UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
Programa de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental

ANDRÉ GOMES DA ROCHA

**Avaliação dos efeitos dos agrotóxicos Kraft® 36 EC e
Score® 250 EC na flora, micro e mesofauna edáficas**

São Carlos – SP
2017

ANDRÉ GOMES DA ROCHA

**Avaliação dos efeitos dos agrotóxicos Kraft® 36 EC e
Score® 250 EC na flora, micro e mesofauna edáficas**

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Escola de
Engenharia de São Carlos, da Universidade
de São Paulo, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Ciências da Engenharia Ambiental

Orientadora: Dra. Vanessa Bezerra
Menezes de Oliveira

São Carlos – SP
2017

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Rocha, André Gomes

R672a Avaliação dos efeitos dos agrotóxicos Kraft® 36 EC e
Score® 250 EC na flora, micro e mesofauna edáficas /
André Gomes Rocha; orientadora Vanessa Bezerra Menezes
Oliveira. São Carlos, 2017.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação e
Área de Concentração em Ciências da Engenharia
Ambiental -- Escola de Engenharia de São Carlos da
Universidade de São Paulo, 2017.

1. abamectina. 2. difenoconazol. 3. Enchytraeus
crypticus. 4. Lycopersicon lycopersicum. 5. densidades
populacionais. 6. interação micro e mesofauna. 7.
ecotoxicologia terrestre. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: ANDRÉ GOMES DA ROCHA

Título da tese: "Avaliação dos efeitos dos agrotóxicos Kraft@ 36 EC e Score@ 250 EC na flora, micro e mesofauna edáficas"

Data da defesa: 12.09.2017

Comissão Julgadora:

Resultado:

Dr^a. Vanessa de Menezes Oliveira (Orientadora)
(Pós-Doutoranda/FAPESP)

APROVADO

Prof. Dr. Leonardo Machado Pitombo
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar-Sorocaba)

APROVADO

Dr. José Paulo Filipe Afonso de Sousa
(Universidade de Coimbra/UC-Portugal)

APROVADO

(conferência)

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental:

Prof. Associado Frederico Fabio Mauad

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Associado Luis Fernando Costa Alberto

À minha mãe, Marcia e ao meu pai, José.

AGRADECIMENTOS

À família, pelo amor e incentivo que sempre me alicerçaram.

À orientadora, Dra. Vanessa Bezerra Menezes de Oliveira, pela força no momento mais crítico e pelo conhecimento valiosamente compartilhado.

À pesquisadora Joana Dias Bresolin, pelo acolhimento e pela primordial ajuda. À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), nomeadamente ao pesquisador Wilson Tadeu Lopes da Silva, pela essencial parceria.

Ao Prof. Evaldo Luiz Gaeta Espindola e à Dra. Maria Edna Tenório Nunes, pela orientação e auxílio durante a realização deste trabalho.

À Beatriz, pela ternura e amor que me alimentam a cada dia.

À Universidade de São Paulo (USP), por tanta coisa que, desde 2009, me proporciona.

Ao Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA) e a todos que dele fazem ou fizeram parte. Aos momentos de trabalho árduo e às descontrações na hora do café.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental (PPG-SEA) e a todos que trabalham em prol de sua existência, dos docentes às faxineiras.

A todos os amigos, tão importantes nessa fase. Ao povo da Eng. Ambiental 2009, aos amigos de Budapeste e aos companheiros com os quais morei.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo fomento de bolsa de estudo durante os dois anos de realização desta pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo fomento ao projeto *Pesticidas nos Ecossistemas Terrestres: efeitos na biodiversidade, funções e serviços dos ecossistemas* (PesTe), ao qual este trabalho está vinculado.

Existe um único lugar onde o ontem e o hoje se encontram e se reconhecem e se abraçam, e este lugar é o amanhã. Soam como futuras certas vozes do passado americano muito antigo. As antigas vozes, digamos, que ainda nos dizem que somos filhos da terra, e que mãe a gente não vende nem aluga. Enquanto chovem pássaros mortos sobre a Cidade do México e os rios se transformam em cloacas, os mares em depósitos de lixo e as selvas em deserto, essas vozes teimosamente vivas nos anunciam outro mundo que não seja este, envenenador da água, do solo, do ar e da alma.

Eduardo Galeano, O Livro dos Abraços

RESUMO

ROCHA, A.G. **Avaliação dos efeitos dos agrotóxicos Kraft® 36 EC e Score® 250 EC na flora, micro e mesofauna edáficas.** 2017. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

As modificações ambientais provocadas pela humanidade, em especial pela agricultura, têm sido motivo de preocupação e estudos por todo o mundo. Nesse sentido, os solos figuram como um dos compartimentos ambientais mais impactados pelo uso de agrotóxicos, produtos amplamente utilizados na agricultura moderna. O objetivo deste trabalho foi avaliar se e como os agrotóxicos Score® 250 EC (i.a. difenoconazol) e Kraft® 36 EC (i.a. abamectina), isolados e em mistura, afetam a flora (germinação e crescimento do tomate - *Lycopersicon Lycopersicum*), as comunidades microbianas do solo (biomassa microbiana em carbono, respiração, quociente metabólico e enzima β -glucosidase) e os enquitreídeos (reprodução de *Enchytraeus crypticus* em diferentes densidades e a relação trófica entre estes e os microrganismos), ao longo do tempo após a contaminação do solo. Em relação aos parâmetros microbianos, a despeito de algumas variações em decorrência da presença dos agrotóxicos, os indicadores das funções gerais do sistema edáfico não foram grandemente prejudicados, expressando uma redundância funcional. Não obstante, o solo-controle apresentou maior estabilidade em relação às variações dos parâmetros, sugerindo que os microrganismos presentes neste solo apresentaram uma maior robustez e estabilidade ao longo do tempo. Em relação aos testes com *E. crypticus*, os índices de reprodução não foram significativamente alterados em função da ação dos agrotóxicos, mas ratificou-se a importância dos microrganismos na dieta dos mesmos, haja vista as correlações entre o tamanho das comunidades microbianas e as taxas de crescimento dos enquitreídeos. Com relação ao crescimento e germinação do tomate, puderam ser observados valores maiores de altura e massa seca das plântulas em relação ao controle. Em contrapartida, observou-se uma possível melhor tendência de crescimento das plântulas no solo controle ao longo do tempo. Por fim, considerando a complexa problemática brasileira em relação ao uso de agrotóxicos, reiterou-se a importância do cumprimento das recomendações de aplicação de ambos os agrotóxicos avaliados por parte dos agricultores e recomendou-se a iniciativa de diminuição progressiva da sua utilização.

Palavras-Chave: Abamectina. Difenconazol. *Enchytraeus crypticus*. *Lycopersicon lycopersicum*. Densidades populacionais. Interação micro e mesofauna. Ecotoxicologia terrestre.

ABSTRACT

ROCHA, A.G. **Evaluation of the ecotoxicological effects of the pesticides Kraft® 36 EC and Score® 250 EC on plants and on soil micro and mesofauna.** 2017. 103 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017.

Environmental changes caused by humanity, especially by agriculture, have been a cause for concern throughout the world. The soils are one of the environmental compartments most impacted by the use of pesticides, which are widely used in modern agriculture. This research aimed at evaluating whether and how the insecticide Kraft® 36 EC (a.i. abamectin) and the fungicide Score® 250 EC (a.i. difenoconazole), isolated and in mixture, affect: a) the soil microbial communities (microbial biomass carbon, respiration, metabolic quotient and β -glucosidase enzyme); b) enchytraeid worms (reproduction of *Enchytraeus crypticus* in different densities and their trophic relation with microorganisms); and c) the flora (emergence and growth of tomato - *Lycopersicon Lycopersicum*), over 84 days after contamination. The microbial indicators were not greatly impaired and expressed a functional redundancy, despite some variations due to the presence of pesticides. Nevertheless, the control group presented a greater stability than the contaminated ones, suggesting a greater robustness and stability of microorganisms over time, which are important factors for a better quality of the soil. In relation to *E. crypticus* tests, the importance of microorganisms on their diet was ratified, since positive correlations between the size of microbial communities and the enchytraeids rate of increase were observed. The different densities of *E. crypticus* were not significantly influenced by the effects of pesticides on the microorganisms. With respect to the growth and germination of tomato, higher values of height and dry mass of the seedlings were observed in contaminated groups. On the other hand, a higher growth tendency of the seedlings in the control soil was observed over time. Finally, considering the complexity of the Brazilian pesticide issue, we emphasize the importance of compliance of the recommendations on pesticides application and reinforce the initiative of decreasing their use.

Keywords: Abamectin. Difenoconazole. *Enchytraeus crypticus*. *Lycopersicon lycopersicum*. Population densities. Micro and mesofauna interactions. Soil ecotoxicology.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS	17
1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Xenobióticos no ambiente.....	18
1.2 Uso de produtos químicos na agricultura.....	18
1.3 Comportamento e destino dos agrotóxicos no ambiente	20
1.4 Ambiente terrestre: destino primário dos agrotóxicos	21
1.5 Ecotoxicologia terrestre voltada aos efeitos de agrotóxicos	23
1.6 Agrotóxicos no Brasil: uma problemática sistêmica.....	24
1.7 Kraft® 36 EC (i.a. abamectina)	27
1.8 Fungicida Score® 250 EC (i.a. difenoconazol).....	29
1.9 Efeitos dos agrotóxicos Kraft e Score e seus respectivos ingredientes ativos sobre organismos do solo	31
2 JUSTIFICATIVA	33
3 OBJETIVOS.....	35
3.1 Objetivo Geral	35
3.2 Objetivos Específicos	35
REFERÊNCIAS	36

CAPÍTULO II: EFEITOS DE AGROTÓXICOS SOBRE MICRORGANISMOS DO SOLO E IMPLICAÇÕES PARA POPULAÇÕES DE *ENCHYTRAEOUS CRYPTICUS* . 43

1 INTRODUÇÃO.....	44
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
2.1 Coleta e preparação do solo.....	47
2.2 Análise química dos agrotóxicos.....	47
2.3 Análises microbianas e teste de reprodução com enquitreídeos.....	48
2.3.1 Biomassa microbiana de carbono	49
2.3.2 Respiração basal e quociente metabólico do solo	49
2.3.3 Enzima β -glucosidase	49
2.3.4 Reprodução de enquitreídeos em diferentes densidades.....	50
2.4 Análises estatísticas	50
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
3.1 Parâmetros microbianos	52

3.2 Reprodução de enquitreídeos em diferentes densidades iniciais	57
4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES	62
REFERÊNCIAS.....	64
APÊNDICE A – Dados da ANOVA para a biomassa microbiana de carbono (BMC)	71
APÊNDICE B – Dados da ANOVA para a respiração basal do solo (RBS)	72
APÊNDICE C – Dados da ANOVA para o quociente metabólico do solo (qCO ₂)	73
APÊNDICE D – Dados da ANOVA para a enzima β-glucosidase	74
 CAPÍTULO III: GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DO TOMATE (<i>LYCOPERSICON</i> <i>LYCOPERSICUM</i>) EM SOLO CONTAMINADO POR KRAFT (INSETICIDA), SCORE (FUNGICIDA) E SUAS MISTURAS.....	 75
1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	76
2 MATERIAIS E MÉTODOS	79
2.1 Coleta e preparação do solo	79
2.2 Desenho experimental e procedimentos	80
2.3 Agrotóxicos e sementes	81
2.4 Análise química dos agrotóxicos	81
2.5 Análises estatísticas.....	81
3 RESULTADOS.....	83
4 DISCUSSÃO	86
5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES	91
REFERÊNCIAS.....	93
APÊNDICE A – Anova de duas vias da biomassa microbiana de carbono	98
 CAPÍTULO IV: CONSIDERAÇÕES FINAIS	 99
REFERÊNCIAS.....	103

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Este documento simboliza um trabalho de mais de dois anos realizado no âmbito do Programa de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental (PPG-SEA), da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC-USP). As etapas experimentais do trabalho foram realizadas parte no Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA), do Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA), parte na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, unidade São Carlos – SP (EMBRAPA Instrumentação).

Este documento segue as “Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses da USP: documento eletrônico e impresso – Parte I”, versão 2016, o qual estabelece as principais normas de estruturação e formatação de teses e dissertações da USP, em conformidade com os padrões da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). De modo a facilitar a apresentação do conteúdo elaborado, a dissertação foi dividida em quatro capítulos, a saber:

- Capítulo I – Introdução, Justificativa e Objetivos: introduz os temas abordados pela pesquisa, uma breve revisão bibliográfica, suas motivações gerais e seus objetivos;
- Capítulo II – Efeitos de agrotóxicos sobre microrganismos do solo e implicações para populações de *Enchytraeus crypticus*: analisa os efeitos de dois agrotóxicos sobre comunidades microbianas do solo, populações de enquitreídeos e a relação trófica entre estes representantes da micro e mesofauna edáficas ao longo do tempo;
- Capítulo III – Germinação e crescimento do tomate (*Lycopersicon lycopersicum*) em solo contaminado por Kraft (inseticida), Score (fungicida) e suas misturas: analisa os efeitos destes dois agrotóxicos sobre a germinação e o crescimento do tomate ao longo do tempo;
- Capítulo IV – Considerações finais: finaliza o documento com uma breve correspondência entre o capítulo I e os dados obtidos nos capítulos II e III.

Uma vez que os capítulos I e IV apenas trazem conceitos e elementos revisionais, eles não possuem os itens de Metodologia, Resultados, Discussão e Conclusão. Por sua vez, os capítulos II e III estão estruturados em formato de artigo científico, uma vez que se deseja publicá-los em periódicos. O capítulo II está em processo de submissão e o capítulo III já foi submetido e está em processo de revisão, conforme indicado no início de cada um deles.

Por fim, salienta-se que em função da divisão da dissertação em artigos, inevitavelmente algumas informações aparecem de modo bastante similar em alguns pontos do documento.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO, JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

1 INTRODUÇÃO

1.1 Xenobióticos no ambiente

Ao longo de sua evolução, a humanidade sempre modificou o meio ambiente de modo a utilizá-lo para o provimento de suas necessidades. Ainda que, historicamente, essa interação não tenha afetado o equilíbrio ambiental de modo mais explícito, as mudanças provocadas nos dois últimos séculos e, em especial, nas últimas décadas, têm levantado teorias de que a estabilidade global do meio ambiente esteja ameaçada (ROCKSTRÖM et al., 2009).

Diversos processos pelos quais passam as crescentes demandas da sociedade moderna têm como entrada ou saída, a produção de compostos químicos sintéticos, não existentes naturalmente no ambiente, também conhecidos como xenobióticos - do grego *xeno* significa estranho e *biótico*, vida (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Consequentemente, o número de substâncias químicas produzidas pelo ser humano e introduzidas no ambiente cresce a cada dia. Para se ter ideia, segundo o *Chemical Abstracts Service Registry Number* (CAS RN[®]), serviço prestado por uma divisão da Sociedade Americana de Química e que compila sistematicamente um banco de dados sobre todas as substâncias químicas já registradas, atualmente há mais de 125 milhões de registros¹.

Atualmente, praticamente todos os modos de produção das sociedades estão substancialmente relacionados à geração de xenobióticos. Atividades de extração mineral, agricultura, processos industriais, comércio de produtos e serviços etc. invariavelmente carecem de tais substâncias para os processos produtivos, ou geram resíduos de tal natureza após a realização da atividade econômica (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Nesse cenário, evidencia-se a preocupação quanto às possíveis interações e consequentes efeitos que determinados tipos e classes de substâncias podem causar ao ambiente e, consequentemente, nos seres vivos que o habitam (PERES; MOREIRA, 2003).

1.2 Uso de produtos químicos na agricultura

A agricultura consta como uma das mais antigas e importantes atividades da humanidade e foi responsável por diversas mudanças econômicas, sociais e ambientais de sua história. Inicialmente desenvolvida com a formação de pequenos grupos sociais e com

¹ Disponível em: <https://www.cas.org/content/chemical-substances>.

pequena demanda em termos de produtividade, a atividade foi se modificando ao longo do tempo. Particularmente em meados do século XX, alterações no modo de se conduzir a agricultura se intensificaram com vistas a uma ampliação da produção mundial de alimentos (FOLEY et al., 2005; TSCHARNTKE et al., 2005), processo comumente conhecido por *revolução verde*. Essa maximização se concebeu com a intensificação dos processos de produção agrícola, sobretudo por meio de seu controle genético e mecanizado e do uso massivo de agroquímicos, como os fertilizantes sintéticos e os agrotóxicos (TILMAN, 1999; TSCHARNTKE et al., 2005).

A despeito dos benefícios relativos a uma maior eficiência agrícola, essas características, aliadas aos processos de desmatamento de florestas e do uso monocultural da terra, implicaram em uma das mais consideráveis alterações ambientais de ordem global já ocorridas (MATSON et al., 1997; TSCHARNTKE et al., 2005), representando um grande desafio a ser enfrentado pela ciência (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). De fato, a agricultura moderna tem priorizado uma alta produtividade imediatista em detrimento de danos ambientais abrangentes e perdas contínuas e de longo prazo nos ecossistemas, como a poluição de corpos d'água, a salinização de solos e águas, a perda de habitats e da biodiversidade, entre outros impactos ambientais (FOLEY et al., 2005; ROCKSTRÖM et al., 2009).

Com relação aos agrotóxicos, muito se evoluiu em termos de tecnologia no decorrer do tempo. Enquanto até a Primeira Guerra Mundial eram-se usados nas lavouras os defensivos naturais produzidos localmente, o período entre guerras acelerou o processo de produção de novos tóxicos usados como armas químicas na Segunda Guerra por parte de empresas que, posteriormente, encontraram na agricultura um novo mercado para venda de seus produtos (LONDRES, 2011; PELAEZ; DA SILVA; ARAÚJO, 2013).

O conjunto de agrotóxicos utilizados nas lavouras muitas vezes não só deixa de cumprir seu papel em virtude de fatores como o aumento da resistência das culturas ante o seu uso indiscriminado, mas também oportunizam a biodisponibilização de contaminantes a espécies edáficas, aquáticas e, em instância posterior, à saúde humana (CARNEIRO et al., 2015). São exemplos desses materiais alguns metais pesados, compostos organoclorados, compostos organofosforados, dentre outros que podem interagir com o ambiente e os seres que nele habitam de maneira a extrapolar os benefícios e objetivos para os quais foram desenvolvidos (CARNEIRO et al., 2015; LONDRES, 2011).

1.3 Comportamento e destino dos agrotóxicos no ambiente

A presença e permanência dos agrotóxicos no meio ambiente variam em função de diversos fatores. Quando da aplicação dos produtos, eles se encontram temporariamente no ar, sobretudo quando há pulverização aérea por meio de aeronaves. Em seguida, parte dos produtos atinge a superfície das plantas que se deseja proteger e parte sofre a chamada deriva técnica, ou seja, um desvio que leva os produtos ao solo e aos ambientes aquáticos superficiais (CARNEIRO et al., 2015; GAVRILESCU, 2005).

Ainda que em condições ideais de temperatura, vento e calibração de equipamento, apenas cerca de 30% dos produtos ficam retidos nas plantas. Do restante, cerca de 20% sequer atingem a área de cultivo e cerca de 50% vão diretamente para o solo (CARNEIRO et al., 2015). Uma vez no solo, parte dos compostos evapora, parte é escoada para corpos d'água superficiais, parte é lixiviada para o lençol freático e outra parte se degrada no ambiente terrestre (CHAIM, 2004). Em decorrência desta situação, mesmo agrotóxicos com elevada eficácia, apresentam baixa eficiência, sendo que alguns estudos indicam que mais de 99% dos princípios ativos aplicados são desperdiçados por não entrarem, de fato, em contato com os organismos alvos (GRAHAM-BRYCE, 1977; PIMENTEL, 1995; PIMENTEL; BURGESS, 2012).

Além da via oficial, isto é, da aplicação usual de agrotóxicos, os compartimentos ambientais também recebem os produtos provenientes da lavagem das folhas tratadas, de lavagem dos equipamentos de aplicação, de derramamentos, de efluentes de indústrias de agrotóxicos e de resíduos de embalagens de agrotóxicos descartadas inadequadamente (CARNEIRO et al., 2015; SILVA, 2016).

O comportamento e destino dos diferentes agrotóxicos no ambiente dependem de características intrínsecas dos produtos - estrutura química e aspectos funcionais da molécula - e de fatores extrínsecos - condições físicas, químicas, biológicas do ambiente, frequência de aplicação, entre outros (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Há uma gama de agrotóxicos que acompanha os diferentes tipos de impactos que eles provocam nos compartimentos ambientais. Alguns produtos são rapidamente dissipados no ambiente, isto é, apresentam baixa persistência, fator geralmente mensurado pelo tempo de meia-vida do produto. Todavia, algumas substâncias revelam-se bastante estáveis no ambiente, podendo apresentar meia-vida de dezenas de anos (FOWLER, 1990; GAVRILESCU, 2005). Ademais, durante a degradação, algumas moléculas podem produzir subprodutos/metabólitos tão ou mais tóxicos que a

molécula original (GAVRILESCU, 2005; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; NOVELLI et al., 2012).

Do mesmo modo, ao passo que alguns agrotóxicos têm ação específica sobre determinados tipos de organismos, outros afetam grupos e níveis distintos, tratando-se de um comportamento bastante complexo no meio ambiente, uma vez que são influenciados por diversas interações físicas, químicas e biológicas do meio, tais como biodegradação, absorção, adsorção, retenção, degradação físico-química, dissolução, precipitação, volatilização, lixiviação e escoamento superficial, entre outras (Figura 1.1) (GAVRILESCU, 2005; GHAFOR et al., 2011; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Figura 1.1 - Alguns dos processos que regulam a persistência, o destino e os impactos dos xenobióticos no ambiente

Fonte: Adaptado de Moreira e Siqueira (2006).

