

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
ENGENHARIA AMBIENTAL**

MICHELLE MIYUKI KANASHIRO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO GLIFOSATO E
DA DELTAMETRINA EM SOLO**

São Carlos, SP

2015

MICHELLE MIYUKI KANASHIRO

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO GLIFOSATO E DA
DELTAMETRINA EM SOLO**

Trabalho de Graduação apresentado à Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de
São Paulo para a obtenção do título de
Engenheira Ambiental

Orientadora: Professora Doutora Maria Olímpia
de Oliveira Rezende

São Carlos, SP

2015

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): **Michelle Miyuki Kanashiro**

Data da Defesa: 29/10/2015

Comissão Julgadora:

Resultado:

Maria Olimpia de Oliveira Rezende (Orientador(a))


Aprovada

Evaldo Luiz Gaeta Espíndola

Aprovada

Valdir Schalch

Aprovada


Prof. Dr. Marcelo Zaiat

Coordenador da Disciplina 1800091- Trabalho de Graduação

Dedico este trabalho à pessoa que é e sempre será a mais importante da minha vida:

minha mãe.

**“Ninguém é tão grande que não possa aprender,
nem tão pequeno que não possa ensinar”**

(Esopo)

**“If your dreams don’t scare you,
They aren’t big enough”**

(Ellen Johnson Sirleaf)

**“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original”**

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo amor, apoio e confiança incondicional que sempre me proporcionaram. Gostaria de agradecer em especial à minha mãe e ao meu irmão mais velho, Tsuki, que são, sem dúvidas, minhas maiores fontes de inspiração e orgulho; e aos meus irmãos mais novos, Dori e Raphinha, que são os meus maiores incentivos para eu me tornar uma pessoa melhor e ser um exemplo para os meus pequenos. Amo todos vocês do fundo da minha alma.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Maria Olímpia de Oliveira Rezende, pelo carinho e confiança que sempre demonstrou por mim e por ter me concedido a oportunidade de desenvolver a pesquisa em seu laboratório.

À minha orientadora não oficial Fernanda, pela imensa ajuda, orientação e amizade.

A todos os pesquisadores do Laboratório de Química Ambiental (LQA), especialmente à Diva, pelo auxílio técnico, pelo carinho e ensinamentos; e ao Leandro, por ter me guiado nos primeiros momentos dentro do LQA.

Aos meus colegas de laboratório e também de classe Lupe, Fejuca e Rafael, pela ajuda e companhia na realização dos experimentos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de iniciação científica (Processo 2012/08709-6).

À Escola de Engenharia de São Carlos, por me proporcionar a minha formação acadêmica.

À turma da Ambiental 010, por ter sido a melhor turma que eu poderia ter escolhido. Agradeço todos os momentos que passamos juntos.

Ao POVO que tornou minha jornada muito mais agradável, divertida e motivadora: Plets, Line, Jé, Laurinha, Jacque, Gabi, Fê, Mah, TP, Ava, Fil e Nati. Pessoas que não importam onde ou como – desde o alto de montanhas ao fundo de cavernas, de trilhas em parques a caminhadas rumo ao campus 2, do Brasil ao Canadá, entre estudos e trabalhos infinitos, postits coloridos, conversas fiadas na sala de estar e brincadeiras que por vezes mereceram repreensão – estiveram sempre presentes na minha vida, na minha memória e em meu coração. A cada data lembrada, a cada momento vivido com vocês, me resta a certeza de que tudo valeu a pena. Vocês são pessoas inestimáveis que eu nunca vou cansar de abraçar!

RESUMO

KANASHIRO, M. M. **Avaliação da Toxicidade do Glifosato e da Deltametrina em Solo**. São Carlos, 2015. 65 p. Monografia de Trabalho de Graduação. Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2015.

O Brasil ainda é um país fortemente agrícola e o uso de pesticidas para o aumento da produtividade é cada vez mais comum. Dentre os pesticidas mais utilizados no ambiente, destacam-se o herbicida glifosato e o piretróide deltametrina. Estudos de toxicidade e programas de monitoramento do uso envolvendo esses pesticidas são essenciais para garantir que a produção de alimentos agrícolas seja eficaz e não ameace o ecossistema local e nem a saúde humana, tanto dos trabalhadores quanto dos consumidores. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade da deltametrina e do glifosato no solo, o qual foi obtido em área rural e caracterizado, utilizando como bioindicador minhocas da espécie *Eisenia foetida*. As minhocas são utilizadas para avaliação da contaminação do solo pois ingerem grande quantidade de solo, demonstrando capacidade de acumulação de poluentes em seus órgãos, sendo uma alternativa viável para a realização dos testes ecotoxicológicos e, também, porque são organismos simples de serem estudados. Nos ensaios de toxicidade do glifosato e da deltametrina, baseados nas ISO 11268-1, 11268-2 e ASTM E-1676, os pesticidas apresentaram toxicidade aguda a partir das concentrações 6000 mg kg⁻¹ e 500 mg kg⁻¹, respectivamente. Tanto o herbicida quanto o piretróide indicaram uma interferência na reprodução das minhocas, visto que, ao fim de 56 dias, apesar de haver uma pequena quantidade de ovos, não foi encontrada nenhum indivíduo jovem. Os resultados indicaram que o glifosato e a deltametrina são desfavoráveis à saúde da fauna edáfica, ao meio ambiente e, por extensão, à saúde humana. Tendo em vista que a deltametrina não é solúvel em água, é usual a inclusão de dispersantes nas soluções comerciais, o que pode, assim, contribuir negativamente para o desenvolvimento das minhocas. Neste contexto, a fim de afirmar se a deltametrina foi responsável pela toxicidade aguda nas minhocas, o experimento de toxicidade foi repetido, comparando-se a formulação comercial da deltametrina e esta mesma formulação apenas com os dispersantes, ou seja, sem a deltametrina (princípio ativo). Como resultado desta segunda parte do experimento, comprovou-se a maior toxicidade da deltametrina frente aos dispersantes. A concentração da formulação recomendada pelo fabricante (5 mg kg⁻¹) mostrou um comportamento semelhante ao do branco, ressaltando a importância de se seguir as instruções no rótulo do produto. Desta forma, recomenda-se cautela na aplicação, manuseamento e transporte do glifosato e deltametrina no ambiente, pois o uso indiscriminado dos mesmos e os acidentes relacionados à derramamentos podem ser extremamente prejudicial ao ecossistema local.

Palavras-chave: glifosato, deltametrina, toxicidade, minhocas, *Eisenia foetida*.

ABSTRACT

KANASHIRO, M. M. **Evaluation of Toxicity of Glyphosate and Deltamethrin in Soil.** São Carlos, 2015. 65 p. Bachelor thesis (Environmental Engineering). São Carlos College of Engineering, University of Sao Paulo, São Carlos, 2015.

Brazil is still strongly dependent on the agricultural sector, and the use of pesticides for increasing productivity is frequent. Among the pesticides commonly used, there are the glyphosate and the deltamethrin. Toxicity studies and monitoring programs of the use of these pesticides are essential to ensure that the agricultural food production is effective and does not threaten the local ecosystem and neither the human health - of the workers and consumers. This study aimed to evaluate the toxicity of glyphosate and deltamethrin in soil, which obtained and characterized in rural area, using as bioindicator earthworm of *Eisenia foetida* species. Earthworms are used for evaluation of soil contamination because of the large quantities of soil that they can ingest, and because of their high pollutant accumulation capacity in their organisms. In this context, using earthworms is a viable alternative to the achievement of ecotoxicological tests, and also they are simple organisms to be studied. The toxicity tests of the glyphosate and deltamethrin, based on ISO 11268-1, 11268-2 and ASTM E-1676, indicate that the pesticides had acute toxicity from the concentrations of 6000 mg kg⁻¹ and 500 mg kg⁻¹, respectively. The glycine and the pyrethroid indicated to interfere on earthworm reproduction, since after 56 days, although there was a small quantity of eggs, no born earthworm was found. The results indicated that glyphosate and deltamethrin are unfavorable to the health of the soil fauna, the environment and so to the human health. Deltamethrin is insoluble in water, so it is common to include dispersants in commercial solutions, which could contribute negatively to the development of the earthworms. In this context, in order to confirm if deltamethrin was the responsible for acute toxicity of the earthworms, the toxicity experiment was repeated. It was compared the commercial formulation of deltamethrin and this same formulation just with the dispersants, ie without deltamethrin. Due to this second part of the experiment, it was proved that the deltamethrin has higher toxicity compared to the dispersants. The glyphosate concentration recommended by the manufacturer (5 mg kg⁻¹) showed a similar behavior to the reference, emphasizing the importance of following the instructions on the product label. Thus, the application, management, and transportation of glyphosate and deltamethrin in the environment should be carefully done, because the indiscriminate use and the risks of spill of these pesticides can harm the local ecosystem.

Keywords: glyphosate, deltamethrin, toxicity, earthworms, *Eisenia foetida*.

Lista de Figuras

Figura 1 – Fórmula estrutural do glifosato.....	17
Figura 2 – Fórmula estrutural da deltametrina.....	18
Figura 3 – a) e b) Minhoca da espécie <i>Eisenia foetida</i> utilizado como bioindicador	30
Figura 4 – a) e b) Recipientes para o acondicionamento das amostras para o experimento.....	31
Figura 5 – Lavagem das minhocas no dia 0 para posterior determinação da biomassa inicial	32
Figura 6 – Verificação da humidade da amostra.....	33
Figura 7 – a), b), c) e d) ovos de minhocas; e) minhoca jovem	34
Figura 8 - Curva de distribuição granulométrica	36
Figura 9 – Mortalidade média de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>), aos 14 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de glifosato, em solo natural. Barras de erros correspondem a desvios-padrão	40
Figura 10 – Mortalidade média de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>), aos 14 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina, em solo natural. Barras de erros correspondem a desvios-padrão	40
Figura 11 – Perda de biomassa média de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>), aos 28 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de glifosato, em solo natural. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.....	41
Figura 12 – Perda de biomassa média de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>), aos 28 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina, em solo natural. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.....	42
Figura 13 – Reprodução de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>), minhocas jovens e ovos, aos 56 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de glifosato, em solo natural. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.....	43
Figura 14 – Reprodução de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>), minhocas jovens e ovos, aos 56 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina, em solo natural. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.....	44
Figura 15 – Comparação gráfica da mortalidade média de minhocas (<i>Eisenia foetida</i>), aos 14 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação de deltametrina (com e sem o seu princípio ativo), em solo natural. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.	45

Figura 16 – Comparação da perda de biomassa média de minhocas (*Eisenia foetida*), aos 28 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina (com e sem o seu princípio ativo), em solo natural. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.46

Figura 17 – Comparação dos ensaios de reprodução de minhocas (*Eisenia foetida*), minhocas jovens, aos 56 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina (com e sem o seu princípio ativo), em solo natural. Barras de erros correspondem a desvios-padrão47

Figura 18 – Comparação dos ensaios de reprodução de minhocas (*Eisenia foetida*), ovos, aos 56 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina (com e sem o seu princípio ativo), em solo natural. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.....48

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Classificação da Toxicidade dos pesticidas segundo a ANVISA	20
Tabela 2 – Classificação Granulométrica	26
Tabela 3 - Composição mineral do solo natural	35
Tabela 4– Resultados da caracterização do solo para as análises de pH, matéria orgânica, umidade e carbono orgânico total.....	37

Lista de Símbolos e Siglas

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASTM – American Society for Testing and Materials

CTC – Capacidade de Troca Catiônica

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

IAC – Instituto Agronômico de Campinas

ICP-OES – Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry (Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente)

INCA – Instituto Nacional de Câncer

ISO – International Organization for Standardization (Organização Internacional para Padronização)

TOC – Total Organic Carbon (Carbono Orgânico Total)

USP – Universidade de São Paulo

Sumário

1	Introdução.....	14
2	Revisão Bibliográfica.....	15
2.1	Pesticidas	15
2.1.1	Glifosato	16
2.1.2	Deltametrina	17
2.2	Toxicidade	18
2.2.1	Toxicidade dos pesticidas	19
2.2.2	Testes de Toxicidade	20
2.2.3	Toxicidade em Minhocas	21
3	Objetivos.....	23
3.1	Objetivo geral	23
3.2	Objetivos específicos	23
4	Metodologia.....	24
4.1	Amostragem de solo	24
4.2	Caracterização do solo	24
4.2.1	Análise Granulométrica	24
4.2.2	Determinação do pH.....	26
4.2.3	Determinação do Teor de Matéria Orgânica	26
4.2.4	Determinação da Umidade	27
4.2.5	Determinação da Capacidade de Troca Catiônica (CTC)	27
4.2.6	Determinação do Carbono Orgânico Total	28
4.3	Ensaio de Toxicidade	29
4.3.1	Preparação das soluções	29
4.3.2	Organismos-teste	29
4.3.3	Preparação e montagem dos ensaios	30
4.3.4	Ensaio de Toxicidade Aguda e de Biomassa	32
4.3.5	Ensaio de Reprodução	33
5	Resultados e Discussões.....	35
5.1	Caracterização do solo	35

5.1.1	Análise Granulométrica.....	35
5.1.2	Capacidade de Troca Catiônica (CTC).....	36
5.1.3	pH, Teor de Matéria Orgânica, Umidade e Teor de Carbono Orgânico Total.....	37
5.2	Ensaio de Toxicidade.....	38
5.2.1	Primeira Fase: Toxicidade do Glifosato e da Deltametrina.....	39
5.2.2	Segunda Fase: Avaliação da influência dos dispersantes na toxicidade da deltametrina comercial.....	44
6	Conclusões.....	49
7	Referências.....	51

Anexo A: Materiais e reagentes utilizados nos ensaios

Anexo B: Tabelas referente à fase 1 dos ensaios de toxicidade

Anexo C: Tabelas referente à fase 2 dos ensaios de toxicidade

Anexo D: Trabalhos Apresentados em Congressos

1 Introdução

A cada ano, milhões de hectares de terra são convertidos, sobretudo, ao uso agropecuário e também urbano. A aplicação de pesticidas visando melhorar a produtividade agrícola é uma prática comumente utilizada. Apesar de constituírem uma pequena porcentagem dos poluentes totais, não se pode negligenciar o uso intensivo e até abusivo de pesticidas, uma vez que, por sua natureza e propósitos, são venenos e seu impacto no meio ambiente pode ser significativo, devido à sua persistência, toxicidade e bioacumulação (NUNES, 2010).

Estima-se que 90% dos pesticidas não atingem o alvo, sendo dissipados para o meio ambiente e tendo como ponto final o solo e reservatórios de água, fatos que agravam consideravelmente o problema de contaminação do solo e água. Sendo assim, frequentemente, a aplicação dos pesticidas pelos agricultores é repetida inúmeras vezes visando compensar as baixas eficiências obtidas. Este excesso, além de aumentar os custos de produção e o potencial de impactos ao meio ambiente, ocasiona riscos associados à saúde humana (NUNES, 2010).

Ademais, considerando a alta frequência de uso de pesticidas, a produção, transporte e armazenamento dessas substâncias também crescem substancialmente. Concomitantemente, o risco da ocorrência de acidente, como derramamentos e vazamentos de grandes quantidades de pesticidas no meio ambiente também aumenta. Assim, é de extrema importância conhecer os riscos e impactos potenciais dos pesticidas que lançados ao meio ambiente, de maneira acidental ou proposital.

