



Contemporânea

Contemporary Journal

3(8): 13087-13106, 2023

ISSN: 2447-0961

Artigo

TOXICIDADE DE OXICLORETO DE COBRE E MANCOZEB PARA *EISENIA FETIDA* (OLIGOCHAETA)

TOXICITY OF COPPER OXYCHLORIDE AND MANCOZEB TO *EISENIA FETIDA* (OLIGOCHAETA)

DOI: 10.56083/RCV3N8-172

Recebimento do original: 31/07/2023

Aceitação para publicação: 29/08/2023

Marcos Vinicius Bastos Garcia

Doutor em Agricultura

Instituição: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Endereço: Rodovia AM-010, Km 29, Zona Rural, Manaus – AM, CEP: 69010-970

E-mail: marcos.garcia@embrapa.br

Camila Correia Mestrinho

Mestra em Agronomia

Instituição: Secretaria Municipal de Meio Ambiente e Sustentabilidade (SEMMAS)

Endereço: Rua Rubídio, 288, Vila da Prata, Manaus – AM, CEP: 69030-530

E-mail: camilamestrinho.semmas@gmail.com

Cintia Carla Niva

Doutora em Ciência Molecular

Instituição: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Endereço: Rodovia BR-020, Km 18, Planaltina – DF, CEP: 73310-970

E-mail: cintia.niva@embrapa.br

Terezinha Batista Garcia

Mestra em Fitotecnia

Instituição: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

Endereço: Rodovia AM-010, Km 29, Zona Rural, Manaus – AM, CEP: 69010-970

E-mail: terezinha.garcia@embrapa.br

Jörg Römbke

Doutor em Biologia

Instituição: ECT Oekotoxikologie GmbH

Endereço: Böttgerstraße 2 – 14, Flörsheim am Main, Alemanha, 65439

E-mail: j-roembke@gmx.de



RESUMO: Os fungicidas a base de cobre e manganês são utilizados nas áreas de várzea próximas a Manaus - Amazonas, para controle de doenças em plantas cultivadas. Esses agrotóxicos, mesmo quando usados adequadamente, podem vir a se acumular no ambiente e tornar-se um risco para a atividade biológica do solo, a qual é fundamental para a exploração agrícola sustentável a longo prazo. Diante disto, para o manejo da qualidade do solo, é necessário o conhecimento do risco ecotoxicológico desses fungicidas. Para tanto, a toxicidade dos fungicidas mancozeb e oxicloreto de cobre para *Eisenia fetida*, espécie de minhoca utilizada como organismo indicador, foi investigada. Os ensaios foram realizados em laboratório utilizando solo artificial tropical (SAT) e solo natural (Gleissolo), para os parâmetros letalidade e comportamento de fuga (rejeição) ao solo contaminado baseados no protocolo OECD número 207/1984 e ISO17512-1/2008, respectivamente. Devido ao alto teor de silte no gleissolo, adicionou-se areia (1:1) para deixar o substrato com friabilidade que possibilitasse incorporação dos produtos químicos. Ambos os fungicidas apresentaram baixa toxicidade para a sobrevivência de minhocas. Entretanto, os ensaios de fuga mostraram que as minhocas evitaram solos contaminados com esses fungicidas, mesmo quando em baixas concentrações. Os ensaios de fuga devem ser usados para análise de risco de agrotóxicos para o solo, já que estes apresentam maior sensibilidade e relevância ecológica, se comparados aos ensaios de toxicidade sobre a sobrevivência.

PALAVRAS-CHAVE: Ecotoxicologia, Fungicidas, Risco Ambiental, Minhoca, Gleissolo.

ABSTRACT: Fungicides based on copper and manganese are used in floodplain areas near Manaus, Amazonas, to control diseases in cultivated plants. Such pesticides, even when properly used, may accumulate in the environment and become a risk for soil biological activity which is crucial for long-term agriculture sustainability. For soil quality management, knowledge about the ecotoxicological risk of these fungicides is necessary. Therefore, the toxicity of the fungicides mancozeb and copper oxychloride was evaluated for *Eisenia fetida*, an earthworm species used as indicator organism. Laboratory tests were performed using tropical artificial soil (TAS) and a natural soil (Gleysol) for the endpoints lethality and behaviour to contaminated soil based on OECD number 207/1984 and ISO17512-1/2008, respectively. Due to the high content of silt in the gleysol, an amount of sand (1:1) was added to turn the substrate more friable to allow the chemicals spiking. Both fungicides showed low toxicity on survival for earthworms. However, the avoidance (behavior) tests showed that earthworms were able to avoid soils contaminated with these fungicides even at low concentrations. To assess the risk of agrochemicals for soil ecosystems, the avoidance test



should be used since it is more sensitive and ecologically relevant than the toxicity test on survival.

KEYWORDS: Ecotoxicology, Fungicides, Environmental Risk, Earthworm, Gleysol.



Artigo está licenciado sob forma de uma licença
Creative Commons Atribuição 4.0 Internacional.

1. Introdução

Vários fatores têm sido apontados como riscos para a diversidade biológica das regiões tropicais, mas o efeito de poluentes químicos sobre a biodiversidade do solo tem sido pouco considerado. A atividade agrícola na Amazônia, em geral, requer o uso intensivo de agrotóxicos para controle de pragas e doenças (Waichman et al., 2002). Parte desta atividade agrícola se concentra nas margens de rios e nas várzeas periodicamente inundadas. As várzeas amazônicas podem ser consideradas ecossistemas de alta vulnerabilidade ambiental, i.e., com grande probabilidade de exposição a contaminantes, tendo em vista suas características geológicas e proximidade dos corpos d'água.