1.4 Ambiente terrestre: destino primário dos agrotóxicos

Em função da já mencionada baixa eficiência dos agrotóxicos, os produtos destinados a controlar determinado tipo específico de praga normalmente acabam por atingir outros organismos, neste caso chamados de não-alvos. Em decorrência, muitos organismos edáficos não-alvos se encontram suscetíveis a uma série de produtos e subprodutos associados à dispersão de agrotóxicos, o que pode afetar seus processos vitais (EDWARDS, 2002; GAVRILESCU, 2005; VAN GESTEL, 2012), ainda que os produtos sejam utilizados

consoantes às recomendações dos rótulos e bulas (LONDRES, 2011). Por esse motivo, Rachel Carson, importante cientista estadunidense, em seu célebre livro *Primavera Silenciosa* por vezes trata os agrotóxicos como biocidas, isto é, capazes de matar tanto organismos considerados alvos, quanto os não-alvos (CARSON, 1962). Uma vez presentes no ambiente terrestre, os compostos se encontram biodisponíveis para a assimilação por parte das micro, meso e macrofauna terrestres, vias pelas quais entram na cadeia trófica do ecossistema. Quando incorporados aos organismos das espécies, os agrotóxicos podem bioacumular e biomagnificar ao longo da cadeia trófica, podendo até mesmo atingir o ser humano² por diversas rotas de exposição (CARNEIRO et al., 2015; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Os solos são primordiais para a provisão de funções e serviços ecossistêmicos, isto é, produtos e serviços dos quais as populações humanas se beneficiam, ainda que tal benefício decorra somente indiretamente da manutenção dos processos funcionais de determinado ecossistema (COSTANZA et al., 1997). São exemplos de serviços indiretos ocorridos no ambiente terrestre e com estreita participação dos organismos presentes: a provisão de habitat propício ao desenvolvimento vegetal; a degradação de poluentes, a decomposição da matéria orgânica; a ciclagem de nutrientes e energia; e os processos de estruturação de solo, uma vez que eles são importantes para a consolidação de outros processos de provisão mais diretos, como o fornecimento de matérias e energia para os seres vivos (alimento, água e matérias-primas em geral), a regulação climática, a melhoria da qualidade do ar, entre outros (ADHIKARI; HARTEMINK, 2016; DOMINATI; PATTERSON; MACKAY, 2010; ROBINSON et al., 2012; VERBRUGGEN et al., 2012).

Sistemas edáficos saudáveis são essenciais para o funcionamento de ecossistemas naturais e manejados (ROBINSON et al., 2012). Entretanto, em contraste aos ecossistemas naturais, as áreas ocupadas pela agricultura geralmente prejudicam a provisão de certos serviços ecossistêmicos, pois a conversão de ecossistemas naturais em terras para produção agrícola não é feita de maneira inteligente (MATSON et al., 1997). Um dos reflexos disso é a eliminação da atividade biológica do solo promovida pelos agrotóxicos, que pode prejudicar o próprio crescimento das culturas agrícolas e torná-las mais suscetíveis a pragas (TILMAN, 1999). Nesse caso, como consequência da ineficiência dos produtos, os agricultores passam a aumentar sistematicamente as doses aplicadas e a recorrer a produtos mais concentrados, gerando um ciclo vicioso desvantajoso (CARNEIRO et al., 2015; LONDRES, 2011)

² Não é objetivo deste trabalho discorrer sobre a problemática dos agrotóxicos em termos de saúde pública, mas já estão demonstrados diversos efeitos que tais produtos podem causar em seres humanos, provocando-lhes desde efeitos desreguladores dos sistemas endócrinos, reprodutivos e imunológicos, até consequências carcinogênicas (CARNEIRO et al., 2015; GAVRILESCU, 2005).

1.5 Ecotoxicologia terrestre voltada aos efeitos de agrotóxicos

Enquanto a toxicologia humana é a ciência que estuda os efeitos decorrentes das interações de substâncias químicas com o organismo humano, a ecotoxicologia estuda os efeitos dos xenobióticos no meio ambiente e tem o objetivo primordial de proteger o bom funcionamento dos ecossistemas (VAN GESTEL, 2012). O termo foi sugerido pelo professor e pesquisador francês René Truhaut, em 1969, embora pesquisas nessa área já ocorressem antes disso, como é o caso do renomado livro, de 1962, *A Primavera Silenciosa*, da pesquisadora Rachel Carson (CARSON, 1962).

Os primeiros artigos de ecotoxicologia terrestre surgiram ainda antes da década de 1960, com o intuito de reportar as observações dos efeitos negativos dos agrotóxicos em invertebrados do solo. Ao longo das décadas, a área ganhou força, sobretudo após o desenvolvimento de protocolos de testes ecotoxicológicos por parte de agências como a *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD), a *International Standardization Organization* (ISO), a *United States Environmental Protection Agency* (EPA) e a *American Society for Testing and Materials* (ASTM), a partir da década de 1980. Contudo, a área ainda se revela muito menos expressiva do que a vertente aquática da ecotoxicologia (VAN GESTEL, 2012). No Brasil não é diferente, mas há uma tendência de grande desenvolvimento da ecotoxicologia terrestre (NIVA et al., 2016), embora a Carta de Brasília³ resultante da Conferência Governança do Solo, promovida pelo Tribunal de Contas da União (TCU), enalteça a falta de informações detalhadas do território no que se refere aos solos.

Mais recentemente, a atenção da área tem se voltado aos efeitos de misturas de produtos químicos e da interação destes com outros fatores estressantes, como temperatura e umidade do solo (VAN GESTEL, 2012). Sabe-se que a exposição da fauna e flora aos agrotóxicos geralmente ocorre por diversas vias, uma vez que sua aplicação ocorre em períodos curtos de tempo (MOREIRA et al., 2017; SANTOS et al., 2011). Desse modo, diversos autores alertam quanto à necessidade de estudos que visem a analisar os efeitos de exposições a múltiplos agrotóxicos, muitas vezes com diferentes características (FLORES et al., 2014; PANIZZI; SUCIU; TREVISAN, 2017; ZHOU et al., 2011). Isso rompe com a ideia de que os efeitos combinados de exposição a um grupo de agrotóxicos sejam considerados apenas aditivos, isto é, o efeito total da mistura de produtos seja a simples soma dos efeitos das exposições separadas dos agentes sob as mesmas circunstâncias, haja vista que os

³Disponível em: <http://www.sbcs.org.br/wp-content/uploads/2015/03/carta-Brasilia-1.pdf>

diferentes princípios dos agrotóxicos podem também influenciar de modo antagônico ou sinérgico uns aos outros (DUFFUS; NORDBERG; TEMPLETON, 2007).

Um dos principais objetivos da ecotoxicologia terrestre é avaliar a qualidade ambiental de um solo, a qual está intimamente ligada à capacidade de sustentação de sua produtividade biológica, isto é, de manter a funcionalidade dos processos vitais à vida animal e vegetal (SILVEIRA; FREITAS, 2007). Nesse sentido, o impacto de agrotóxicos em organismos não-alvos são motivos de grande preocupação dentro da ecotoxicologia terrestre (VAN GESTEL, 2012). Particularmente, são de grande interesse as pesquisas acerca das relações entre a presença dos produtos e a manutenção ou não das funções que os microrganismos desempenham na qualidade ambiental dos solos (IMFELD; VUILLEUMIER, 2012; TOPP, 2003), uma vez que eles exercem papel importante em diversos processos, como a ciclagem de nutrientes e energia, a degradação de poluentes, a estruturação do solo, a decomposição da matéria orgânica, entre outros (DORAN, 2002; IMFELD; VUILLEUMIER, 2012; MARON; MOUGEL; RANJARD, 2011; NANNIPIERI et al., 2003).

Além do enfoque microbiológico, a ecotoxicologia terrestre se preocupa em estudar a toxicidade de agrotóxicos sobre seres vivos de outros níveis, como a mesofauna, a macrofauna e os vegetais superiores, além das interações entre os microrganismos e representantes da fauna e flora edáficas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Isto posto, os parâmetros de crescimento e reprodução da fauna e da flora do solo podem representar indicadores de avaliação dos impactos de agrotóxicos em ecossistemas terrestres (DIDDEN; RÖMBKE, 2001; IMFELD; VUILLEUMIER, 2012; JÄNSCH; RÖMBKE; DIDDEN, 2005; KRAEHMER et al., 2014).

Outra preocupação da ecotoxicologia terrestre é que quando se estuda o efeito de agrotóxicos no solo em condições de campo, as interações ocorridas são de tamanha complexidade que, muitas vezes, a interpretação dos dados é prejudicada (SCHAEFFER et al., 2010). Desse modo, o estudo das interações dos produtos entre os organismos pode ser feita de modo compartimentado e sob condições controladas (ex.: temperatura, umidade, iluminação, organismos selecionados) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

1.6 Agrotóxicos no Brasil: uma problemática sistêmica

Na literatura internacional, o grupo de substâncias utilizadas para o controle de pragas e doenças de plantas é denominado pesticidas (*pesticides*), com algumas referências a agroquímicos (*agrochemicals*). No Brasil, até a Constituição de 1988, a legislação tratava

esses produtos como defensivos agrícolas, termo, contudo, que exclui os agentes no controle sanitário urbano e omite a ideia de efeitos negativos à saúde humana e ao meio ambiente que os produtos podem causar (PERES; MOREIRA, 2003).

Neste trabalho é utilizado o termo *agrotóxico*, tanto por ser mais atual e contemplar melhor o significado do grupo de substâncias que ele representa (GOMIDE, 2005; PERES; MOREIRA, 2003), quanto por ser a denominação constante na legislação brasileira, desde a Lei nº 7.802/1989, que os define:

- a) os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos;
- b) substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 1989).

Concomitantemente a outros países, o uso dos agrotóxicos no Brasil começou a ser expandido no período conhecido como a modernização da agricultura nacional, situado entre 1945 e 1985 (TERRA; PELAEZ, 2009). Esse período caracterizou-se por profundas mudanças no processo tradicional de trabalho agrícola, traduzindo-se na industrialização do setor primário brasileiro por diversos meios, com destaque às estratégias de imposição de insumos químicos e biológicos via internacionalização produtiva das empresas líderes do mercado (PELAEZ; DA SILVA; ARAÚJO, 2013; PERES; MOREIRA, 2003).

A modernização da agricultura nacional foi efetivamente viabilizada quando foi criado o Sistema Nacional de Crédito Rural (SNCR) em 1965 (COELHO, 2001). Contudo, após 1975 é que notadamente a instalação do parque industrial de agrotóxicos no país se efetivou, sob o amparo do Programa Nacional de Defensivos Agrícolas (PNDA), no âmbito do II Plano Nacional de Desenvolvimento (PND) (PELAEZ; TERRA; SILVA, 2010).

Nas décadas de 1980 e 1990, a crise macroeconômica no Brasil forçou uma recessão da política de crédito agrícola, o que, todavia, não se traduziu em proporcional redução da produtividade média nacional (PELAEZ; TERRA; SILVA, 2010). O bom desempenho da agricultura nacional nesse período e no período subsequente dos anos 2000 levou o Brasil aos maiores índices mundiais de consumo de agrotóxicos. De fato, desde 1975 o país sempre esteve entre os seis maiores mercados de agrotóxicos do mundo (TERRA, 2008). O mesmo autor confere que em 2004 o país já detinha o terceiro maior índice de faturamento da

indústria mundial e, conforme dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDIVEG), desde 2008 o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA VEGETAL, 2015).

Dados recentes de agrotóxicos do Brasil mostram que foram vendidas 352 toneladas de ingredientes ativos e 914 toneladas de produtos comerciais em 2014, movimentando 12,2 bilhões de dólares americanos, o maior montante da história do país até então (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA VEGETAL, 2015). Observando a tendência de crescimento dos últimos anos (Figura 1.2), provavelmente os anos mais recentes superaram essa marca. No período entre os anos 2000 e 2014, enquanto o mercado mundial de produção de agrotóxicos cresceu cerca de 120% acumuladamente, o mercado brasileiro cresceu quase cerca de 400% acumuladamente, conforme a Figura 1.2 (ROCHA; ESPÍNDOLA, 2015; SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA VEGETAL, 2015).

Figura 1.2 - Comparação entre as taxas de vendas de agrotóxicos do Brasil e do restante do mundo no período de 2000 a 2014

Fonte: Adaptado de Rocha e Espíndola (2015); Sindiveg (2015)

No Brasil, há cerca de 430 ingredientes ativos, 750 produtos técnicos e 1.400 formulações de agrotóxicos registrados (CARNEIRO et al., 2015), sendo que o registro dos produtos não possui prazo de validade, ao contrário do que ocorre na União Europeia e nos Estados Unidos, por exemplo (PELAEZ; DA SILVA; ARAÚJO, 2013). Isto significa que não

existem procedimentos de atualização periódicas dos registros, o que possibilitaria reavaliar sistematicamente os efeitos dos produtos sobre o meio ambiente e requereria consequentes aprovações do Ministério do Meio Ambiente (CARNEIRO et al., 2015; LONDRES, 2011). Dentre a gama de agrotóxicos utilizados no Brasil, dois serão motivo de pesquisa neste trabalho e são apresentados nos itens a seguir.

1.7 Kraft® 36 EC (i.a. abamectina)

O produto comercial Kraft® 36 EC (doravante denominado Kraft), produzido no Brasil pela empresa Cheminova Brasil Ltda., é um inseticida e acaricida com modo de ação por contato e ingestão, pertencente ao grupo químico das avermectinas e cuja formulação leva o ingrediente ativo abamectina em concentração de 36 g L⁻¹ (CHEMINOVA BRASIL LDTA., 2014).

As avermectinas originam-se do processo de fermentação das actinobactérias *Streptomyces avermitilis* e são majoritariamente utilizadas para controle veterinário de parasitas. Há diversos tipos de avermectinas, tais como abamectina, doramectina, eprinomectina, ivermectina, milbemicina oxima, moxidectina e selamectina, as quais se diferenciam entre si em relação a suas estruturas moleculares. Os tipos mais comuns são a ivermectina e a abamectina (Figura 1.3), sendo esta última a única avermectina utilizada para controle de pragas agrícolas (BAI; OGBOURNE, 2016; FISHER; MROZIK, 1989). As avermectinas são consideradas neurotoxinas que, no caso dos vertebrados, atuam nos receptores do neurotransmissor ácido gama-aminobutírico (GABA) e, no caso dos invertebrados, atuam nos receptores de glutamato e cloreto, bloqueando a execução das principais funções de tais organismos, processo que ainda não é tão bem compreendido (BLOOMQUIST, 2003; PEMBERTON et al., 2001; WOLSTENHOLME, 2012).

Figura 1.1 – Estrutura química da abamectina

Fonte: Wislocki, Grosso e Dybas (1989).

A abamectina caracteriza-se por ser composta por uma mistura de ao menos 80% de avermectina B_{1a} e não mais do que 20% de avermectina B_{1b} (FISHER; MROZIK, 1989). Ela possui baixa mobilidade no solo pois liga-se fortemente às suas partículas em função de alta afinidade à matéria orgânica (alto coeficiente de partição de carbono orgânico - KOC) e a baixa solubilidade em água (WISLOCKI; GROSSO; DYBAS, 1989). Contudo, a molécula de abamectina normalmente se degrada rapidamente por mecanismos microbiológicos e, mormente, fotoquímicos, o que pode prevenir processos de bioconcentração (CHEMINOVA BRASIL LDTA., 2014; WISLOCKI; GROSSO; DYBAS, 1989). Em função das particularidades dos processos de degradação da abamectina, alguns fatores influenciam bastante o seu tempo de degradação, tais como a concentração do produto no ambiente e as condições físico-químicas do mesmo. Para o solo, já foram relatados valores de meia-vida que vão desde 3 até mais de 50 dias (BAI; OGBOURNE, 2016). Algumas outras propriedades da abamectina podem ser encontradas na Tabela 1.1.

Tabela 1.1 - Características físico-químicas da abamectina

Número CAS¹	71751-41-2
Fórmula molecular¹	C ₄₈ H ₇₂ O ₁₄
Massa molar (g mol⁻¹)¹	873,09
Solubilidade em água (ppb)²	7.8
Coef. de partição de carbono orgânico (Koc)²	≥ 4.000
Classificação de persistência³	Não persistente

¹ Conforme disponível em: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/avermectin_b1a#section=Top

² Conforme Wislocki, Grosso e Dybas (1989).

³ Conforme a classificação de Moreira e Siqueira (2006).

O Kraft é um produto formulado concentrado emulsionável, líquido e estável às condições normais de temperatura e pressão. Possui classificação toxicológica I – Extremamente Tóxico, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e classificação do potencial de periculosidade ambiental II – Muito Perigoso ao Meio Ambiente, segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). No Brasil, o Kraft é geralmente utilizado nas culturas de algodão, batata, café, citros, crisântemo, feijão, maçã, mamão, morango, soja e tomate (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2015a)

A abamectina é um princípio ativo banido na União Europeia e atualmente passa por processo de reavaliação toxicológica perante a ANVISA, em função de toxicidade aguda e da suspeita de toxicidade reprodutiva a seres humanos do ingrediente ativo e de seus metabólitos (CARNEIRO et al., 2015).

1.8 Fungicida Score[®] 250 EC (i.a. difenoconazol)

O produto comercial Score[®] 250 EC (doravante denominado Score), produzido no Brasil pela empresa Syngenta Proteção de Cultivos Ltda., é um fungicida com modo de ação sistêmico, pertencente ao grupo químico dos triazóis e cuja formulação leva o ingrediente ativo difenoconazol em concentração de 250 g L⁻¹. O produto comercial Score[®] 250 é um fungicida com modo de ação sistêmico, pertencente ao grupo químico dos triazóis e cuja formulação leva o ingrediente ativo difenoconazol em concentração de 250 g L⁻¹ (SYNGENTA PROTEÇÃO DE CULTIVOS LTDA, 2002).

O modo de ação dos triazóis e, por extensão, do difenoconazol (Figura 1.4) consiste em inibir a biossíntese do ergosterol, responsável por manter a estrutura da membrana celular dos fungos e por ser um precursor de hormônios importantes, de modo análogo ao papel exercido pelo colesterol nas células animais (BOSSCHE; KOYMANS; MOEREELS, 1995).

Figura 1.2 – Estrutura química do difenoconazol

Fonte: Dong et al. (2013)

Assim como a abamectina, o difenoconazol também possui baixa mobilidade e grande afinidade à matéria orgânica do solo, em cujas partículas fixa fortemente. Diferentemente da abamectina, porém, o difenoconazol apresenta uma persistência maior no ambiente terrestre, sendo que sua meia-vida pode atingir valores de mais de 200 dias em condições aeróbias e mais de 400 dias em condições anaeróbias (DONG et al., 2013; GUO et al., 2010; THOM; OTTOW; BENCKISER, 1997). Algumas outras propriedades do difenoconazol podem ser encontradas na Tabela 2.

Tabela 1.2 - Características físico-químicas do difenoconazol

Número CAS¹	119446-68-3
Fórmula molecular¹	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃
Massa molar (g mol⁻¹)¹	406,26
Solubilidade em água (ppm)¹	15,0
Coef. de partição de carbono orgânico (Koc)²	≥ 6.000
Classificação de persistência³	Moderadamente persistente

¹ Conforme disponível em: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/230.htm>

² Conforme disponível em: http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC35904

³ Conforme a classificação de Moreira e Siqueira (2006).

Assim, como o Kraft, o Score é um produto formulado concentrado emulsionável, líquido e estável às condições normais de temperatura e pressão. Também possui classificação toxicológica I – Extremamente Tóxico, segundo a ANVISA e classificação do potencial de periculosidade ambiental II – Muito Perigoso ao Meio Ambiente, segundo o IBAMA. No Brasil, o Score é utilizado em uma grande variedade de culturas, tais como: abacate, abobrinha, alface, algodão, batata, banana, café, cebola, citros, feijão, girassol, maçã, mamão, milho, morango, soja, tomate e uva (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2015b).

1.9 Efeitos dos agrotóxicos Kraft e Score e seus respectivos ingredientes ativos sobre organismos do solo

Em relação aos produtos comerciais Kraft e Score e seus ingredientes ativos, alguns já foram objeto de estudos ecotoxicológicos, mas a maioria dos trabalhos voltam-se à toxicidade dos produtos a organismos aquáticos (CASALI-PEREIRA et al., 2015; MOREIRA et al., 2017; NOVELLI et al., 2012, 2016), havendo uma carência de trabalhos sobre os efeitos de tais substâncias em organismos terrestres.

No caso da abamectina, o fato de a maioria dos trabalhos analisarem efeitos em organismos aquáticos também deriva do fato de que ela é considerada altamente tóxica para peixes e invertebrados aquáticos (CHEMINOVA BRASIL LDTA., 2014; WISLOCKI; GROSSO; DYBAS, 1989). Em que pese à grande capacidade da abamectina em se adsorver às partículas de solo, parca é a literatura acerca dos possíveis efeitos deste ingrediente aos organismos terrestres. Dos estudos existentes, a maioria refere-se a efeitos sobre minhocas (DIAO; JENSEN; HANSEN, 2007; JENSEN; DIAO; SCOTT-FORDSMAND, 2007; NIVA et al., 2016; NUNES; DAAM; ESPÍNDOLA, 2016; NUNES; ESPÍNDOLA, 2012; WANG et al., 2012), havendo alguns outros estudos com enquitreídeos, colêmbolos (DIAO; JENSEN; HANSEN, 2007), nematoides (QIAO et al., 2012), isópodos (KOLAR et al., 2010) e ácaros (AHMAD et al., 2009; HAMED; FATHIPOUR; SABER, 2011).