Neste sentido, o presente trabalho apresenta um estudo da toxicidade, em ambiente edáfico, de dois pesticidas comumente utilizados no Brasil, o glifosato e a deltametrina. Este trabalho está inserido em um estudo mais amplo e detalhado realizado por Fernanda Benetti, em seu projeto de doutorado, o qual foi financiado pela FAPESP (processo número 2011/22651-8) e intitulado “Avaliação da Contaminação de Solos Impactados com Xenobióticos Orgânicos em Culturas de Grande Expressão Econômica e sua Remediação com Vermicompostagem”.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Pesticidas

Segundo o Decreto Federal nº 4.074 de 04 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989, em seu Artigo 1º, Inciso IV, “agrotóxicos e afins” são definidos como:

“Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento;”

No Brasil, antes da Constituição Federal de 1988, utilizava-se o termo “defensivos agrícolas” porém, através da grande mobilização da sociedade civil organizada houve uma modificação na terminologia para “agrotóxicos”. Mais do que uma simples mudança de terminologia, este termo coloca em evidência a toxicidade desses produtos para o meio ambiente e para a saúde humana (RUPPENTHAL, 2013). Os agrotóxicos são também chamados de venenos, remédios, defensivos ou pesticidas. Nesse trabalho, será adotado o termo “pesticida”. Apesar do uso majoritário dos pesticidas ser na agricultura, eles também são utilizados na saúde pública (controle de vetores), no tratamento de madeira, no armazenamento de grãos e sementes, na produção de flores, no combate a piolhos e outros parasitas no homem e na pecuária (RUPPENTHAL, 2013).

O grupo dos pesticidas pode ser classificado, segundo sua função: inseticidas (controle de insetos), fungicidas (controle de fungos), herbicidas (combate às plantas invasoras), fumigantes (combate às bactérias do solo), algicida (combate a algas), avicidas (combate a aves), nematicidas (combate aos nematoides), moluscicidas (combate aos moluscos), acaricidas (combate aos ácaros), além de reguladores de crescimento, desfoliantes (combate às folhas indesejadas) e disseccantes (BRAIBANTE; ZAPPE, 2012).

A utilização intensiva de pesticidas, com finalidade de melhorar a produtividade agrícola, requerida pela demanda de alimentos, teve papel fundamental na contaminação ambiental durante o último século, sobretudo em águas superficiais e sedimentos (FILIZOLA et al., 2002).

O destino dos pesticidas no ambiente está diretamente relacionado com as propriedades físico-químicas dos produtos, quantidade e frequência de uso, métodos de aplicação, características bióticas e abióticas do ambiente e condições meteorológicas. Em função desses fatores, cada pesticida pode-se comportar de maneira distinta, dependendo da variação dos produtos e do modo como eles interagem com o ambiente e os fatores que podem levar à bioacumulação (CALDAS et al., 2006, BORGA et al., 2006).

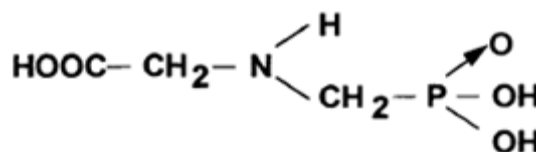
Pesquisas abordando o monitoramento de resíduos de pesticidas em água têm sido desenvolvidas em todo o mundo, sendo a seleção da metodologia de análise um fator muito importante, pois os compostos a serem detectados estão em níveis de traços, o que requer metodologias cada vez mais sensíveis de extração e quantificação (PARREIRA et al., 2004).

No Brasil, os parâmetros relevantes para as análises em quaisquer matrizes devem obedecer aos critérios estabelecidos pela NBR ISO/IEC 17025 : 2005 - Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Ensaio e Calibração - elaborados pelo órgão regulador brasileiro e pela Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT (ANVISA, 2005), que elabora suas próprias normas, sempre em conformidade com a International Organization for Standardization e International Electrotechnical (ISO/IEC), formando um sistema de padronização mundial com exigências gerais que devem ser seguidas pelos laboratórios para comprovação da eficácia e qualidade de seus serviços (OLIVARES, 2009).

2.1.1 Glifosato

O glifosato é o nome primário de um ácido orgânico fraco que consiste em metade glicina, metade fosfonometil. A fórmula empírica é $C_3H_8NO_5P$ e a fórmula estrutural está ilustrada na Figura 1 (MARQUES, 2008).

Figura 1 – Fórmula estrutural do glifosato.



O glifosato é um herbicida que atua por inibição da atividade da enzima 3-enol-piruvilchiquimato-5-fosfatase, resultando na diminuição da quantidade de aminoácidos aromáticos essenciais para crescimento e sobrevivência de plantas, estando também presente em muitos microrganismos. Sua meia-vida no solo varia desde menos de uma semana até alguns meses, dependendo dos teores de argila e matéria orgânica e do nível de atividade microbiana (ANDREA et al., 2004).

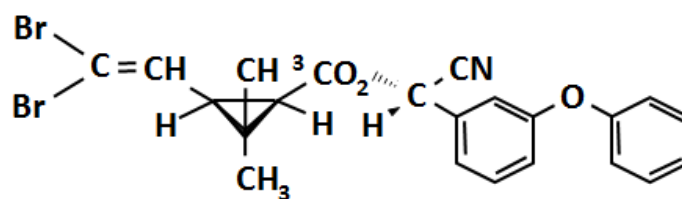
O herbicida tem aparência de um pó branco cristalino inodoro. Possui densidade específica de 1,704, baixa pressão de vapor e alta solubilidade em água. É anfotérico e pode existir como espécies iônicas diferentes, dependendo do pH (MARQUES, 2008).

Apesar do glifosato não ser tóxico em mamíferos e aves, os peixes são mais sensíveis a este herbicida (MARQUES, 2008). Atualmente, o glifosato é o herbicida mais utilizado na agricultura de grande porte e familiar, sendo considerado por muitos agricultores e agrônomos como um produto quase “inofensivo” ao homem, o que faz com que sua utilização na agricultura brasileira seja também bastante decorrente. No entanto, considerando a grande frequência com que o herbicida é aplicado, é necessário que se conheça o real potencial tóxico do glifosato, a fim de avaliar se este provoca alterações significativas na biota.

2.1.2 Deltametrina

A deltametrina ((S)- α -ciano-3-fenoxibenzil (1R,3R)-3-(2,2-dibromovinil)- 2,2-dimetilciclopropanocarboxilato) é um piretróide usado no controle de pragas invasoras, que atua por contato ou ingestão. Possui baixa solubilidade em água ($<0,2 \mu\text{g L}^{-1}$) e alto ponto de fusão (100 – 102°C) A fórmula química da deltametrina é $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{Br}_2\text{NO}_3$ e a fórmula estrutural está representada na Figura 2 (ROTUNDO, 2007). A deltametrina é considerada um inseticida medianamente tóxico, de classe toxicológica III e muito eficaz no controle de baratas, moscas e mosquitos (SAVOY, 2011).

Figura 2 – Fórmula estrutural da deltametrina.



Os pesticidas piretróides são divididos em duas classes distintas, sendo que a deltametrina pertence à classe II. Nesta classe os compostos determinam efeitos que parecem ser de origem central, produzindo salivação excessiva, movimentos irregulares dos membros, convulsões tônicas e crônicas e sensibilidade aumentada aos estímulos externos. Os compostos da classe II promovem uma despolarização persistente na membrana do nervo pelo influxo contínuo de íons Na^+ , com redução na amplitude do potencial de ação e colapso na condução axonal. Esta alteração é reversível, com o retorno à normalidade das funções dos canais de sódio pela ausência do composto piretróide. Os compostos piretróides não apresentam atividade anticolinesterásica e determinam um pequeno efeito na sensibilidade muscular da acetilcolina (ROTUNDO, 2007).

A deltametrina é usualmente utilizada no controle de insetos na agricultura, além disso, pode ser utilizada para prevenir doenças transmitidas por pragas domésticas, como pulgas, carrapatos, baratas e percevejos, entre outros (ROTUNDO, 2007).

2.2 Toxicidade

Toxicidade é a capacidade inerente a uma substância de instalar um estado patológico em consequência de sua introdução e interação com o organismo, ou seja, é a medida relativa do potencial tóxico da substância sob certas condições controladas de exposição. Uma substância muito tóxica causará danos a um organismo se for administrada em quantidades muito pequenas, enquanto uma substância de baixa toxicidade somente produzirá efeito quando a quantidade administrada for muito grande. É importante ressaltar que a resposta à uma determinada dose da substância tóxica depende da sensibilidade de cada espécie. O conhecimento da toxicidade das substâncias químicas pode ser obtida através de experimentos em laboratório utilizando organismos-teste (TOCCHETTO, 2007).

A toxicidade de uma substância pode ser classificada segundo seu tempo de resposta ou sua severidade (DUX, 1988). No primeiro caso, a toxicidade pode ser:

- **Aguda:** caracterizado quando os efeitos tóxicos em seres vivos são produzidos por uma única ou por múltiplas exposições a uma substância, por qualquer via, por um curto período – aproximadamente de 24 horas. As manifestações geralmente ocorrem de forma rápida, surgem de imediato ou no decorrer de alguns dias, no máximo duas semanas (DUX, 1988).
- **Sobreaguda ou Subcrônica:** caracterizada quando os efeitos tóxicos em seres vivos produzidos por exposições diárias repetidas a uma substância, por qualquer via, aparecem em um período de aproximadamente 10% do tempo de vida de exposição do organismo ou alguns meses (DUX, 1988). Denomina-se toxicidade sobreaguda quando ocorre exposição durante um período menor ou igual a um mês. Enquanto que, para os períodos entre um e três meses, classifica-se como toxicidade subcrônica (RUPPENTHAL, 2013).
- **Crônica:** caracterizada quando os efeitos tóxicos ocorrem após repetidas exposições, por um período longo de tempo, geralmente durante toda a vida do indivíduo ou aproximadamente 80% do tempo de sua vida (DUX, 1988).

No segundo caso, a toxicidade é subdividida em:

- **Leve:** os distúrbios produzidos no organismo podem ser rapidamente reversíveis e desaparecem com o término da exposição ou sem intervenção médica (DUX, 1988).
- **Moderada:** os distúrbios produzidos no organismo são reversíveis e não são suficientes para provocar danos físicos sérios ou prejuízos à saúde (DUX, 1988).
- **Severa:** mudanças irreversíveis no organismo humano, suficientemente severo para produzirem lesões graves ou a morte (DUX, 1988).

2.2.1 Toxicidade dos pesticidas

Os pesticidas podem ser absorvidos através das vias dérmica, gastrointestinal e respiratória, podendo determinar quadros de intoxicação aguda, subaguda e crônica (INCA, 2010). Os pesticidas são classificados pela Anvisa, órgão de controle do Ministério da Saúde, em quatro classes de perigo para saúde humana. Cada classe é representada por uma cor no rótulo e na bula do produto (ANVISA, 2011). A Tabela 1 mostra esta classificação.

Tabela 1 – Classificação da Toxicidade dos pesticidas segundo a ANVISA

CLASSE	TOXICIDADE	COR NO RÓTULO DO PRODUTO
I	Extremamente tóxico	Vermelha
II	Altamente Tóxico	Amarela
III	Medianamente Tóxico	Azul
IV	Pouco Tóxico	Verde

2.2.2 Testes de Toxicidade

Testes de toxicidade são caracterizados com ensaios laboratoriais, realizados sob condições experimentais específicas e controladas, utilizados para estimar a toxicidade de substâncias, efluentes industriais e amostras ambientais. Nesses ensaios, os organismos-teste são expostos a diferentes concentrações de amostra e os efeitos tóxicos produzidos sobre eles são observados e quantificados (COSTA et al, 2008)

Esses testes não permitem obter uma resposta absoluta sobre o risco que uma determinada substância apresenta para a população humana, tendo em vista a dificuldade de extrapolar os resultados de toxicidade obtidos para os organismos em laboratório para os seres humanos e até mesmo correlacionar os resultados de toxicidade entre organismos de diferentes espécies (COSTA et al, 2008). No entanto, o uso de outros seres vivos (peixes, minhocas, ratos, etc.) nos testes de toxicidade ajudam na extrapolação de potenciais riscos agudos e crônicos para seres humanos.

Diversos testes podem ser usados para avaliar a toxicidade e efeitos dos poluentes nos seres vivos. Em minhocas, os testes mais comuns são aqueles que envolvem exposição em papel de filtro umedecido ou fazem uso de solo artificial. O método do papel de filtro é rápido e confiável, e pode ser usado como teste prévio para avaliar a toxicidade dos produtos químicos agrícolas, enquanto que o teste envolvendo solo artificial conduz a dados de toxicidade mais representativos de exposição natural das minhocas aos produtos químicos (VELKI e HACKENBERGER, 2013).

Os testes de toxicidade fornecem medidas diretas da biodisponibilidade dos poluentes ou agentes tóxicos e podem ajudar a estabelecer ligações entre a contaminação local e os efeitos ecológicos adversos. Avaliam exposições agudas e crônicas e medem os efeitos biológicos resultantes dessas exposições, tais como, mortalidade, desempenho reprodutivo, crescimento e mudanças comportamentais (ANDRÉA, 2010).

O teste de toxicidade aguda é classificado como um experimento de curta duração, que proporciona resposta rápida em estudos sobre efeitos tóxicos letais, cujo objetivo é determinar a

concentração letal (CL) de uma substância (ALBINATI et al, 2007). Já os testes de toxicidade crônica avaliam a ação dos poluentes cujo efeito traduz-se pela resposta a um estímulo que continua por longo tempo, geralmente por período que vai de 1/10 do ciclo vital até à totalidade da vida do organismo. Estes testes são também utilizados sempre que os testes de toxicidade aguda não forem suficientes para caracterizar um efeito tóxico mensurável, isto é, capaz de detectar indícios de toxicidade aguda (KERN, 2012).

2.2.3 Toxicidade em Minhocas

Os organismos do solo estão expostos a uma grande variedade de poluentes ambientais, sendo as minhocas um dos grupos mais importantes desses organismos uma vez que desempenham papel fundamental na promoção da fertilidade do solo. Logo, as minhocas podem ser utilizadas como bioindicadores para a avaliação ecotoxicológica da poluição do solo (VELKI e HACKENBERGER, 2013).

O uso de bioindicadores é de grande importância uma vez que estes são capazes de revelar alterações causadas por poluentes no estado fisiológico dos organismos, proporcionando, assim, sinais de alerta precoces de risco ambiental de poluição ou estresse aos organismos. Além disso, essas respostas podem ser indicadores sensíveis de estresse químico antes que efeitos subletais, tais como inibição do crescimento ou reprodução, tornem-se aparentes (VELKI e HACKENBERGER, 2013).

As minhocas são utilizadas para avaliação da contaminação do solo, pois tem seu desenvolvimento afetado por diversos compostos orgânicos e inorgânicos (CORREIA e MOREIRA, 2010). Elas usam os receptores sensíveis sobre a superfície de seu corpo para detectar produtos químicos no solo (WANG et al, 2012). Geralmente, as minhocas são escolhidas por ingerirem grande quantidade de solo (ou seja, possuem capacidade de acumulação de poluentes), representarem cerca de 92% da biomassa de invertebrados presentes no solo e serem importantes na reciclagem de nutrientes (LANDGRAF et al, 2005). Elas representam uma alternativa viável para a realização dos testes ecotoxicológicos, também, por serem organismos simples de serem estudados. Além disso, as minhocas são um importante elo na cadeia trófica terrestre, constituindo uma fonte de recursos para uma grande variedade de organismos, incluindo aves, mamíferos, répteis, anfíbios e insetos, bem como na cadeia aquática, podendo ser alimento para peixes e outros organismos (ASTM, 1995; ALOK, 2008).

Desta forma, os testes da OECD (Organização Europeia de Cooperação e Desenvolvimento Econômico), da EPA (Agência Americana de Proteção do Ambiente) e da ISO (Organização Internacional para Padronização) entre outros, adotaram a espécie *Eisenia foetida* para os testes de toxicidade em solo, respectivamente em 1984, 1991 e 1993 (ANDRÉA, 2010).