Os organismos de solo são essenciais para a manutenção dos processos químicos e biológicos de solo (Brown et al., 2000; Lavelle & Spain, 2001). As minhocas em especial, têm sido utilizadas na avaliação de risco ecotoxicológico para o ambiente terrestre (Jänsch et al., 2005, ABNT, 2010), mas outros invertebrados terrestres também têm sido cada vez mais utilizados, tais como Collembola, Enchytraeidae, Isopoda, Acari e outros (Jänsch et al., 2005; Van Gestel, 2012). O efeito de poluentes sobre a letalidade de minhocas, avaliado através de ensaios de toxicidade aguda, tem sido o principal parâmetro utilizado para a análise de risco ambiental. Entretanto, de modo geral, a toxicidade aguda fornece pouca informação



sobre os reais efeitos sobre as populações de minhocas no ambiente natural (Slimak, 1997; Avila et al., 2007; Van Gestel, 2012).

O ensaio de toxicidade baseado no efeito sobre o comportamento de rejeição ao ambiente contaminado tem sido sugerido como uma alternativa de maior relevância ecológica na avaliação da toxicidade de substâncias químicas para o solo (Yearley et al., 1996; Hund-Rinke et al., 2003, van Gestel, 2012). Além de ser um ensaio simples e de custo baixo, apresenta vantagens em relação ao ensaio de efeito sobre a reprodução e até mesmo sobre o ensaio de letalidade, pois tem a duração de apenas 2 dias contra 14 e 56 dias respectivamente (ABNT, 2011, 2012).

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos dos fungicidas oxicloreto de cobre e mancozeb para a minhoca *Eisenia fetida* em laboratório considerando os parâmetros de letalidade e comportamento de fuga (rejeição) em solo natural da margem de várzeas da Amazônia. Os resultados obtidos neste estudo são parte de um conjunto de informações necessárias para a avaliação do risco de agrotóxicos para o solo.

2. Material e Métodos

2.1 Substratos-Teste

Os ensaios de toxicidade foram conduzidos em Solo Artificial Tropical (SAT), composto de areia (70%), caulim (20%) e pó de fibra da casca de coco (10%), cuja formulação foi baseada no protocolo internacional (OECD 1984), mas substituindo-se a turfa de musgo esfagno, pela fibra de coco (Garcia, 2004). Um solo natural (SN), tipo Gleissolo, presente em áreas de várzeas também foi utilizado como substrato para os ensaios, mas misturado com areia fina (25% dos grãos com até 200 μm) na proporção de 1:1 (m/m) devido ao alto teor de silte. Este procedimento foi necessário para tornar a textura do solo mais adequada para incorporação do fungicida



posteriormente. As características físicas e químicas destes solos são apresentadas na tabela 1.

2.2 Organismo-Teste

A espécie indicadora utilizada para os ensaios foi *Eisenia fetida* (Bouché, 1972) (Oligochaeta, Lumbricidae), comum em criações para produção de húmus e compostagem. Atualmente é uma das espécies recomendadas em protocolos nacionais e internacionais para uso em ensaios padronizados de toxicidade de substâncias químicas para o solo (OECD, 1984, ABNT, 2011) e tropicais (IBAMA, 1990). Neste trabalho foram utilizadas culturas de minhocas mantidas em caixas de madeira (150L) à temperatura ambiente (25 a 30 °C; média = 28 °C), expostas a um ciclo luminoso natural (12h luz/12h escuro) e alimentadas com esterco bovino seco, triturado e livre de qualquer contaminação por substâncias químicas.

2.3 Substâncias-Teste

Os ensaios de toxicidade foram feitos com duas substâncias usadas como ingredientes ativos em formulações dos seguintes fungicidas: Fungitol Azul® (oxicloreto de cobre), fungicida de ação por contato, do grupo químico cúprico, que contém 588 g/kg do ingrediente ativo, oxicloreto de cobre (350g/kg de cobre metálico), na formulação pó molhável, usado para o controle das doenças fúngicas em várias culturas; Dithane® (mancozeb), fungicida de contato, do grupo químico ditiocarbamatos, conteúdo 800g/kg do ingrediente ativo Etileno-bis-ditiocarbamato de *manganês* e zinco (mancozeb), usado para o controle de doenças de diversas culturas. Os fungicidas de oxicloreto de cobre e mancozeb são frequentemente aplicados em diferentes cultivos na região de Manaus nas doses variando de 11,8 a



1201,4 g i.a./ha e 6,0 a 32,0 g i.a./ha, respectivamente (Römbke et al., 2008).

2.4 Ensaio de Toxicidade Aguda

A determinação da toxicidade aguda, efeito sobre a sobrevivência/letalidade, de fungicidas para *E. fetida* foi baseada nos protocolos internacionais OECD no. 207 (OECD, 1984) e ISO 11268-1 (ISO, 1993), que descrevem um método para a determinação de toxicidade aguda para minhocas por via cutânea e ingestão, usando solo artificial. A amplitude de concentrações utilizada nos ensaios foi definida de acordo com o resultado de ensaios preliminares. Antes do ensaio, as minhocas foram mantidas para aclimação no substrato sem adição dos contaminantes por 24 horas em caixas de plástico (25 cm x 36 cm de área e 12 cm de altura). Diferentes concentrações dos fungicidas foram preparadas com base na massa seca (ms) do substrato, i.e., cada concentração representando a quantidade do ingrediente ativo em mg por kg do substrato. O ingrediente ativo foi diluído em água destilada, misturado em 500 g (ms) de substrato e colocado em frasco de vidro (vol. 1,3 L) com tampa de plástico perfurada. A umidade do substrato foi ajustada para 30% e 20% para o solo artificial e natural respectivamente. Embora ambos os substratos tivessem semelhantes valores de capacidade máxima de retenção de água (tabela 1), devido ao silte presente no solo natural, foi necessário o ajuste de menor umidade (20%) para que estes tivessem friabilidade semelhantes, e permitissem livre movimentação das minhocas. Após a contaminação em diferentes concentrações, amostras foram retiradas para cálculo da umidade e pH do substrato, em uma réplica de cada tratamento. Em seguida, 10 indivíduos de *E. fetida* pesando entre 300 e 600 mg foram colocados sobre a superfície do substrato e incubados à temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, na ausência de luz. Aos 14 dias de incubação avaliou-se a letalidade.