Em relação ao difenoconazol, a carência de estudos em ecotoxicologia terrestre é ainda maior, praticamente inexistindo estudos em periódicos conceituados. É possível encontrar alguns estudos com difenoconazol em ambientes aquáticos e alguns estudos sobre os efeitos de outros compostos da família dos triazóis sobre organismos do solo, como minhocas (BART et al., 2017; NÉLIEU et al., 2016; PELOSI et al., 2016), microrganismos (GONÇALVES et al., 2009b; ZHANG et al., 2014b), colêmbolos (FRAMPTON; WRATTEN, 2000) e

enquitreídeos (BART et al., 2017), fato preocupante considerando o potencial de persistência do produto no solo (DONG et al., 2013; SYNGENTA PROTEÇÃO DE CULTIVOS LTDA, 2002). Além disso, dada a tendência mundial de substituição dos fungicidas de modo de ação que seja por contato por fungicidas sistêmicos, estudos acerca da ecotoxicidade de tais produtos são bastante recomendados (DIAS, 2012).

2 JUSTIFICATIVA

O destaque do Brasil como o maior consumidor de agrotóxicos do mundo (SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA VEGETAL, 2015) perpassa um contexto que vai além dos problemas causados pelo uso regulamentado dos produtos, isto é, aquele que segue as leis, os rótulos e as bulas. Evidenciam-se, no país, problemas de ordens política e jurídica, como a demora nos processos de reavaliação; a permissividade de uso de produtos já proibidos em diversos países (PELAEZ; DA SILVA; ARAÚJO, 2013); aspectos de precarização das condições de trabalho dos agricultores; como a falta de uso de Equipamento de Proteção Individual (EPI); o descarte inadequado de embalagens (LONDRES, 2011); entre outras vicissitudes em função das quais a conjuntura brasileira em relação aos agrotóxicos é motivo de estudo amiúde.

Nesse complexo contexto, ainda são parcas as informações sobre o comportamento dos agrotóxicos em regiões tropicais e com organismos do solo, sendo que tais pesquisas são enfaticamente recomendadas (DAAM; VAN DEN BRINK, 2010; NIVA et al., 2016; RICO et al., 2011; SANCHEZ-BAYO; HYNE, 2011). Com efeito, os países em desenvolvimento, majoritariamente presentes nas regiões tropicais, estão sujeitos a problemas mais complexos relacionados aos agrotóxicos, devido à falta de qualificação da força de trabalho e ao agravamento provocado por uma série de determinantes de ordem social (PERES; MOREIRA, 2003).

A Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (*Food and Agriculture Organization* - FAO) determinou 2015, ano de início deste trabalho, como Ano Internacional dos Solos em virtude da sua importância ímpar para o provimento de funções ecossistêmicas e para a segurança alimentar da humanidade.

Em termos de políticas públicas brasileiras, este trabalho se conecta e encontra respaldo em diversas frentes, tais como a Política Nacional do Meio Ambiente (BRASIL, 1981), o Plano Nacional de Saúde 2016-2019 (BRASIL, 2016a), o Plano Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional 2016-2019 (BRASIL, 2016b), a Política Nacional de Saúde Integral das Populações do Campo e da Floresta (BRASIL, 2013), a Política Nacional de Saúde do Trabalhador e da Trabalhadora (BRASIL, 2012), a Constituição Federal de 1988, lei máxima do país (BRASIL, 1988), entre outros diplomas jurídicos e políticos.

Dadas as informações sobre a complexa conjuntura brasileira em relação ao uso dos agrotóxicos, evidencia-se a importância do entendimento de como os contaminantes podem

afetar a fauna e flora edáficas, sobretudo em regiões de intensa produção agrícola. O Núcleo de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (NEEA), do Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA), da USP - São Carlos, vem estudando a região do município de Bom Repouso (MG) desde o ano 2000, devido a sua importância como produtora agrícola e potencial causadora de danos ambientais pelo uso intensivo de produtos químicos nas lavouras. Há uma preocupação quanto ao impacto desses produtos no meio ambiente, sobretudo devido às suscetibilidades ambientais da região, que está localizada no alto da Serra da Mantiqueira, com topografia acidentada e alta incidência de chuvas, o que favorece a dispersão dos produtos químicos pelo ambiente (MOREIRA et al., 2017; NOVELLI et al., 2012, 2016; NUNES; ESPÍNDOLA, 2012).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar se e como os agrotóxicos Score[®] 250 EC e Kraft[®] 36 EC, muito utilizados na região de Bom Repouso - MG, isolados e em mistura, afetam a flora, a micro e a mesofauna edáficas ao longo do tempo após a contaminação do solo.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Analisar os efeitos dos agrotóxicos Score[®] 250 EC e Kraft[®] 36 EC, isolados e em mistura, sobre as comunidades microbianas do solo ao longo de 84 dias após a contaminação, usando como indicadores da atividade microbiana os parâmetros: biomassa microbiana de carbono (BMC), a respiração basal do solo (RBS), o quociente metabólico do solo (qCO_2) e a atividade da enzima β -glucosidase;
- b) Analisar os efeitos dos agrotóxicos Score[®] 250 EC e Kraft[®] 36 EC, isolados e em mistura, sobre a reprodução de enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*) em diferentes densidades de populações ao longo de 84 dias após a contaminação;
- c) Analisar os efeitos dos agrotóxicos Score[®] 250 EC e Kraft[®] 36 EC, isolados e em mistura, sobre a relação trófica entre enquitreídeos e microrganismos ao longo de 84 dias após a contaminação;
- d) Analisar os efeitos dos agrotóxicos Score[®] 250 EC e Kraft[®] 36 EC, isolados e em mistura, sobre a germinação e o crescimento do tomate (*Lycopersicon Lycopersicum*) ao longo de 84 dias após a contaminação.

REFERÊNCIAS⁴

ADHIKARI, K.; HARTEMINK, A. E. Linking soils to ecosystem services - A global review. **Geoderma**, v. 262, p. 101–111, 2016.

AHMAD, N. et al. Selectivity of Three Miticides to Spider Mite Predator, *Phytoseius plumifer* (Acari: Phytoseiidae) Under Laboratory Conditions. **Agricultural Sciences in China**, v. 8, n. 3, p. 326–331, 1 mar. 2009.

BAI, S. H.; OGBOURNE, S. Eco-toxicological effects of the avermectin family with a focus on abamectin and ivermectin. **Chemosphere**, v. 154, p. 204–214, jul. 2016.

BART, S. et al. Differences in sensitivity between earthworms and enchytraeids exposed to two commercial fungicides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 140, p. 177–184, jun. 2017.

BLOOMQUIST, J. R. Chloride channels as tools for developing selective insecticides. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 54, n. 4, p. 145–156, 2003.

BOSSCHE, H. V.; KOYMANS, L.; MOEREELS, H. P450 inhibitors of use in medical treatment: Focus on mechanisms of action. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 67, n. 1, p. 79–100, 1 jan. 1995.

BRASIL. **Lei nº 6.938, de 31 de agosto de 1981**. Dispõe sobre a Política Nacional do Meio Ambiente, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L6938.htm. Acesso em out. 2016.

BRASIL. **Constituição (1988)**. Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF: Senado, 1988. BRASIL. 7802. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989.

BRASIL. 1823. **Portaria nº 1.823, de agosto de 2012**. Institui a Política Nacional de Saúde do Trabalhador e da Trabalhadora. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2012/prt1823_23_08_2012.html. Acesso em out. 2016..

BRASIL. **Política nacional de saúde integral das populações do campo e da floresta**. 2013 Disponível em: goo.gl/vv4DWB. Acesso em out. 2016.

BRASIL. **Plano Nacional de Saúde 2016-2019**. 2016^a. Disponível em: http://conselho.saude.gov.br/ultimas_noticias/2016/docs/PlanoNacionalSaude_2016_2019.pdf. Acesso em out. 2016.

BRASIL. **Plano Nacional de Segurança Alimentar 2016-2019**. 2016 b. Disponível em: http://www.mds.gov.br/webarquivos/arquivo/seguranca_alimentar/caisan/plansan_2016_19.pdf. Acesso em out. 2016.

CARNEIRO, F. F. et al. (EDS.). **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde** EPSJV/Expressão Popular, , 2015.

⁴ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023)

CARSON, R. **Primavera silenciosa**. 2. ed. [s.l.] Melhoramentos, 1962.

CASALI-PEREIRA, M. P. et al. Toxicity of Vertimec® 18 EC (active ingredient abamectin) to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Chemosphere**, v. 139, p. 558–564, nov. 2015.

CHAIM, A. Tecnologia de Aplicação de Agrotóxicos: Fatores que afetam a eficiência e o impacto ambiental. In: **Agrotóxicos e ambiente**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 400.

CHEMINOVA BRASIL LDTA. **Ficha de informação de segurança de produto químico**, de outubro de 2014. Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/kraft.pdf>>

COELHO, C. N. 70 anos de política agrícola no Brasil (1931-2001). **Revista de Política Agrícola**, 2001.

COSTANZA, R. et al. The value of the world's ecosystem services and natural capital. **Nature**, v. 387, n. 6630, p. 253–260, 1997.

DAAM, M. A.; VAN DEN BRINK, P. J. Implications of differences between temperate and tropical freshwater ecosystems for the ecological risk assessment of pesticides. **Ecotoxicology**, v. 19, n. 1, p. 24–37, 2010.

DIAO, X.; JENSEN, J.; HANSEN, A. D. Toxicity of the anthelmintic abamectin to four species of soil invertebrates. **Environmental Pollution**, v. 148, n. 2, p. 514–519, 1 jul. 2007.

DIAS, M. C. Phytotoxicity: An Overview of the Physiological Responses of Plants Exposed to Fungicides. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1–4, 2012.

DIDDEN, W.; RÖMBKE, J. Enchytraeids as Indicator Organisms for Chemical Stress in Terrestrial Ecosystems. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 50, n. 1, p. 25–43, 1 set. 2001.

DOMINATI, E.; PATTERSON, M.; MACKAY, A. A framework for classifying and quantifying the natural capital and ecosystem services of soils. **Ecological Economics**, v. 69, n. 9, p. 1858–1868, 2010.

DONG, F. et al. Chiral Triazole Fungicide Difenoconazole: Absolute Stereochemistry, Stereoselective Bioactivity, Aquatic Toxicity, and Environmental Behavior in Vegetables and Soil. **Environmental Science & Technology**, v. 47, n. 7, p. 3386–3394, 2 abr. 2013.

DORAN, J. W. Soil health and global sustainability: translating science into practice. **Soil Health as an Indicator of Sustainable Management**, v. 88, n. 2, p. 119–127, fev. 2002.

DUFFUS, J. H.; NORDBERG, M.; TEMPLETON, D. M. Glossary of terms used in toxicology. **Pure and Applied Chemistry**, p. 1153–1344, 2007.

EDWARDS, C. A. Assessing the effects of environmental pollutants on soil organisms, communities, processes and ecosystems. **European Journal of Soil Biology**, v. 38, n. 3–4, p. 225–231, 2002.

FISHER, M. H.; MROZIK, H. Chemistry. In: CAMPBELL, W. C. (Ed.). . **Ivermectin and Abamectin**. New York, NY: Springer New York, 1989. p. 1–23.

FLORES, L. et al. Effects of a fungicide (imazalil) and an insecticide (diazinon) on stream fungi and invertebrates associated with litter breakdown. **Science of the Total Environment**, v. 476–477, p. 532–541, 2014.

FOLEY, J. A. et al. Global consequences of land use. **Science**, v. 309, n. 5734, p. 570–574, 2005.

FOWLER, S. W. Critical review of selected heavy metal and chlorinated hydrocarbon concentrations in the marine environment. **Marine Environmental Research**, v. 29, n. 1, p. 1–64, 1990.

FRAMPTON, G. K.; WRATTEN, S. D. Effects of Benzimidazole and Triazole Fungicide Use on Epigeic Species of Collembola in Wheat. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 46, n. 1, p. 64–72, 1 maio 2000.

GAVRILESCU, M. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. **Engineering in Life Sciences**, v. 5, n. 6, p. 497–526, 2005.

GHAFOOR, A. et al. Measurements and modeling of pesticide persistence in soil at the catchment scale. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 10, p. 1900–1908, 2011.

GOMIDE, M. Agrotóxico: que nome dar? **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10, p. 1047–1054, 2005.

GONÇALVES, I. C. R. et al. Effect of paclobutrazol on microbial biomass, respiration and cellulose decomposition in soil. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 3, p. 235–238, 1 maio 2009.

GRAHAM-BRYCE, I. J. Crop Protection: A Consideration of the Effectiveness and Disadvantages of Current Methods and of the Scope for Improvement. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 281, n. 980, p. 163, 25 nov. 1977.

GUO, C. et al. Determination and safety evaluation of difenoconazole residues in apples and soils. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 85, n. 4, p. 427–431, 2010.

HAMEDI, N.; FATHIPOUR, Y.; SABER, M. Sublethal effects of abamectin on the biological performance of the predatory mite, *Phytoseius plumifer* (Acari: Phytoseiidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 53, n. 1, p. 29–40, 2011.

IMFELD, G.; VUILLEUMIER, S. Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: A critical review. **Bioindication in Soil Ecosystems**, v. 49, p. 22–30, mar. 2012.

JÄNSCH, S.; RÖMBKE, J.; DIDDEN, W. The use of enchytraeids in ecological soil classification and assessment concepts. **Includes Special Issue: ECOLOGICAL SOIL QUALITY Classification and Assessment Includes Special Issue: ECOLOGICAL SOIL QUALITY**, v. 62, n. 2, p. 266–277, out. 2005.

JENSEN, J.; DIAO, X.; SCOTT-FORDSMAND, J. J. Sub-lethal toxicity of the antiparasitic abamectin on earthworms and the application of neutral red retention time as a biomarker. **Chemosphere**, v. 68, n. 4, p. 744–750, 1 jun. 2007.

KOLAR, L. et al. Toxicity of abamectin to the terrestrial isopod *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea). **Ecotoxicology**, v. 19, n. 5, p. 917–927, 2010.

KRAEHMER, H. et al. Herbicides as Weed Control Agents: State of the Art: I. Weed Control Research and Safener Technology: The Path to Modern Agriculture. **Plant Physiology**, v. 166, n. 3, p. 1119–1131, 2014.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.

MARON, P.-A.; MOUGEL, C.; RANJARD, L. Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. **Biodiversity in face of human activities / La biodiversité face aux activités humaines**, v. 334, n. 5–6, p. 403–411, maio 2011.

MATSON, P. A. et al. Agricultural intensification and ecosystem properties. **Science**, v. 277, n. 5325, p. 504–509, 1997.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Relatório de produtos formulados: Kraft 36 EC**, 2015a.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Relatório de produtos formulados: Score 250 EC**, 2015b.

MOREIRA, F. M. DE S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006.

MOREIRA, R. A. et al. Toxicity of abamectin and difenoconazole mixtures to a Neotropical cladoceran after simulated run-off and spray drift exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 185, p. 58–66, 2017.

NANNIPIERI, P. et al. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v. 54, n. 4, p. 655–670, 2003.

NÉLIEU, S. et al. Evaluation of epoxiconazole bioavailability in soil to the earthworm *Aporrectodea icterica*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 4, p. 2977–2986, 2016.

NIVA, C. C. et al. Soil ecotoxicology in Brazil is taking its course. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 11, p. 11363–11378, 2016.

NOVELLI, A. et al. Field and laboratory studies to assess the effects of Vertimec® 18EC on *Daphnia similis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 75, p. 87–93, 1 jan. 2012.

NOVELLI, A. et al. Impact of runoff water from an experimental agricultural field applied with Vertimec® 18EC (abamectin) on the survival, growth and gill morphology of zebrafish juveniles. **Chemosphere**, v. 144, p. 1408–1414, fev. 2016.

NUNES, M. E. T.; DAAM, M. A.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Survival, morphology and reproduction of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) as affected by Vertimec® 18 EC (a.i. abamectin) in tests performed under tropical conditions. **Applied Soil Ecology**, v. 100, p. 18–26, abr. 2016.

NUNES, M. E. T.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 4, p. 1063–1071, 2012.

PANIZZI, S.; SUCIU, N. A.; TREVISAN, M. Combined ecotoxicological risk assessment in the frame of European authorization of pesticides. **Science of the Total Environment**, v. 580, p. 136–146, 2017.

PELAEZ, V.; DA SILVA, L. R.; ARAÚJO, E. B. Regulation of pesticides: A comparative analysis. **Science and Public Policy**, v. 40, n. 5, p. 644–656, 2013.

PELAEZ, V.; TERRA, F. H. B.; SILVA, L. R. DA. A regulamentação dos agrotóxicos no Brasil: entre o poder de mercado e a defesa da saúde e do meio ambiente. **Revista de Economia**, p. 27–48, jan. 2010.

PELOSI, C. et al. Sublethal effects of epoxiconazole on the earthworm *Aporrectodea icterica*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 4, p. 3053–3061, 1 fev. 2016.

PEMBERTON, D. J. et al. Characterization of glutamate-gated chloride channels in the pharynx of wild-type and mutant *Caenorhabditis elegans* delineates the role of the subunit GluCl- α 2 in the function of the native receptor. **Molecular Pharmacology**, v. 59, n. 5, p. 1037–1043, 2001.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. (EDS.). **É veneno ou é remédio?: agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.

PIMENTEL, D. Amounts of pesticides reaching target pests: Environmental impacts and ethics. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, v. 8, n. 1, p. 17–29, 1995.

PIMENTEL, D.; BURGESS, M. Small amounts of pesticides reaching target insects. **Environment, Development and Sustainability**, v. 14, n. 1, p. 1–2, 2012.

QIAO, K. et al. Effect of abamectin on root-knot nematodes and tomato yield. **Pest Management Science**, v. 68, n. 6, p. 853–857, 2012.

RICO, A. et al. Effects of malathion and carbendazim on Amazonian freshwater organisms: Comparison of tropical and temperate species sensitivity distributions. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 4, p. 625–634, 2011.

ROBINSON, D. A. et al. Natural capital, ecosystem services, and soil change: Why soil science must embrace an ecosystems approach. **Vadose Zone Journal**, v. 11, n. 1, 2012.

ROCHA, A. G. DA; ESPÍNDOLA, E. L. G. **A warning about Brazilian framework regarding pesticides**. Abstract Book. **Anais...** In: SETAC LATIN AMERICA 11TH BIENNIAL MEETING. Buenos Aires: 2015

ROCKSTRÖM, J. et al. A safe operating space for humanity. **Nature**, v. 461, n. 7263, p. 472–475, 2009.

SANCHEZ-BAYO, F.; HYNE, R. V. Comparison of environmental risks of pesticides between tropical and nontropical regions. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 7, n. 4, p. 577–586, 2011.

SANTOS, M. J. G. et al. Evaluation of the joint effect of glyphosate and dimethoate using a small-scale terrestrial ecosystem. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 7, p. 1994–2001, 2011.

SCHAEFFER, A. et al. (EDS.). **Semi-Field Methods for the Environmental Risk Assessment of Pesticides in Soil**. [s.l.] CRC Press, 2010.

SILVA, M. R. **Gestão de embalagens de agrotóxicos - logística reversa em pequenos municípios brasileiros: o caso do município de Bom Repouso, MG**. Dissertação de mestrado—São Carlos: Universidade de São Paulo, 2016.

SILVEIRA, A. P. D. DA; FREITAS, S. DOS S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Campinas: Instituto Agrônômico, 2007.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA VEGETAL. **Vendas de defensivos por classes**, 2015.

SYNGENTA PROTEÇÃO DE CULTIVOS LTDA. **Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico: Score 250 EC**, de agosto de 2002. Disponível em: <https://www.extrapratika.com.br/BR_Docs/Portuguese/FISPQ/SCORE.pdf>

TERRA, F. H. B. **A indústria de agrotóxicos no Brasil**. Dissertação de mestrado—Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2008.

TERRA, F. H. B.; PELAEZ, V. **A história da indústria de agrotóxicos no Brasil: das primeiras fábricas na década de 1940 aos anos 2000**. Oral apresentado em 47o Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural. Porto Alegre, 2009. Disponível em: <<http://www.sober.org.br/palestra/13/43.pdf>>

THOM, E.; OTTOW, J. C. G.; BENCKISER, G. Degradation of the fungicide difenoconazole in a silt loam soil as affected by pretreatment and organic amendment. **Environmental Pollution**, v. 96, n. 3, p. 409–414, 1 jan. 1997.

TILMAN, D. Global environmental impacts of agricultural expansion: The need for sustainable and efficient practices. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 11, p. 5995–6000, 1999.

TOPP, E. Bacteria in agricultural soils: Diversity, role and future perspectives. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 83, n. 3, p. 303–309, 2003.

TSCHARNTKE, T. et al. Landscape perspectives on agricultural intensification and biodiversity - Ecosystem service management. **Ecology Letters**, v. 8, n. 8, p. 857–874, 2005.

VAN GESTEL, C. A. M. Soil ecotoxicology: State of the art and future directions. **ZooKeys**, v. 176, n. SPECIAL ISSUE, p. 275–296, 2012.

VERBRUGGEN, E. et al. Provision of contrasting ecosystem services by soil communities from different agricultural fields. **Plant and Soil**, v. 350, n. 1–2, p. 43–55, 2012.

WANG, Y. et al. Comparative acute toxicity of twenty-four insecticides to earthworm, *Eisenia fetida*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 79, p. 122–128, 1 maio 2012.

WISLOCKI, P. G.; GROSSO, L. S.; DYBAS, R. A. Environmental Aspects of Abamectin Use in Crop Protection. In: CAMPBELL, W. C. (Ed.). . **Ivermectin and Abamectin**. New York, NY: Springer New York, 1989. p. 182–200.

WOLSTENHOLME, A. J. Glutamate-gated chloride channels. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 48, p. 40232–40238, 2012.

ZHANG, W. et al. Effect of tetraconazole application on the soil microbial community. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 13, p. 8323–8332, 1 jul. 2014.

ZHOU, S. et al. Individual and combined toxic effects of cypermethrin and chlorpyrifos on earthworm. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, n. 4, p. 676–680, 2011.

