacloprid seed treatment of corn on foliar feeding and *Erwinia stewartii* transmission by the corn flea beetle. **Plant Disease**, v.80, n.7, p. 747-749, jul. 1996.

MUNKVOLD, G. P.; SWEETS, L.; WINTERSTEEN, W. **Iowa Commercial Pesticide Applicator Manual**. Seed Treatment. Ames, Iowa. Iowa State University, 2006. 35p.

NATAL-DA-LUZ, T.; RIBEIRO, R.; SOUSA, J. P. Avoidance tests with collembola and earthworms as early screening tools for site-specific assessment of polluted soils. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 23, n. 9, p. 2188–2193, 2004.

NATAL-DA-LUZ, T.; RÖMBKE, J.; SOUSA, J. P. Avoidance tests in site-specific risk assessment: influence of soil properties on the avoidance response of collembola and earthworms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 5, p. 1112–1117, 2008b.

NATAL-DA-LUZ, T. et al. The use of sewage sludge as soil amendment. The need for an ecotoxicological evaluation. **Journal of Soils and Sediments**, v. 9, n. 3, p. 246-260, 2009.

NATIONAL REGISTRATION AUTHORITY (NRA) Agricultural and Veterinary Chemicals. **Evaluation of the new active thiametoxam in the product Cruiser 350FS insecticide seed treatment**. Canberra, Australia, 2001.

NAUEN, R. et al. Efficacy of plant metabolites of imidacloprid against *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* (Homoptera : Aphididae). **Pesticide Science**, v.52, n.1, p. 53-57, jan. 1998.

NAULT, B. A.; STRAUBB, R. W.; TAYLOR, A. G. Performance of novel insecticide seed treatments for managing onion maggot (Diptera: Anthomyiidae) in onion fields. **Crop Protection**, v.25 p.58–65, 2006.

NEERGAARD, P. **Seed Pathology**. 2 ed. London: McMillan press, 1979.

NIEMEYER, J. C. et al. Comportamento de *Cubaris murina* Brandt (Crustacea: Isopoda) em Solo com Glifosato: Testes de Fuga em Laboratório. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 1, n. 1, p. 13-16, 2006a.

NIEMEYER, J. C.; VILAÇA, D.; DA-SILVA, E. M. Efeitos na Biomassa de *Cubaris murina* Brandt (Crustacea: Isopoda) Expostos ao Solo com Glifosato em Laboratório. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 1, n. 1, p. 17-20, 2006b.

NIEMEYER, J. C. et al. Environmental risk assessment of a metal-contaminated area in the tropics. Tier I: screening phase. **J. Soils Sediments**, Soils sec. 4, maio 2010.

OFFICE OF ENVIRONMENTAL HEALTH HAZARD ASSESSMENT (OEHHA). **Soil Toxicity and Bioassessment Test Methods for Ecological Risk Assessment: Toxicity Test Methods for Soil Microorganisms, Terrestrial Plants, Terrestrial Invertebrates and Terrestrial Vertebrates**. Califórnia Environmental Protection Agency, 2008, 160p.

OLIVEIRA, C. M. et al. Eficiência de inseticidas em tratamento de sementes de milho no controle da cigarrinha *Dalbulus maidis* (DeLong & Wolcott) (Hemiptera: Cicadellidae) em viveiro telado. **Ciência Rural**, v. 38, p. 231-235, 2008

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD) **Guideline for Testing of Chemicals No. 207**. Earthworm Acute Toxicity Test. Paris, 1984, 9p.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **OECD-Guideline for Testing of Chemicals No. 222. Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida / andreï*)**. Paris (In press), 2004, 18p.

OVERMYER, J. P.; MASON, B. N.; ARMBRUST, K. L. Acute Toxicity of Imidacloprid and Fipronil to a Nontarget Aquatic Insect, *Simulium vittatum* Zetterstedt cytospecies IS-7. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.74, p.872–879, 2005.