2.5 Ensaio de Fuga (Toxicidade Comportamental)

A determinação da toxicidade comportamental (fuga ou rejeição ao substrato) de fungicidas para *E. fetida* foi baseada no protocolo internacional ISO17512-1 (ISO, 2008). O princípio deste ensaio é a exposição simultânea das minhocas ao solo que se quer avaliar (contaminado) e ao solo controle, permitindo a migração entre ambos. Após o período de dois dias a localização dos indivíduos foi determinada. Os ensaios de fuga foram feitos em cinco concentrações de cada fungicida, em quatro réplicas, em solo artificial e natural. Caixas de plástico (área 11 cm x 15.5 cm, 6 cm de altura) foram preenchidas com 250 g (ms) de solo em cada metade, uma com substrato contaminado e em outra, não contaminado. A amplitude de concentrações utilizadas nos ensaios foi definida levando em conta os valores de concentrações subletais obtidos nos ensaios de toxicidade aguda. Durante o preenchimento, foi usada uma lâmina divisória para evitar a mistura dos substratos. Em seguida, a lâmina foi retirada e 10 indivíduos de *E. fetida* pesando entre 300 e 600 mg, foram colocados na região central do recipiente sobre o substrato e aguardou-se o tempo necessário para as minhocas imergirem. Em seguida estas foram incubadas por 48 h a 28 ± 2 °C, na ausência de luminosidade. Ao término da incubação cada recipiente foi examinado, separando-se as seções (controle e tratamento) e o número de indivíduos que migraram para o controle foi observado.



2.6 Expressão dos Dados e Análise Estatística

Os ensaios foram feitos em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e controle, em quatro repetições. Para avaliação da toxicidade aguda dos fungicidas foram estimados a concentração letal mediana (CL_{50}) e respectivos intervalos de confiança 95% (IC-95%), usando o método de Probit (Finney, 1971). O programa de análise de Probit foi obtido em USEPA (2006). O programa ToxRat® foi utilizado para gerar as curvas de dose-resposta, após análise de Probit (TOXRAT, 2003). As estimativas da concentração de efeito mediana (CE_{50}) e IC95% em ensaios de rejeição ao substrato contaminado foram feitas pelo método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1977). Para análise da toxicidade aguda, as concentrações de efeito significante foram determinadas através da análise de variância (ANOVA) e teste de Dunnett para comparação de médias.

Para a análise do efeito de fuga (rejeição), a resposta de rejeição foi quantificada pela diferença entre as proporções de indivíduos em cada uma das seções. Em cada réplica, a rejeição (R) (expressa em porcentagem) foi calculada pela fórmula: $R = [(C - T)/10] \times 100$; onde (C) é o total de indivíduos observados no solo controle; (T) é o total de indivíduos observados no solo contaminado e, o valor "10" representa o número de indivíduos por réplica. Valores de "R" positivos e negativos indicam rejeição e atração, respectivamente. Conforme recomendado em ISO (2008), as reações de atração (i.e., preferência pelo solo contaminado) foram consideradas como valores nulos de rejeição. O teste t-Student foi utilizado para comparar a proporção de indivíduos entre as seções contaminadas e o controle.

Os valores da CL_{50} e CE_{50} são apresentados em massa do ingrediente ativo (mg) por massa seca de solo (kg).

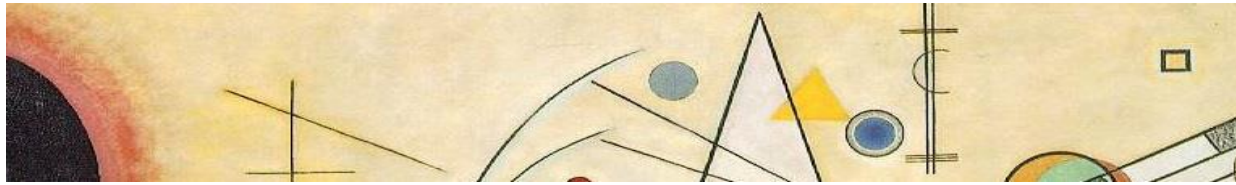


Tabela 1 – Caracterização físico-química dos substratos solo artificial e natural.

Variável	Unidade	Solo Artificial	Solo Natural*
P	(mg/dm ³)	35	73
K	"	660	29
Na	"	160	23
Ca	"	986,0	2440,9
Mg	"	136,1	534,6
N total	(%)	0,07	0,43
C org	"	3,59	0,25
Matéria Orgânica	"	6,17	0,43
Relação CN	-	51,3	0,58
Capacidade máxima de retenção de água	-	39,5	36,2
pH (CaCl ₂)	-	6,7	5,3
Argila	%	20	7,9
Silte	"	0	33,9
Areia	"	70	58,2

*Solo natural tipo gleissolo misturado com areia fina (25 % dos grãos com até 200 µm) na proporção de 1:1 (m/m).

Fonte: Elaborada pelos autores.