As minhocas utilizadas nos ensaios são da espécie *Eisenia foetida*, pertencente do filo *Annelida*. Esta espécie é conhecida pela sua alta prolificidade e pela sua capacidade de se adaptar aos mais diferentes resíduos, para a geração de vermicomposto (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Sua respiração é feita por ramificações capilares (respiração cutânea) e são consideradas como organismos ácido-tolerantes, por possuírem glândulas calcíferas que permite o controle da acidez dos resíduos. Quando o ambiente e a temperatura são favoráveis, a reprodução das minhocas dura quase todo o ano e cada minhoca pode originar 500 descendentes por ano. O período de incubação de uma minhoca pode variar entre dez e vinte e um dias, se as condições do meio forem favoráveis; caso contrário, os casulos não eclodem (LOURENÇO, 2010).

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

O objetivo desta pesquisa foi avaliar a toxicidade aguda e subcrônica dos pesticidas deltametrina e glifosato, utilizando a espécie *Eisenia foetida* (Annelida) como organismo-teste.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar o ensaio (mortalidade, biomassa ou reprodução) mais representativo para o estudo de toxicidade.
2. Avaliar a influência dos dispersantes na toxicidade da formulação comercial de deltametrina.

4 Metodologia

4.1 Amostragem de solo

As amostras de solo foram coletadas na Fazenda Santo Antônio da Invernada, localizada na zona rural de São Carlos, nas seguintes localizações:

- Ponto 1: 22°4'0.29''S;47°46'32.26''O
- Ponto 2: 22°4'30.10''S;47°46'42.37''O

Após as coletas das amostras de solo, foram realizadas ensaios em cromatógrafo para garantir a isenção de pesticidas nas amostras referência. Estes ensaios estão detalhados na tese de doutorado de Fernanda Benetti.

4.2 Caracterização do solo

4.2.1 Análise Granulométrica

A análise granulométrica foram feitas baseadas nas instruções da ABNT 7181 e ABNT 6457. Assim, para esta análise, primeiramente, adicionaram-se 100 mL da solução dispersante em 20 g da amostra. A solução dispersante foi preparada diluindo 45,7 gramas de hexametáfosfato de sódio em 1 litro de água destilada e mantendo-a em agitação até ocorrer a dissolução completa do reagente. Em seguida, a amostra com a solução dispersante foi posta na mesa agitadora (Tecnal TE-140) por 16 horas. Após esse procedimento, a suspensão foi passada numa peneira com malha de 0,05 mm. O material retido pela peneira foi lavado e seco em estufa de secagem e esterilização (Ethik Technology 402/D) a 100°C até atingir uma massa constante. O filtrado foi colocado em uma proveta, a qual foi completada com água destilada.

Posteriormente, foi feita a análise de argila e silte. Para isso, agitou-se a solução presente na proveta até a completa suspensão das partículas, inseriu-se um densímetro dentro da proveta e anotou-se o início da sedimentação. Nos tempos de 0,5; 1; 2; 4; 8; 15; 30; 60; 120; 240 e 480 minutos realizaram-se medições referentes à temperatura e à densidade. Com os dados obtidos, foram calculados o diâmetro máximo da partícula e o percentual deste particulado na suspensão de acordo com as Equações [1] e [2] (Nogueira 2005).

$$d = \sqrt{\frac{1000 \cdot \mu \cdot a}{(\delta - \delta_d) \cdot t}} \quad [1]$$

$$Q = N \cdot \frac{\delta}{(\delta - \delta_d)} \cdot \frac{V \cdot \delta_c \cdot (L - L_d)}{\frac{M_L}{h(10h_0 + h)h} \cdot 100} \quad [2]$$

Onde: d: diâmetro máximo das partículas (mm)

μ : coeficiente de viscosidade da água (Tabelado)

δ : massa específica dos grãos do solo (Tabelado)

δ_d : massa específica do meio dispersor (g cm^{-3})

a: altura de queda das partículas (Tabelado)

t: tempo de sedimentação (s)

Q: porcentagem de particulado na suspensão (%)

N: percentual de material peneirado em 2 mm (%)

V: volume da suspensão (mL)

L: densidade na suspensão (g cm^{-3})

L_d : densidade no meio dispersor (Tabelado)

M_h : peso do material úmido (g)

h: umidade do material (unidade)

Concomitantemente à determinação de silte e argila, determinou-se o conteúdo de areia e pedregulho. Neste contexto, as frações de pedregulhos e areias fina, média e grossa foram determinadas utilizando-se o método de peneiramento. Neste método, o material retido pela peneira de malha 0,05 mm, já seco, é peneirado novamente através de um jogo de peneiras com malhas: 4,8; 9,5; 19,0; 25,0; 38,0 e 50,0 mm. Para auxiliar no peneiramento, o sistema foi colocado em uma mesa agitadora (Tecnal TE-140) durante dez minutos. A massa retida em cada peneira foi anotada e os percentuais da composição do solo foram calculados. A Tabela 2 apresenta a classificação granulométrica de acordo com o diâmetro das partículas (ABNT, 2003).

Ressalta-se que a análise granulométrica foi realizada no Laboratório de Geotecnia da Escola de Engenharia de São Carlos, USP.

Tabela 2 – Classificação Granulométrica

Componente	Diâmetro (mm)
Argila	$d < 0,002$
Silte	$0,002 < d < 0,06$
Areia	Fina $0,06 < d < 0,2$
	Média $0,2 < d < 0,6$
	Grossa $0,6 < d < 2$
Areia	Fina $2 < d < 6$
	Média $6 < d < 20$
	Grossa $d > 20$

4.2.2 Determinação do pH

Primeiramente, a amostra de solo foi triturada e passada em uma peneira de malha de 2,5 mm. Depois, secou-se a amostra em estufa de secagem e esterilização (Ethik Technology 402/D) a 50°C por cerca de 24 horas. Adicionou-se 100 mL de solução de CaCl_2 , com concentração 0,01 mol L^{-1} , a 10 gramas da amostra de solo seca. A suspensão foi mantida na mesa agitadora (Tecnal TE-140) por 30 minutos. Posteriormente, o pH da solução foi determinado por meio do pHmetro digital (Tecnal modelo pH Meter TEC-2). O experimento foi realizado em triplicata (EMBRAPA, 2011).

4.2.3 Determinação do Teor de Matéria Orgânica

O teor de matéria orgânica foi determinado baseado na metodologia de JACKSON (1958). Para isso, a amostra de solo foi triturada e passada em uma peneira de malha de 2,5 mm. Depois, secou-se a amostra em estufa de secagem e esterilização (Ethik Technology 402/D) a 50°C até apresentar uma massa constante e, posteriormente, manteve-se a amostra de solo seco no dessecador. Colocaram-se 10 gramas da amostra seca na mufla (EGG 1800) a 550°C por 4 horas. O experimento foi realizado em triplicata. Com os dados obtidos e por meio da Equação [3], o teor de matéria orgânica foi calculado (EMBRAPA, 2005).

$$\%MO = \frac{Ps - Pm}{Ps} \cdot 100 \quad [3]$$

Onde: %MO: porcentagem de matéria orgânica na amostra

Ps: massa da amostra inicial (g)

Pm: massa da amostra após a combustão (g)

4.2.4 Determinação da Umidade

Colocaram-se cerca de 10 gramas da amostra de solo *in natura* na estufa de secagem e esterilização (Ethik Technology 402/D) a 100-110°C por 24 horas. Para o cálculo da umidade, foi utilizada a Equação [4] das amostras (EMBRAPA, 2011). O experimento foi realizado em triplicata.

$$\%W_{(100-110\text{ }^{\circ}\text{C})} = \frac{M - Ms}{M} \cdot 100 \quad [4]$$

Onde: %W: porcentagem de umidade da amostra

M: massa da amostra inicial (g)

Ms: massa da amostra após a secagem (g)

4.2.5 Determinação da Capacidade de Troca Catiônica (CTC)

A determinação da capacidade de troca catiônica (CTC) foi baseada na metodologia de RODELLA e ALCARDE (1994), a qual é resultado de uma adaptação da metodologia da Association of Official Analytical Chemists, empregada para análise de CTC de turfa. Esta metodologia também foi seguida por FIALHO (2007).

Para analisar esse parâmetro, foram pesados cerca de 2 g de amostra de solo e 1 g de carvão ativado e transferidos juntamente com 100 mL de HCl 0,5 mol L⁻¹ para um balão volumétrico de 250 mL. Esta mistura foi levada para a mesa agitadora (Tecnal TE-140) por 30 minutos. Montou-se o sistema de filtração a vácuo, colocando-se sobre o funil de Buchner um disco de papel de faixa azul. Com o papel umedecido, aplicou-se sucção moderada e transferiu-se a mistura lavando o balão volumétrico com porções de água destilada. Procederam-se sucessivas lavagens do material orgânico retido no funil, desagregando-o com jatos provenientes de uma pisseta e enchendo o funil até 1 cm de sua borda. A próxima lavagem foi realizada após todo líquido da lavagem anterior ter sido drenado.

Fez-se um número de lavagens suficientes para obter um volume de 350 mL no kitassato de 500 mL. Após a fase das lavagens, trocou-se o kitassato por outro de igual capacidade e foram transferidas 10 alíquotas de 10 mL de solução de CaAc_2 0,5 mol L⁻¹ com pH 7,0, sendo distribuídas sobre toda superfície do material orgânico sob vácuo reduzido, para permitir uma lenta percolação. Uma nova porção de solução de acetato de cálcio foi adicionada, após a porção anterior ter sido drenada para o kitassato.

Após a adição dos 100 mL de acetato de cálcio, o material orgânico foi lavado com porções de água destilada até totalizar um volume de, aproximadamente, 300 mL no kitassato. Esta solução foi transferida para um erlenmeyer de 500 mL e titulada com solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹, previamente padronizada. Utilizou-se fenolftaleína como indicador.

Foi conduzida uma análise, empregando-se o carvão ativado e omitindo a presença da amostra. Então, calculou-se a CTC utilizando a Equação [5].

$$CTC = [(Va - Vb) \times (C \div m)] \quad [5]$$

Onde: CTC: Capacidade de Troca Catiônica (mmol_c kg⁻¹)

Va: Volume de solução de NaOH gastos nas titulações das amostras (mL)

Vb: Volume de solução de NaOH gasto na titulação da amostra branco (mL)

C: Concentração da solução padronizada de NaOH (mol L⁻¹)

m: Massa de solo utilizada (kg)

4.2.6 Determinação do Carbono Orgânico Total

A amostra de solo foi triturada e passada em uma peneira de malha de 250 µm. Depois, secou-se a amostra em estufa de secagem e esterilização (Ethik Technology 402/D) a 50°C por cerca de 24 horas. Colocaram-se 100 mg da amostra de solo seca em um equipamento tipo TOC – analisador de carbono Shimadzu (TOC-VCPH, acoplado ao módulo para amostras sólidas SSM-5000A) – para que a porcentagem de carbono total e inorgânico fosse queimado e assim por diferença de massas o equipamento pode calcular o teor de cinzas. O experimento foi realizado em triplicata.

4.3 Ensaio de Toxicidade

4.3.1 Preparação das soluções

Para preparar as soluções de pesticidas que foram aplicadas nas amostras de solo, inseriu-se um determinado volume da solução comercial de pesticida (deltametrina ou glifosato) em um balão volumétrico de 100mL e completou-se com água destilada. Para a determinação do volume de pesticida a ser diluído, utilizou-se a Equação [6].

$$V = \frac{M_s * D}{C_p}$$

Onde: V: Volume da solução comercial de pesticida a ser diluído (mL)

M_s : Massa de solo em cada pote de amostragem (Kg)

D: Dosagem de pesticida requerida na amostra (mg Kg⁻¹)

C_p : Concentração da formulação comercial de pesticida (mg mL⁻¹)

Ressalta-se que as formulações comerciais de deltametrina e de glifosato possuem concentração de 250 mg mL⁻¹ e 480 mg mL⁻¹, respectivamente, e que cada pote de amostragem contém 0,5 Kg de solo.

4.3.2 Organismos-teste

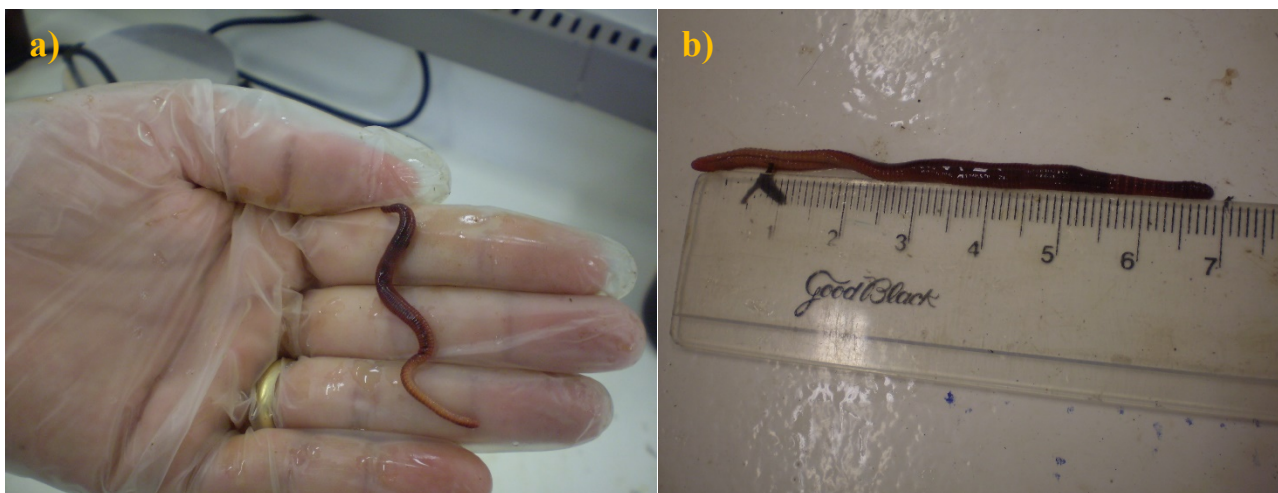
Para o manuseamento dos organismos-teste utilizou-se como base a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos – DBCA (CONCEA, 2013)

Os lotes de minhoca *Eisenia foetida* foram obtidos de produtores na cidade de São Carlos, SP, Brasil e foram conservados e mantidos no Laboratório de Química Ambiental do Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo (LQA / IQSC / USP), São Carlos, SP, Brasil, em uma mistura de latossolo vermelho e esterco bovino seco (50:50 v/v) em recipientes de plástico resistente (15 cm x 15 cm x 10 cm, com fundo arredondado e tampa perfurada) com uma capacidade de 1.000 g de substrato seco, a uma temperatura constante de 20 °C com foto período de 16 h/8 h de luz/escuro. Esta mistura foi umedecida periodicamente para manter o teor de umidade entre 40 e 60%. Os indivíduos utilizados nos testes foram os adultos (com presença de clitelo), com peso médio de 200 mg.

4.3.3 Preparação e montagem dos ensaios

O ensaio de toxicidade foi realizado de acordo com as ISO 11268-1, ISO 11268-2 e ASTM E-1676. O experimento foi realizado em duas fases. Cada fase foi feita em duas etapas e utilizou-se minhocas da espécie *Eisenia foetida* como bioindicadores (Figura 3). Na primeira fase, avaliou-se a toxicidade do glifosato (480 A KB Kelldrin®) e da deltametrina (Deltamax 25 SC) comerciais. Enquanto na segunda fase, avaliou-se mais profundamente a toxicidade da deltametrina comercial (Deltamax 25 SC), comparando-se a toxicidade do produto vendido usualmente e a toxicidade do produto sem o seu princípio ativo, a deltametrina, ou seja, a toxicidade do produto (Deltamax 25 SC) somente com os seus dispersantes (propelente, surfactante e solvente). As etapas de cada fase referem-se aos ensaios de toxicidade aguda (mortalidade), perda de biomassa ao longo do tempo e de reprodução das minhocas.