PANKHURST, C.; DOUBE, B.M.; GUPTA, V.V.S.R. **Biological Indicators of Soil Health**. Cambridge, CAB International, 1997, 451p.

PAOLETTI, M.G. et al. Invertebrates as bioindicators of soil use. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.34, p.341-362, 1991.

PAOLETTI, M.G.; BRESSAN, M. Soil invertebrates as bioindicators of human disturbance. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v.15, n.1, p.21-62, 1996.

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

PAULSRUD, B. E. et al. **Oregon Pesticide Applicator Training Manual**. Seed Treatment. Urbana, Illinois. University of Illinois Board of Trustees, 2001. 28p.

PECK, D. C. Long-term effects of imidacloprid on the abundance of surface- and soil-active nontarget fauna in turf. **Agricultural and Forest Entomology**, v.11, p. 405–419, 2009.

PEREIRA, J. L. et al. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. **Ecotoxicology**, v.18, n.455–463, 2009.

PESTANA, J. L. T. et al. Structural and functional responses of benthic invertebrates to imidacloprid in outdoor stream mesocosms. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 2328–2334, 2009.

PESTANA, J. L. T. et al. Pesticide exposure and inducible antipredator responses in the zooplankton grazer, *Daphnia magna* Straus. **Chemosphere**, v.78, p. 241–248, 2010.

PETERSEN, H. Collembolan ecology at the turn of the millennium. **Pedobiologia**, v.46, p.246–260, 2002.

PEVELING, R. et al. Impact of locust control on harvester termites and endemic vertebrate predators in Madagascar. **Journal of Applied Ecology** [S.I.], v. 40, n. 4, p. 729-741, aug. 2003.

PHILLIPS, C. T.; KUPERMAN, R. G.; CHECKAI, R. T. Toxicity of chemical-warfare agent HD to *Folsomia candida* in different soil types. **Eur. J. Soil Biol.**, v.38, p. 281–285, 2002.

PICININI, E.C.; FERNANDES, J.M.C. Efeito do tratamento de sementes com fungicida sobre o controle de doenças na parte aérea do trigo. **Fitopatologia Brasileira**. v.28. p.515-520. 2003.

PINTO, N. F. J. de A. Tratamento fungicida de sementes de milho contra fungos do solo e o controle de *Fusarium* associado às sementes. **Sci. agric.**, Piracicaba, v. 57, n. 3, set. 2000.

PIOTROWSKA-SEGET, Z. et al. Successive soil treatment with captan or oxytetracycline affects non-target microorganisms. **World Journal of Microbiology & Biotechnology** [S.l.], v. 24, n. 12, p. 2843-2848, dez. 2008.

PLIMMER, J. R.; GAMMON, D. W.; RAGSDALE, N. N. **Encyclopedia of Agrochemicals**. V.1-3. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2003. 1648p.

REGISTRATION ELIGIBILITY DECISION (RED). **Captan; EPA-738-R-99-015**; U.S. Environmental Protection Agency, Office of Pesticide Programs, Washington, DC, U.S. Government Printing Office, p.2-49, Nov., 1999.

REINECKE, S. A.; REINECKE, A. J. Biomarker response and biomass change of earthworms exposed to chlorpyrifos in microcosms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.66, p. 92–101, 2007.

RESH, V. H.; CARDÉ, R. T. **Encyclopedia of Insects**. San Diego: Academic Press, 2003, 1266p.

RIDA, A. M. M. A.; BOUCHÉ, M. B. Earthworm toxicology: from acute to chronic tests. **Soil Biol. Biochem.**, v.29, n.3/4, p. 699-703, set., 1997.

RIGHI, G. Oligochaeta (Annelida) Diversidade e Agro-Ecologia. In: JOLY, C. A.; BICUDO C. E. M. Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: síntese do conhecimento ao final do século XX. p.11-22, 1999.

RÖMBKE, J.; BAUER, C.; MARSCHNER, A. Hazard Assessment of Chemicals in Soil. Proposed Ecotoxicological Test Strategy. **ESPR - Environ. Sci. Pollut. Res.**, v.3, p. 78-82, 1996.