3. Resultados

A maior letalidade de *E. fetida* para oxiclóreto de cobre foi observada nas concentrações nominais mais altas, tanto em solo natural como artificial (gráfico 1). Comparado ao controle, as duas maiores concentrações (1344 e 2016 mg i.a./kg) em SN e apenas a maior em SAT (4704 mg i.a./kg) apresentaram valores estatisticamente diferentes (ANOVA, teste de Dunnett, $p < 0,01$). O valor da concentração letal mediana (CL₅₀) para 14 dias de exposição ao oxiclóreto de cobre foi estimado em 1.953 mg i.a./kg para SN, enquanto em SAT, esse valor foi maior do que duas vezes, ultrapassando 4.700 mg i.a./kg (tabela 2). Para mancozeb, as curvas de dose-resposta para ambos os substratos mostraram um efeito dose-dependente sobre a letalidade de *E. fetida* (gráfico 2) sendo os valores da CL₅₀ estimados, 981 e 870 mg i.a./kg, para os solos artificial e natural, respectivamente. Esses valores, no entanto, não são estatisticamente diferentes, pois apresentaram intervalos de confiança que se sobrepõem (tabela 2).

Os ensaios de fuga mostraram que as minhocas evitaram solos contaminados com esses fungicidas (gráfico 4). As minhocas rejeitaram o



solo tratado com mancozeb mesmo quando em baixas concentrações no solo, especialmente em solo natural. Para este fungicida foram estimados valores de CE_{50} de 8,3 mg i.a./kg e 12,4 mg i.a./kg para os solos artificial e natural, respectivamente (tabela 2). Os valores de CL_{50} apresentaram intervalos de confiança que se sobrepõem e, portanto, são considerados estatisticamente semelhantes. O comportamento de rejeição ao solo contaminado foi significativo a partir de 14 mg i.a./kg e 7 mg i.a./kg para o solo natural e artificial, respectivamente (gráfico 4A e 4B). Já para o oxiclreto de cobre, os valores estimados da concentração de efeito mediano (CE_{50}) para o comportamento de fuga foram 162,4 mg i.a./kg e 34,8 mg i.a./kg para os SAT e SN, respectivamente (tabela 2) e a rejeição só foi significativa nas concentrações maiores, principalmente em SAT.

4. Discussão

O menor efeito letal do oxiclreto de cobre (tabela 2) observado no SAT em relação ao SN poderia ser explicado pelo maior conteúdo de argila neste substrato (20 vs 7,9%, tabela 1), sugerindo que as propriedades do solo podem ter interferido na disponibilidade desse fungicida e, conseqüentemente, na toxicidade às minhocas. Daoust et al. (2006) e Owojori et al. (2010) observaram que a proporção de argila no solo contribuiu para a redução da disponibilidade do cobre na fase líquida devido à adsorção deste metal às partículas de argila. Cesar et al. (2010) em estudos com lodo de esgoto verificaram que as propriedades do solo usado como substrato, tais como pH, fertilidade, teor de matéria orgânica e argila influenciavam fortemente a disponibilidade de metais no solo. Maboeta et al. (2004) avaliando a toxicidade de oxiclreto de cobre em solo artificial OECD estimaram CL_{50} em 883 mg i.a./kg, aos 28 dias de exposição, valor muito menor que o obtido no presente trabalho tanto em SAT (>4.700 mg i.a./kg) como SN (1.953 mg i.a./kg). O solo artificial OECD e SAT diferem quanto ao



tipo de matéria orgânica utilizada (turfa versus fibra de coco), sugerindo que o tipo de matéria orgânica pode ter influenciado a disponibilidade dos metais. De qualquer modo, se considerarmos que os agrotóxicos com valores de concentração letal mediana (CL_{50}) maiores que 1.000 mg i.a./kg são atóxicos para minhocas no campo (Kokta, 1992), podemos dizer que o oxicloreto de cobre nos solos testados no presente trabalho não é tóxico.

No presente trabalho, o maior teor de argila e também o maior pH no solo artificial parecem não ter influenciado a biodisponibilidade do mancozeb (tabela 1), a julgar pelos valores de CE_{50} semelhantes entre SAT e SN observados (tabela 2). Os valores de CL_{50} para mancozeb (tabela 2), foram inferiores ao limite 1000 mg i.a./kg sugerido por Kokta (1992) indicando baixa toxicidade deste fungicida para *Eisenia*. Na literatura, a toxicidade de mancozeb sobre *E. fetida* também parece ser baixa. Vermeulen et al. (2001) observaram toxicidade aguda relativamente baixa de mancozeb para *E. fetida* ($CL_{50} = 1262$ mg i.a./kg), se comparado a outros pesticidas carbamatos. Estes autores (op. cit.) observaram que o mancozeb não causou efeito significativo na taxa de reprodução e crescimento de *E. fetida*. Em contrapartida, quando a espécie *Peryonix excavatus* foi utilizada, a CL_{50} para formulação comercial de mancozeb em solo artificial OCDE foi de 500 mg i.a./kg e a CE_{50} para reprodução foi de 22 mg i.a./kg, demonstrando que diferentes espécies podem apresentar sensibilidades distintas (De Silva et al., 2010).