CAPÍTULO II

EFEITOS DE AGROTÓXICOS SOBRE MICRORGANISMOS DO SOLO E IMPLICAÇÕES PARA POPULAÇÕES DE *ENCHYTRAEOUS CRYPTICUS*

André Gomes da Rocha¹, Joana Dias Bresolin², Wilson Tadeu Lopes da Silva², Evaldo
Luiz Gaeta Espindola¹, Vanessa Bezerra de Menezes Oliveira¹

⁽¹⁾ PPG-SEA e NEEA/CRHEA/EESC/ Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, Brasil

⁽²⁾ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, São Carlos, São Paulo, Brasil

1 INTRODUÇÃO

Historicamente a agricultura sempre foi uma das principais atividades humanas, sendo que, no Brasil, ela corresponde a um dos setores econômicos mais relevantes (FERREIRA et al., 2012). A partir de meados do século XX, o modo de produção agrícola mundial começou a se transformar para satisfazer a crescente demanda das sociedades. Tal mudança se deu por diversas frentes de transformações, dentre as quais pode-se destacar a utilização de produtos que ajudem a maximizar a eficiência produtiva das lavouras, como é o caso dos agrotóxicos (ARMAGAN; ÖZDEN; DIMITROVSKI, 2015). Se por um lado tais produtos são importantes para prevenir e combater pragas agrícolas, por outro eles têm sido motivo de preocupação em termos de saúde humana e ambiental devido a fatores como: alta persistência no ambiente (GAVRILESCU, 2005), alta toxicidade a organismos não alvo (BHAT, 2012) e baixa especificidade (GRAHAM-BRYCE, 1977; PIMENTEL, 1995; PIMENTEL; BURGESS, 2012).

Os compartimentos terrestres são o destino primário dos agrotóxicos quando das aplicações nas lavouras (GAVRILESCU, 2005). Nesse contexto, a depender das características do meio e dos compostos, estes ficarão biodisponíveis para a assimilação por parte dos organismos edáficos pertencentes à micro, meso e macrofauna terrestres, vias pelas quais os compostos entram na cadeia trófica do ecossistema (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Em relação aos microrganismos do solo, eles são responsáveis pela provisão de uma série de serviços que amparam a funcionalidade ambiental dos ecossistemas, tais como a decomposição da matéria orgânica, a ciclagem de nutrientes e energia, os processos de estruturação do solo, a degradação de poluentes etc., além de servirem como fonte primária de alimento dentro de diversas cadeias alimentares (DORAN, 2002; IMFELD; VUILLEUMIER, 2012; MARON; MOUGEL; RANJARD, 2011; NANNIPIERI et al., 2003).

Já em relação à mesofauna edáfica, um dos principais invertebrados que dependem diretamente das comunidades microbianas para se alimentar são os enquitreídeos (classe Oligochaeta, família Enchytraeidae), cuja dieta baseia-se 80% no consumo de microrganismos (DIDDEN, 1993; JAFFEE; MULDOON; DIDDEN, 1997). Tais organismos também demonstram grande importância ao desempenhar funções ecológicas dentro do habitat terrestre, servindo como bioindicadores em avaliações da qualidade do solo (JÄNSCH; RÖMBKE; DIDDEN, 2005) e em estudos ecotoxicológicos (CASTRO-FERREIRA et al., 2012; DIDDEN; RÖMBKE, 2001).

Embora os enquitreídeos sejam amplamente distribuídos pelos mais diversos tipos de solo, as densidades de suas populações variam de acordo com a região e com as condições físicas, químicas e biológicas do ambiente edáfico (JÄNSCH; RÖMBKE; DIDDEN, 2005). Além das diferenças naturais relativas à abundância das comunidades de enquitreídeos, a densidade destas populações também pode estar relacionada a ações antrópicas que afetem direta ou indiretamente estas comunidades, tais como a presença de contaminantes, conforme descrito por alguns autores em relação a presença de metais no solo (KRAMARZ; ZWOLAK; LASKOWSKI, 2005; MENEZES-OLIVEIRA et al., 2011, 2013).

Estudos que avaliem os efeitos toxicológicos de agrotóxicos aos enquitreídeos são comuns, principalmente ao nível da reprodução e sobrevivência dos mesmos (AMORIM; RÖMBKE; SOARES, 2005; BART et al., 2017; DIDDEN; RÖMBKE, 2001; LEITÃO et al., 2014). No entanto, pouco se sabe acerca da sensibilidade dos organismos quando estes encontram-se expostos a diferentes condições de estresse, como limitações de espaço e alimento, as quais podem ser causadas, por exemplo, pelas oscilações na densidade, e quanto isso pode afetar as cadeias alimentares dos organismos do solo e, conseqüentemente, o equilíbrio do ecossistema (JENSEN; KROGH; SVERDRUP, 2003).

Dentro dessa perspectiva, a maioria dos autores analisam as conseqüências da presença de enquitreídeos sobre a comunidade microbiana, praticamente inexistindo abordagens que analisem as relações contrárias, isto é, se os efeitos dos produtos sobre as comunidades microbianas podem, por extensão, afetar a reprodução dos enquitreídeos (COLE et al., 2002; HEDLUND; AUGUSTSSON, 1995; SANDOR; SCHRADER, 2012; VAN VLIET et al., 2004).

Dentre a grande variedade de agrotóxicos utilizados no Brasil, são comuns os usos do inseticida Kraft® 36 EC (i.a. abamectina, avermectinas) e do fungicida Score® 250 EC (i.a. difenoconazol, triazois) (SILVA, 2016). Apesar do uso contínuo da abamectina em diversas regiões do mundo (BAI; OGBOURNE, 2016), são poucos os estudos que já investigaram os efeitos da abamectina ou de outras avermectinas sobre microrganismos terrestres ou sobre a reprodução de enquitreídeos (JENSEN; DIAO; HANSEN, 2009; JENSEN; KROGH; SVERDRUP, 2003; JENSEN; SCOTT-FORDSMAND, 2012; KOLAR et al., 2008; ZHANG et al., 2009b). No que concerne ao impacto de fungicidas triazois sobre indicadores microbianos, algumas pesquisas já foram realizadas (GONÇALVES et al., 2009; HART; BROOKES, 1996; ZHANG et al., 2014), mas praticamente inexistem estudos que avaliem os efeitos de tais princípios sobre os enquitreídeos.

Dentro desse contexto, o objetivo do presente estudo foi analisar os efeitos dos agrotóxicos Kraft® 36 EC e Score® 250 EC, aplicados isoladamente e em mistura, sobre: a) as comunidades microbianas do solo, em seis períodos de exposição diferentes (0, 7, 14, 28, 56 e 84 dias após a contaminação do solo); b) populações de enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*) em diferentes densidades iniciais (5, 10 e 50 organismos), em quatro períodos de exposição diferentes (0, 28, 56 e 84 dias após a contaminação do solo); e c) a consequente relação trófica entre tais representantes da micro e mesofauna edáficas, aos 0, 28, 56 e 84 dias após a contaminação do solo, de modo a avaliar a evolução temporal da toxicidade dos produtos. A escolha da utilização de produtos comerciais, além de conferir maior relevância ecológica ao experimento pelo fato de que é desta forma que eles são dispersados no ambiente, também deriva do fato de que os outros ingredientes presentes na composição dos mesmos e denominados inertes podem, por si só, apresentar toxicidade e/ou maximizar a toxicidade dos ingredientes ativos dos agrotóxicos (COX; SURGAN, 2006; NOVELLI et al., 2012a; SURGAN; CONDON; COX, 2010).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta e preparação do solo

O solo foi coletado em camada superior, na faixa de 0 a 15 cm de profundidade, em terreno sem histórico de contaminação (NUNES; ESPÍNDOLA, 2012), localizado no Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA), da USP São Carlos, coordenadas 22°10'10"S 47°53'56"O. O solo foi peneirado (abertura 2 mm), seco e desfaunado em estufa a 65 °C por 24 horas (MENEZES-OLIVEIRA et al., 2014). Para garantir a presença de comunidades microbianas, foi inoculado um substrato microbiano produzido a partir de solo fresco coletado no mesmo local do solo teste, conforme procedimento já descrito na literatura (JENSEN; SCOTT-FORDSMAND, 2012). Após 5 dias de estabilização do substrato microbiano, o solo foi contaminado com as doses recomendadas para a cultura de morango (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2015a, 2015b) dos produtos comerciais Kraft® 36 EC (0,02 mg abamectina kg⁻¹ solo seco), Score® 250 EC (0,04 mg difenoconazol kg⁻¹ solo seco) e a mistura dos dois produtos nas mesmas doses, diluídos em água destilada de modo a ajustar a umidade final do solo em 20 %, que representou aproximadamente 50 % da capacidade máxima de retenção hídrica do solo.

Após a contaminação e ajuste da umidade, o solo foi disposto em potes de plástico de capacidade de 1000 ml contendo 500 gramas de solo seco cada. No total, foram 120 potes para satisfazer o desenho experimental 6x5x4 (6 tempos de exposição - 0, 7, 14, 28, 56 e 84; 5 réplicas por tratamento; 4 tratamentos – Controle, Kraft, Score e Mistura). Os potes permaneceram em laboratório climatizado a 23 °C, com fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, sendo semanalmente abertos por 10 minutos para troca gasosa e correção da umidade. A cada período de exposição, 20 réplicas (5 de cada tratamento) eram sacrificadas para as análises microbianas e montagem de teste de reprodução com enquitreídeos.

2.2 Análise química dos agrotóxicos

Os agrotóxicos foram adquiridos em loja especializada na cidade de São Carlos, São Paulo. No intuito de confirmar as concentrações nominais testadas, as soluções estoque foram analisadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC Waters 2695), equipada com detector arranjo de diodos (DAD). As condições da análise foram: coluna Agilent Zorbax ODS C18 (250x4,6x5 mm) e temperatura de forno de 25 °C. A fase móvel

isocrática utilizada foi metanol e água (ácido fórmico 0.1%; 95:5 v/v) por seis minutos, a uma injeção de volume de 20 µl e fluxo de 1,0 ml min⁻¹. As análises foram conduzidas em triplicatas. Com base na absorbância dos sinais observados no espectro do DAD das soluções padrões, a abamectina e o difenoconazol foram detectados e quantificados a 246 nm e 230 nm, com tempos de retenção de 2,9 e 2,2 minutos, respectivamente. A precisão em termos de repetibilidade, expressa em desvio-padrão relativo, foi 2,05% para abamectina e 1,88% para o difenoconazol. Os limites de detecção foram 50 µg L⁻¹ (abamectina) e 25 µg L⁻¹ (difenoconazol).

2.3 Análises microbianas e teste de reprodução com enquitreídeos

Após 0, 7, 14, 28, 56 e 84 dias da contaminação do solo, foram realizadas as análises dos seguintes parâmetros microbianos: biomassa microbiana de carbono, respiração basal do solo e enzima β-glucosidase. O quociente metabólico do solo (qCO₂), baseado na razão entre a BMC e a RBS, também foi calculado. Após 0, 28, 56 e 84 dias da contaminação, as mesmas réplicas utilizadas para as análises microbianas foram utilizadas para dar início aos testes de reprodução com enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*), em densidades de 5, 10 e 50 organismos adultos iniciais, conforme a Figura 2.1.

Figura 2.3 – Representação esquemática das análises de biomassa microbiana de carbono (BMC), respiração basal do solo (RBS), enzima β-glucosidase (BG), quociente metabólico (qCO₂) e testes de reprodução com enquitreídeos em densidades de 5 (D5), 10 (D10) e 50 (D50), realizados após diferentes períodos após a contaminação do solo.

2.3.1 Biomassa microbiana de carbono

O carbono da biomassa microbiana foi mensurado de acordo com o método de fumigação-extração (VANCE; BROOKES; JENKINSON, 1987), usualmente citado como o mais adequado para tal determinação (ANDRÉA; HOLLWEG, 2004; SILVA; AZEVEDO; DE-POLLI, 2007). Foi utilizado clorofórmio (CHCl_3) livre de etanol para fumigação das amostras, sulfato de potássio (K_2SO_4) 0,5 M para extração do carbono das amostras e o coeficiente de correção (K_{ec}) - que representa a quantidade de carbono proveniente da biomassa microbiana que é extraída - foi definido em 0,33 (SPARLING; WEST, 1988). Além disso, antes das análises, as amostras de solo foram cuidadosamente limpas, retirando-se pedaços de raízes, tecidos de planta e outros materiais orgânicos grosseiros que pudessem interferir na determinação do carbono.

2.3.2 Respiração basal e quociente metabólico do solo

A RBS foi mensurada com base no método de incubação das amostras não fumigadas utilizadas na análise do carbono da biomassa microbiana (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2002; JENKINSON; POWLSON, 1976). Foi utilizada solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,3 M para reter o evolvido/emitido e solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1 M para a titulação do excesso de OH^- . O quociente metabólico do solo foi estimado para cada réplica com base na razão entre a respiração basal do solo e a biomassa microbiana.

2.3.3 Enzima β -glucosidase

A atividade da β -glucosidase foi determinada via análise colorimétrica do p-nitrofenol liberado do solo após o mesmo ser incubado por 1 hora a 37 °C com uma solução tamponada de p-nitrofenil-p-D-glucopiranosídeo (EIVAZI; TABATABAI, 1988; NANNIPIERI, 1995). Para a determinação do p-nitrofenol das amostras, foram traçadas curvas de calibração em cada bateria de amostras analisadas, a partir de soluções de 0, 10, 20, 30, 40 e 50 μg de p-nitrofenol provenientes de uma solução estoque de p-nitrofenol.

2.3.4 Reprodução de enquitreídeos em diferentes densidades

Os testes de reprodução com enquitreídeos foram realizados conforme adaptação do protocolo 220 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) - *Guidelines for the testing of chemicals: Enchytraeid reproduction test* (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2004). Os enquitreídeos *E. crypticus* foram cultivados em laboratório a temperatura de 20 ± 1 °C, fotoperíodo de 16:8, luz:escuro, e alimentados com farelo de aveia.

O solo de cada réplica inicialmente armazenada foi utilizado para montagem de testes com 5, 10 e 50 organismos adultos iniciais, cada qual contendo 20 gramas de solo colocados em frascos plásticos (100 ml). Durante os 21 dias de realização do teste, a umidade foi corrigida semanalmente, mas os organismos não foram alimentados, de modo a restringir sua fonte de alimentos às comunidades microbianas do solo.

Com a finalidade de análise das taxas de crescimento dos enquitreídeos em diferentes densidades sob um mesmo índice, foi estimada a Taxa Instantânea de Crescimento (TIC), de acordo com a equação seguinte:

$$TIC = \frac{1}{t} * \ln \left(\frac{N_t}{N_0} \right)$$

em que: t: tempo de duração do teste (dias); N_t : número final de organismos; N_0 : número inicial de organismos introduzidos (SIBLY, 1999).

2.4 Análises estatísticas

No intuito de verificar a interação entre os diferentes tratamentos e os tempos de coleta, as comparações estatísticas foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) de duas vias com teste *post-hoc* de Holm-Šidák. Cada parâmetro microbiano foi considerado uma variável dependente e analisado separadamente. As variáveis independentes utilizadas foram os tempos de exposição - 0, 7, 14, 28, 56 e 84 dias após a contaminação - e os tratamentos - Controle, Kraft, Score e Mistura (Kraft + Score).

Para a análise da reprodução dos enquitreídeos foram realizadas análises de variância de duas vias para cada densidade e tratamentos separadamente, com teste *post-hoc* de Holm-Šidák, utilizando como variável dependente a TIC e como variáveis independentes os tempos de início do teste após a contaminação e os tratamentos.

Por fim, para se estabelecerem relações entre os parâmetros microbianos e as taxas de crescimento de enquitreídeos, foram feitas análises do coeficiente de correlação de Pearson para cada tempo de coleta.

As análises foram executadas com os programas *SigmaPlot*® versão 11.0 e o *IBM SPSS Statistics*® versão 22, ambos para Windows® e a significância foi estabelecida em 5% em todas elas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Parâmetros microbianos

Os pressupostos para a realização das análises de variância foram atendidos ($P > 0,05$) para todos os parâmetros microbianos analisados, exceto para o quociente metabólico do solo. Neste caso, os dados foram transformados logaritmicamente de modo a atender os pressupostos. A Figura 2.1 mostra a variação dos parâmetros (BMC, RBS, qCO_2 , β -glucosidase) em função do tempo e dos quatro diferentes tratamentos. Os resultados da análise de variância que comparou os parâmetros em função dos tratamentos e do tempo de exposição podem ser conferidos nos apêndices deste capítulo.

A variável mais diretamente associada ao crescimento e tamanho geral das comunidades microbianas (BMC) apresentou valores mais baixos e sem diferenças significativas entre os tratamentos correspondentes às exposições anteriores ao 28º dia, ao passo que variáveis mais associadas às atividades metabólicas (RBS e qCO_2) traçaram o caminho contrário e apresentaram queda contínua com valores próximos entre todos os tratamentos nas últimas três análises (dias 28, 56 e 84). A enzima β -glucosidase, vinculada à atividade metabólica de degradação da celulose, apresentou comportamento mais parecido com a BMC, embora com menores variações no decorrer do tempo.

Além da ação dos agrotóxicos, os parâmetros também podem ter sido influenciados pelas próprias características do experimento, uma vez que são observadas variações temporais até mesmo no Controle. Nas primeiras análises (0, 7 e 14 dias), as comunidades microbianas possivelmente ainda se encontravam em processo de estabilização após a inoculação do substrato microbiano, 5 dias antes da contaminação. Nas análises posteriores (28, 56 e 84 dias), o maior intervalo de tempo possibilitou o desenvolvimento das comunidades a ponto de, aparentemente, estabilizar seus níveis de reprodução e crescimento, conforme esperado em razão do limite espacial do habitat edáfico fornecido no laboratório, conforme relatado em outros trabalhos (FRANKLIN; MILLS, 2007; KIM et al., 2008; VOS et al., 2013).

Figura 2.2 - Variação temporal e erros-padrão de A) biomassa microbiana de carbono (BMC); B) respiração basal do solo (RBS); C) quociente metabólico ($\log q\text{CO}_2$); e D) enzima β -glucosidase (ρ -nitrofenol) em solos contaminados com dose recomendada única dos agrotóxicos Kraft® 36 EC, Score® e a mistura de ambos.

Embora tenha havido uma influência temporal que parece ter permitido a estabilização das comunidades microbianas, nota-se que a presença dos agrotóxicos pode ter contribuído para menores valores de biomassa microbiana e maiores taxas de respiração nas análises iniciais, seguidas de crescimento geral das comunidades e decréscimo das taxas metabólicas, possivelmente em decorrência dos processos de degradação dos produtos comerciais utilizados.

Nesse sentido, é importante destacar que a influência dos agrotóxicos nas variações dos parâmetros apresentados pela Figura 2.2 possivelmente foi reduzida ao longo do experimento, em virtude da degradação dos produtos. A velocidade desse processo, geralmente expressada pela meia-vida dos produtos, varia bastante em função das diversas singularidades que os influenciam no meio em que estão presentes (WISLOCKI; GROSSO; DYBAS, 1989). Em condições semelhantes às conduzidas pelo experimento - laboratório a 23 °C, solo franco-argiloso em condições aeróbias e incidência periódica de radiação ultravioleta

-, a meia-vida dos ingredientes ativos aplicados em doses semelhantes é geralmente descrita pela literatura como variando de 3 a 14 dias para a abamectina (BAI; OGBOURNE, 2016; HALLEY; NESSEL; LU, 1989) e de 33 a 55 dias para o difenoconazol (THOM; OTTOW; BENCKISER, 1997; WANG et al., 2008). Isso significa que é razoável considerar reduções substanciais da influência do Kraft e do Score no mínimo a partir da terceira (dia 14) e quinta (dia 56) análises, respectivamente.

Acerca do crescimento das comunidades microbianas observado inclusive nos solos contaminados, Moreira e Siqueira elencam três principais razões: i) o material celular dos microrganismos afetados e mortos pelos produtos pode tornar-se substrato disponível para os sobreviventes que, por não sofrerem competição no solo tratado, proliferam; ii) os resíduos do agrotóxico podem servir de fonte de carbono, energia e nutrientes inorgânicos para os sobreviventes; iii) os produtos podem promover modificações físico-químicas no solo, favorecendo a proliferação microbiana (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Desse modo, ainda que os agrotóxicos possam ter prejudicado certos grupos de microrganismos, o tamanho das comunidades microbianas como um todo nos solos contaminados apresentou crescimento similar àquele observado no solo controle. A seguir tais interações são melhor exploradas em relação aos nossos resultados.

No caso deste trabalho, os subprodutos da abamectina não parecem ter impactado negativamente os parâmetros microbianos, sendo que a análise da BMC após 28 dias da contaminação do solo revelou valores significativamente superiores em solos tratados com o Kraft. Além de a abamectina ser descrita como um químico que não apresenta atividade antimicrobiana ou antifúngica, exceto em altíssimas doses (BAI; OGBOURNE, 2016), uma das principais vias de degradação do composto é a atividade metabólica microbiana, que transforma a molécula original de avermectina B_{1a} (da qual mais de 80% da abamectina é composta) principalmente em 8a-hidroxi-avermectina B1a (HALLEY; VANDENHEUVEL; WISLOCKI, 1993), o que é corroborado pelo fato de tal composto não ser metabolizado em solos esterilizados (WISLOCKI; GROSSO; DYBAS, 1989). Desse modo, o ápice da biomassa microbiana em solo tratado com Kraft verificado aos 28 dias após a contaminação do solo pode estar associado à disponibilidade de substrato proveniente da degradação do produto e/ou consequente diminuição da toxicidade.