RÖMBKE, J.; MOLTMANN, J. F. **Applied Ecotoxicology**. Boca Raton: CRC Lewis, 1996. 282 p.

RÖMBKE, J.; GARCIA, M.V.B.; SCHEFFCZYK, A. Effects of the fungicide benomyl on earthworms in laboratory tests under tropical and temperate conditions. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 53, p. 590-598, 2007.

RONDAY, R.; HOUX, N. W. H. Suitability of seven species of soil-inhabiting invertebrates for testing toxicity of pesticides in soil pore water. **Pedobiologia**, v.40, p.106–12, 1996.

SAN MIGUEL, A. et al. Phenylpyrazoles impact on *Folsomia candida* (Collembola). **Soil Biology & Biochemistry**, v.40, p. 2351–2357, 2008.

SARDO, A. M.; SOARES, A. M. V. M. Assessment of the Effects of the Pesticide Imidaclopridon the Behavior of the Aquatic Oligochaeta *Lumbriculus variegates*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v.58, p. 648–656, 2010.

SCHAEFER, M. Assessing 2,4,6-trinitrotoluene (TNT)-contaminated soil using three different earthworm test methods. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.57, p.74–80, 2004.

SCHLENK, D. et al. Toxicity of Fipronil and Its Degradation Products to *Procambarus sp.*: Field and Laboratory Studies. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v.41, p. 325–332, 2001.

SCHÜÜRMAN, G.; MARKERT, B. **Ecotoxicology**: ecological fundamentals, chemical exposure, and biological effects. New York: J. Wiley, 1997. 900p.

SHUGART, L. R. **Emerging Topics in Ecotoxicology**: principles, approaches and perspectives. Oak Ridge, TN: Springer Science+Business Media, LLC., 2009, 400 p.

SILVA, A. L. et al. Inseticidas aplicados via tratamento de sementes visando o controle das moscas branca (*Bemisia tabaci* Genn.) e minadora (*Liriomiza* sp.) na cultura do feijoeiro. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 23, n. 1, p. 47-53, 1993.

SILVA, M. T. B. Inseticidas na proteção de sementes e plantas. **Seed News**, Pelotas, n.5, p.26-27, maio/jun. 1998.

SILVA, C. P. L. et al. Avaliação do efeito de inseticidas em sementes de milho em diferentes profundidades de semeadura. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia** (PUCRS. Uruguaiana), v. 16, p. 14-21, 2009.

SISINNO, C. L. S. et al. Ensaio de Comportamento com Minhocas (*Eisenia fetida*) para Avaliação de Áreas Contaminadas: Resultados Preliminares para Contaminação por Hidrocarbonetos. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 1, n. 2, p. 137-140, 2006.

SLODERBECK, P.E.; WITT, M.D.; BUSCHMAN, L.L. Effects of imidacloprid seed treatment on greenbug (Homoptera: Aphididae) infestations on three sorghum hybrids. **Southwestern Entomologist**, v.21, n.2, p.181-187, Jun., 1996.

SPURGEON, D. J.; WEEKS, J. M.; VAN GESTEL, C. A. M. A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology. **Pedobiologia**, v.47, p. 588–606, 2003.
STENBERG, B. Monitoring soil quality of arable land: microbiological indicators. **Soil and Plant Science**, v.49, p.1-24, 1999

STEVENS, M. M.; HELLIWELL, S.; WARREN, G. N. Fipronil seed treatments for the control of chironomid larvae (Diptera: Chironomidae) in aerially-sown rice crops. **Field Crops Research**, v.57,p.195–207, 1998

STOJANOVIĆ, M.; KARAMAN S.; MILUTINOVIĆ, T. Herbicide and pesticide effects on the earthworm species *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) (Oligochaeta, Lumbricidae). **Archives of Biological Sciences [S.I.]**, v. 59, n. 2, p. 25P-26P, 2007.