O risco de toxicidade crônica de solos contaminados nunca deve ser ignorado, como por exemplo, os efeitos subletais sobre a reprodução, crescimento, bioacumulação e também o comportamento. Nesse contexto, Helling et al. (2000), observaram que, mesmo em concentrações muito baixas, o oxicloreto de cobre pode afetar a taxa de reprodução e o crescimento de juvenis de *E. fetida*. Após sucessivas aplicações, os fungicidas à base de cobre podem se acumular no solo e causar impacto sobre as populações de minhocas. Da mesma forma, Eijsackers et al. (2005)



observaram que em áreas de vinhedos após longo tempo de uso de fungicidas cúpricos, além da redução da taxa de crescimento, houve menor atividade de minhocas no solo contaminado, colocando em risco a manutenção da qualidade do solo. Em áreas de plantação de abacateiros, solos contendo alto teor de resíduos de cobre provenientes da aplicação de fungicidas também apresentaram menores populações de minhocas (Van Zwieten et al. 2004).

Os resultados dos ensaios de fuga no presente trabalho, de modo geral, mostraram a mesma tendência que os dados de letalidade para os fungicidas testados, ou seja, maior toxicidade de mancozeb em relação ao oxicloreto de cobre e diferença maior na resposta do oxicloreto de cobre quando em solo artificial ou natural (tabela 1). Em SN, a resposta de rejeição foi significativa a partir da concentração de 47 mg i.a./kg (28 mg Cu/kg), atingindo 95% de rejeição a 94 mg i.a./kg (56 mg Cu/kg) (gráfico 3A). Van Zwieten et al. (2004), verificou que *E. fetida* evitam o solo quando o nível de contaminação está entre 4 a 34 mg Cu/kg e atinge 90% de rejeição a 553 mg Cu/kg em ensaios de fuga utilizando solo natural contaminado por fungicidas cúpricos. Em SAT, no presente trabalho, a resposta de rejeição ao oxicloreto de cobre só foi observada a partir da concentração de 188 mg i.a./kg (112 mg Cu/kg) (gráfico 3B). Já em relação ao mancozeb, Reinecke et al. (2002) relata alta sensibilidade de *E. fetida* para o fungicida mancozeb sendo esta capaz de detectar e rejeitar concentrações a partir de 8 mg i.a./kg, o que corrobora com os valores de CE₅₀ encontrados aqui. Por outro lado, Garcia-Santos e Keller-Forrer (2011) observaram que o comportamento de fuga de *E. fetida* foi variável e inconclusivo em solo natural na Colômbia em concentrações entre 4 e 1000 mg i.a./kg. As minhocas possuem vários quimiorreceptores em seu tegumento, estruturas que as tornam sensíveis às mudanças químicas no ambiente podendo evitar áreas contaminadas (Stephenson et al., 1998). O ensaio de fuga com minhocas justifica-se pela vantagem de ser mais sensível e produzir



informações de maior relevância ecológica e poderia substituir o ensaio de toxicidade aguda na avaliação de risco ambiental (Garcia et al. 2008). Além disso, o ensaio de fuga tem demonstrado ser tão sensível quanto o ensaio de reprodução em algumas situações (Scheffczyk et al., 2014). Estes ensaios também têm sido recomendados na avaliação de solos contaminados que estejam em processo de remediação (Booth et al., 2005; Demuynck et al., 2014).

Ensaio ecotoxicológicos para organismos terrestres têm sido realizados com o solo artificial (OECD, 1984), o que permite padronização entre laboratórios e a comparação dos resultados de ensaios entre diferentes espécies da fauna do solo. Porém, segundo Amorim et al. (2005) e Spurgeon e Hopkin (1996), a toxicidade de metais como o cobre e zinco, avaliada em solo artificial OECD, tem sido subestimada em relação aos valores obtidos em solos naturais. Portanto, considerando que as propriedades do solo influenciam a biodisponibilidade de alguns poluentes (Römbke et al., 2006), dados ecotoxicológicos obtidos somente em solo artificial poderiam subestimar o risco para o ambiente. Por outro lado, pode ser difícil trabalhar com o solo natural. O presente trabalho relatou a necessidade de se adicionar areia ao solo natural de várzea (gleissolo) para permitir a realização dos ensaios dentro de metodologias padronizadas. A padronização de um solo(s) natural(is) é uma questão importante, mas complexa, e que merece atenção especial em futuros estudos ecotoxicológicos no Brasil.



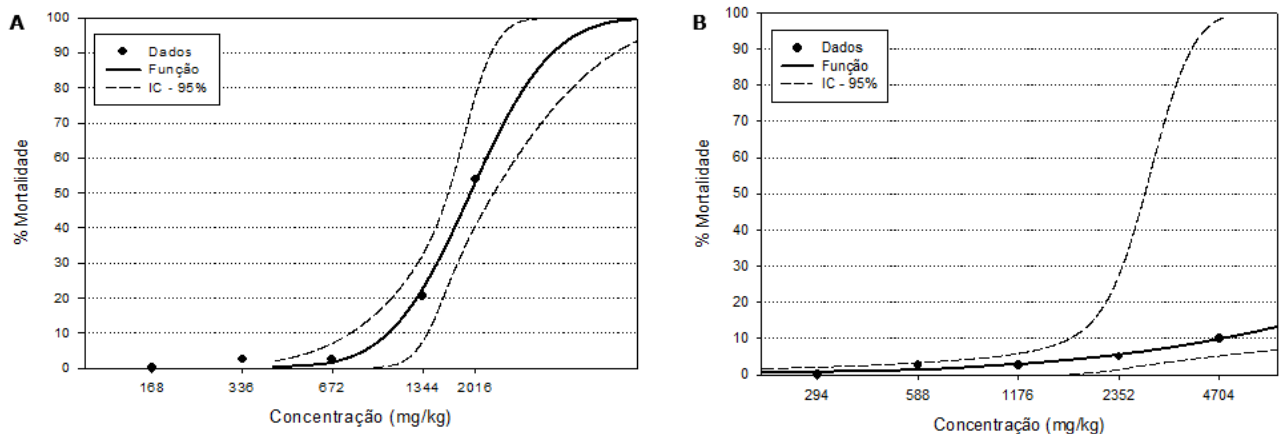
Tabela 2 – Toxicidade aguda (CL₅₀) e sobre o comportamento de rejeição (CE₅₀) de fungicidas para *Eisenia fetida* em solo artificial e natural (Valores de CL₅₀ CE₅₀ com respectivos intervalos de confiança - IC, a 95%).