Figura 3 – a) e b) Minhoca da espécie *Eisenia foetida* utilizado como bioindicador



Na primeira fase, todos os ensaios foram feitos em quintuplicata, com 10 minhocas adultas em cada pote. Na totalidade, o experimento consistiu em dez potes controle (cinco para o ensaio envolvendo o glifosato e cinco para a deltametrina, com 500 g de solo cada) e cinco potes com cada concentração de glifosato e/ou deltametrina (para glifosato: 96 mg kg⁻¹ – concentração recomendada pelo fabricante do herbicida comercial – 3.000, 4.500, 6.000, 7.500 e 10.000 mg kg⁻¹ e para deltametrina: 5 – concentração recomendada pelo fabricante do piretróide comercial – 100, 250, 500, 1.000 e 1.500 mg kg⁻¹), perfazendo um total de 70 potes. Ressalta-se que as altas dosagens adotadas para os ensaios foram escolhidas visando similar situações envolvendo

derramamento, um caso típico de acidente ambiental, onde não se sabe ao certo a quantidade de material que foi derramado, mas que, com certeza, está além dos limites permitidos pelas leis nacionais/internacionais.

Na segunda fase, o planejamento fatorial dos experimentos foi de $(2 \times 4 \times 5) + 5$ amostras controle, ou seja, foram realizados 2 tratamentos (com e sem o princípio ativo – deltametrina) em 4 concentrações distintas (5, 100, 250 e 500 mg kg⁻¹) em 5 repetições. Assim sendo, perfeitamente um total de 45 potes.

A Figura 4 mostra os recipientes plásticos (15 cm x 15 cm x 10 cm, com fundo arredondado e tampa perfurada, de modo a permitir a circulação de ar) em que as amostras foram acondicionadas para a realização do experimento. Foram feitos pequenos orifícios nas tampas dos recipientes, de modo a permitir a circulação de ar. Os recipientes foram mantidos nas bancadas do laboratório a temperatura ambiente.

Figura 4 – a) e b) Recipientes para o acondicionamento das amostras para o experimento



A umidade em todos os potes foi mantida em 60%. O solo utilizado como substrato foi coletado em área rural para melhor reproduzir as condições encontradas nas lavouras. O fato de que o glifosato e a deltametrina não foram provenientes de solução padrão e sim de formulações comerciais disponíveis no mercado nacional, contribui para maior veracidade do experimento. A formulação sem o princípio ativo da deltametrina foi cedida pelo fabricante do piretróide comercial.

4.3.4 Ensaio de Toxicidade Aguda e de Biomassa

Nos dias 0, 7, 14, 21 e 28, as minhocas foram retiradas dos potes, lavadas (como mostrado na Figura 5), secas e pesadas. Para a toxicidade aguda, foram avaliadas as mortes das minhocas ocorridas nas duas primeiras semanas, ou seja, até o 14º dia. As minhocas foram consideradas mortas quando não apresentavam movimento nem respondiam a nenhum estímulo tátil. Como as minhocas tendem a se desintegrar rapidamente, em caso de falta de alguma minhoca, elas foram consideradas mortas. Para o estudo do ganho de biomassa, foram calculadas e analisadas as porcentagens de ganho/perda de biomassa total e entre cada semana até o 28º dia. Semanalmente, monitorou-se também a umidade em cada pote, assim como mostrado na Figura 5.

Figura 5 – Lavagem das minhocas no dia 0 para posterior determinação da biomassa inicial



Figura 6 – Verificação da umidade da amostra



4.3.5 Ensaio de Reprodução

O ensaio de reprodução foi feito posteriormente ao ensaio de ganho de biomassa. Após o 28º dia, as minhocas sobreviventes foram retiradas dos potes e o monitoramento de umidade (60%) continuou até o 56º dia. Neste dia, realizou-se a contagem de ovos e/ou minhocas jovens (Figura 7).

Figura 7 – a), b), c) e d) ovos de minhocas encontradas nas amostras no dia 56; e) minhoca jovem encontrada nas amostras no dia 56



5 Resultados e Discussões

5.1 Caracterização do solo

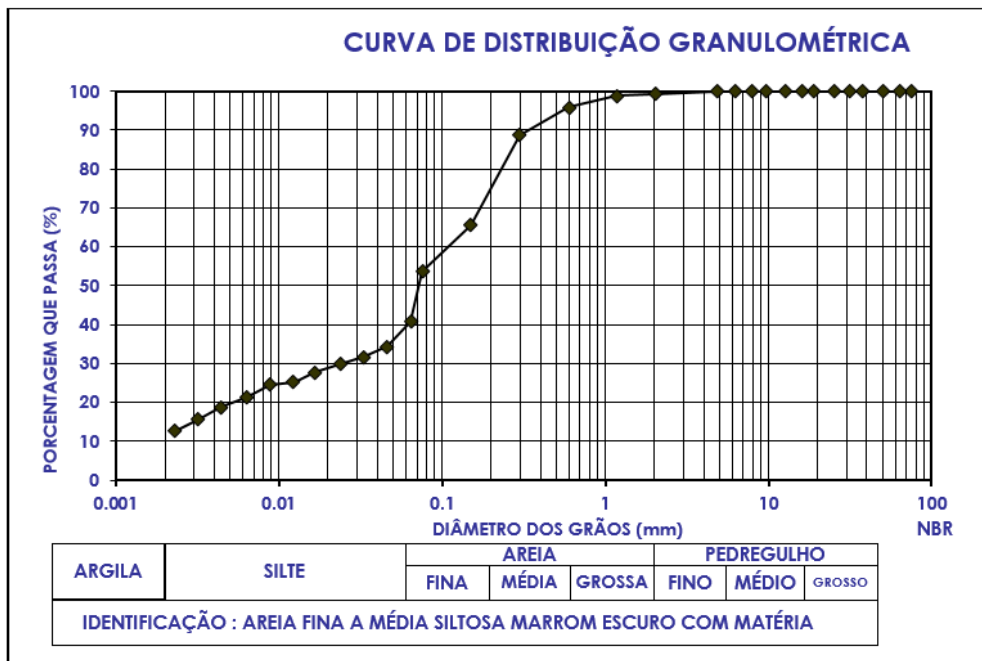
5.1.1 Análise Granulométrica

A Tabela 3 apresenta a composição granulométrica do solo natural utilizado para os testes ecotoxicológicos deste trabalho e a Figura 8 mostra sua respectiva curva granulométrica.

Tabela 3 - Composição mineral do solo natural

Composição	
Material	%
Pedregulho grosso	0,0
Pedregulho médio	0,0
Pedregulho fino	0,0
Areia grossa	4,2
Areia média	20,8
Areia fina	35,0
Silte	27,5
Argila	12,5
Σ (%)	100,0

Figura 8 - Curva de distribuição granulométrica



Analisando os dados obtidos na análise granulométrica, observa-se que o solo amostrado possui uma granulometria arenosa, tendo mais de 50% de areia (fina - 35,% e média – 20,8%) e uma fração significativa de silte (27,5%). Desta forma, o solo foi classificado como areia fina a média siltosa marrom escuro com matéria orgânica. O solo predominantemente arenoso mostra-se favorável à realização do experimento, considerando que uma alta porcentagem de argila e silte adsorveria boa parte dos analitos estudados (glifosato e deltametrina), indisponibilizando uma fração dos destes xenobióticos para o ambiente.

5.1.2 Capacidade de Troca Catiônica (CTC)

A Tabela 4 mostra as capacidades de troca catiônica encontrado nas amostragens de solo.

Tabela 4 - Capacidade de troca catiônica em amostras de solo após a realização dos testes de toxicidade

Capacidade de troca catiônica	mmol _c kg ⁻¹
Solo referência	96,35 ± 5,27
Solo + GLY	99,75 ± 4,55
Solo + DISP	93,47 ± 4,94
Solo + DELTA	105,76 ± 5,29

*GLY – glifosato/DELTA – deltametrina/DISP – dispersante

Analisando os resultados da Tabela 4, induz-se que adição de xenobióticos no solo (deltametrina, glifosato e dispersante) altera a capacidade de troca catiônica do mesmo. Porém, ao

analisar estatisticamente os resultados – ou seja, considerando os desvios-padrão – nota-se que não há significativa alteração da CTC.

A CTC do solo está relacionada com a capacidade de liberação de nutrientes, sendo que uma maior CTC representa maior liberação destes, o que pode favorecer a manutenção da fertilidade por um prolongado período e reduzindo ou evitando a ocorrência de efeitos tóxicos da aplicação de fertilizantes (EMBRAPA, 2010). É importante ressaltar que altas CTC não representam, necessariamente, um solo fértil, e sim que o solo tem uma alta capacidade de reter cátions – os quais podem não ser totalmente benéficos para a flora e biota do solo. Esta análise, apenas evidenciou que a adição de pesticidas não ser significativamente na alteração de algumas características geoquímicas do solo, como a CTC.

5.1.3 pH, Teor de Matéria Orgânica, Umidade e Teor de Carbono Orgânico Total

A **Error! Reference source not found.** mostra os valores de pH, umidade, teor de matéria orgânica e carbono orgânico total obtidos nas análises da caracterização das amostras de solo.

Tabela 4– Resultados da caracterização do solo para as análises de pH, matéria orgânica, umidade e carbono orgânico total.

Amostra	pH	MO (%)	Umidade (%)	COT (%)
1	4,17	12,01	23,97	2,368
2	4,23	12,15	24,61	3,316
3	3,95	12,11	23,99	3,461
Média ± SD	4,12 ± 0,15	12,09 ± 0,07	24,19 ± 0,36	3,05± 0,594

SD = Desvio Padrão, MO = Matéria Orgânica, COT = Carbono Orgânico Total

De acordo com os resultados da Tabela 4, observa-se que o solo é ácido. Embora as minhocas apresentem maior porcentagem de sobrevivência em pH baixo, o valor obtido está abaixo da faixa ótima de pH (5 a 6). Apesar disso, espera-se que o pH não influencie o experimento de forma significativa devido ao fato das minhocas da espécie *Eisenia foetida* possuírem glândulas

calcíferas, as quais permitem o controle da acidez do meio, através da liberação de secreções de carbonato de cálcio (PRIMAVESI, 2002).

Nota-se também que o solo possui um teor de matéria orgânica alto (NASCIMENTO et al., 2010; DICK et al., 2010), representando um fator positivo para o desenvolvimento das minhocas.

Referente a umidade do solo, observa-se que esta é relativamente baixa. Sendo assim, foi necessário o acréscimo frequente de água para manter o teor de água no solo requerida para o experimento (60%). Considerando que as minhocas respiram através da sua pele e que sua morte ocorre quando sua pele seca (LOURENÇO, 2010), a alta umidade do solo é essencial para evitar o óbito das minhocas e, conseqüentemente, prevenir erros acerca da toxicidade aguda dos pesticidas em análise.

O teor de carbono orgânico total está relacionado diretamente com o teor de matéria orgânica, sendo assim quanto maior a quantidade de carbono orgânico total maior será a quantidade de matéria orgânica no solo.

5.2 Ensaio de Toxicidade

Para analisar e discutir mais embasadamente os resultados dos testes de toxicidade, é interessante que as comparações sejam feitas considerando as diferenças estatisticamente significante. Desta forma, os resultados e discussões apresentados nessa seção foram realizados considerando as análises estatísticas ANOVA e Teste de Dunnett, os quais estão detalhados na teses de doutorado de Fernanda Benetti.

5.2.1 Primeira Fase: Toxicidade do Glifosato e da Deltametrina

5.2.1.1 Ensaio de Toxicidade Aguda (mortalidade)

As

Figura 9 e 10 mostram graficamente mostra a média percentual da mortalidade das minhocas *Eisenia foetida* quando expostas à um gradiente de concentração das formulações comerciais de glifosato e de deltametrina, respectivamente, durante 14 dias. Segundo Shi et al (2007), a mortalidade pode ser usada como um indicador de poluição ambiental.

Figura 9 – Mortalidade média de minhocas (*Eisenia foetida*), aos 14 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de glifosato, em solo natural. Barras de erros correspondem a desvios-padrão

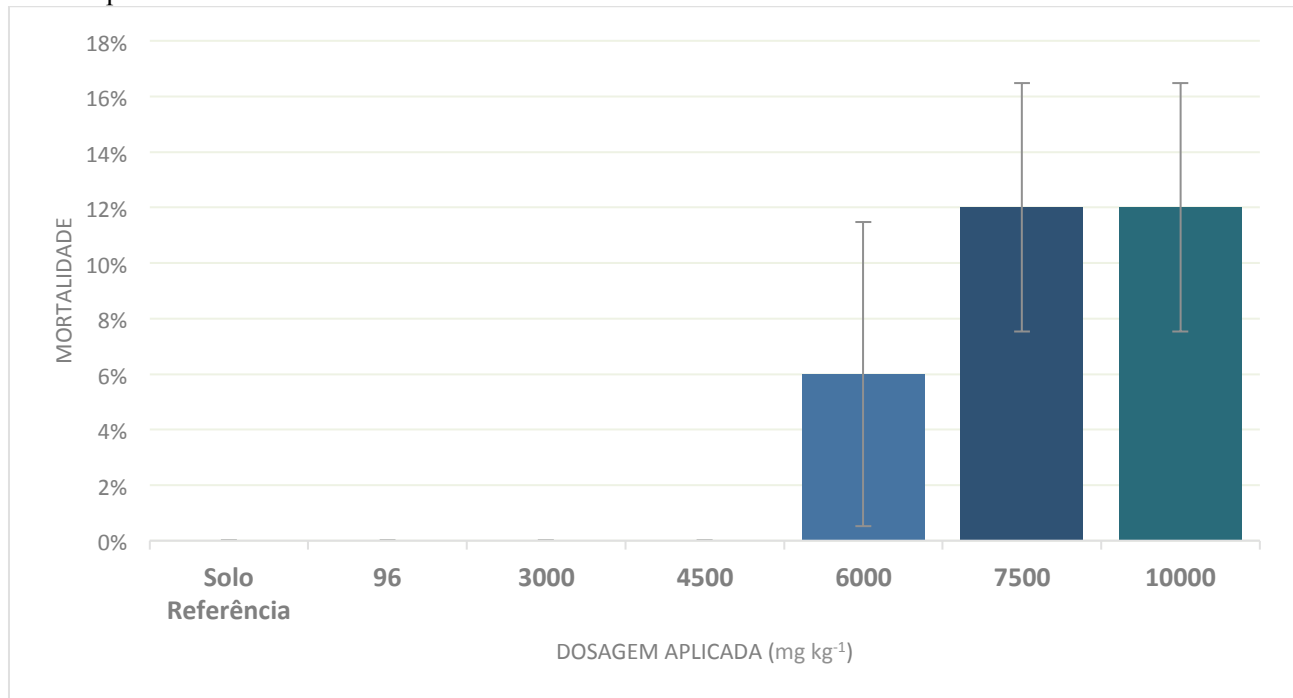
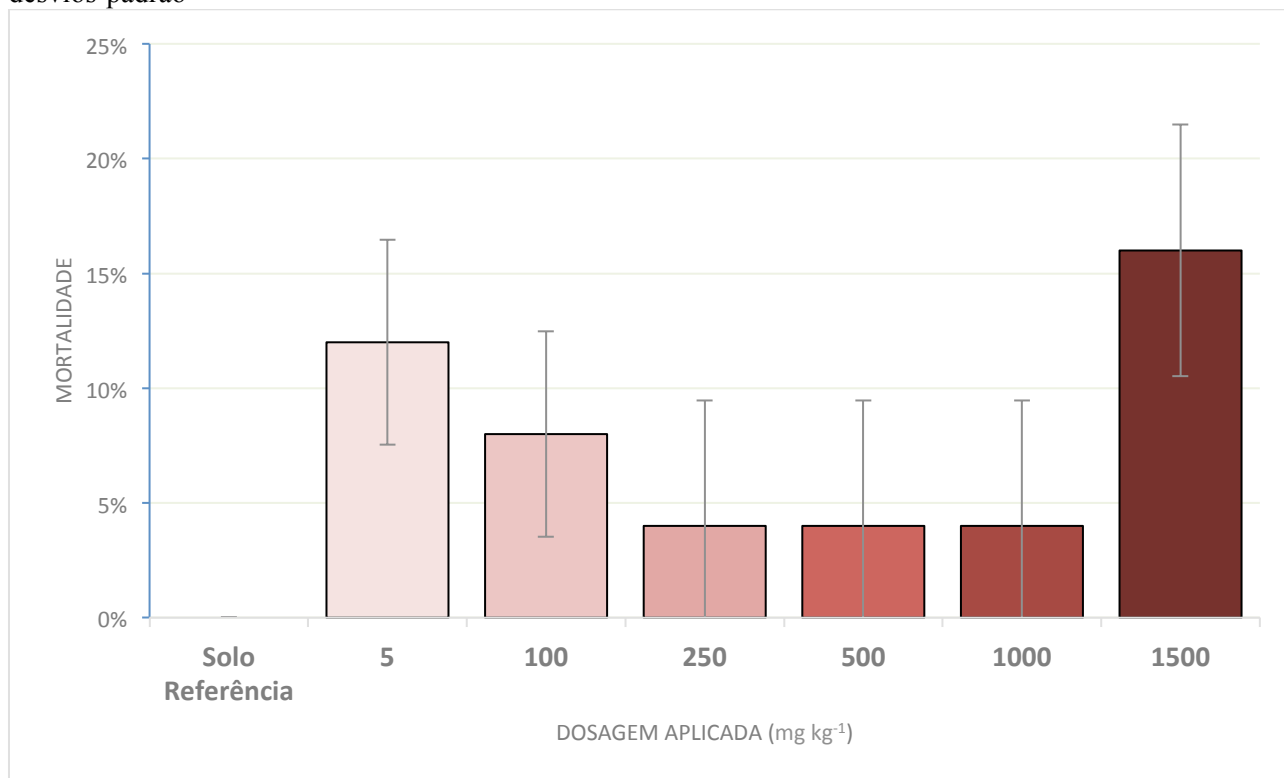