Pouco se sabe acerca dos efeitos da abamectina e de seus metabólitos sobre organismos edáficos, mas alguns autores sugerem que seus metabólitos não apresentam maior toxicidade do que a molécula primária para tais organismos (BAI; OGBOURNE, 2016; WISLOCKI; GROSSO; DYBAS, 1989). Contudo, a maioria dos estudos existentes foram

feitos com o uso de fezes de gado tratado com avermectinas ou se trataram de experimentos *in vitro*, fatos pelos quais a menor toxicidade dos subprodutos da abamectina carece de maiores evidências (BAI; OGBOURNE, 2016). Além disso, há indícios de que os outros ingredientes (inertes) que compõem a formulação comercial de agrotóxicos a base de abamectina possam influenciar na toxicidade de minhocas (NUNES; DAAM; ESPÍNDOLA, 2016), tal qual como observado para ingredientes inertes de outros tipos de agrotóxicos (PEREIRA et al., 2009). Também já foram reportados efeitos tóxicos dos ingredientes inertes de formulações a base de abamectina para organismos aquáticos, como os microcrustáceos *Ceriodaphnia silvestrii* (CASALI-PEREIRA et al., 2015) e *Daphnia similis* (NOVELLI et al., 2012b).

Em relação ao Score, seu possível efeito tóxico sobre as comunidades fúngicas do solo não se refletiu em redução da biomassa microbiana na maioria das análises. Em termos de densidade, as comunidades microbianas do solo são formadas majoritariamente por bactérias, seguidas das comunidades de fungos e demais microrganismos (COLEMAN; WHITMAN, 2005). Parte das bactérias do solo é considerada micófaga, as quais utilizam-se dos fungos ou parte deles como fonte adicional de nutrientes (DE BOER et al., 2004; LEVEAU; PRESTON, 2008). Tal relação ocorre, em maior parte, via necrotrofia extracelular, quando a morte dos fungos libera nutrientes para o crescimento das bactérias, mas também pode ocorrer via biotrofia extracelular, quando as bactérias micófagas colonizam a superfície das hifas dos fungos, ou ainda via biotrofia endocelular, quando as bactérias se multiplicam nas células dos fungos e absorvem os nutrientes diretamente do citoplasma das mesmas (LEVEAU; PRESTON, 2008). Independentemente do mecanismo de atuação das bactérias nesses casos, a possível morte dos fungos ou o comprometimento de suas funções em decorrência do fungicida Score, podem ter auxiliado o crescimento e a reprodução de bactérias.

Outros trabalhos também relataram que efeitos tóxicos sobre as comunidades fúngicas do solo podem resultar em menor competição para degradação de compostos orgânicos, favorecendo o crescimento de comunidades bacterianas heterotróficas (CYCON et al., 2006; MUÑOZ-LEOZ et al., 2012; ZHANG et al., 2009a). Ademais, outros tipos de microrganismos edáficos que apresentam comportamento fungívoro, como os protozoários, também podem se beneficiar do enfraquecimento das comunidades de fungos (GEISEN et al., 2016). Isso explicaria por que, mesmo num solo tratado com um fungicida, a biomassa microbiana de carbono não foi afetada como um todo.

Em condições favoráveis aos microrganismos, as variações da BMC são acompanhadas por proporcionais variações de RBS, o que, por definição, resulta em baixas variações do quociente metabólico do solo (qCO_2). Com isso, valores elevados de qCO_2

(Figura 2.2C) indicam condições de estresse para as comunidades microbianas que, utilizando uma maior quantidade de recursos energéticos para a própria sobrevivência, acabam por promover uma menor conversão do carbono orgânico em biomassa microbiana (ANDERSON; DOMSCH, 1985; MUÑOZ-LEOZ et al., 2013).

Sendo assim, em alguns momentos, a presença dos agrotóxicos parece ter estimulado o metabolismo dos microrganismos, fazendo com que eles gastassem mais energia em processos de desintoxicação e degradação dos produtos (VAN VLIET et al., 2004). Com isso, os resultados obtidos divergem de outros trabalhos que citam o difenoconazol (MUÑOZ-LEOZ et al., 2012, 2013) e outros agrotóxicos do grupo dos triazois (CYCON et al., 2006; JU et al., 2016) como princípios que não afetam a respiração basal em doses baixas. Por sua vez, a abamectina e outras ivermectinas já foram descritas como princípios que podem inibir (CARBONELL-MARTIN et al., 2011), não afetar (FÖRSTER et al., 2011) ou até mesmo estimular a respiração microbiana (LATIF; RAZZAQUE; RAHMAN, 2008).

A respeito da enzima β -glucosidase, a atividade no solo com Score se mostrou significativamente menor do que no Controle na primeira análise realizada (dia 0), em conformidade com o trabalho de Muñoz-Leoz et al., que também relataram a diminuição da atividade da enzima após a aplicação de fungicidas triazois (MUÑOZ-LEOZ et al., 2011). Na análise seguinte, a atividade enzimática do tratamento com a mistura dos produtos se mostrou significativamente maior do que no solo com Kraft. Apesar de o desenho experimental utilizado não permitir conclusões concretas a esse respeito, os resultados obtidos a partir da análise da atividade enzimática sugerem um princípio de sinergia dos produtos no sentido de estimular a atividade da enzima, posto que eles não demonstraram tal propriedade quando aplicados separadamente.

Considerando que a enzima β -glucosidase contribui para a degradação da celulose e outros β -glucanos (SINSABAUGH et al., 2008), hidrolisando-os em glicose (EIVAZI; TABATABAI, 1988), ela exerce um papel importante na ciclagem de carbono, sendo sua inibição um fator desfavorável à saúde do solo (MUÑOZ-LEOZ et al., 2011). Nesse sentido, embora seja natural que a atividade enzimática acompanhe o tamanho das comunidades microbianas, a enzima β -glucosidase se mostrou um parâmetro mais sensível aos efeitos do fungicida Score do que a BMC. Isto possivelmente ocorreu porque a inibição do crescimento das comunidades fúngicas, que são uma das principais fontes de β -glucosidase no solo (HAYANO; TUBAKI, 1985), não implicou em redução proporcional da BMC, conforme já explanado.

As demais variações dos parâmetros microbianos parecem apresentar uma complexidade maior do que as análises podem explicar, isto é, possivelmente decorrem das interações microbianas de competição, cooperação, predação e outras inúmeras relações que ocorrem entre os microrganismos presentes no solo. De fato, em escalas de análise mais amplas, como em campo, a maior complexidade dos sistemas terrestres e a variabilidade das condições ambientais prejudicada (SCHAEFFER et al., 2010) poderiam proporcionar dissimilaridades nas interações das comunidades microbianas observadas pelos resultados aqui apresentados. Ademais, o tipo de experimentação em menor escala, com limitações físicas à entrada de agentes físicos, químicos ou biológicos externos tende a favorecer o alcance e a manutenção de uma estabilidade microbiana ao longo do tempo (FRANKLIN; MILLS, 2007; TREVES et al., 2003).

Uma observação final em relação aos efeitos dos agrotóxicos sobre os microrganismos, é que, embora não tenham sido observados grandes efeitos deletérios nos solos contaminados com agrotóxicos, o solo-controle apresentou maior estabilidade em relação às variações dos parâmetros mensurados. Os valores da BMC no Controle apresentaram uma crescente a ponto de superar os demais tratamentos na última análise, sendo que o solo-controle é o único que não apresenta queda nos valores de BMC após a recuperação ocorrida a partir do 7º dia. Também verifica-se que a RBS, o qCO_2 e a enzima β -glucosidase do Controle apresentaram uma menor variabilidade em relação aos demais tratamentos, sugerindo que os microrganismos presentes no solo sem os agrotóxicos apresentaram maiores robustez e facilidade de se estabilizar ao longo do tempo.

3.2 Reprodução de enquitreídeos em diferentes densidades iniciais

Os pressupostos para a realização das análises de variância foram atendidos para todos os testes realizados ($P > 0,05$). Analisando as taxas instantâneas de crescimento dos enquitreídeos em cada tratamento separadamente, percebe-se que as diferenças de reprodução não ocorreram de maneira similar em cada um deles (Figura 2.3).

Figura 2.3 – Taxa instantânea de crescimento (TIC) e erros-padrão de *E. crypticus*, representados pelas barras verticais, em testes iniciados com diferentes densidades em solo-controle (C) e após 0, 28, 56 e 84 dias da contaminação do solo com dose recomendada única dos agrotóxicos Kraft® 36 EC (K), Score® 250 EC (S) e a mistura de ambos (M), bem como valores de BMC (linhas e pontos) dos respectivos tratamentos medida nos dias de início dos testes.

Para as três densidades analisadas, as diferenças na reprodução dos enquitreídeos entre os tratamentos de cada teste não foram grandes o suficiente para excluir a possibilidade de provirem da inerente variabilidade amostral. Isso indica que os contaminantes, nas condições propostas pelo experimento, não impactaram diretamente a reprodução dos organismos, o que já foi descrito para os princípios ativos utilizados em doses baixas e condições padrão de densidade (JENSEN; DIAO; HANSEN, 2009; KOLAR et al., 2008).

Embora as diferenças entre os tratamentos não tenham sido significativas, algumas tendências importantes puderam ser observadas (Figura 2.4). Em relação à menor densidade (5 organismos iniciais – D5) de enquitreídeos, os testes no solo-controle se iniciaram (dia 0) com a menor taxa de reprodução, apresentando uma permanente ascensão até o último teste (dia 84), em que a TIC supera a dos demais tratamentos e se mostra significativamente maior do que no primeiro teste. A mesma tendência ascendente pode ser observada para os outros tratamentos, exceto para o Kraft, que apresenta comportamento menos regular, fato reforçado pelos valores significativamente maiores da segunda coleta em relação à primeira.

Nos testes que utilizaram 10 organismos iniciais, número tradicionalmente descrito pela literatura e preconizado pelos protocolos de realização do teste (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2003; ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO, 2004), os dados de reprodução no solo-controle variaram menos do que nos demais tratamentos, a despeito de não refletirem diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos ou entre os tempos de realização dos testes. Exceção foi observada para o solo contaminado com Score, em que as taxas de reprodução no teste realizado após 28 dias se mostraram significativamente maiores do que no teste realizado após 56 dias (Figura 2.4).

Nos testes com a maior densidade de organismos (50 adultos iniciais), em solo controle, a TIC do primeiro teste (dia 0) foi significativamente maior do que a do terceiro (dia 56), contrariamente ao que foi observado para a menor densidade (Figura 2.4).

Figura 2.4 – TIC e erros-padrão de *E. crypticus* em testes iniciados com densidades de 5 (D5), 10 (D10) e 50 (D50) adultos iniciais após 0, 28, 56 e 84 dias da contaminação do solo com dose recomendada única dos agrotóxicos Kraft® 36 EC, Score® 250 EC e a mistura de ambos.

Os números que acompanham as barras indicam diferenças significativas no respectivo tratamento, em comparação com os testes iniciados 0 e 56 dias após a contaminação do solo.

De modo a tentar perceber a relação entre o desempenho dos enquitreídeos e a comunidade microbiana como fonte exclusiva de alimentação para os mesmos, a evolução da biomassa microbiana em carbono (BMC) foi analisada e a relação foi constatada por meio de fortes correlações positivas verificadas entre as duas variáveis (Tabela 1).

Além da biomassa microbiana, altos índices de correlação, positivas e negativas, foram constatadas entre as demais variáveis microbianas e as taxas instantâneas de crescimento. Todavia, tais relações não apresentaram constância entre os parâmetros microbianos, os tratamentos, as densidades ou os tempos de análise. Em outras palavras, foi possível verificar a importância dos microrganismos para a reprodução dos enquitreídeos, mas as relações entre estes e os parâmetros microbianos se mostraram de grande complexidade.

Assim, ao passo que outros estudos indicam que o aumento das populações de enquitreídeos geralmente implica em decréscimos da biomassa microbiana em função do consumo das mesmas (COLE et al., 2002; VAN VLIET et al., 2004), nossos resultados sugerem que o tamanho da comunidade microbiana é um fator relevante para os enquitreídeos na busca por alimento, mesmo que não tenham sido observadas grandes diferenças entre essa relação no solo Controle e em solos contaminados.

Ademais, quando comparados com os resultados obtidos por Menezes-Oliveira et. al (2011), a taxa instantânea de crescimento (TIC) dos enquitreídeos *E. crypticus* mostrou-se cerca de duas vezes inferior neste trabalho e, considerando que a principal diferença entre os dois experimentos se refere à suplementação alimentar, sugere-se que a falta de tal procedimento pode ter sido um fator limitante, principalmente no primeiro ensaio, quando supostamente as comunidades microbianas ainda não estavam estabilizadas (MENEZES-OLIVEIRA et al., 2011).

Tabela 1 - Coeficientes de correlação de Pearson (valores r) entre a taxa instantânea de crescimento de *E. crypticus* em densidades iniciais de 5 (D5), 10 (D10) e 50 (D50) organismos, em testes iniciados após 0, 28, 56 e 84 dias da contaminação do solo com dose única recomendada dos agrotóxicos Kraft® 36 EC, Score® 250 EC e a mistura de ambos e os parâmetros microbianos: biomassa microbiana de carbono (BMC), respiração basal do solo (RBS), quociente metabólico (qCO₂) e enzima β-glucosidase (BG).

		Dia 0				Dia 28				Dia 56				Dia 84			
		BMC	RBS	qCO ₂	BG	BMC	RBS	qCO ₂	BG	BMC	RBS	qCO ₂	BG	BMC	RBS	qCO ₂	BG
D5	Controle	-0,59	-0,22	0,16	-0,22	0,52	0,53	0,06	-0,47	0,15	0,95**	0,25	-0,08	0,91*	0,80	0,85*	0,12
	Kraft	0,01	0,12	0,07	-0,48	-0,20	0,83*	0,36	-0,01	-0,45	0,49	0,63	0,58	0,96**	0,05	-0,13	-0,04
	Score	0,62	0,66*	-0,11	-0,25	0,39	-0,27	-0,47	0,44	-0,51	-0,57	-0,57	0,00	0,19	0,15	0,02	0,17
	Mistura	-0,49	-0,09	0,32	0,09	0,29	-0,52	-0,53	-0,09	0,81*	0,48	0,65	0,82*	-0,55	-0,78	-0,88*	0,17
D10	Controle	0,08	-0,31	-0,26	-0,08	0,28	0,57	0,22	-0,58	0,12	-0,54	-0,37	-0,18	-0,36	-0,13	-0,04	0,76
	Kraft	0,16	0,89**	0,58	-0,38	0,25	-0,31	-0,19	0,25	-0,18	-0,68	-0,54	-0,30	-0,22	0,82*	0,82*	-0,15
	Score	0,02	-0,11	-0,32	-0,31	0,12	0,65	0,19	-0,38	0,86*	0,76	0,59	0,65	0,37	-0,87*	-0,76	-0,23
	Mistura	0,80	0,66	-0,66	0,22	-0,48	-0,24	0,43	0,21	-0,16	0,50	0,46	0,67	-0,53	-0,41	-0,20	-0,77
D50	Controle	-0,50	0,42	0,49	0,12	-0,14	0,78	0,60	-0,72	0,91*	0,30	-0,89*	0,56	-0,48	0,61	0,55	-0,17
	Kraft	-0,12	-0,97**	-0,65	0,50	-0,41	-0,67	0,23	0,18	-0,09	0,08	0,12	-0,87*	0,18	-0,92*	-0,88*	0,43
	Score	0,07	0,30	0,33	0,04	0,18	-0,63	-0,32	-0,30	0,82*	0,67	0,43	0,99**	0,28	-0,72	-0,63	-0,04
	Kraft + Score	0,64	0,38	-0,68	-0,14	0,65	0,63	-0,37	0,05	-0,31	0,69	0,60	0,90*	-0,11	-0,51	-0,68	-0,06

Os valores seguidos por asterisco indicam correlação significativa para *P < 0,05 e **P < 0,01.

4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES

A respeito dos microrganismos do solo, os parâmetros analisados parecem ter sido afetados pela aplicação dos agrotóxicos, mas também apresentaram algumas variações no tratamento Controle, o que sinaliza a influência das condições de condução do experimento.

A biomassa microbiana de carbono iniciou com valores mais baixos e cresceu ao longo do tempo, provavelmente em função da disponibilização de substrato liberado pelos produtos e do domínio de algumas populações microbianas sobre outras, indicando melhor estabilização da comunidade ao longo do tempo. Os indicadores metabólicos (respiração basal e quociente metabólico) percorreram o sentido contrário, representando o estresse das comunidades no início, em função da degradação dos agrotóxicos e das competições microbianas dentro do limitado habitat a elas fornecido, seguidos de estabilização a partir do 28º dia, quando o crescimento das comunidades já se mostrava mais estagnado e os produtos já estavam em boa parte dissipados. A enzima β -glucosidase foi inibida no tratamento com o fungicida na primeira análise, o que revela o potencial do difenoconazol em afetá-la mesmo em doses baixas, evidenciando o potencial perigoso deste tipo de agrotóxico ao interferir negativamente na ciclagem de carbono e na qualidade do solo como um todo.

Desse modo, entende-se que a despeito de algumas variações dos parâmetros microbianos em decorrência da presença dos agrotóxicos, as funções gerais do sistema edáfico não foram grandemente prejudicadas. Isso expressa o conceito de redundância funcional, segundo o qual um produto pode apresentar efeitos negativos sobre certos microrganismos sem, contudo, afetar as funções globais das comunidades microbianas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Em contrapartida, o solo-controle apresentou maior estabilidade em relação às variações dos parâmetros, sugerindo que os microrganismos presentes neste solo apresentaram uma maior robustez e estabilidade ao longo do tempo, fatores importantes para uma melhor qualidade do solo.

Em relação aos testes com *E. crypticus*, ratificou-se a importância dos microrganismos na dieta dos mesmos, haja vista as correlações entre o tamanho das comunidades microbianas e as taxas de crescimento dos enquitreídeos.

Não obstante, vale frisar que a toxicidade dos agrotóxicos utilizados sobre os microrganismos e enquitreídeos em situações agrícolas reais podem diferir consideravelmente dos resultados aqui encontrados. Fato este ainda mais enfático quando se trata da conjuntura agrícola brasileira, em que é comum a prática de aplicação de agrotóxicos em doses maiores

que as recomendadas de maneira repetida e que não respeita os intervalos mínimos entre uma aplicação e outra (PERES; MOREIRA, 2003). Desta forma, a extrapolação dos resultados aqui obtidos para uma situação real de campo deve ser feita com cautela, levando em consideração, além das características naturais do ambiente, os critérios de aplicação dos agrotóxicos.

Particularmente em relação à abamectina, já foram relatadas situações de aplicação de quantidades 10 vezes maiores do que as máximas permitidas pela legislação (NUNES; ESPÍNDOLA, 2012). Soma-se a isso o fato de que outras avermectinas podem ser encontradas no ambiente terrestre, sobretudo em razão da presença no solo de fezes de gado tratados com tais produtos (HALLEY; VANDENHEUVEL; WISLOCKI, 1993).

Em face do exposto, reitera-se a importância do cumprimento das recomendações de aplicação de ambos os agrotóxicos avaliados por parte dos agricultores e recomenda-se a iniciativa de diminuição progressiva da sua utilização, uma vez que mesmo alterações microbiológicas provocadas por eles podem contribuir com mudanças de maior magnitude, dada sua escala utilização. De modo geral, os resultados corroboram a importância funcional dos microrganismos na promoção de serviços ecossistêmicos relacionados à participação na cadeia trófica de outros organismos, à degradação de poluentes, à decomposição da matéria orgânica e à ciclagem de nutrientes.

REFERÊNCIAS⁵

- AIRA, M.; MONROY, F.; DOMÍNGUEZ, J. Earthworms strongly modify microbial biomass and activity triggering enzymatic activities during vermicomposting independently of the application rates of pig slurry. **Science of the Total Environment**, v. 385, n. 1–3, p. 252–261, 2007.
- AMORIM, M. J. B.; RÖMBKE, J.; SOARES, A. M. V. M. Avoidance behaviour of *Enchytraeus albidus*: Effects of Benomyl, Carbendazim, phenmedipham and different soil types. **Chemosphere**, v. 59, n. 4, p. 501–510, 2005.
- ANDERSON, T.-H.; DOMSCH, K. H. Determination of ecophysiological maintenance carbon requirements of soil microorganisms in a dormant state. **Biology and Fertility of Soils**, v. 1, n. 2, p. 81–89, 1985.
- ANDRÉA, M. M.; HOLLWEG, M. J. M. Comparação de métodos para determinação de biomassa microbiana em dois solos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 981–986, 2004.
- ARMAGAN, G.; ÖZDEN, A.; DIMITROVSKI, D. Food production and pesticide use: A dilemma in agriculture. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 24, n. 12, p. 4364–4373, 2015.
- BAI, S. H.; OGBOURNE, S. M. Eco-toxicological effects of the avermectin family with a focus on abamectin and ivermectin. **Chemosphere**, v. 154, p. 204–214, 2016.
- BART, S. et al. Differences in sensitivity between earthworms and enchytraeids exposed to two commercial fungicides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 140, p. 177–184, jun. 2017.
- BHAT, A. K. Effect of pesticides on non-target sites with reference to soil ecosystems. In: **Integrated Pest Management: Principles and practice**. [s.l.: s.n.]. p. 370–385.
- BISHNU, A. et al. Ethion degradation and its correlation with microbial and biochemical parameters of tea soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 48, n. 1, p. 19–29, 2012.
- CARBONELL-MARTIN, G. et al. Targeting the environmental assessment of veterinary drugs with the multi-species-soil system (MS.3) agricultural soil microcosms: the ivermectin case study. **Spanish Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 2, p. 433–443, 2011.
- CASALI-PEREIRA, M. P. et al. Toxicity of Vertimec® 18 EC (active ingredient abamectin) to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Chemosphere**, v. 139, p. 558–564, nov. 2015.
- CASTRO-FERREIRA, M. P. et al. *Enchytraeus crypticus* as model species in soil ecotoxicology. **Chemosphere**, v. 87, n. 11, p. 1222–1227, 2012.