Fungicida	Substrato	CL ₅₀ (IC 95 %) mg i.a. / kg
Mancozeb	Artificial	981 (890 – 1.081)
	Natural	870 (700 – 1.000)
Oxicloreto de cobre	Artificial	> 4.700
	Natural	1.953 (1.638 – 2.327)

Fungicida	Substrato	CE ₅₀ (IC 95 %) mg i.a./kg
Mancozeb	Artificial	8,3 (6,3 – 10,9)
	Natural	12,4 (10,3 – 15,0)
Oxicloreto de cobre	Artificial	162,4 (146 – 180)
	Natural	34,8 (31,3 – 38,8)

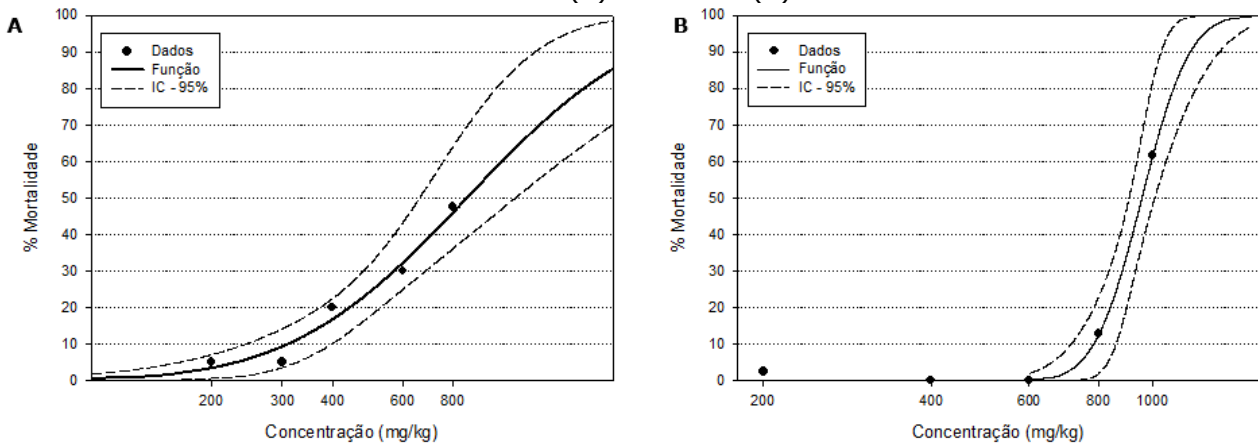
Fonte: Elaborada pelos autores.

Gráfico 1 – Curva dose-resposta de toxicidade aguda de oxicloreto de cobre para *Eisenia fetida* em solo natural (A) e artificial (B).



Fonte: Elaborado pelos autores.

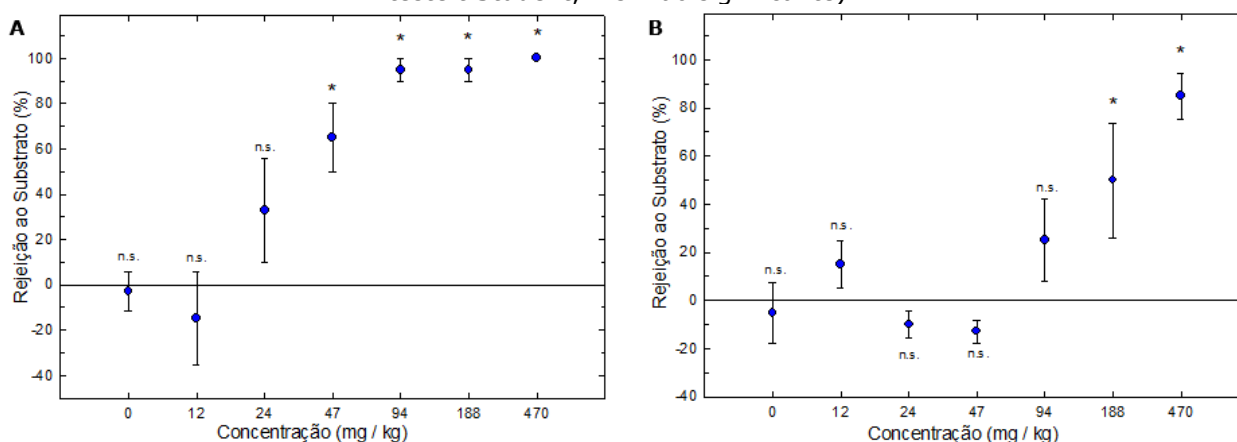
Gráfico 2 – Curva dose-resposta de toxicidade aguda de mancozeb para *Eisenia fetida* em solo natural (A) e artificial (B).



Fonte: Elaborado pelos autores.