Figura 10 – Mortalidade média de minhocas (*Eisenia foetida*), aos 14 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina, em solo natural. Barras de erros correspondem a desvios-padrão



Analisando-se os dados obtidos, pode-se notar que para concentrações inferiores a 6000 mg kg⁻¹, o glifosato comercial avaliado não apresenta toxicidade aguda. Porém, para dosagens mais elevadas, o efeito tóxico do herbicida torna-se mais evidente, sendo que a maior mortalidade observada foi de 12% ± 4%. Por outro lado, a formulação de deltametrina apresenta efeito tóxico nas minhocas a partir da menor concentração estudada – a qual corresponde à concentração recomendada pelo fabricante – e a maior mortalidade encontrada nos ensaios com deltametrina foi de 16% ± 5%. Neste caso, a concentração limite, ou seja, a concentração que, em tese, seria a máxima que poderia ser utilizada com intuito de não causar nenhum efeito deletério nas minhocas é inferior a 5 mg kg⁻¹. Assim, para encontrar o valor mais preciso para a concentração limite, seria necessário realizar novos estudos com menores concentrações. Ademais, é interessante notar que as concentrações de deltametrina que influenciam negativamente o desenvolvimento das minhocas (acima de 5 mg kg⁻¹) são muito inferiores às do glifosato (superiores a 6000 mg kg⁻¹). Desta forma,

pode-se constatar que a formulação de deltametrina é muito mais tóxica às minhocas da espécie *Eisenia foetida* do que a formulação de glifosato.

Ademais, as minhocas adultas sobreviventes apresentaram alterações morfológicas – principalmente afilamento e fragmentação – e alterações de comportamento (lentidão na resposta a estímulos mecânicos). Essas observações relacionaram-se diretamente ao aumento da dosagem aplicada.

5.2.1.2 Ensaio de Biomassa

Segundo Santadino et al (2014), o número de minhocas, bem como sua biomassa, podem ser influenciados pelo uso regular de pesticidas na agricultura. Desta forma, o ensaio de biomassa objetivou a verificação da existência de alterações na biomassa das minhocas. As Figura 11 e 12 mostram graficamente as médias do percentual de ganho/perda de biomassa das minhocas *Eisenia foetida* quando expostas a um gradiente de concentração das formulações comerciais de glifosato e de deltametrina durante 28 dias.

Figura 11 – Perda de biomassa média de minhocas (*Eisenia foetida*), aos 28 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de glifosato, em solo natural. Barras de erros correspondem aos desvios-padrão.

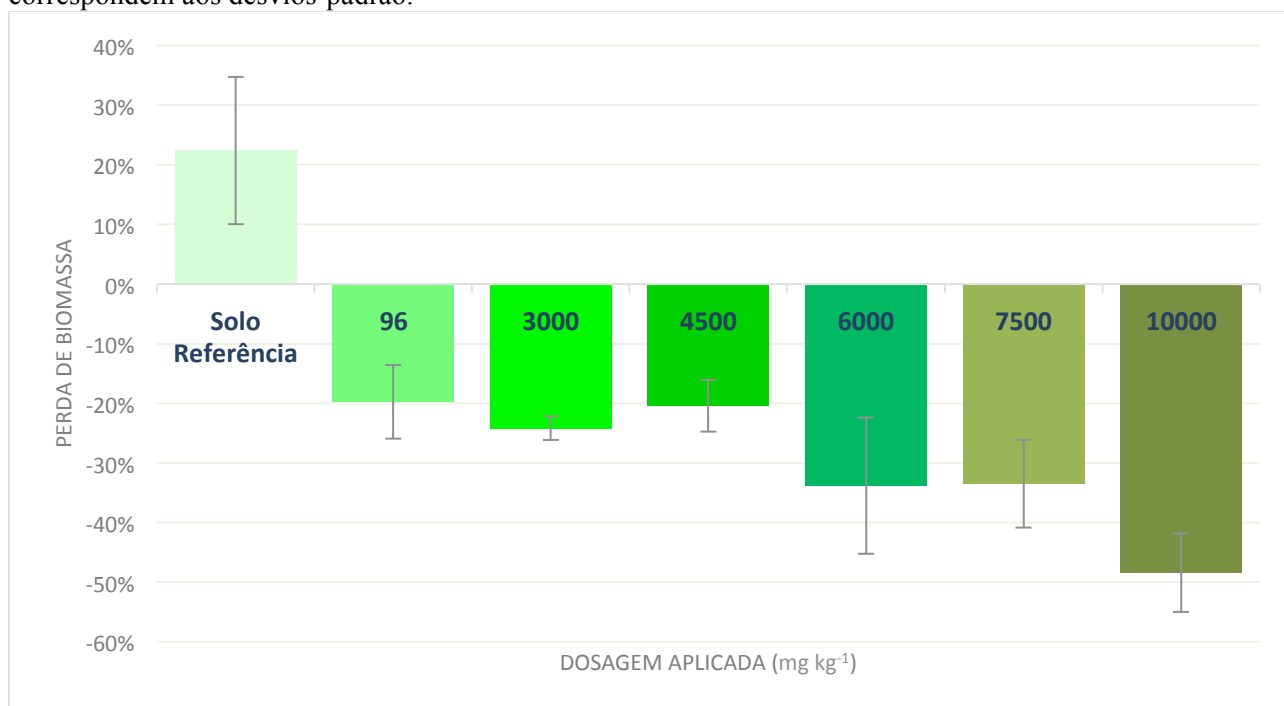
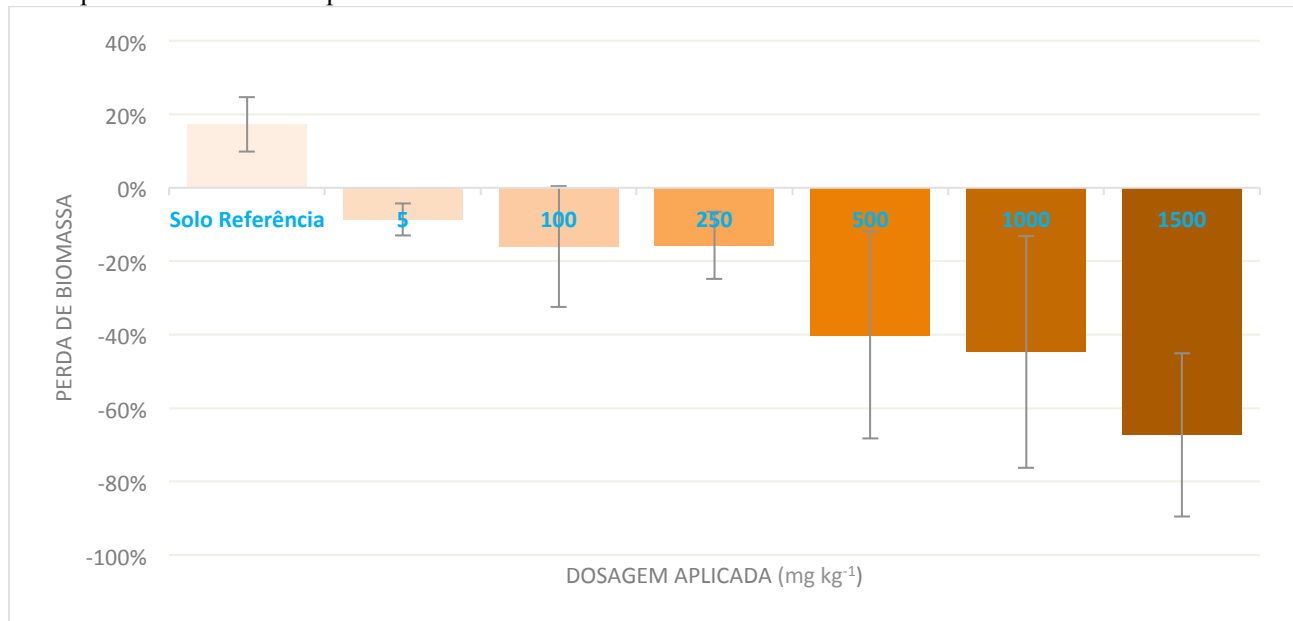


Figura 12 – Perda de biomassa média de minhocas (*Eisenia foetida*), aos 28 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina, em solo natural. Barras de erros correspondem aos desvios-padrão.



Com a realização dos experimentos, notou-se que em ambos os casos (isto é, nos ensaios envolvendo tanto a formulação com deltametrina quanto a com glifosato), todas as dosagens dos pesticidas apresentaram comportamento distintos do controle. Em outras palavras, em todos os experimentos em que haviam uma dosagem de pesticidas, os organismos teste perderam biomassa comparando-se com o início do ensaio; sendo que foi observado uma maior perda de biomassa conforme aumentou-se a concentração de pesticidas aplicada. As mudanças na biomassa podem representar um indicador de estresse químico, ou seja, o contaminante estudado pode afetar quimicamente a dinâmica de obtenção de energia do ser vivo e, finalmente, inibir seu crescimento. A inibição do crescimento das minhocas resultantes da presença do glifosato e da deltametrina no solo pode estar relacionada à estratégia de sobrevivência natural: a redução da ingestão de alimentos visando evitar as toxinas. Esta estratégia é comumente usada em minhocas para evitar o envenenamento com metais pesados e produtos químicos orgânicos (Shi et al, 2014).

5.2.1.3 Ensaio de Reprodução

A ISO 11268-2 estabelece que é necessário que no teste de solo referência haja, no mínimo, 30 minhocas jovens (juvenis) em cada replicata para que o teste de reprodução seja válido. Segundo Santadino et al (2014), a avaliação da transição do organismo jovem para o adulto – isto é, a avaliação do ensaio de reprodução – é o parâmetro mais sensível para a análise de toxicidade. Qualquer alteração nessa dinâmica sugere fortes efeitos subletais e pode conduzi-las à extinção local da população. As Figuras 13 e 14 mostram graficamente a quantidade de organismos encontrados nos ensaios referente ao glifosato e à deltametrina, respectivamente.

Figura 13 – Reprodução de minhocas (*Eisenia foetida*), minhocas jovens e ovos, aos 56 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de glifosato, em solo natural. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.

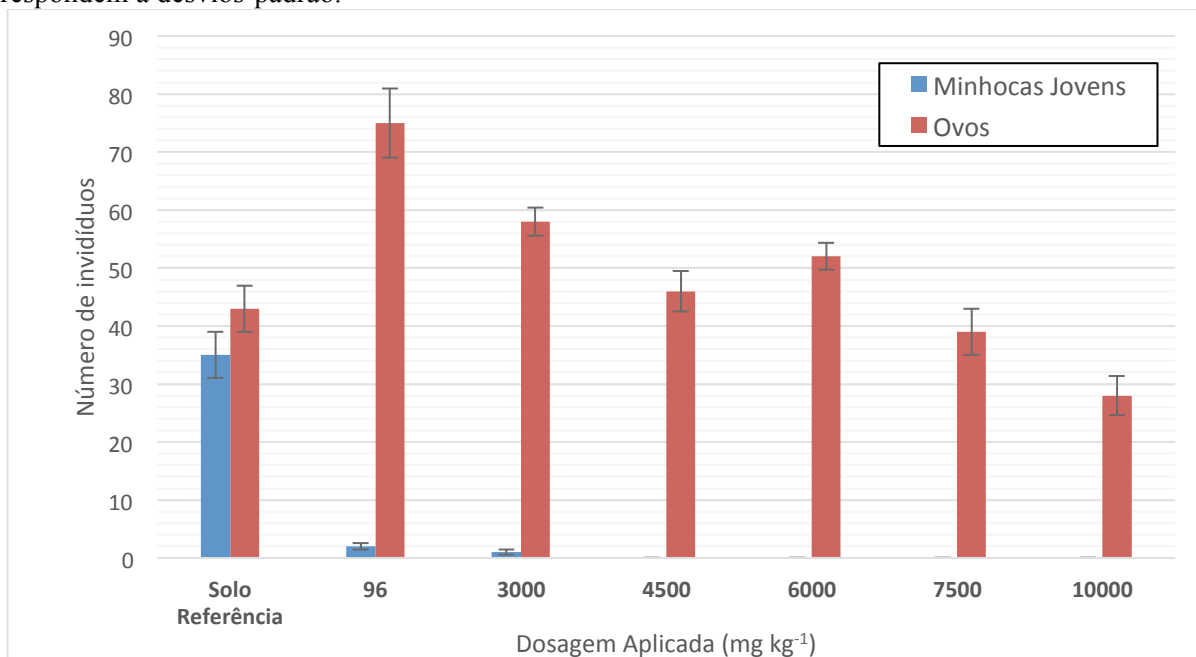
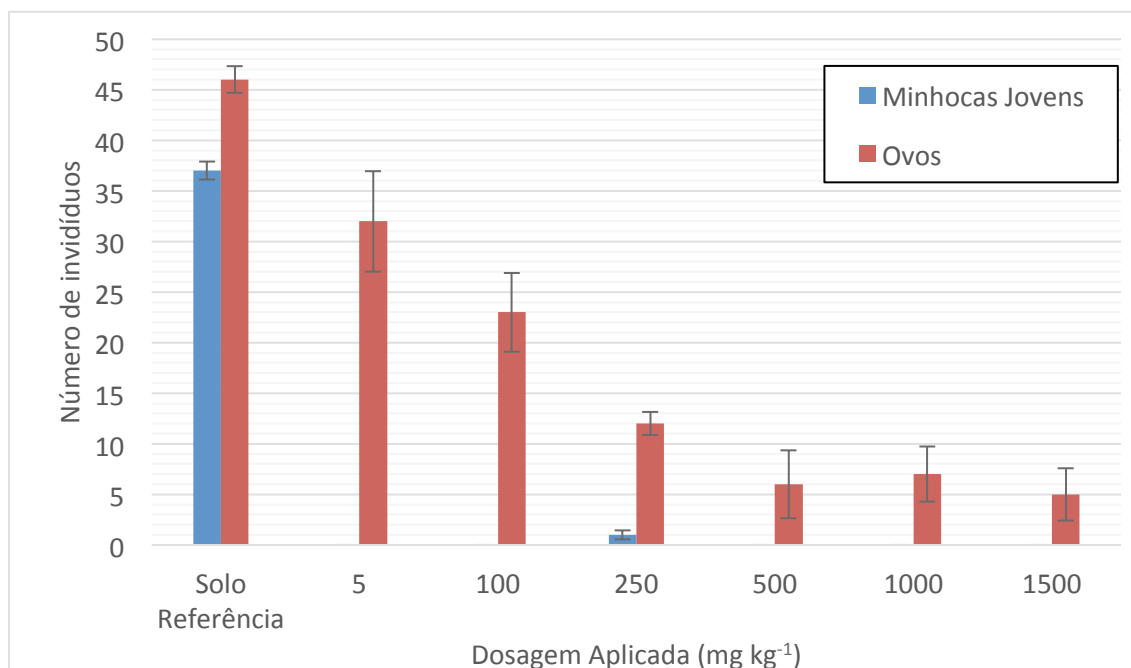


Figura 14 – Reprodução de minhocas (*Eisenia foetida*), minhocas jovens e ovos, aos 56 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina, em solo natural. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.