⁵ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

COLE, L. et al. Enchytraeid worm (Oligochaeta) influences on microbial community structure, nutrient dynamics and plant growth in blanket peat subjected to warming. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 34, n. 1, p. 83–92, jan. 2002.

COLEMAN, D. C.; WHITMAN, W. B. Linking species richness, biodiversity and ecosystem function in soil systems. **Pedobiologia**, v. 49, n. 6, p. 479–497, nov. 2005.

COX, C.; SURGAN, M. Unidentified inert ingredients in pesticides: Implications for human and environmental health. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 12, p. 1803–1806, 2006.

CYCON, M. et al. Microbiological characteristics of a sandy loam soil exposed to tebuconazole and λ -cyhalothrin under laboratory conditions. **Ecotoxicology**, v. 15, n. 8, p. 639–646, 2006.

DE BOER, W. et al. *Collimonas fungivorans* gen. nov., sp. nov., a chitinolytic soil bacterium with the ability to grow on living fungal hyphae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 857–864, 2004.

DIDDEN, W. A. M. ECOLOGY OF TERRESTRIAL ENCHYTRAEIDAE. **Pedobiologia**, v. 37, n. 1, p. 2–29, 1993.

DIDDEN, W.; RÖMBKE, J. Enchytraeids as Indicator Organisms for Chemical Stress in Terrestrial Ecosystems. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 50, n. 1, p. 25–43, 1 set. 2001.

DORAN, J. W. Soil health and global sustainability: translating science into practice. **Soil Health as an Indicator of Sustainable Management**, v. 88, n. 2, p. 119–127, fev. 2002.

EIVAZI, F.; TABATABAI, M. A. Glucosidases and galactosidases in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, n. 5, p. 601–606, jan. 1988.

FERREIRA, J. et al. Towards environmentally sustainable agriculture in Brazil: Challenges and opportunities for applied ecological research. **Journal of Applied Ecology**, v. 49, n. 3, p. 535–541, 2012.

FÖRSTER, B. et al. Fate and effects of ivermectin on soil invertebrates in terrestrial model ecosystems. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 1, p. 234–245, 2011.

FRANKLIN, R. B.; MILLS, A. L. Introduction. In: FRANKLIN, R. B.; MILLS, A. L. (Eds.). **The Spatial Distribution of Microbes in the Environment**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 1–30.

GAVRILESCU, M. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. **Engineering in Life Sciences**, v. 5, n. 6, p. 497–526, 2005.

GEISEN, S. et al. The soil food web revisited: Diverse and widespread mycophagous soil protists. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 94, p. 10–18, mar. 2016.

GONÇALVES, I. C. R. et al. Effect of paclobutrazol on microbial biomass, respiration and cellulose decomposition in soil. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, n. 3, p. 235–238, maio 2009.

GRAHAM-BRYCE, I. J. Crop Protection: A Consideration of the Effectiveness and Disadvantages of Current Methods and of the Scope for Improvement. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 281, n. 980, p. 163, 25 nov. 1977.

HALLEY, B. A.; NESSEL, R. J.; LU, A. Y. H. Environmental Aspects of Ivermectin Usage in Livestock: General Considerations. In: CAMPBELL, W. C. (Ed.). **Ivermectin and Abamectin**. New York, NY: Springer New York, 1989. p. 162–172.

HALLEY, B. A.; VANDENHEUVEL, W. J. A.; WISLOCKI, P. G. Environmental effects of the usage of avermectins in livestock. **Veterinary Parasitology**, v. 48, n. 1, p. 109–125, jun. 1993.

HART, M. R.; BROOKES, P. C. Effects of two ergosterol-inhibiting fungicides on soil ergosterol and microbial biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 28, n. 7, p. 885–892, jul. 1996.

HAYANO, K.; TUBAKI, K. Origin and properties of β -glucosidase activity of tomato-field soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 17, n. 4, p. 553–557, 1 jan. 1985.

HEDLUND, K.; AUGUSTSSON, A. Effects of enchytraeid grazing on fungal growth and respiration. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 7, p. 905–909, 1 jul. 1995.

IMFELD, G.; VUILLEUMIER, S. Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: A critical review. **Bioindication in Soil Ecosystems**, v. 49, p. 22–30, mar. 2012.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 16072. Soil quality - Laboratory methods for determination of microbial soil respiration**, 15 2002.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 16387. Soil Quality - effects of pollutants on Enchytraeidae (Enchytraeus sp.) - determination of effects on reproduction and survival**, 2003.

JAFFEE, B. A.; MULDOON, A. E.; DIDDEN, W. A. M. Enchytraeids and nematophagous fungi in soil microcosms. **Biology and Fertility of Soils**, v. 25, n. 4, p. 382–388, 1997.

JÄNSCH, S.; RÖMBKE, J.; DIDDEN, W. The use of enchytraeids in ecological soil classification and assessment concepts. **Includes Special Issue: ECOLOGICAL SOIL QUALITY Classification and Assessment Includes Special Issue: ECOLOGICAL SOIL QUALITY**, v. 62, n. 2, p. 266–277, out. 2005.

JENKINSON, D. S.; POWLSON, D. S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil-V. A method for measuring soil biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 8, n. 3, p. 209–213, 1976.

JENSEN, J.; DIAO, X.; HANSEN, A. D. Single- and two-species tests to study effects of the anthelmintics ivermectin and morantel and the coccidiostatic monensin on soil invertebrates. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 2, p. 316–323, 2009.

JENSEN, J.; KROGH, P. H.; SVERDRUP, L. E. Effects of the antibacterial agents tiamulin, olanquinox and metronidazole and the anthelmintic ivermectin on the soil invertebrate species *Folsomia fimetaria* (Collembola) and *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae). **Chemosphere**, v. 50, n. 3, p. 437–443, 2003.

JENSEN, J.; SCOTT-FORDSMAND, J. J. Ecotoxicity of the veterinary pharmaceutical ivermectin tested in a soil multi-species (SMS) system. **Environmental Pollution**, v. 171, p. 133–139, 2012.

JU, C. et al. Effects of myclobutanil on soil microbial biomass, respiration, and soil nitrogen transformations. **Environmental Pollution**, v. 208, Part B, p. 811–820, jan. 2016.

KIM, H. J. et al. Defined spatial structure stabilizes a synthetic multispecies bacterial community. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 47, p. 18188–18193, nov. 2008.

KOLAR, L. et al. Toxicity of abamectin and doramectin to soil invertebrates. **Environmental Pollution**, v. 151, n. 1, p. 182–189, 2008.

KRAMARZ, P.; ZWOLAK, M.; LASKOWSKI, R. Effect of interaction between density dependence and toxicant exposure on population growth rate of the potworm *Enchytraeus doerjesi*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 3, p. 537–540, 2005.

LATIF, M. A.; RAZZAQUE, M. A.; RAHMAN, M. M. Impact of some selected insecticides application on soil microbial respiration. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 16, p. 2018–2022, 2008.

LEITÃO, S. et al. Effects of azoxystrobin, chlorothalonil, and ethoprophos on the reproduction of three terrestrial invertebrates using a natural Mediterranean soil. **Applied Soil Ecology**, v. 76, p. 124–131, 2014.

LEVEAU, J. H. J.; PRESTON, G. M. Bacterial mycophagy: definition and diagnosis of a unique bacterial–fungal interaction. **New Phytologist**, v. 177, n. 4, p. 859–876, 1 mar. 2008.

MARON, P.-A.; MOUGEL, C.; RANJARD, L. Soil microbial diversity: Methodological strategy, spatial overview and functional interest. **Biodiversity in face of human activities / La biodiversité face aux activités humaines**, v. 334, n. 5–6, p. 403–411, maio 2011.

MENEZES-OLIVEIRA, V. B. et al. Interaction between density and Cu toxicity for *Enchytraeus crypticus* and *Eisenia fetida* reflecting field scenarios. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 18, p. 3370–3374, 2011.

MENEZES-OLIVEIRA, V. B. et al. Interaction between density and Cu toxicity for *Enchytraeus crypticus* - Comparing first and second generation effects. **Science of the Total Environment**, v. 458–460, p. 361–366, 2013.

MENEZES-OLIVEIRA, V. B. et al. Development of ecosystems to climate change and the interaction with pollution—Unpredictable changes in community structures. **Applied Soil Ecology**, v. 75, p. 24–32, mar. 2014.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Relatório de produtos formulados: Kraft 36 EC**, maio de 2015a.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Relatório de produtos formulados: Score 250 EC**, maio de 2015b.

MOREIRA, F. M. DE S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006.

MUÑOZ-LEOZ, B. et al. Tebuconazole application decreases soil microbial biomass and activity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 2176–2183, out. 2011.

MUÑOZ-LEOZ, B. et al. Fertilization can modify the non-target effects of pesticides on soil microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 48, p. 125–134, maio 2012.

MUÑOZ-LEOZ, B. et al. Non-target effects of three formulated pesticides on microbially-mediated processes in a clay-loam soil. **Science of The Total Environment**, v. 449, p. 345–354, 2013.

NANNIPIERI, P. (ED.). 7 - Enzyme activities A2 - Alef, Kassem. In: **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**. London: Academic Press, 1995. p. 311–373.

NANNIPIERI, P. et al. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v. 54, n. 4, p. 655–670, 2003.

NOVELLI, A. et al. Field and laboratory studies to assess the effects of Vertimec® 18EC on *Daphnia similis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 75, n. 0, p. 87–93, 2012a.

NOVELLI, A. et al. Field and laboratory studies to assess the effects of Vertimec® 18EC on *Daphnia similis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 75, p. 87–93, 1 jan. 2012b.

NUNES, M. E. T.; DAAM, M. A.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Survival, morphology and reproduction of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) as affected by Vertimec® 18 EC (a.i. abamectin) in tests performed under tropical conditions. **Applied Soil Ecology**, v. 100, p. 18–26, abr. 2016.

NUNES, M. E. T.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 4, p. 1063–1071, 2012.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD Guidelines for the testing of chemicals: Enchytraeid reproduction test**, 2004.

PEREIRA, J. L. et al. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. **Ecotoxicology**, v. 18, n. 4, p. 455–463, 2009.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. (EDS.). **É veneno ou é remédio?: agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.

PIMENTEL, D. Amounts of pesticides reaching target pests: Environmental impacts and ethics. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, v. 8, n. 1, p. 17–29, 1995.

PIMENTEL, D.; BURGESS, M. Small amounts of pesticides reaching target insects. **Environment, Development and Sustainability**, v. 14, n. 1, p. 1–2, 2012.

SANDOR, M.; SCHRADER, S. Interaction of earthworms and enchytraeids in organically amended soil. **North-Western Journal of Zoology**, v. 8, n. 1, p. 46–56, 2012.

SCHAEFFER, A. et al. (EDS.). **Semi-Field Methods for the Environmental Risk Assessment of Pesticides in Soil**. [s.l.] CRC Press, 2010.

SIBLY, R. M. Efficient Experimental Designs for Studying Stress and Population Density in Animal Populations. **Ecological Applications**, v. 9, n. 2, p. 496–503, 1999.

SILVA, E. E. DA; AZEVEDO, P. H. S. DE; DE-POLLI, H. **Comunicado Técnico 98 - Determinação do carbono da biomassa microbiana do solo (BMS-C)**Seropédica: Embrapa Agrobiologia, , 2007.

SILVA, M. R. **Gestão de embalagens de agrotóxicos - logística reversa em pequenos municípios brasileiros: o caso do município de Bom Repouso, MG**. Dissertação de mestrado—São Carlos: Universidade de São Paulo, 2016.

SINSABAUGH, R. L. et al. Stoichiometry of soil enzyme activity at global scale. **Ecology Letters**, v. 11, n. 11, p. 1252–1264, 1 nov. 2008.

SPARLING, G. P.; WEST, A. W. A direct extraction method to estimate soil microbial C: calibration in situ using microbial respiration and ¹⁴C labelled cells. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, n. 3, p. 337–343, 1988.

SURGAN, M.; CONDON, M.; COX, C. Pesticide risk indicators: Unidentified inert ingredients compromise their integrity and utility. **Environmental Management**, v. 45, n. 4, p. 834–841, 2010.

THOM, E.; OTTOW, J. C. G.; BENCKISER, G. Degradation of the fungicide difenoconazole in a silt loam soil as affected by pretreatment and organic amendment. **Environmental Pollution**, v. 96, n. 3, p. 409–414, 1997.

TREVES, D. S. et al. A Two-Species Test of the Hypothesis That Spatial Isolation Influences Microbial Diversity in Soil. **Microbial Ecology**, v. 45, n. 1, p. 20–28, 2003.

TYLER, H. L. et al. Impact of conservation land management practices on soil microbial function in an agricultural watershed. **Journal of Soil and Water Conservation**, v. 71, n. 5, p. 396–403, 2016.

VAN VLIET, P. C. J. et al. Effects of enchytraeids (Annelida: Oligochaeta) on soil carbon and nitrogen dynamics in laboratory incubations. **Applied Soil Ecology**, v. 25, n. 2, p. 147–160, 2004.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 703–707, 1987.

VOS, M. et al. Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 6, p. 936–954, nov. 2013.

WANG, Z. H. et al. Determination and dynamics of difenoconazole residues in Chinese cabbage and soil. **Chinese Chemical Letters**, v. 19, n. 8, p. 969–972, ago. 2008.

WISLOCKI, P. G.; GROSSO, L. S.; DYBAS, R. A. Environmental Aspects of Abamectin Use in Crop Protection. In: CAMPBELL, W. C. (Ed.). . **Ivermectin and Abamectin**. New York, NY: Springer New York, 1989. p. 182–200.

ZHANG, B. et al. The impacts of cypermethrin pesticide application on the non-target microbial community of the pepper plant phyllosphere. **Science of The Total Environment**, v. 407, n. 6, p. 1915–1922, 1 mar. 2009a.

ZHANG, B.-G. et al. Effect of abamectin insecticide on the microbial community in broccoli phyllosphere. **Huanjing Kexue/Environmental Science**, v. 30, n. 5, p. 1292–1297, 2009b.

ZHANG, W. et al. Effect of tetraconazole application on the soil microbial community. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n. 13, p. 8323–8332, 2014.

APÊNDICE A – Dados da ANOVA para a biomassa microbiana de carbono (BMC)

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS PARA OS MESMOS TEMPOS												
Tratamento em 0			Tratamento em 7		Tratamento em 14		Tratamento em 28		Tratamento em 56		Tratamento em 84	
Critical Level	Comparação	P	Comparação	P	Comparação	P	Comparação	P	Comparação	P	Comparação	P
0,009	S vs. C	0,222	C vs. K	0,079	C vs. S	0,153	K vs. S	<0,001*	M vs. C	<0,001*	C vs. S	<0,001*
0,01	S vs. M	0,404	M vs. K	0,079	M vs. S	0,203	K vs. M	<0,001*	M vs. K	<0,001*	M vs. S	0,003*
0,013	K vs. C	0,449	C vs. S	0,12	C vs. K	0,314	K vs. C	0,002*	S vs. C	0,029	K vs. S	0,004*
0,017	S vs. K	0,639	M vs. S	0,12	M vs. K	0,396	C vs. S	0,139	S vs. K	0,034	C vs. K	0,267
0,025	M vs. C	0,697	S vs. K	0,837	K vs. S	0,669	M vs. S	0,213	M vs. S	0,207	C vs. M	0,275
0,05	K vs. M	0,713	C vs. M	1	C vs. M	0,872	C vs. M	0,81	K vs. C	0,946	M vs. K	0,986

COMPARAÇÃO ENTRE TEMPOS PARA OS MESMOS TRATAMENTOS									
Tempo em C			Tempo em K		Tempo em S		Tempo em M		
Critical Level	Comparação	P	Comparação	P	Comparação	P	Comparação	P	P
0,003	84 vs. 7	<0,001*	28 vs. 7	<0,001*	56 vs. 7	<0,001*	56 vs. 7		0,001*
0,004	84 vs. 0	<0,001*	84 vs. 7	<0,001*	84 vs. 7	<0,001*	84 vs. 7		<0,001*
0,004	84 vs. 14	<0,001*	28 vs. 14	<0,001*	56 vs. 14	<0,001*	56 vs. 14		<0,001*
0,004	28 vs. 7	<0,001*	56 vs. 7	<0,001*	28 vs. 7	<0,001*	84 vs. 14		<0,001*
0,005	56 vs. 7	<0,001*	84 vs. 14	<0,001*	84 vs. 14	<0,001*	56 vs. 0		<0,001*
0,005	28 vs. 0	<0,001*	28 vs. 0	<0,001*	56 vs. 0	<0,001*	84 vs. 0		<0,001*
0,006	28 vs. 14	<0,001*	84 vs. 0	<0,001*	28 vs. 14	<0,001*	28 vs. 7		<0,001*
0,006	56 vs. 0	<0,001*	56 vs. 14	<0,001*	84 vs. 0	<0,001*	28 vs. 14		<0,001*
0,007	56 vs. 14	<0,001*	56 vs. 0	<0,001*	0 vs. 7	<0,001*	28 vs. 0		<0,001*
0,009	84 vs. 56	<0,001*	0 vs. 7	<0,001*	28 vs. 0	<0,001*	56 vs. 28		<0,001*
0,01	84 vs. 28	<0,001*	28 vs. 56	<0,001*	56 vs. 28	0,001*	84 vs. 28		0,003*
0,013	14 vs. 7	0,011*	14 vs. 7	0,001*	14 vs. 7	0,008*	0 vs. 7		0,004*
0,017	0 vs. 7	0,011*	84 vs. 56	0,003*	0 vs. 14	0,009*	14 vs. 7		0,016*
0,025	28 vs. 56	0,745	0 vs. 14	0,082	56 vs. 84	0,04	0 vs. 14		0,592
0,05	14 vs. 0	0,989	28 vs. 84	0,707	84 vs. 28	0,195	56 vs. 84		0,732

Diferenças significativas estão indicadas por asteriscos (*)

APÊNDICE B – Dados da ANOVA para a respiração basal do solo (RBS)

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS PARA OS MESMOS TEMPOS												
Tratamento em 0			Tratamento em 7		Tratamento em 14		Tratamento em 28		Tratamento em 56		Tratamento em 84	
Critical Level	Comparação	P	Comparação	P	Comparação	P	Comparação	P	Comparação	P	Comparação	P
0,009	M vs. C	<0,001*	S vs. K	0,002*	M vs. C	<0,001*	K vs. C	0,206	S vs. K	0,051	S vs. K	0,049
0,01	M vs. K	<0,001*	C vs. K	0,092	K vs. C	<0,001*	K vs. S	0,253	M vs. K	0,11	M vs. K	0,107
0,013	M vs. S	<0,001*	M vs. K	0,118	S vs. C	<0,001*	M vs. C	0,253	S vs. C	0,303	S vs. C	0,3
0,017	S vs. C	0,076	S vs. M	0,126	M vs. S	<0,001*	M vs. S	0,308	C vs. K	0,348	C vs. K	0,344
0,025	K vs. C	0,282	S vs. C	0,158	K vs. S	<0,001*	K vs. M	0,901	M vs. C	0,504	M vs. C	0,502
0,05	S vs. K	0,479	C vs. M	0,902	M vs. K	0,465	S vs. C	0,901	S vs. M	0,716	S vs. M	0,714

COMPARAÇÃO ENTRE TEMPOS PARA OS MESMOS TRATAMENTOS									
Tempo em C			Tempo em K		Tempo em S		Tempo em M		
Critical Level	Comparação	P	Comparação	P	Comparação	P	Comparação	P	
0,003	0 vs. 84	<0,001*	14 vs. 84	<0,001*	14 vs. 84	<0,001*	14 vs. 84	<0,001*	
0,004	0 vs. 56	<0,001*	14 vs. 56	<0,001*	0 vs. 84	<0,001*	14 vs. 56	<0,001*	
0,004	7 vs. 84	<0,001*	14 vs. 7	<0,001*	14 vs. 56	<0,001*	0 vs. 84	<0,001*	
0,004	0 vs. 28	<0,001*	14 vs. 28	<0,001*	0 vs. 56	<0,001*	14 vs. 28	<0,001*	
0,005	14 vs. 84	<0,001*	0 vs. 84	<0,001*	14 vs. 28	<0,001*	14 vs. 7	<0,001*	
0,005	0 vs. 14	<0,001*	0 vs. 56	<0,001*	0 vs. 28	<0,001*	0 vs. 56	<0,001*	
0,006	28 vs. 84	<0,001*	0 vs. 7	<0,001*	7 vs. 84	<0,001*	0 vs. 28	<0,001*	
0,006	0 vs. 7	<0,001	14 vs. 0	<0,001*	14 vs. 7	<0,001*	0 vs. 7	<0,001*	
0,007	7 vs. 56	<0,001*	28 vs. 84	<0,001*	0 vs. 7	<0,001*	7 vs. 84	<0,001*	
0,009	14 vs. 56	<0,001*	0 vs. 28	<0,001*	28 vs. 84	<0,001*	28 vs. 84	<0,001*	
0,01	56 vs. 84	0,008*	7 vs. 84	<0,001*	7 vs. 56	<0,001*	14 vs. 0	<0,001*	
0,013	28 vs. 56	0,014	28 vs. 56	<0,001*	56 vs. 84	0,008*	7 vs. 56	0,003*	
0,017	7 vs. 28	0,184	7 vs. 56	0,003*	7 vs. 28	0,01*	28 vs. 56	0,004*	
0,025	14 vs. 28	0,308	56 vs. 84	0,008*	28 vs. 56	0,114	56 vs. 84	0,008*	
0,05	7 vs. 14	0,756	28 vs. 7	0,105	14 vs. 0	0,193	7 vs. 28	0,949	

Diferenças significativas estão indicadas por asteriscos (*)