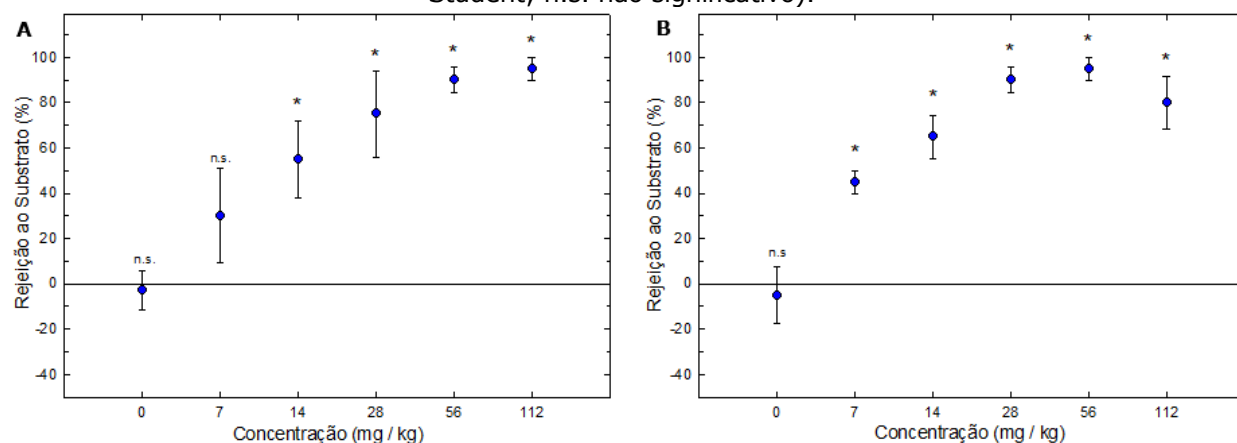


Gráfico 3 – Resposta de rejeição de *Eisenia fetida* a concentrações de oxicloreto de cobre em solo natural (A) e artificial OECD (B), (média e erro padrão), (*estatisticamente significativa, $p \leq 0,05$, teste t Student; n.s. não significativa).



Fonte: Elaborado pelos autores.

Gráfico 4 – Resposta de rejeição de *Eisenia fetida* a concentrações de mancozeb em solo natural (A) e artificial OECD (B) (média e erro padrão), (*estatisticamente significativo, $p \leq 5$, teste t Student; n.s. não significativo).



Fonte: Elaborado pelos autores.

5. Conclusões

Os ensaios de ecotoxicidade aguda e de fuga com gleissolo só foram exequíveis através da adição de areia. Embora os fungicidas oxicloreto de cobre e mancozeb tenham baixa toxicidade aguda para *E. fetida*, é necessário manter-se atentos aos possíveis efeitos do acúmulo no solo após sucessivas aplicações. Para ambos os fungicidas, a determinação da toxicidade aguda não pode ser usada como único parâmetro para análise de



risco ambiental. Os ensaios de fuga (efeito sobre o comportamento) devem ser incluídos no conjunto de testes para a análise de risco destes fungicidas para o solo.

Agradecimentos

Os autores são gratos à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo suporte financeiro ao projeto.



Referências

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Qualidade do solo — Guia para a seleção e a avaliação de bioensaios para caracterização ecotoxicológica de solos e materiais de solo ABNT NBR ISO 17616, p. 11, 2010.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Qualidade do Solo — Ensaio de fuga para avaliar a qualidade de solos e efeitos de substâncias químicas no comportamento Parte 1: Ensaio com minhocas (*Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*). ABNT NBR ISO 17512-1, p. 26, 2011.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. Ecotoxicologia terrestre - Toxicidade aguda - Método de ensaio com minhocas (Lumbricidae). ABNT NBR 15537, p. 13, 2012.

Amorim, MJ, Römbke, J, Schallnaß, HJ, Soares AMVM. Effect of soil properties and aging on the toxicity of copper for *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus luxuriosus*, and *Folsomia candida*. Environ Toxicol Chem. 2005; 24: 1875-1885.

Ávila G, Gaete H, Morales M, Neaman A. Reproducción de *Eisenia foetida* en suelos agrícolas de áreas mineras contaminadas por cobre y arsénico. Pesq. agropec. Bras; 2007; 42: 435-441.

Booth L, Heppelthwaite, V, O'Halloran, K. Effects-based assays in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*: their utilisation for evaluation of contaminated sites before and after remediation (8 pp). J Soil Sediment. 2005; 5: 87-94.

Brown GG, Barois, I, Lavelle P. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. Eur J Soil Biol. 2000; 36: 177-198.

Cesar R, Colonese J, Silva M, Bertolino LC, Castilhos Z, Egler S, Polivanov H, Bidone E, Perez D. Avaliação da ecotoxicidade de mercúrio em três tipos de solos utilizando ensaios ecotoxicológicos com oligoquetas. Geochim Bras. 2010; 24: 3-12.

Daoust CM, Bastien C, Deschenes L. Influence of soil properties and aging on the toxicity of copper on compost worm and barley. J Environ Qual. 2006; 35: 558-567.

De Silva PMC, Pathiratne A, van Gestel CA. Toxicity of chlorpyrifos, carbofuran, mancozeb and their formulations to the tropical earthworm *Perionyx excavatus*. Appl Soil Ecol. 2010; 44: 56-60.



Demuynck S, Succiu IR, Grumiaux F, Douay F, Leprêtre A. Effects of field metal-contaminated soils submitted to phytostabilisation and fly ash-aided phytostabilisation on the avoidance behaviour of the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotox environ safe*. 2014; 107: 170-177.

Eijsackers H, Beneke P, Maboeta M, Louw JPE, Reinecke AJ. The implications of copper fungicide usage in vineyards for earthworm activity and resulting sustainable soil quality. *Ecotox Environ Safe*. 2005; 62: 99-111.

Finney DJ. *Probit analysis*. Cambridge University Press; 1971.

Garcia M, Römbke J, Brito MVT, Scheffczyk A. Effects of three pesticides on the avoidance behaviour of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. *Environ Pollut*. 2008; 153: 450-456.