Analisando os dados obtidos, nota-se que, nas amostras em que havia presença do piretróide ou do herbicida, o número de minhocas jovens nascida foi extremamente baixo ou nulo, ou seja, em nenhum desses casos, este número foi significativo. Não obstante, observou-se que o número de ovos encontrados nas amostras decaía conforme a dosagem dos pesticidas aumentava. Portanto, evidenciou-se que os pesticidas podem influenciar negativamente a reprodução das minhocas *Eisenia foetida*, tanto na formação de ovos – agravando-se o cenário com o aumento da dosagem – quanto na eclosão dos ovos – visto que o número de juvenis decresce sensivelmente com a adição de pesticidas.

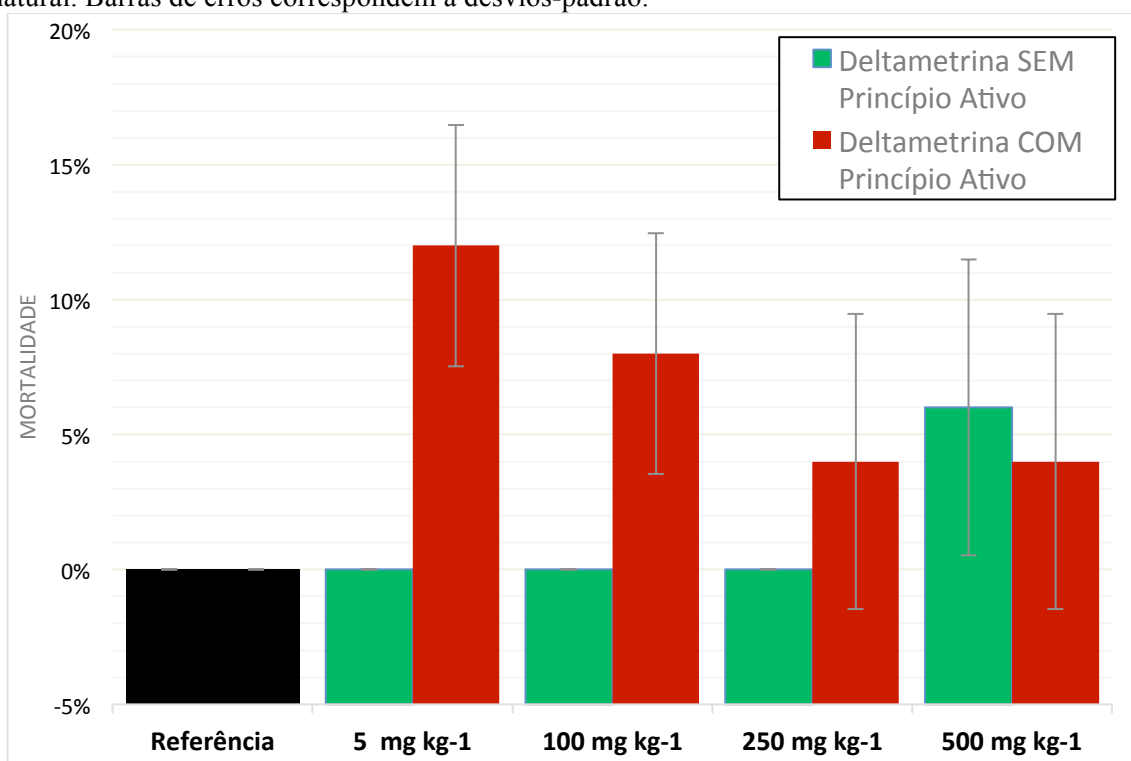
5.2.2 Segunda Fase: Avaliação da influência dos dispersantes na toxicidade da deltametrina comercial

Na primeira fase do experimento, não foi possível afirmar que a deltametrina foi responsável pela toxicidade aguda nas minhocas. Visto que o piretróide não é solúvel em água, é usual a inclusão de dispersantes nas soluções comerciais, podendo assim contribuir negativamente para o desenvolvimento das minhocas. Sendo assim, foi necessário realizar novos ensaios comparando-se os efeitos das formulações com e sem deltametrina.

5.2.2.1 Ensaio de Toxicidade Aguda (mortalidade)

A Figura 15 mostra graficamente a média percentual da mortalidade das minhocas *Eisenia foetida* quando expostas à um gradiente de concentração das formulações de deltametrina, com e sem o seu princípio ativo, durante 14 dias.

Figura 15 – Comparação gráfica da mortalidade média de minhocas (*Eisenia foetida*), aos 14 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação de deltametrina (com e sem o seu princípio ativo), em solo natural. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.



Analisando os resultados obtidos, nota-se que o princípio ativo da formulação comercial de deltametrina é o fator mais influente na toxicidade aguda nas minhocas *Eisenia foetida*, fato evidenciado pelas taxas de mortalidade distintas encontradas em ambos os casos. Para os ensaios referente à formulação comercial com o princípio ativo, observa-se um efeito tóxico nas minhocas para todas as dosagens aplicadas do piretróide. Por outro lado, o efeito tóxico nos ensaios referente aos dispersantes (formulação comercial sem o princípio ativo) só apareceu para a dosagem de 500 mg kg⁻¹.

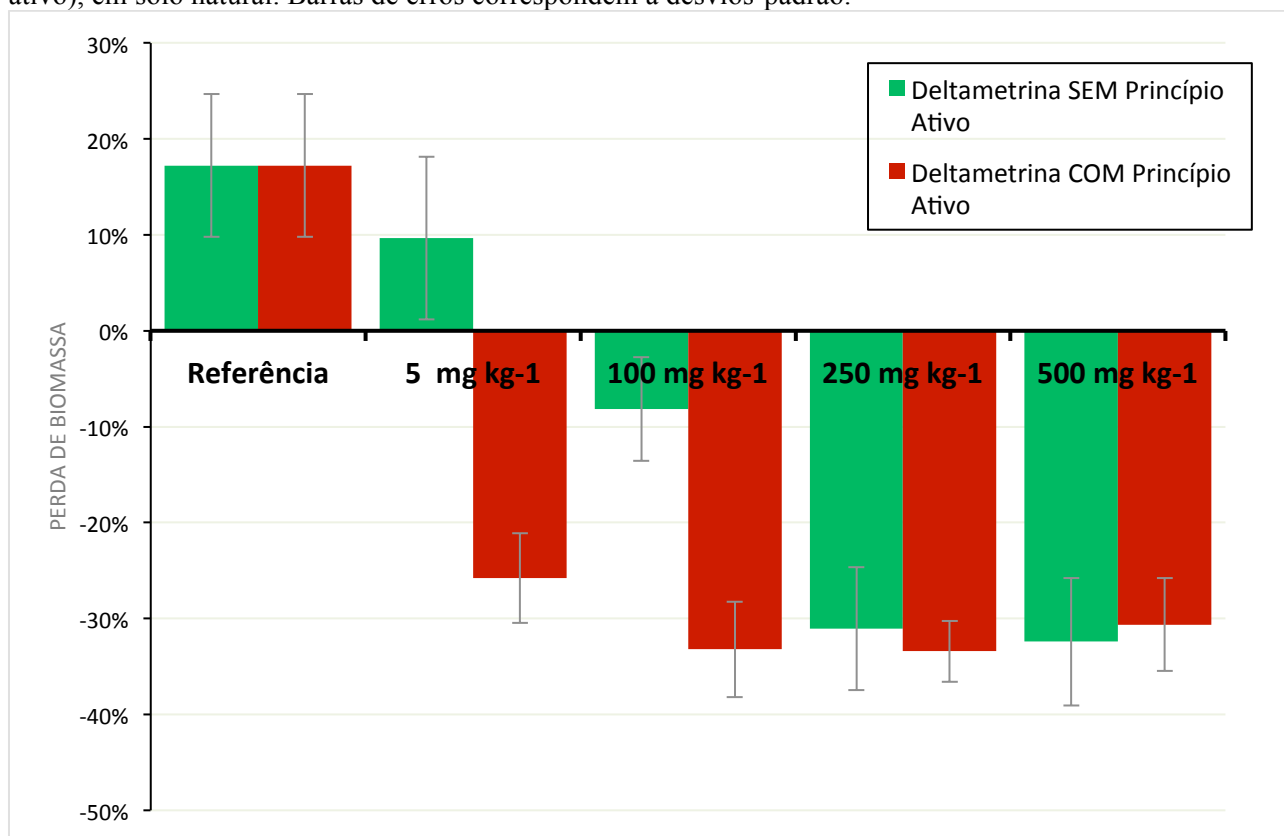
Ademais, as minhocas adultas sobreviventes apresentaram alterações morfológicas – principalmente afilamento e fragmentação – e alterações de comportamento (lentidão na resposta a

estímulos mecânicos). Essas observações relacionaram-se diretamente ao aumento da dosagem aplicada.

5.2.2.2 Ensaio de Biomassa

Segundo Santadino et al (2014), o número de minhocas, bem como sua biomassa, podem ser influenciados pelo uso regular de pesticidas na agricultura. A Figura 16 mostra graficamente as médias do percentual de ganho/perda de biomassa das minhocas *Eisenia foetida* quando expostas à um gradiente de concentração das formulações comerciais de deltametrina, com e sem o seu princípio ativo, durante 28 dias.

Figura 16 – Comparação da perda de biomassa média de minhocas (*Eisenia foetida*), aos 28 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina (com e sem o seu princípio ativo), em solo natural. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.



Com a realização dos experimentos, notou-se que, em ambos os casos (isto é, nos ensaios envolvendo a formulação com deltametrina, tanto com o princípio ativo quanto sem o mesmo), para todas as dosagens das formulações aplicadas – com exceção da concentração de 5 mg kg⁻¹ da formulação apenas com dispersante – obteve-se resultados antagônicos ao do experimento referência. Em outras palavras, em todos os experimentos em que haviam uma dosagem da

formulação de deltametrina, os organismos teste perderam biomassa se comparado com o início do ensaio; sendo observado uma maior perda de biomassa conforme aumentou-se a dosagem aplicada. Até a concentração de 100 mg kg⁻¹, observou-se que a discrepância entre as perdas de biomassa percentuais das formulações com e sem o princípio ativo são muito maiores que a discrepância entre as mesmas se comparado com as dosagens mais elevadas. Assim, para dosagens iguais ou superiores a 250 mg kg⁻¹, a formulação apenas com dispersantes influencia negativamente ao desenvolvimento das minhocas *Eisenia foetida* ao que se refere ao ganho de biomassa.

5.2.2.3 Ensaio de Reprodução

A ISO 11268-2 estabelece que é necessário que no teste de solo referência haja, no mínimo, 30 minhocas jovens (juvenis) em cada replicata para que o teste de reprodução seja válido. As Figuras 17 e 18 mostram graficamente comparação da quantidade de minhocas jovens e de ovos, respectivamente, encontrados nos ensaios referente à formulação de deltametrina, com e sem o seu princípio ativo.

Figura 17 – Comparação dos ensaios de reprodução de minhocas (*Eisenia foetida*), minhocas jovens, aos 56 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina (com e sem o seu princípio ativo), em solo natural. Barras de erros correspondem a desvios-padrão