APÊNDICE C – Dados da ANOVA para o quociente metabólico do solo (qCO₂)

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS PARA OS MESMOS TEMPOS												
Tratamento em 0			Tratamento em 7		Tratamento em 14		Tratamento em 28		Tratamento em 56		Tratamento em 84	
Critical Level	Comparação	P	Comparação	P	Comparação	P	Comparação	P	Comparação	P	Comparação	P
0,009	M vs. S	0,077	S vs. M	<0,001*	K vs. C	<0,001*	M vs. K	0,223	C vs. M	0,359	S vs. K	<0,001*
0,01	M vs. K	0,087	S vs. C	<0,001*	M vs. C	<0,001*	S vs. K	0,228	C vs. K	0,381	S vs. C	0,01*
0,013	M vs. C	0,167	K vs. M	<0,001*	S vs. C	<0,001*	M vs. C	0,432	S vs. M	0,483	M vs. K	0,034
0,017	C vs. S	0,694	K vs. C	<0,001*	K vs. S	0,4	S vs. C	0,439	S vs. K	0,509	S vs. M	0,12
0,025	C vs. K	0,735	S vs. K	0,126	K vs. M	0,537	C vs. K	0,663	C vs. S	0,828	C vs. K	0,278
0,05	K vs. S	0,956	C vs. M	0,937	M vs. S	0,822	M vs. S	0,99	K vs. M	0,967	M vs. C	0,292

COMPARAÇÃO ENTRE TEMPOS PARA OS MESMOS TRATAMENTOS									
Tempo em C			Tempo em K		Tempo em S		Tempo em M		
Critical Level	Comparação	P	Comparação	P	Comparação	P	Comparação	P	
0,003	7 vs. 84	<0,001*	7 vs. 84	<0,001*	7 vs. 84	<0,001*	14 vs. 84	<0,001*	
0,004	0 vs. 84	<0,001*	14 vs. 84	<0,001*	7 vs. 56	<0,001*	7 vs. 84	<0,001*	
0,004	14 vs. 84	<0,001*	7 vs. 56	<0,001*	7 vs. 28	<0,001*	0 vs. 84	<0,001*	
0,004	7 vs. 56	<0,001*	0 vs. 84	<0,001*	14 vs. 84	<0,001*	14 vs. 56	<0,001*	
0,005	7 vs. 28	<0,001*	7 vs. 28	<0,001*	14 vs. 56	<0,001*	7 vs. 56	<0,001*	
0,005	0 vs. 56	<0,001*	14 vs. 56	<0,001*	0 vs. 84	<0,001*	0 vs. 56	<0,001*	
0,006	0 vs. 28	<0,001*	14 vs. 28	<0,001*	14 vs. 28	<0,001*	14 vs. 28	<0,001*	
0,006	14 vs. 56	<0,001*	0 vs. 56	<0,001*	0 vs. 56	<0,001*	7 vs. 28	<0,001*	
0,007	28 vs. 84	<0,001*	0 vs. 28	<0,001*	7 vs. 0	<0,001*	0 vs. 28	<0,001*	
0,009	14 vs. 28	<0,001*	28 vs. 84	<0,001*	0 vs. 28	<0,001*	28 vs. 84	<0,001*	
0,01	56 vs. 84	<0,001*	7 vs. 0	<0,001*	7 vs. 14	<0,001*	28 vs. 56	0,002*	
0,013	7 vs. 14	<0,001*	56 vs. 84	<0,001*	28 vs. 84	<0,001*	56 vs. 84	0,022	
0,017	0 vs. 14	0,039	14 vs. 0	<0,001*	14 vs. 0	<0,001*	14 vs. 0	0,079	
0,025	7 vs. 0	0,109	7 vs. 14	0,043	28 vs. 56	0,015*	14 vs. 7	0,107	
0,05	28 vs. 56	0,142	28 vs. 56	0,057	56 vs. 84	0,144	7 vs. 0	0,882	

Diferenças significativas estão indicadas por asteriscos (*)

APÊNDICE D – Dados da ANOVA para a enzima β -glucosidase

COMPARAÇÃO ENTRE TRATAMENTOS PARA OS MESMOS TEMPOS												
Tratamento em 0			Tratamento em 7		Tratamento em 14		Tratamento em 28		Tratamento em 56		Tratamento em 84	
Critical Level	Comparação	P	Comparação	P	Comparação	P	Comparação	P	Comparação	P	Comparação	P
0,009	C vs. S	0,001*	M vs. K	0,007*	M vs. C	0,075	M vs. K	0,075	C vs. K	0,106	K vs. M	0,1
0,01	C vs. M	0,032	M vs. C	0,047	K vs. C	0,125	S vs. K	0,178	M vs. K	0,254	K vs. C	0,121
0,013	C vs. K	0,042	S vs. K	0,141	S vs. C	0,358	C vs. K	0,293	C vs. S	0,393	S vs. M	0,227
0,017	M vs. S	0,177	M vs. S	0,209	M vs. S	0,384	M vs. C	0,458	S vs. K	0,44	S vs. C	0,277
0,025	K vs. S	0,188	S vs. C	0,457	K vs. S	0,535	M vs. S	0,657	C vs. M	0,628	K vs. S	0,639
0,05	K vs. M	0,982	C vs. K	0,464	M vs. K	0,802	S vs. C	0,765	M vs. S	0,71	C vs. M	0,853

COMPARAÇÃO ENTRE TEMPOS PARA OS MESMOS TRATAMENTOS									
Tempo em C			Tempo em K		Tempo em S		Tempo em M		
Critical Level	Comparação	P	Comparação	P	Comparação	P	Comparação	P	P
0,003	28 vs. 7	0,002*	84 vs. 7	<0,001*	28 vs. 0	<0,001*	28 vs. 0	<0,001*	<0,001*
0,004	0 vs. 7	0,041	14 vs. 7	<0,001*	84 vs. 0	<0,001*	14 vs. 0	0,002*	0,002*
0,004	28 vs. 14	0,062	84 vs. 0	0,003*	14 vs. 0	<0,001*	28 vs. 56	0,008	0,008
0,004	56 vs. 7	0,09	84 vs. 56	0,003*	28 vs. 7	0,007	28 vs. 84	0,015	0,015
0,005	28 vs. 84	0,097	28 vs. 7	0,005	28 vs. 56	0,01	7 vs. 0	0,037	0,037
0,005	84 vs. 7	0,132	14 vs. 0	0,005	56 vs. 0	0,033	28 vs. 7	0,057	0,057
0,006	28 vs. 56	0,141	14 vs. 56	0,007	7 vs. 0	0,042	14 vs. 56	0,063	0,063
0,006	14 vs. 7	0,194	28 vs. 0	0,036	84 vs. 7	0,065	14 vs. 84	0,096	0,096
0,007	28 vs. 0	0,264	28 vs. 56	0,042	84 vs. 56	0,082	84 vs. 0	0,196	0,196
0,009	0 vs. 14	0,446	84 vs. 28	0,349	14 vs. 7	0,141	56 vs. 0	0,2	0,2
0,01	0 vs. 84	0,58	56 vs. 7	0,417	14 vs. 56	0,172	14 vs. 7	0,277	0,277
0,013	56 vs. 14	0,687	0 vs. 7	0,456	28 vs. 14	0,209	28 vs. 14	0,406	0,406
0,017	0 vs. 56	0,719	14 vs. 28	0,719	14 vs. 28	21,334	0,715	0,476	0,476
0,025	84 vs. 14	0,834	84 vs. 14	0,834	84 vs. 14	6,753	0,226	0,821	0,821
0,05	56 vs. 84	0,846	56 vs. 0	0,846	56 vs. 0	1,971	0,066	0,947	0,947

Diferenças significativas estão indicadas por asteriscos (*)

**Revista
Brasileira de
Ciência do Solo**

CAPÍTULO III

GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO DO TOMATE (*LYCOPERSICON LYCOPERSICUM*) EM SOLO CONTAMINADO POR KRAFT (INSETICIDA), SCORE (FUNGICIDA) E SUAS MISTURAS

**André Gomes da Rocha⁽¹⁾, Evaldo Luiz Gaeta Espíndola⁽¹⁾, Vanessa Bezerra de Menezes
Oliveira⁽¹⁾**

⁽¹⁾ PPG-SEA e NEEA/CRHEA/EESC/ Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo,
Brasil

Artigo submetido à Revista Brasileira de Ciência do Solo, em 06/07/2017

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

A agricultura é uma das atividades mais importantes da humanidade e, no Brasil, corresponde a um dos setores econômicos mais relevantes (FERREIRA et al., 2012). Devido à necessidade de aumento de produção e reaproveitamento de áreas já agricultadas, o modo de produção agrícola atual está estreitamente vinculado à utilização de produtos que ajudem a maximizar a eficiência produtiva das lavouras, como é o caso dos agrotóxicos (ARMAGAN; ÖZDEN; DIMITROVSKI, 2015).

Embora tais produtos possam apresentar eficácia satisfatória em prevenir e combater pragas agrícolas, eles têm sido motivo de preocupação devido à sua baixa especificidade, ou seja, eles podem afetar tanto as pragas (organismos alvo), quanto outros organismos não alvo (BHAT, 2012; GRAHAM-BRYCE, 1977; PIMENTEL, 1995; PIMENTEL; BURGESS, 2012), tais como as próprias plantas em que são aplicados, ou outras plantas que não são o objetivo primário da pulverização (BERNARDES et al., 2015; DIAS, 2012; SHAKIR et al., 2016). Consequentemente, os agrotóxicos podem interferir nos processos de germinação e crescimento das plantas em virtude de diversos fatores, tais como a ação sobre fatores fisiológicos das mesmas, a toxicidade a organismos que são benéficos a elas e a interferência nos processos de absorção de nutrientes (FLETCHER, 1987; PETIT et al., 2012; SHAKIR et al., 2016).

A maioria dos ensaios de fitotoxicidade com agrotóxicos é conduzida com herbicidas, uma vez que o modo de ação dos produtos permite uma nocividade maior deles às plantas (KRAEHMER et al., 2014). Além disso, constata-se que a maioria dos trabalhos acerca do impacto de outros tipos de agrotóxicos às plantas volta-se apenas à avaliação de sua eficiência agrônoma ou de seus resíduos no produto final (DIAS, 2012). Contudo, estudos já demonstraram que outros tipos de agrotóxicos, como inseticidas e fungicidas, podem influenciar a fisiologia das plantas, alterando significativamente seus índices de germinação e crescimento (EBEL; WALLACE; ELKINS, 2000; SHAKIR et al., 2016), motivo pelo qual recomendam-se estudos de fitotoxicidade com outros tipos de agrotóxicos afora os herbicidas (DIAS, 2012).

O tomate é uma das culturas mais importantes do mundo e uma das 10 mais cultivadas no Brasil (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2017). Contudo, também é uma das culturas que mais apresentam resíduos de agrotóxicos em função de superdosagem dos produtos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA,

2016). Dentre os agrotóxicos utilizados no cultivo do tomate no Brasil, encontram-se o inseticida Kraft® 36 EC (abamectina, avermectinas) e o fungicida Score® 250 EC (difenoconazol, triazois) (SILVA, 2016).

Na cultura do tomate, o Kraft® 36 EC é recomendado para o combate à Mosca-minadora (*Liriomyza trifolii*), ao Ácaro-rajado (*Tetranychus urticae*) e à Traça-do-tomateiro (*Tuta absoluta*). Por sua vez, o Score® 250 EC é recomendado para o combate aos fungos *Alternaria solani* e *Septoria lycopersici*, responsáveis pelas doenças mancha-de-alternaria e mancha-de-septoria, respectivamente (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2015a, 2015b).

No que se refere ao Kraft® 36 EC, alguns autores relatam indícios de fitotoxicidade de subprodutos da abamectina e outras avermectinas, inclusive no tomate e em doses baixas (KOŁODZIEJSKA et al., 2013; SHAKIR et al., 2016). Em relação ao Score® 250 EC, outros autores mencionam o potencial de compostos triazois em afetar o crescimento de plantas (FLETCHER, 1987; FLETCHER; HOFSTRA; GAO, 1986), enquanto outros também descrevem o potencial de tais compostos em auxiliar o crescimento de algumas culturas (MUTHUKUMARASAMY; PANNEERSELVAM, 1997; PETIT et al., 2012; WU; VON TIEDEMANN, 2002). Ademais, com a tendência mundial de substituição dos fungicidas cujo modo de ação seja por contato por fungicidas sistêmicos, estudos acerca da fitotoxicidade de tais produtos são enfaticamente recomendados (DIAS, 2012).

Sabe-se que a exposição da fauna e flora aos agrotóxicos raramente ocorre de modo segregado, isto é, na grande maioria das vezes a aplicação dos produtos nas lavouras é feita com agrotóxicos de diferentes características, gerando uma multiplicidade de exposições a diversos grupos de substâncias, de maneira sistemática e em longo prazo (MOREIRA et al., 2017; SANTOS et al., 2011). Conforme um estudo realizado no Brasil com profissionais ligados à agricultura, 97% disseram que a aplicação de agrotóxicos é feita mediante a prévia mistura de dois ou mais produtos, demonstrando que essa é uma prática recorrente, embora não regulamentada (GAZZIERO, 2015). Considerando ainda que os diferentes princípios dos agrotóxicos podem influenciar na toxicidade uns dos outros, diversos autores alertam quanto à necessidade de estudos dos efeitos que diversas substâncias adquirem quando utilizadas em mistura (FLORES et al., 2014; PANIZZU; SUCIU; TREVISAN, 2017; ZHOU et al., 2011).

Dentro deste contexto, o presente estudo objetivou analisar os efeitos dos agrotóxicos Kraft® 36 EC e Score® 250 EC, aplicados isoladamente e em mistura, sobre a germinação e o crescimento do tomate (*Lycopersicon lycopersicum*), em quatro períodos de exposição ao longo de 84 dias após a contaminação do solo, de modo a avaliar a evolução temporal da

toxicidade dos produtos. A utilização de produtos comerciais deriva tanto da ideia de conferir maior relevância ecológica ao experimento considerando que é desta forma que eles são dispersados no ambiente, quanto do fato de que os outros ingredientes presentes na composição dos mesmos e denominados inertes podem, por si só, apresentar toxicidade e/ou maximizar a toxicidade dos ingredientes ativos dos agrotóxicos (COX; SURGAN, 2006; NOVELLI et al., 2012; SURGAN; CONDON; COX, 2010).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta e preparação do solo

O solo foi coletado em camada superior, na faixa de 0 a 15 cm de profundidade, em terreno sem histórico de contaminação (NUNES; ESPÍNDOLA, 2012), localizado no Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA), da USP São Carlos, coordenadas 22°10'09"S 47°53'56"O. O solo foi peneirado (abertura 2 mm), seco e desfaunado em estufa a 65 °C por 24 horas (MENEZES-OLIVEIRA et al., 2014). Para garantir a presença de comunidades microbianas, muitas vezes importantes ao crescimento das plantas, foi inoculado um substrato microbiano produzido a partir de solo do mesmo local da coleta, conforme procedimento já descrito na literatura (JENSEN; SCOTT-FORDSMAND, 2012). Após 5 dias de estabilização do substrato microbiano, o solo foi contaminado com as doses mínimas recomendadas para a cultura do tomate (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2015a, 2015b) dos produtos comerciais Kraft® 36 EC (0,02 mg abamectina kg⁻¹ solo), Score® 250 EC (0,04 mg difenoconazol kg⁻¹ solo) e a mistura dos dois produtos nas mesmas doses, diluídos em água destilada de modo a ajustar a umidade final do solo em 20%, que representou aproximadamente 50% da capacidade máxima de retenção hídrica do solo. Os agrotóxicos foram utilizados em suas doses mínimas recomendadas de modo a evitar a supressão de microrganismos do solo que pudessem influenciar a germinação e o crescimento das plantas.

Após a contaminação e ajuste da umidade, o solo foi disposto em potes de plástico de capacidade de 1000 ml contendo 500 gramas de solo seco cada. No total, foram 80 potes considerando o desenho experimental 4x5x4 (4 tempos de exposição – 0, 28, 56 e 84 dias; 5 réplicas por tratamento; 4 tratamentos – Controle, Kraft, Score e Mistura). Os potes permaneceram em laboratório climatizado a 23 °C, com período de iluminação de 16 horas diárias e período noturno de escuridão de 8 horas, sendo semanalmente abertos por 10 minutos para troca gasosa e correção da umidade. A cada período de exposição, 20 réplicas (5 de cada tratamento) foram sacrificadas para a montagem dos testes com as sementes de *Lycopersicon lycopersicum*.

2.2 Desenho experimental e procedimentos

Após 0, 28, 56 e 84 dias da contaminação do solo, foram iniciados os testes de germinação e crescimento do tomate, conforme adaptações dos protocolos OECD 208: *Seedling Emergence and Seedling Growth Test* (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2006) e ISO 11269-2: *Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants* (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2005). Nesses tempos, cada um dos quatro tratamentos (Controle, Kraft, Score e Mistura) foi dividido em 4 réplicas, cada qual composta por 100 ± 1 g de solo dispostos em frascos com capacidade de 350 ml, onde foram introduzidas 5 sementes da espécie de tomate *Lycopersicon lycopersicum*. Foi utilizado um sistema autônomo de rega, com a utilização de cordas de fibras sintéticas que, conectadas do fundo dos frascos com solo a um recipiente contendo água destilada, permitiram que o solo absorvesse água de modo autossuficiente, conforme preconizado pelo protocolo ISO 11269-2 (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2005). O teste permaneceu na mesma sala em que o solo inicial foi armazenado, com temperatura de 23 ± 1 °C e com intensidade de iluminação de aproximadamente 7.000 lux, fornecida por lâmpadas fluorescentes tubulares por 16 horas diárias.

Cada teste durou 21 dias contados a partir da germinação de metade das sementes do tratamento Controle. Após esse período, foram mensurados os seguintes parâmetros das plantas: número de sementes germinadas (observação direta), altura da parte aérea (régua milimetrada), massa fresca e massa seca (balança analítica). Para medição dos parâmetros de crescimento, as plântulas foram cortadas na altura do solo, excluindo-se, desse modo, suas raízes. Considerou-se parte aérea o comprimento do colo até a gema apical das plântulas. Para medição da massa seca, as plântulas foram colocadas em estufa a 80 °C por 24 horas e, em seguida, deixadas em dessecador até esfriarem antes da pesagem (INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2005; ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2006)

Antes do início de cada teste, também foi analisada a biomassa microbiana de carbono (BMC), de acordo com o método de fumigação-extração (VANCE; BROOKES; JENKINSON, 1987), usualmente citado como o mais adequado (ANDRÉA; HOLLWEG, 2004; SILVA; AZEVEDO; DE-POLLI, 2007) utilizando-se coeficiente de correção (Kec) igual a 0,33 (SPARLING; WEST, 1988).

2.3 Agrotóxicos e sementes

O produto comercial Score[®] 250 é um fungicida com modo de ação sistêmico, cuja formulação leva o ingrediente ativo (i.a.) difenoconazol (pertencente ao grupo químico dos triazóis) em concentração de 250 g L⁻¹ (SYNGENTA PROTEÇÃO DE CULTIVOS LTDA, 2002). O produto comercial Kraft[®] 36 é um inseticida e acaricida com modo de ação por contato e ingestão, cuja formulação leva o i.a. abamectina (pertencente ao grupo químico das avermectinas) em concentração de 36 g L⁻¹ (CHEMINOVA BRASIL LDTA., 2014). Foram utilizadas sementes comerciais selecionadas de tomate da variedade *Lycopersicon lycopersicum*, com pureza de 99% e índice de germinação de 85%. Os agrotóxicos e as sementes foram adquiridos em loja especializada na cidade de São Carlos, São Paulo.

2.4 Análise química dos agrotóxicos

No intuito de confirmar as concentrações nominais testadas, as soluções estoque foram analisadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC Waters 2695), equipada com detector arranjo de diodos (DAD). As condições da análise foram: coluna Agilent Zorbax ODS C18 (250×4,6×5 mm) e temperatura de forno de 25 °C. A fase móvel isocrática utilizada foi metanol e água (ácido fórmico 0.1 %; 95:5 v/v) por seis minutos, a uma injeção de volume de 20 µl e fluxo de 1,0 ml min⁻¹. As análises foram conduzidas em triplicatas. Com base na absorbância dos sinais observados no espectro do DAD das soluções padrões, a abamectina e o difenoconazol foram detectados e quantificados a 246 nm e 230 nm, com tempos de retenção de 2,9 e 2,2 minutos, respectivamente. A precisão em termos de repetibilidade, expressa em desvio-padrão relativo, foi 2,05% para abamectina e 1,88% para o difenoconazol. Os limites de detecção foram 50 µg L⁻¹ (abamectina) e 25 µg L⁻¹ (difenoconazol).

2.5 Análises estatísticas

Todos os dados se mostraram apropriados para serem conduzidos por testes paramétricos (distribuição normal e variâncias homogêneas). No intuito de verificar a interação entre os diferentes tratamentos e os tempos de coleta, as comparações estatísticas foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) de duas vias com teste post-hoc

de Holm-Šídák, tanto para os parâmetros das plântulas, quanto para a biomassa microbiana de carbono. Cada parâmetro (porcentagem de germinação, altura da parte aérea, massa fresca, massa seca e BMC) foi considerado uma variável dependente e analisado separadamente. As variáveis independentes utilizadas foram os tempos de análise do solo (0, 28, 56 e 84 dias após a contaminação) e os tratamentos (Controle, Kraft, Score e Mistura).

As análises foram executadas com os programas *SigmaPlot*®, versão 11.0 e *IBM SPSS Statistics*®, versão 22, ambos para Windows® e a significância foi estabelecida em 5 % para todas as análises.

3 RESULTADOS

Os pressupostos para a realização das análises de variância foram atendidos ($P > 0,05$) para todas as variáveis analisadas. Na Figura 3.1 são apresentadas as variações na germinação e crescimento das plantas, para cada um dos diferentes tratamentos, nos quatro períodos de exposição após a contaminação do solo.