Garcia M. Effects of pesticides on soil fauna: Development of ecotoxicological test methods for tropical regions. *Ecology and Development Series*, Cuvillier Verlag Göttingen. 2004; 19: 281, 2004.

García-Santos G., Keller-Forrer K. Avoidance behaviour of *Eisenia fetida* to carbofuran, chlorpyrifos, mancozeb and metamidophos in natural soils from the highlands of Colombia. *Chemosphere*. 2011; 84: 651-656.

Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ Sci Technol*. 1997; 11: 714-719.

Helling B, Reinecke SA, Reinecke AJ. Effects of the fungicide copper oxychloride on the growth and reproduction of *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Ecotoxicol Environ Safe*. 2000; 46: 108-116.

Hund-Rinke K, Achazi R, Römbke J, Warnecke D. Avoidance test with *Eisenia fetida* as indicator for the habitat function of soils: Results of a laboratory comparison test. *J Soil Sediment*. 2003; 3: 7-12.

IBAMA. Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos. 2ª. ed. Brasília: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis; 1990.

ISO. International Organization for Standardization. Soil quality - Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour - Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). ISO Guideline 17512-1, Geneve, Switzerland, p. 25, 2008.

ISO. International Organization for Standardization. Soil-quality – Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) – Part 1: Determination of acute



toxicity using artificial soil substrate. ISO Guideline 11268-1, Geneva, Switzerland, p. 6, 1993.

Jänsch S, Amorim MJ, Römbke J. Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. *Environ Rev.* 2005; 13: 51-83.

Kokta C. Measuring effects of chemicals in the laboratory: effect criteria and endpoints. In: Greig-Smith PW, Becker H, Edwards PJ, Heimbach F (Eds.), *Ecotoxicology of Earthworms*. Springer Verlag, Intersept; 1992, 55-62.

Lavelle P, Spain AV. *Soil ecology*. Amsterdam: Kluwer Scientific. 2001.

Maboeta MS, Reinecke SA, Reinecke AJ. The relationship between lysosomal biomarker and organismal responses in an acute toxicity test with *Eisenia fetida* (Oligochaeta) exposed to the fungicide copper oxychloride. *Environ Res.* 2004; 96: 95-101.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development: **OECD-Guideline for testing of chemicals N. 207. Earthworm acute toxicity test**, Paris., p. 9, 1984.

Owojori OJ, Reinecke AJ, Rozanov AB. Influence of clay content on bioavailability of copper in the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicol Environ Safe.* 2010; 73: 407-414.

Reinecke AJ, Maboeta MS, Vermeulen LA, Reinecke SA. Assessment of lead nitrate and mancozeb toxicity in earthworms using the avoidance response. *B Environ Contam Tox.* 2002; 68: 779-786.

Römbke J, Jänsch S, Junker T, Pohl B, Scheffczyk A, Schallnaß HJ. Improvement of the applicability of ecotoxicological tests with earthworms, springtails, and plants for the assessment of metals in natural soils, *Environ Toxicol Chem.* 2006; 25: 776-787.

Römbke J, Waichman AV, Garcia MVB. Risk assessment of pesticides for soils of the central Amazon, Brazil: Comparing outcomes using temperate and tropical data. *Integrated Environ Assess Manag.* 2008; 4: 94-104.

Scheffczyk A, Frankenbach S, Jänsch S, Römbke J. Comparison of the effects of zinc nitrate-tetrahydrate and tributyltin-oxide on the reproduction and avoidance behavior of the earthworm *Eisenia andrei* in laboratory tests using nine soils. *Appl Soil Ecol.* 2014; 83: 253-257.

Slimak KM. Avoidance response as a sublethal effect of pesticides on *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Soil Biol Biochem.* 1997; 29: 713-715.



Spurgeon DJ, Hopkin SP. Effects of variations of the organic matter content and pH of soils on the availability and toxicity of zinc to the earthworm *Eisenia fetida*, *Pedobiologia*. 1996; 40: 80-96.

Stephenson GL, Kaushik A, Kaushik NK, Solomon KR, Steele T, Scroggins RP. Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: Sheppard S, Bembridge J, Holmstrup M, Posthuma L, editors. *Advances in earthworm ecotoxicology*. Setac Press, Pensacola, 1998, p. 67-81.

TOXRAT. **Software for the Statistical Analysis of Biotests**, Copyright: ToxRat Solutions GmbH, Alsdorf, Germany, 2003.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Ecological Exposure Research: Statistical Analysis for Biological Methods. Disponível em: <http://www.epa.gov/eerd/stat2.htm>. Acesso em: 10 de junho de 2010, 2006.

Van Gestel CAM. Soil ecotoxicology: state of the art and future directions, *ZooKeys*. 2012; 176, 275-296.

Van Zwieten L, Rust J, Kingston T, Merrington G, Morris S. Influence of copper fungicide residues on occurrence of earthworms in avocado orchard soils. *Sci Total Environ*. 2004; 329: 29-41.

Vermeulen LA, Reinecke AJ, Reinecke SA. Evaluation of the fungicide manganese-zinc ethylene bis (dithiocarbamate) (Mancozeb) for sublethal and acute toxicity to *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Ecotoxicol Environ Safe*. 2001; 48: 183-189.

Waichman AV, Römbke J, Ribeiro, MOA, Nina NCS. Use and fate of pesticides in the Amazon state, Brazil: Risk to human health and the environment. *Environ Sci Pollut Res*. 2002; 9: 423-428.

Yardley RB, Lazorchak JM, Gast LC. The potential of an earthworm avoidance test for evaluation of hazardous waste sites. *Environ Toxicol Chem*. 1996; 15: 1532-1537.