STORK N. E.; EGGLETON P. Invertebrates as indicators of soil quality. **American Journal of Alternative Agriculture** v.7, p.38–47, 1992.

TINGLE, C. C. D. et al. Health and environmental effects of fipronil. **Pesticide Action Network UK**, briefing A11, Nov. 2000.

TOMLIN, C. D. S. **The Pesticide Manual**. 12. ed. British Crop Protection Council. Surrey, U.K., 2000.

VAN GESTEL, C. A. M.; LÉON C.D.; VAN STRAALLEN, N.M. Evaluation of soil fauna toxicity tests regarding their use in risk assessment. In: TARRADELLAS, J.; BITTON, G.; ROSSEL, D. (Ed.) **Soil Ecotoxicology**. Boca Raton: CRC Press, 1997. p.291-317.

VAN GESTEL, C. A. M. et al. The use of acute and chronic bioassays to determine the ecological risk and bioremediation efficiency of oil-polluted soils. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 7, p. 1438–1449, 2001.

VAN STRAALLEN, N. M. Community structure of soil arthropods as a bioindicator of soil health. In: PANKHURST, C.E., DOUBE, B. M.; GUPTA, V.V.S.R. (Ed.). **Biological Indicators of Soil Health**. Wallingford, UK: CAB International, 1997. p. 235–264,

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

VAN STRAALLEN, N. M. Assessment of soil contamination: a functional perspective. **Biodegradation**, v. 13 p.41–52, 2002a.

VAN STRAALLEN, N.M. Theory of ecological risk assessment based on species sensitivity distributions. In: POSTHUMA, L.; SUTER G. W.; TRAAS, T. P. (Ed.). **Species Sensitivity Distributions in Ecotoxicology**. CRC Press, 2002b. p. 37–48.

VERNON, R. S. et al. Wireworm Management I: Stand Protection Versus Wireworm Mortality with Wheat Seed Treatments. **Journal of Economic Entomology**. Columbia, Canada, v. 102, n. 6, p. 2126-2136, 2009.

WALTERS, D. **Disease control in crops: biological and environmentally friendly approaches**. Edinburgh, UK.: Blackwell Publishing Ltd, 2009. 266 p.

WAXMAN, M. F. **Agrochemical and Pesticides Safety Handbook**. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, 1998. 1040p.

WILDE, G. E. et al. Seed treatment for control of wheat insects and its effect on yield. **Journal of Agricultural and Urban Entomology**, v.18, n.1, p.1-11, jan. 2001.

WILDE, G. et al. Various seed treatments were evaluated for their effect on early-season corn pests. **Journal of Agricultural And Urban Entomology**, v.21, n.2, p. 75-85, abr. 2004.

WILES, J. A.; KROGH, P. H. Tests with the Collembolans *Isotoma viridis*, *Folsomia candida* and *Folsomia fimetaria*. In: LØKKE, H.; VAN GESTEL, C. A. M. **Handbook of soil invertebrate toxicity tests**. Chichester, UK.: John Wiley and Sons, Ltd., 1998. p. 131–156.

WILSON, W. A. et al. Enantioselective Chronic Toxicity of Fipronil to *Ceriodaphnia dubia*. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 54, p. 36–43, 2008.

WILSON, D. O. et al. Evaluation of fungicide seed treatments for shrunken-2 (super sweet) sweet corn. **Plant Disease**, v. 77, n. 4, p. 348-351, abr. 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The Who Recommended Classification Of Pesticides By Hazard And Guidelines To Classification**. World Health Organization, Stuttgart, Germany, 2010. 81p.

YEARCLEY, R. B.; LAZORCHAK, J. M.; GAST, L. C. The potential of an earthworm avoidance test for evaluation of hazardous waste sites. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, n. 9, p. 1532–1537, 1996.

YEATES, G.W.; BONGERS, T. Nematode diversity in agroecosystems. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.74, p.113-135, 1999.