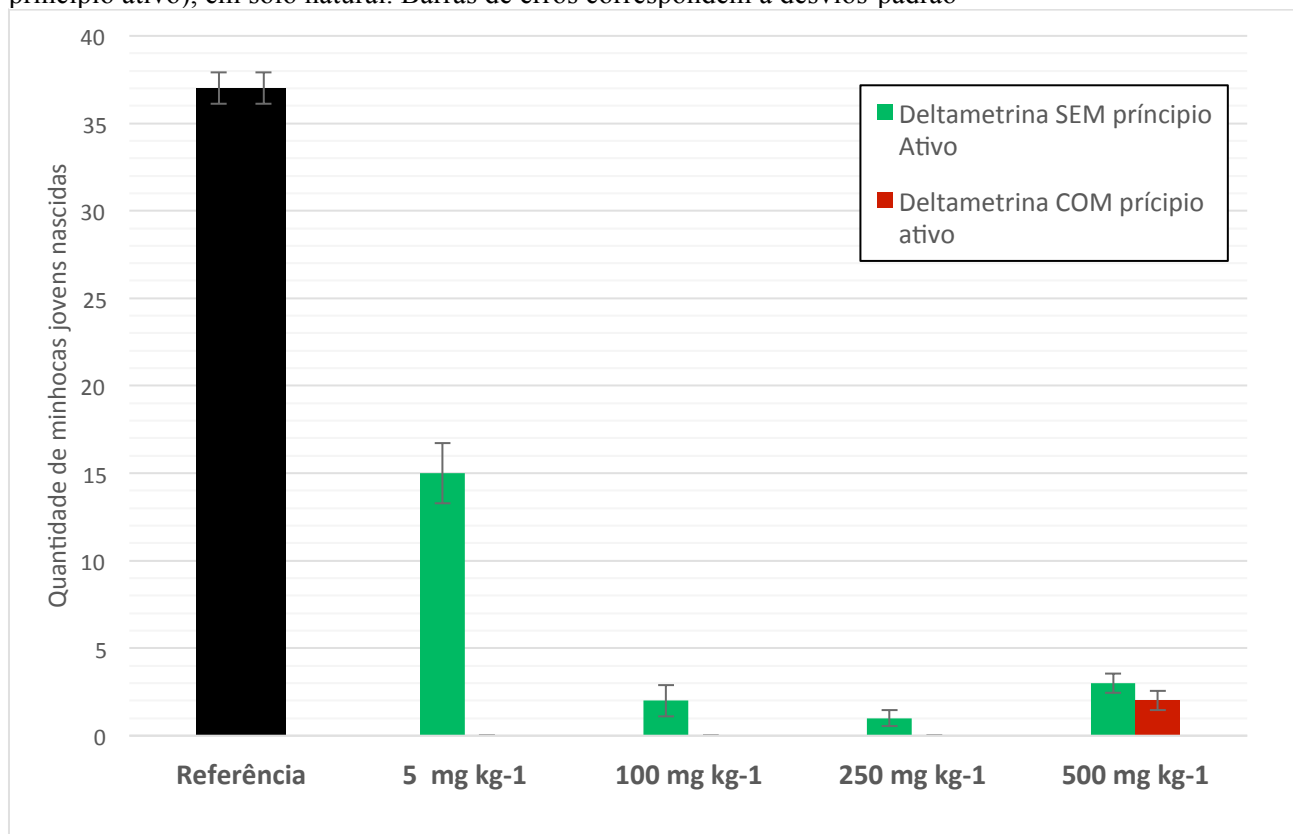
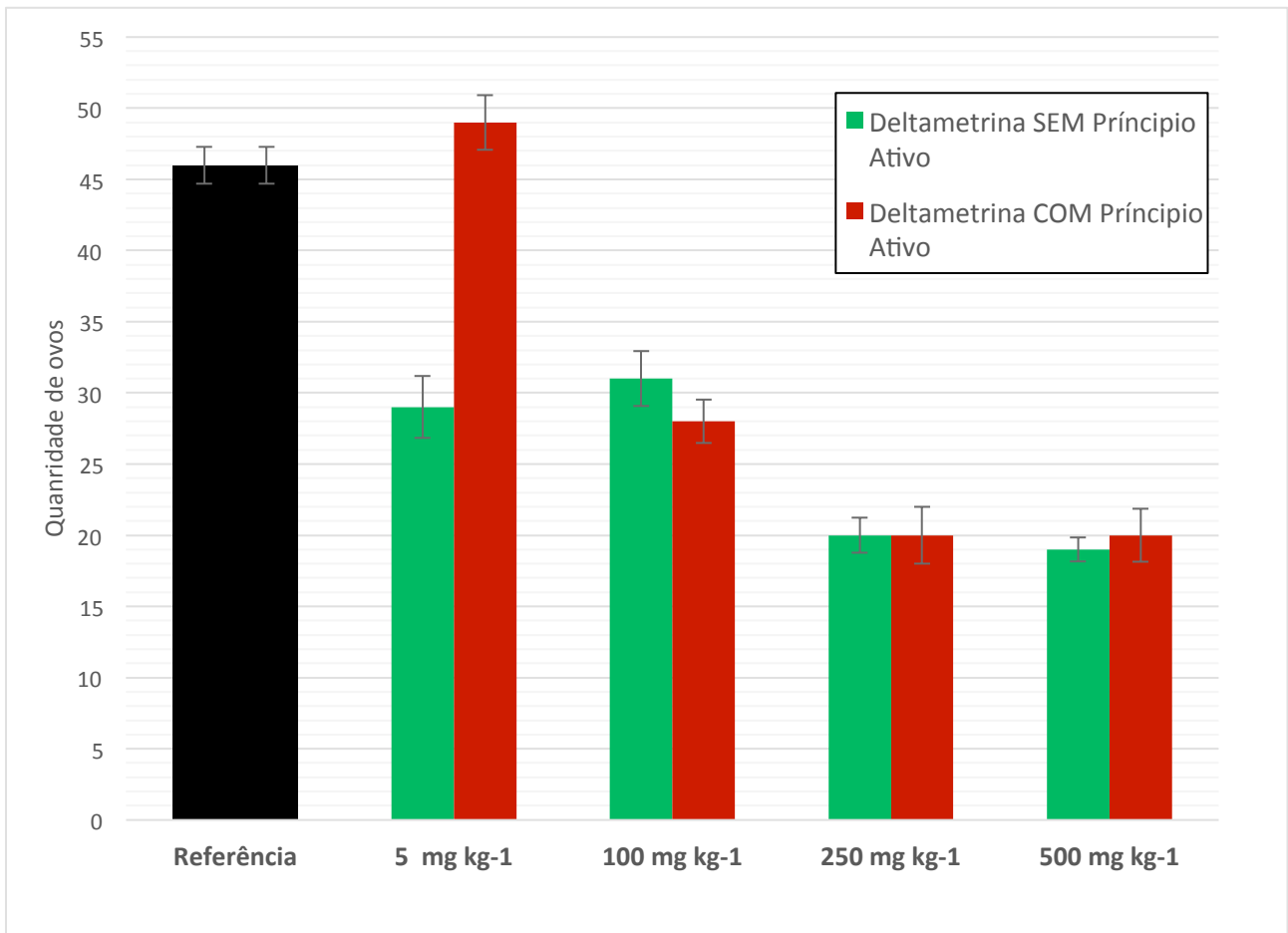


Figura 18 – Comparação dos ensaios de reprodução de minhocas (*Eisenia foetida*), ovos, aos 56 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulação comercial de deltametrina (com e sem o seu princípio ativo), em solo natural. Barras de erros correspondem a desvios-padrão.



Analisando os dados obtidos, nota-se que, nas amostras em que havia presença da formulação de deltametrina (tanto com como sem o princípio ativo), o número de minhocas jovens nascida foi extremamente baixo ou nulo, ou seja, em nenhum desses casos, este número foi significativo. Não obstante, observou-se que o número de ovos encontrados nas amostras decaía conforme a dosagem aplicada aumentava. Portanto, evidenciou-se que, não apenas o princípio ativo da formulação comercial de deltametrina, mas também seus dispersantes podem influenciar negativamente a reprodução das minhocas *Eisenia foetida*, tanto na formação de ovos – agravando-se o cenário com o aumento da dosagem – quanto na eclosão dos ovos – visto que o número de juvenis decresce sensivelmente com a adição da deltametrina comercial.

6 Conclusões

A partir da caracterização do solo, evidenciou-se que o solo de referência não era o ambiente mais favorável à sobrevivência e reprodução das minhocas *Eisenia foetida* – visto que a acidez era alta e a umidade e o carbono orgânico total possuíam um teor relativamente baixo. Todavia, com manutenção da umidade ao longo do tempo e considerando que o solo era arenoso e com baixo teor de matéria orgânica, o experimento pode ser realizado satisfatoriamente sem interferências de condições adversas do meio.

Nos ensaios de toxicidade, ao adicionar os pesticidas no meio, os efeitos observados nas minhocas mostraram-se negativos, tanto em relação à sobrevivência quanto à reprodução, indicando um agravante referente à saúde da fauna edáfica, ao meio ambiente e, por extensão, à saúde humana. É interessante notar que as minhocas responderam de maneiras distintas à exposição ao glifosato e à deltametrina e as características destes xenobióticos podem ter sido relevantes nesse comportamento. O glifosato é um herbicida e a deltametrina, um inseticida, com ação direta no sistema nervoso dos seres vivos. Apesar de o glifosato ser um herbicida – em outras palavras, os alvos desses pesticidas são plantas, os resultados mostraram que há efeito tóxico em minhocas e que não devem ser ignorados por aqueles que o manipulam diariamente.

Para obter informações mais precisas acerca da toxicidade do herbicida e do piretróide estudado, seria interessante realizar novos ensaios com outras faixas de concentração – como por exemplo, dosagens inferiores a 5 mg kg^{-1} para a deltametrina e entre 4500 mg kg^{-1} e 6000 mg kg^{-1} para o glifosato. Assim, seria possível determinar com maior precisão a dosagem mínima que representa toxicidade às minhocas *Eisenia foetida*.

Referentemente à segunda fase do experimento, a partir da comparação das formulações com e sem deltametrina, comprovou-se a toxicidade do piretróide, deixando evidente que os dispersantes utilizados nos produtos comerciais geram efeitos menos relevantes à sobrevivência das minhocas com relação à deltametrina; muito embora, os dispersantes tenham influenciado negativamente a reprodução das minhocas. Enfatiza-se, também, a importância de seguir as instruções do fabricante do produto, pois, como apresentado, a dosagem recomendada resulta em impactos consideravelmente menos significativos sobre a saúde da fauna edáfica. Desta forma, recomenda-se cautela na aplicação do glifosato e deltametrina, visto que o uso indiscriminado de pesticidas pode prejudicar o ecossistema local.

Com relação aos ensaios realizados, como pode ser observado nos resultados obtidos, o ensaio de biomassa foi o mais representativo para a evidência dos efeitos deletérios dos pesticidas estudados. Por fim, salienta-se que, como este trabalho é parte de um estudo maior e mais detalhado de um projeto de doutorado, algumas informações e detalhamento de ensaios não foram apresentados nesta monografia. Por conseguinte, estas informações estão contidas apenas na tese de Fernanda Benetti, a qual será defendida em dezembro de 2015.

7 Referências

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 6457 - Amostras de solo - preparação para ensaios de compactação e ensaios de caracterização.** Rio de Janeiro, p. 9, 1986.

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 7181 – Solo – Análise Granulométrica.** Rio de Janeiro, 1984.

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR NM 248: Agregados – Determinação da Composição Granulométrica.** Rio de Janeiro, 2003.

ALBINATI, A. C. ; MOREIRA, E. L. T. ; ALBINATI, R. C. B. ; CARVALHO, J. V. ; SANTOS, G. B. ; E LIRA, A. D.. **Toxicidade aguda do herbicida roundup® para piauçu (*Leporinus macrocephalus*).** *Rev. Bras. Saúde e Produção Anim.*, vol. 8, pp. 184–192, 2007.

ALOK, A. ;TRIPATHI A. K.; SONI. P., 2008, **Vermicomposting: A Better Option for Organic Solid Waste Management.** *J. Hum. Ecol.*, 24, 59-64.

ANDRÉA, M. M.; **O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos.** *Acta Zoológica Mex.*, no. Número Especial, pp. 95–107, 2010.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Cartilha dobre Agrotóxicos.** Série Trilhas do Campo. p.10, 2011.

ANVISA – AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **NBR ISO/IEC 17.025 : 2005 – Requisitos gerais para competência de laboratórios de calibração e ensaios.** Porto Velho, RO. 2005.

ASTM. American Society Testing Material. **Standard Guide for Conducting a Laboratory Soil Toxicity Test with Lumbricid Earthworm *Eisenia fetida*,** American Society for Testing and Materials, Standard Designation, 1676-1695, 1995.

BORGA, K.H., HOP, J.U., WOLKERS, S.H., GABRIELSEN, G.W. **Selective bioaccumulation of chlorinated pesticides and metabolites in Arctic seabirds.** *Environmental Pollution*, In Pres, 1-9, 2006.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A. **Química dos Agrotóxicos**. Química Nova na Escola, v. 34, p. 10-15, 2012.

CALDAS, E.D., BOON, P.E., TRESSOU, J. **Probabilistic assessment of the cumulative acute exposure to organophosphorus and carbamate insecticides in the Brazilian diet**. Toxicology, v. 222, p. 132-142, 2006.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. **Introdução a métodos cromatográficos**. 1a. ed. Campinas: Editora da Universidade de Campinas, 1987. p. 298

CORREIA, F. V. ; E MOREIRA, J. C.. **Effects of glyphosate and 2,4-D on earthworms (*Eisenia foetida*) in laboratory tests**. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, vol. 85, no. 3, pp. 264–268. 2010.

COSTA, C. R.; OLIVI, P. ; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. . **A toxicidade em ambientes aquáticos: Discussão e métodos de avaliação** *Quim. Nova*, vol. 31, no. 7, pp. 1820–1830, 2008.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C.; **Cromatografia um breve ensaio**. Química nova na escola, v. 7, p. 21-25, 1998.

DICK, D. P.; MARTINAZZO, R.; KNICKER, H.; e ALMEIDA, P. S. G.. **Matéria orgânica em quatro tipos de solos brasileiros: composição química e Sorção de atrazina**. Química Nova, Vol. 33, nº1, p.14-19, 2010.

DUX, J. P. e STALZER, R. F.. **Managing Safety in the Chemical Laboratory**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1988.

EMBRAPA. **Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento. p. 30, 2010.

EMBRAPA. **Manual de métodos de análise de solo**. Rio de Janeiro: EMBRAPA/SOLOS, 2011.

FIALHO, L. L.. **Caracterização da matéria orgânica em processo de compostagem por métodos convencionais e espectroscópicos**. Universidade de São Paulo, 2007.

FILIZOLA, H.F.; FERRACINI, V.K.; SANS, L.M.A.; GOMES, M.A.F.; FERREIRA, C.J.A. **Monitoramento e avaliação do risco de contaminação por pesticidas em água superficial e subterrânea na região de Guáira**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v.327, n. 5, p. 659-667, maio 2002.

HARRIS, D. **Análise Química Quantitativa**. Rio de Janeiro: LTC, 2005. p. 876

IAC (Instituto Agrônomo de Campinas). **Métodos de análise química, mineralógica e física de solos**. Campinas, p.77. 2009.

INCA (Instituto Nacional de Câncer). **Vigilância do Câncer Relacionado ao Trabalho e ao Ambiente**. Ministério da Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância. 2e. rev. atual. – Rio de Janeiro: INCA, 2010.

INMETRO DOQ-CGCRE-008. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**, março 2003.

ISO (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION). **ISO 11268-2 - Soil quality - Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia foetida*) - Part 2: Determination of effects on reproduction**. ISO, Genebra, p. 21, 1998.

JACKSON, M. L.. **Soil chemical analysis**. New York: Prentice Hall, 1958.

KERN, D. I.. **Avaliação da eficiência da ozonização fotocatalítica no tratamento de efluentes de lavanderia hospitalar, por meio de ensaios ecotoxicológicos e genotóxicos**. Dissertação (Mestrado em Gestão e Tecnologia Ambiental). Universidade de Santa Cruz do Sul – UNISC. Santa Cruz do Sul – RS, 2012.

KOMATSU, E.; VAZ, M. **Otimização dos parâmetros de extração para determinação multiresíduo de pesticidas em amostras de água empregando micro extração em fase sólida**. Química Nova, v. 27, n. 5, p. 720-724, 2004.

LANDGRAF, M.D. MESSIAS, R.A. REZENDE, M.O.O. **A Importância Ambiental da Vermicompostagem: Vantagem e Aplicação**, 1^aed., Rima: São Carlos, 105,2005.

LOURENÇO, N. M. G. **Características da minhoca epígea *Eisenia foetida*- Benefícios, características e mais-valias ambientais decorrentes da sua utilização**. Disponível no link: < <http://www.slideshare.net/FuturambGSR/caractersticas-da-minhoca-epgea-eisenia-foetida-benefcios-caractersticas-e-maisvalias-ambientais-decorrentes-da-sua-utilizao> > acessado em 30/05/2013.

MIDIO, A. F.; MARTINS, D. I. **Agentes tóxicos contaminantes indiretos de alimentos**. In: TOXICOLOGIA de alimentos. São Paulo: Varela, 2000. Cap. 4, p.163-252.

NASCIMENTO, P. C.; LANI, J. L.; MENDONÇA, E. S.; ZOFFOLI, H. J. O.; e PEIXOTO, H. T. M. P.. **Teores e características da matéria orgânica de solos hidromórficos do Espírito Santo**. R. Bras. Ci. Solo, p. 339-348, 2010

NETO, B. B.; SCARMINIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Campinas. Editora da Unicamp, 2002. 401p.

OLIVARES, I. R. B. **Desenvolvimento, otimização e validação das técnicas HS-SPME-CG/MS para análise de amostras obtidas no Rio Atibaia através da aplicação de uma sistemática “ISO” para diagnóstico ambiental de áreas contaminadas**. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo (EESC/USP). São Carlos, 2006.

OLIVARES, I. R. B. **Gestão de qualidade em laboratórios**. Campinas: Átomo, 2009. 2ª ed. 146p.

OLIVEIRA, E. M.; COSTA, F. X.; COSTA, C. C. **Reprodução de minhoca (*Eisenia foetida*) em diferentes substratos**. Revista Caatinga (Mossoró, Brasil), v.21 n.5 (Número Especial), p.146-150, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) 2008.

OVIEDO, M. T. P.; TOLEDO, M. C. F.; VICENTE, E. **Resíduos de Agrotóxicos Piretróides em Hortaliças**. Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente, Curitiba, v. 13, p. 9-18, jan./dez. 2003.

PARREIRA, F.V.; ALVES, J.F.; MELLO, G.C.B.; POS, W.H.; VIOLA, Z.G.G.; CARVALHO, C.R. **Monitoramento de pesticidas e outros poluentes orgânicos em recursos hídricos utilizando dispositivos de membranas semipermeáveis**. Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, Curitiba, v. 14, p.109–120, jan./dez. 2004.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. R. L. **Análise de resíduos de agrotóxicos em tomates empregando dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) e cromatografia gasosa**. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Química. Minas Gerais, 2009.

PRIMAVESI, A.. **Manejo Ecológico do Solo**. São Paulo: Nobel, 2002.

RIBANI, M.; COLLINS, C. B. G. B.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. **Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos**. Química Nova, Vol. 27, No. 5, 771-780, 2004

RODELLA, A. A. e ALCARDE, J. C..**Avaliação de materiais orgânicos empregados como fertilizantes.** *Sci. Agric.*, vol. 51, no. 3, pp. 556–562, Dec. 1994.

ROTUNDO, M. **Exposição dérmica de trabalhadores a resíduos de deltametrina presentes nas plantas, na reentrada na lavoura de algodão após pulverização.** Dissertação (Mestrado em Sistemas de Produção) – Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Ilha Solteira, 2007.

RUPPENTHAL, J. E.. **Toxicologia.** Universidade Federal de Santa Maria, Colégio Técnico Industrial de Santa Maria; Rede e-Tec Brasil, 2013. [Online] Disponível em: < http://estudio01.proj.ufsm.br/cadernos_seguranca/sexta_etapa/toxicologia.pdf >. Acessado em: 24/07/2015.

SANTADINO, M.; COVIELLA, C.; E MOMO, F.. **Glyphosate Sublethal Effects on the Population Dynamics of the Earthworm *Eisenia fetida* (Savigny, 1826).** *Water, Air, Soil Pollut.*, vol. 225, no. 12, 2014.

SAVOY, V. L. T.. **Classificação dos Agrotóxicos.** Instituto Biológico, Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Proteção Ambiental, São Paulo, v.73, n.1, p.91-92, jan./jun., 2011

SHI, Y.; SHI, Y.; WANG, X.; LU, Y. E YAN, S.. **Comparative effects of lindane and deltamethrin on mortality, growth, and cellulase activity in earthworms (*Eisenia fetida*).** *Pestic. Biochem. Physiol.*, vol. 89, no. 1, pp. 31–38, Sep. 2007

SILVA, A. P.; ALVES, M. C. C. **Como Iniciar A Validação De Métodos Analíticos.** In: ENQUALAB-2006 - Congresso e Feira da Qualidade em Metrologia. Rede Metrológica do Estado de São Paulo – REMESP. São Paulo, junho de 2006.

TOCCHETTO, M. R. L., **Toxicologia e Segurança no Trabalho.** Caderno Didático (Cursos de Química Industrial e Licenciatura) – Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2007

VELKI, M.; e HACKENBERGER, B. K.; **Biomarker responses in earthworm *Eisenia andrei* exposed to pirimiphos-methyl and deltamethrin using different toxicity tests.** *Chemosphere*, vol. 90, no. 3, pp. 1216–26, Jan. 2013.

WANG, Y.; WU, S.; CHEN, L.; WU, C.; YU, R.; WANG, Q.; E ZHAO, X.; **Toxicity assessment of 45 pesticides to the epigeic earthworm *Eisenia fetida***. *Chemosphere*, vol. 88, no. 4, pp. 484–91, Jul. 2012.

Anexo A: Materiais e reagentes utilizados nos ensaios

Vidrarias

- Balão volumétrico (10 e 250 mL);
- Erlenmeyer (500 mL);
- Funil de Buchner;
- Kitassato (500 mL);
- Peneira (2,5 mm);
- Proveta (25, 100 e 1000 mL);
- Recipiente de plástico resistente (15x15x10).

8 Reagentes

- Água destilada;
- Carvão ativado;
- Deltamax® 25 SC (Insetimax Indústria Química LTDA);
- Dispersante do Deltamax 25 SC (propelente, surfactante e solvente)
- Fenolftaleína 0,01%;
- Glifosato® AKB 400 (Kelldrin Indústria e Comércio de Produtos Químicos e Agrícolas LTDA);
- Hexametáfosfato de sódio;
- Solução de CaAc_2 0,5 mol L⁻¹;
- Solução de CaCl_2 0,01 mol L⁻¹;
- Solução de HCl 0,5 mol L⁻¹;
- Solução de NaOH 0,1 mol L⁻¹.

Equipamentos

- Analisador de carbono Shimadzu (TOC-VCPH, acoplado ao módulo para amostras sólidas SSM-5000A);
- Balança analítica (BG 1000 Gehaka);
- Densímetro;

- Dessecador;
- Espectrofotômetro HACH (DR 6000);
- Estufa de secagem e esterilização (Ethik Technology 402/D);
- Jogo de peneiras de malhas: 4,8; 9,5; 19,0; 25,0; 38,0 e 50,0 mm;
- Mesa agitadora (Tecnal TE-140);
- Mufla (EGG 1800);
- pHmetro digital (Tecnal modelo pH Meter TEC-2).

Outros

- Minhocas *Eisenia foetida*;
- Papel de filtro;
- Solo natural coletado em área rural (localização 21°56'6"S, 47°54'16"O).

Anexo B: Tabelas referente à fase 1 dos ensaios de toxicidade

Tabela B.1 – Mortalidade média de minhocas (*Eisenia foetida*), aos 14 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulações comerciais de glifosato e de deltametrina, em solo natural.

Pesticida	Tratamento	Média do número de minhocas mortas até o dia 14
Glifosato	Solo Referência	0,0 ± 0,0
	96 mg kg ⁻¹	0,0 ± 0,0
	3000 mg kg ⁻¹	0,0 ± 0,0
	4500 mg kg ⁻¹	0,0 ± 0,0
	6000 mg kg ⁻¹	0,6 ± 0,5
	7500 mg kg ⁻¹	1,2 ± 0,4
	10000 mg kg ⁻¹	1,2 ± 0,4
Deltametrina	Solo Referência	0,0 ± 0,0
	5 mg kg ⁻¹	1,2 ± 0,4
	100 mg kg ⁻¹	0,8 ± 0,4
	250 mg kg ⁻¹	0,4 ± 0,5
	500 mg kg ⁻¹	0,4 ± 0,5
	1000 mg kg ⁻¹	0,4 ± 0,5
	1500 mg kg ⁻¹	1,6 ± 0,5

Tabela B.2 – Média do ganho de biomassa do teste de toxicidade envolvendo minhocas *Eisenia foetida* em formulações comerciais de glifosato e de deltametrina durante 28 dias, em solo natural.

Pesticida	Tratamento	Média do percentual de perda de biomassa até o dia 28
Glifosato	Solo Referência	22,4% ± 12,39%
	96 mg kg ⁻¹	-19,77% ± 6,17%
	3000 mg kg ⁻¹	-24,19% ± 1,99%
	4500 mg kg ⁻¹	-20,37% ± 4,38%
	6000 mg kg ⁻¹	-33,82% ± 11,42%
	7500 mg kg ⁻¹	-33,48% ± 7,36%
	10000 mg kg ⁻¹	-48,43% ± 6,57%
Deltametrina	Solo Referência	17,24% ± 7,50%
	5 mg kg ⁻¹	-8,68% ± 4,40%
	100 mg kg ⁻¹	-16,03% ± 16,40%
	250 mg kg ⁻¹	-15,66% ± 9,10%
	500 mg kg ⁻¹	-40,15% ± 28,10%
	1000 mg kg ⁻¹	-44,69% ± 31,60%
	1500 mg kg ⁻¹	-67,29% ± 22,30%

Tabela B.3 – Resultado do teste de reprodução para minhocas *Eisenia foetida*, ao final de 56 dias, na presença de gradiente de formulação comercial do herbicida glifosato e do piretróide deltametrina, em solo natural.

Pesticida	Tratamento	Número de organismos	
		Minhocas jovens	Ovos
Glifosato	Solo Referência	35 ± 4	43 ± 4
	96 mg kg ⁻¹	2 ± 1	75 ± 6
	3000 mg kg ⁻¹	1 ± 0	58 ± 2
	4500 mg kg ⁻¹	0 ± 0	46 ± 3
	6000 mg kg ⁻¹	0 ± 0	52 ± 2
	7500 mg kg ⁻¹	0 ± 0	39 ± 4
	10000 mg kg ⁻¹	0 ± 0	28 ± 3
Deltametrina	Solo Referência	37 ± 1	46 ± 1
	5 mg kg ⁻¹	0 ± 0	32 ± 5
	100 mg kg ⁻¹	0 ± 0	23 ± 4
	250 mg kg ⁻¹	1 ± 0	12 ± 1
	500 mg kg ⁻¹	0 ± 0	6 ± 3
	1000 mg kg ⁻¹	0 ± 0	7 ± 3
	1500 mg kg ⁻¹	0 ± 0	5 ± 3

Anexo C: Tabelas referente à fase 2 dos ensaios de toxicidade

Tabela C.1 – Mortalidade média de minhocas (*Eisenia foetida*), aos 14 dias, quando expostas a diferentes concentrações de formulações comercial de deltametrina (com e sem o seu princípio ativo), em solo natural.

Formulação de deltametrina	Tratamento	Média do número de minhocas mortas até o dia 14
SEM o princípio ativo	Solo Referência	0,0 ± 0,0
	5 mg kg ⁻¹	0,0 ± 0,0
	100 mg kg ⁻¹	0,0 ± 0,0
	250 mg kg ⁻¹	0,0 ± 0,0
	500 mg kg ⁻¹	0,6 ± 0,5
COM o princípio ativo	Solo Referência	0,0 ± 0,0
	5 mg kg ⁻¹	1,2 ± 0,4
	100 mg kg ⁻¹	0,8 ± 0,4
	250 mg kg ⁻¹	0,4 ± 0,5
	500 mg kg ⁻¹	1,6 ± 0,5

Tabela C.2 – Média do ganho de biomassa percentual do teste de toxicidade envolvendo minhocas *Eisenia foetida* em formulações comerciais de deltametrina (com e sem o seu princípio ativo) durante 28 dias, em solo natural.

Formulação de deltametrina	Tratamento	Média do percentual de perda de biomassa até o dia 28	
COM o princípio ativo	Solo Referência	17,2% ± 7,5%	
	5 mg kg ⁻¹	-25,8% ± 4,7%	
	100 mg kg ⁻¹	-33,2% ± 5,0%	
	250 mg kg ⁻¹	-33,4% ± 3,2%	
	500 mg kg ⁻¹	-30,7% ± 4,8%	
SEM o princípio ativo	Solo Referência	17,2% ± 7,5%	
	5 mg kg ⁻¹	9,7% ± 8,5%	
	100 mg kg ⁻¹	-8,2% ± 5,4%	
	250 mg kg ⁻¹	-31,0% ± 6,4%	
	500 mg kg ⁻¹	-32,4% ± 6,7%	

Tabela C.3 – Resultado do teste de reprodução para minhocas *Eisenia foetida*, ao final de 56 dias, na presença de gradiente de formulação comercial de deltametrina (com e sem o seu princípio ativo), em solo natural.

Formulação de deltametrina analisada	Tratamento	Número de organismos	
		Minhocas jovens	Ovos
COM Princípio ativo	Solo Referência	37 ± 1	46 ± 1
	5 mg kg ⁻¹	0 ± 0	49 ± 2
	100 mg kg ⁻¹	0 ± 0	28 ± 2
	250 mg kg ⁻¹	0 ± 0	20 ± 2
	500 mg kg ⁻¹	2 ± 1	20 ± 2
SEM Princípio ativo	Solo Referência	37 ± 1	46 ± 1
	5 mg kg ⁻¹	15 ± 2	29 ± 2
	100 mg kg ⁻¹	2 ± 1	31 ± 2
	250 mg kg ⁻¹	1 ± 0	20 ± 1
	500 mg kg ⁻¹	3 ± 1	19 ± 1

Anexo D: Trabalhos Apresentados em Congressos

BENETTI, F.; PIGATIN, L. B. F.; **KANASHIRO, M. M.**; RODRIGUES, R. N.; REZENDE, M. O. O. Use of FTIR and UV-Vis spectroscopy for analyze structural changes of humic acids after hummus aditon (filter cake and orange pel) in soil contaminated with deltamethrin. In: 17th Meeting of the International Meeting Substances Society, Ioannina, 2014.

BENETTI, F.; PIGATIN, L. B. F.; **KANASHIRO, M. M.**; RODRIGUES, R. N.; REZENDE, M. O. O. Influence of the presence of humus in the humification degree of soil contaminated by commercial deltamethrin via fluorescence spectroscopy. In: 248th ACS National Meeting, San Francisco. 248th ACS National Meeting, 2014. v. 1.

PIGATIN, L. B. F.; BENETTI, F.; RODRIGUES, R. N.; **KANASHIRO, M. M.**; LANDGRAF, M. D.; BORSATO, A. V.; REZENDE, M. O. O. Influence of the presence of dispersants in commercial deltamethrin on acute toxicity in *Eisenia foetida* earthworms. In: 34th SETAC North America, Nashville - TN. Society of Environmental Toxicology and Chemistry - Harmonizing Science Across Disciplines. Pensacola - FL: Society of Environmental Toxicology and Chemistry, 2013. v. 1. p. 316.

BENETTI, F.; PIGATIN, L. B. F.; **KANASHIRO, M. M.**; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O. Estudo das mudanças estruturais da matéria orgânica do solo em função da aplicação de vermicomposto e sua influência sobre a toxicidade de glifosato em minhocas *Eisenia foetida*. In: X Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas, Goiania - GO, 2013. v. 1. p. 220-222.

MENDES, L. A. ; BUCATER, L. F. P. ; **KANASHIRO, M. M.** ; LANDGRAF, M. D. ; REZENDE, M. O. O. . Influence of the incorporation of organic matter in the retention of Pb, Cr and Cu cations in soil. In: The 16th Meeting of the International Humic Substances Society, Hangzhou, China. Functions of natural organic matter in changing environment. Zhejiang: Springer, 2012. v. 1. p. 367-369.

PIGATIN, L. B. F.; BENETTI, F.; **KANASHIRO, M. M.**; FERRER, R. S.; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O. Bioindicadores: reprodução de minhocas *Eisenia foetida* em solo com aplicação de resíduo orgânico fresco e vermicompostado. In: XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, Porto de Galinhas - PE. 2012.

BENETTI, F.; PIGATIN, L. B. F. ; **KANASHIRO, M. M.** ; LANDGRAF, M. D. ; REZENDE, M. O. O. . Bioensaio para monitoramento reprodutivo em minhocas da espécie *Eisenia foetida* na presença de glifosato comercial. In: XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, Porto de Galinhas - PE. 2012.

BENETTI, F. ; PIGATIN, L. B. F. ; SANTOS, A. ; **KANASHIRO, M. M.** ; LANDGRAF, M. D. ; REZENDE, M. O. O. . Avaliação do ganho de biomassa em minhocas da espécie *Eisenia foetida* na presença de glifosato comercial em diversas concentrações. In: XII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, Porto de Galinhas - PE. 2012.

BENETTI, F. ; PIGATIN, L. B. F. ; MENDES, L. A. ; **KANASHIRO, M. M.** ; SANTOS, A. ; NUNES, R. R. ; LANDGRAF, M. D. ; REZENDE, M. O. O. . Influence of the presence of vermicompost in the toxicity of glyphosate on *Eisenia foetida* earthworms. In: Society of Environmental Toxicology and Chemistry North America 33rd Annual Meeting, Long Beach, USA. 2012. v. 1. p. 231-231.

PIGATIN, L. B. F. ; BENETTI, F. ; SANTOS, A. ; MENDES, L. A. ; **KANASHIRO, M. M.** ; NUNES, R. R. ; LANDGRAF, M. D. ; REZENDE, M. O. O. . Use of ecotoxicological tests to evaluate the acute toxicity and increase of biomass of earthworms *Eisenia foetida* acclimated in fresh and vermicomposted organic residue. In: Society of Environmental Toxicology and Chemistry North America 33rd Annual Meeting, Long Beach, USA. 2012.