Figura 3.1 - Valores e erros-padrão de A) germinação de sementes; B) massa fresca; C) massa seca; e D) altura da parte aérea de *L. lycopersicum* em testes iniciados após 0, 28, 56 e 84 dias da contaminação do solo com as doses recomendadas para o tomate dos produtos Kraft® 36 EC, Score® 250 EC e a mistura de ambos.

* Diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre os mesmos tratamentos em relação a diferentes tempos de exposição (0, 28, 56, 84).

** Diferenças significativas ($P \leq 0,05$) entre o respectivo tratamento e o Controle no mesmo tempo de exposição.

Para todos os tratamentos, as diferenças dos valores de germinação das sementes (Figura 3.1A) entre os quatro períodos de exposição não foram suficientes para excluir a possibilidade de provirem da aleatoriedade intrínseca à variabilidade amostral. Em relação à massa fresca (Figura 3.1B), nota-se um aumento gradual dos valores em todos os tratamentos

ao longo dos quatro períodos de exposição, com algumas diferenças significativas entre os dois últimos e os dois primeiros, excetuando-se o caso da exposição ao Score, para a qual tal parâmetro permaneceu estável ao longo do tempo. Para a massa seca (Figura 3.1C) e a altura das plântulas (Figura 3.1D), os valores do Controle do primeiro período de exposição se mostraram significativamente menores em comparação com os períodos posteriores. Subsequentemente, há uma ascensão de ambos os parâmetros, levando o Controle a equiparar-se aos demais tratamentos a partir da análise realizada após 28 dias da contaminação do solo. Tal qual ocorrido para a altura das plântulas, não foram observadas diferenças significativas da massa seca entre os demais tempos de análise para quaisquer tratamentos, mas percebe-se um crescimento generalizado de tal parâmetro ao longo dos quatro períodos de exposição.

Em relação aos possíveis efeitos dos agrotóxicos sobre o crescimento das plântulas, apenas no primeiro período de exposição foi possível observar diferenças estatisticamente significativas entre a massa seca e altura das plântulas medidas no solo-controle e aquelas medidas nos solos contaminados. Porém, em todos os casos, tais diferenças consistiram em valores maiores nos solos tratados com agrotóxicos em relação ao Controle (Kraft e Score para massa seca e Score e Mistura para altura da parte aérea).

Na Figura 3.2 são plotados os valores da biomassa microbiana de carbono (BMC) correspondentes a cada um dos tempos de exposição e tratamentos. No Apêndice A é possível encontrar os valores de BMC, com a indicação das diferenças significativas entre os quatro tratamentos nos mesmos tempos de análise e nos mesmos tratamentos ao longo dos 84 dias. É importante frisar que as análises da BMC foram feitas com o solo em situação imediatamente anterior ao plantio das sementes, o que significa que as variações da BMC podem servir para explicar determinados resultados no crescimento do tomate, mas que a recíproca não é verdadeira, isto é, o plantio do tomate não afetou os valores de BMC aqui expressados.

Para todos os tratamentos, os valores de BMC da primeira análise se mostraram menores do que nas análises subsequentes. A primeira análise não revelou diferenças significativas entre os valores de BMC dos diferentes tratamentos, ao contrário do que pode ser observado para alguns tratamentos nas análises realizadas após 28, 56 e 84 dias da contaminação do solo. Todos os tratamentos apresentaram diversas diferenças significativas entre os tempos de análise (Apêndice A), sendo que o fator tempo pareceu exercer relevante influência nos valores mensurados de BMC, tal qual ocorreu para os parâmetros de crescimento das plantas.

Figura 3.2 - Valores e erros-padrão da biomassa microbiana de carbono do solo após 0, 28, 56 e 84 dias da contaminação do solo com as doses recomendadas para o tomate dos produtos Kraft® 36 EC, Score® 250 EC e a mistura de ambos.

4 DISCUSSÃO

Excetuando-se a germinação das sementes, todos os outros parâmetros avaliados, de uma forma geral, demonstraram um crescimento ao longo dos quatro períodos de exposição em todos os tratamentos avaliados (Figura 3.1). Tal fato sugere que o maior tempo de armazenamento do solo favoreceu o crescimento das plântulas, uma vez que as demais variáveis foram as mesmas para todos os períodos de exposição (as variáveis físicas - temperatura, umidade e iluminação - permaneceram inalteradas e as sementes utilizadas originaram-se do mesmo lote).

Aliados ao tempo de exposição estão dois fatores importantes, os quais podem ter influenciado consideravelmente os resultados obtidos. Em primeiro lugar está a degradação dos produtos utilizados e em segundo a composição biológica do solo. Em relação à modificação dos produtos, a velocidade de degradação dos compostos, geralmente expressada por sua meia-vida, varia bastante em função das diversas singularidades que os influenciam no meio em que estão presentes, tais como luminosidade, tipo de solo e temperatura (WISLOCKI; GROSSO; DYBAS, 1989). Em condições semelhantes às conduzidas na presente experiência, isto é, laboratório com temperatura de 23 °C, solo franco-argiloso em condições aeróbias reduzidas pela alta umidade e incidência periódica de radiação ultravioleta, a meia-vida dos ingredientes ativos aplicados em doses semelhantes é descrita como variando aproximadamente de 3 a 14 dias para a abamectina (BAI; OGBOURNE, 2016; HALLEY; NESSEL; LU, 1989) e de 33 a 55 dias para o difenoconazol (THOM; OTTOW; BENCKISER, 1997; WANG et al., 2008). Posto isso, o fato de não terem sido observadas diferenças significativas dos parâmetros de crescimento das plântulas entre os diferentes tratamentos nos períodos de exposição após 28, 56 e 84 dias da contaminação do solo, provavelmente decorreu dos processos de transformação dos produtos ocorridos no solo.

O segundo fator que possivelmente influenciou substancialmente os parâmetros de crescimento das plantas ao longo do tempo, foi a composição biológica do solo. Nesse sentido, salienta-se que tal composição limitou-se às comunidades microbianas do solo, as quais são citadas pela literatura como determinantes no crescimento de plantas (DE BELLO et al., 2010; FRANKLIN; MILLS, 2007; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SILVEIRA; FREITAS, 2007).

A hipótese de influência dos microrganismos no crescimento das plantas é corroborada pelo fato de que a emergência das plântulas, única variável que não representou um indicador de crescimento propriamente dito, não apresentou variações significativas nos diferentes

períodos de exposição, tanto para o grupo controle, quanto para os demais tratamentos testados. De fato, a germinação de sementes tem se mostrado como o parâmetro menos sensível dentre os usualmente avaliados em testes de fitotoxicidade de agrotóxicos (SHAKIR et al., 2016), muito embora já tenham sido relatados efeitos negativos sobre tal variável diante de doses altas de abamectina e difenoconazol (BERNARDES et al., 2015; SHAKIR et al., 2016).

Acerca das possíveis influências das comunidades microbianas nos parâmetros de crescimento das plântulas, observa-se um crescimento generalizado dos microrganismos do solo após a análise inicial (Figura 3.2). Nesse primeiro período, as comunidades microbianas possivelmente ainda se encontravam em processo de estabilização após a inoculação do substrato microbiano, 5 dias antes e é importante notar que a biomassa não se mostrou estatisticamente diferente entre quaisquer tratamentos na análise inicial. Nas análises posteriores (28, 56 e 84 dias), o maior intervalo de tempo possibilitou o crescimento das comunidades a ponto de, aparentemente, estabilizar seus níveis de reprodução e crescimento, conforme esperado em razão do limite espacial do habitat edáfico fornecido no laboratório (FRANKLIN; MILLS, 2007; KIM et al., 2008; VOS et al., 2013).

Em relação aos valores significativamente maiores de altura e massa seca das plântulas em solos contaminados com Score (difenoconazol) no primeiro tempo de exposição (dia 0), sabe-se que alguns fungicidas triazóis são descritos como reguladores de crescimento vegetal (FLETCHER, 1987; FLETCHER; HOFSTRA; GAO, 1986), podendo favorecer, por exemplo, o processo de fotossíntese das plantas (MUTHUKUMARASAMY; PANNEERSELVAM, 1997; PETIT et al., 2012), bem como amenizar estresses provocados por diversos fatores, como salinidade (MUTHUKUMARASAMY; PANNEERSELVAM, 1997), agentes oxidativos e senescência das células (WU; VON TIEDEMANN, 2002).

Embora o tratamento com Score possa ter afetado negativamente as comunidades fúngicas do solo, o carbono da biomassa microbiana não parece ter sido afetado como um todo na primeira análise (dia 0). As comunidades microbianas do solo são, em termos de densidade, formadas majoritariamente por bactérias, seguidas das comunidades de fungos e demais microrganismos (COLEMAN; WHITMAN, 2005; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Parte das bactérias do solo é considerada micófaga (fungívora), ou seja, utiliza-se dos fungos ou parte deles como fonte adicional de nutrientes (DE BOER et al., 2004; LEVEAU; PRESTON, 2008), mormente por processos de necrotrofia extracelular, quando a morte dos fungos libera nutrientes para o crescimento das bactérias, mas também por processos de biotrofia extra e endocelular (LEVEAU; PRESTON, 2008).

Independentemente do mecanismo de atuação das bactérias nesses casos, a possível morte dos fungos ou o comprometimento de suas funções em decorrência da ação fungicida do Score, podem ter auxiliado o crescimento e a reprodução de bactérias. Ademais, outros tipos de microrganismos edáficos que apresentam comportamento fungívoro, tais como os protozoários, também podem se beneficiar do enfraquecimento das comunidades de fungos (GEISEN et al., 2016). Isso explicaria por que, mesmo num solo tratado com um fungicida, o carbono da biomassa microbiana como um todo não foi afetado.

Além dos efeitos do Score sobre a altura e a massa seca das plântulas, também foi possível observar uma influência positiva do Kraft (abamectina) aplicado isoladamente sobre este último parâmetro, bem como uma possível contribuição positiva da mistura dos produtos em relação à massa seca (Figura 3.1).

As avermectinas são descritas como princípios que possuem fitotoxicidade baixa ou nula, mas, ao contrário dos triazóis, não são relatados casos de estímulo fisiológico ao crescimento de vegetais (HALLEY; NESSEL; LU, 1989; HALLEY; VANDENHEUVEL; WISLOCKI, 1993). Em relação às interações microbianas que possam ter favorecido o crescimento das plântulas, a abamectina é normalmente descrita como um princípio que não apresenta atividade antibacteriana ou antifúngica, exceto em altíssimas doses (BAI; OGBOURNE, 2016), ainda que a actinobactéria que a origina - *Streptomyces avermitilis* – já tenha demonstrado tais propriedades (BURG; STAPLEY, 1989). Além disso, uma das principais vias de degradação do composto é a atividade metabólica microbiana, que transforma a molécula original de avermectina B_{1a} (da qual mais de 80% da abamectina é composta) em 8a-hidroxi-avermectina B_{1a}, principalmente (HALLEY; VANDENHEUVEL; WISLOCKI, 1993). Desse modo, ademais da não toxicidade da abamectina sobre os microrganismos, ela pode ter servido como substrato e estimulado o crescimento de populações microbianas benéficas ao crescimento das plântulas, quase de modo oposto ao que foi suposto para o Score.

Para os organismos de solo, pouco se sabe acerca dos efeitos da abamectina e de seus metabólitos, mas alguns estudos sugerem que os produtos de sua degradação apresentam toxicidade menor ou igual à molécula primária para a fauna e a flora do solo (BAI; OGBOURNE, 2016; WISLOCKI; GROSSO; DYBAS, 1989). Tal informação carece, porém, de maiores evidências, visto que a maioria desses estudos foi feita com as fezes de gado tratado com avermectinas ou se trataram de experimentos *in vitro* (BAI; OGBOURNE, 2016). Além disso, outros autores não descartam possíveis efeitos tóxicos a outros organismos edáficos, como minhocas, dos outros ingredientes que compõem a formulação comercial de

agrotóxicos a base de abamectina (NUNES; DAAM; ESPÍNDOLA, 2016), ou dos ingredientes inertes de outros tipos de agrotóxicos (PEREIRA et al., 2009).

Possíveis efeitos tóxicos dos denominados ingredientes inertes das formulações a base de abamectina também já foram descritos para organismos aquáticos, como os microcrustáceos *Daphnia similis* (NOVELLI et al., 2012) e *Ceriodaphnia silvestrii* (CASALI-PEREIRA et al., 2015). No caso deste trabalho, considerando o tempo sugerido para a degradação da abamectina, seus subprodutos não apresentaram indícios de fitotoxicidade, tampouco parecem ter apresentado o mesmo tipo de influência no solo que estimulou o crescimento das plântulas observado no primeiro período de exposição (dia 0).

No que se refere ao tratamento com a mistura dos dois agrotóxicos, o único efeito observado, apesar de não significativo estatisticamente, foi uma possível combinação antagonica para a massa seca das plântulas no primeiro tempo de exposição. O possível antagonismo observado, porém, não pôde ser confirmado nos demais períodos de exposição, o que pode ser explicado pela mudança na influência dos contaminantes ao longo do tempo devido, principalmente, à degradação dos mesmos. Não há registros na literatura sobre os possíveis efeitos da mistura de abamectina e difenoconazol aos organismos edáficos. Contudo, outros trabalhos já relataram efeitos sinérgicos ou antagonicos que fungicidas e inseticidas podem adquirir quando utilizados em conjunto, como no caso das taxas de respiração e fotossíntese do dossel de macieiras (UNTIEDT; BLANKE, 2004).

As análises realizadas após 28, 56 e 84 dias da contaminação indicam que o crescimento das comunidades microbianas pode ter contribuído para a equiparação da altura e da massa seca das plântulas do solo-controle em relação aos demais tratamentos, bem como influenciado na redução da toxicidade dos compostos testados.

Embora a ação de ambos os agrotóxicos possivelmente tenha auxiliado pontualmente a altura da parte aérea e a massa seca das plântulas no primeiro período de exposição, constatou-se que o Controle foi o único tratamento em que a altura não apresentou decréscimo ao longo dos tempos de exposição, indicando a tendência de melhor desempenho do crescimento das plântulas no solo não contaminado por agrotóxicos. Tais valores também são acompanhados de níveis mais elevados de biomassa microbiana, sendo que o crescimento conjunto dos dois parâmetros (altura e BMC) se relaciona pelo fato de que solos mais ricos em microrganismos podem ser benéficos às plantas em relação às funcionalidades ecológicas microbianas, tais como maior facilidade de fixação e absorção de nutrientes, decomposição e assimilação da matéria orgânica, agregação e estabilidade de agregados no solo, produção de

enzimas, vitaminas e simbioses benéficas às plantas (DE BELLO et al., 2010; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; SILVEIRA; FREITAS, 2007).

As demais variações da biomassa microbiana parecem apresentar uma complexidade maior do que a simples análise dos valores dos parâmetros podem explicar, porque possivelmente decorrem das inúmeras interações e relações microbianas possíveis, tais como competição, cooperação, predação, entre outras. Nesse sentido, o tipo de experimentação em menor escala, com limitações físicas à entrada de agentes físicos, químicos ou biológicos externos tende a favorecer o alcance e a manutenção de uma abundância microbiana ao longo do tempo (FRANKLIN; MILLS, 2007; TREVES et al., 2003).

Por fim, o fato de não ser possível observar, para a massa fresca, os mesmos resultados encontrados para a massa seca das plântulas pode ser explicado pelas flutuações que a massa fresca está sujeita quanto à umidade incorporada pelas plântulas no momento do corte e pesagem das mesmas. Isso sugere a massa seca como um parâmetro mais preciso do que a massa fresca para avaliação de fitotoxicidade.

5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES

Os resultados deste trabalho indicam que houve poucas diferenças significativas entre os distintos períodos de exposição após a contaminação do solo para os mesmos tratamentos. As diferenças constatadas parecem ter influência da presença dos agrotóxicos Kraft® 36 EC e Score® 250 EC, mas ocorreram apenas no primeiro período de exposição, possivelmente em função da degradação dos compostos e melhor estabilização das comunidades microbianas nos períodos de exposição posteriores. Não obstante, observou-se uma possível melhor tendência de crescimento a longo prazo das plântulas no solo controle, em detrimento aos solos contaminados pelos agrotóxicos.

Em relação aos possíveis efeitos tóxicos dos produtos, constatou-se que ambos os agrotóxicos, aplicados uma única vez e em dose recomendada, isoladamente ou em conjunto, não afetaram negativamente a germinação ou o crescimento da espécie de tomate *Lycopersicon lycopersicum*. Ao contrário, puderam ser observados valores maiores de altura e massa seca das plântulas em relação ao controle. Tais efeitos não foram observados após 28 dias da aplicação dos agrotóxicos, mesmo no solo contaminado com Score, cujo princípio ativo (difenoconazol) possui degradação mais lenta do que o princípio ativo do Kraft (abamectina). Para as misturas, foi observado um possível efeito antagônico apenas para a massa seca no primeiro tempo de exposição, não indicando maiores consequências ao crescimento das plantas dos produtos utilizados em combinação.

Uma possível razão para a equiparação dos valores de crescimento do controle em relação aos demais tratamentos após as primeiras semanas, reside no crescimento das comunidades microbianas do solo, que podem ter auxiliado principalmente: i) na degradação dos compostos no solo e minimização dos seus efeitos; e ii) em fatores benéficos ao crescimento das plântulas - mais acentuadamente representados no solo-controle -, tais como a assimilação da matéria orgânica, a estruturação do solo e disponibilização de nutrientes. Tais resultados corroboram a importância funcional dos microrganismos na promoção de serviços ecossistêmicos relacionados à provisão alimentar, degradação de poluentes, fixação de nutrientes, entre outros (BRUSSAARD; DE RUITER; BROWN, 2007; CHAPIN III et al., 2000; DE BELLO et al., 2010).

Vale frisar que a fitotoxicidade ou outros efeitos ambientais dos agrotóxicos em condições de campo podem diferir consideravelmente dos resultados aqui encontrados, não sendo possíveis extrapolações diretas destes resultados para situações reais de cultivo. Fato

este ainda mais enfático quando se trata da conjuntura agrícola brasileira, em que é comum a prática de aplicação de agrotóxicos em doses maiores do que as recomendadas, de maneira repetida e que não respeita os intervalos mínimos entre uma aplicação e outra (PERES; MOREIRA, 2003). Particularmente em relação à abamectina, já foram relatadas situações de aplicação de quantidades 10 vezes maiores do que as máximas permitidas pela legislação (NUNES; ESPÍNDOLA, 2012). Soma-se a isso o fato de que outras avermectinas podem ser encontradas no ambiente terrestre, sobretudo em razão da presença no solo de fezes de gado tratados com tais produtos (HALLEY; VANDENHEUVEL; WISLOCKI, 1993).

Outro fator que pode constituir diferenças entre este trabalho e outros que analisam a fitotoxicidade de agrotóxicos, é que os produtos não foram pulverizados por sobre as plantas, mas sim incorporados ao solo utilizado para plantio das mesmas. Em relação aos ingredientes ativos utilizados, sabe-se que ambos possuem alto poder de adsorção às partículas de solo e, portanto, não é de esperar que as plantas os absorvam (WISLOCKI; GROSSO; DYBAS, 1989). Particularmente em relação ao Kraft, a despeito de sua rápida degradação na superfície das plantas e do solo, quando há a aspersão por sobre as plantas, a abamectina pode ser incorporada em virtude de seu efeito translaminar, podendo ser encontrados altos residuais do produto nas folhas das plantas (PFEIFER et al., 1993).

Por fim, recomenda-se aos ensaios futuros de fitotoxicidade que seja dada preferência à massa seca das plantas em detrimento da massa fresca, em virtude das flutuações de valores a que este último parâmetro se sujeita. Além disso, reitera-se a importância do cumprimento das recomendações de aplicação de ambos os agrotóxicos avaliados por parte dos agricultores e recomenda-se a iniciativa de diminuição progressiva da sua utilização, uma vez que mesmo alterações microbiológicas provocadas por eles podem contribuir com mudanças de maior magnitude, dada a sua escala utilização.

REFERÊNCIAS⁶

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos: relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015**. Brasília: ANVISA, 25 nov. 2016. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+PARA+2013-2015_VERS%C3%83O-FINAL.pdf/494cd7c5-5408-4e6a-b0e5-5098cbf759f8>.

ANDRÉA, M. M.; HOLLWEG, M. J. M. Comparação de métodos para determinação de biomassa microbiana em dois solos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 28, p. 981–986, 2004.

ARMAGAN, G.; ÖZDEN, A.; DIMITROVSKI, D. Food production and pesticide use: A dilemma in agriculture. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 24, n. 12, p. 4364–4373, 2015.

BAI, S. H.; OGBOURNE, S. Eco-toxicological effects of the avermectin family with a focus on abamectin and ivermectin. **Chemosphere**, v. 154, p. 204–214, jul. 2016.

BERNARDES, P. M. et al. Toxicity of Difenoconazole and Tebuconazole in *Allium cepa*. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 226, n. 7, 2015.

BHAT, A. K. Effect of pesticides on non-target sites with reference to soil ecosystems. In: **Integrated Pest Management: Principles and practice**. [s.l.: s.n.]. p. 370–385.

BRUSSAARD, L.; DE RUITER, P. C.; BROWN, G. G. Soil biodiversity for agricultural sustainability. **Biodiversity in Agricultural Landscapes: Investing without Losing Interest Symposium on Agrobiodiversity at the First Open Science Conference of DIVERSITAS**, v. 121, n. 3, p. 233–244, jul. 2007.

BURG, R. W.; STAPLEY, E. O. Isolation and Characterization of the Producing Organism. In: CAMPBELL, W. C. (Ed.). **Ivermectin and Abamectin**. New York, NY: Springer New York, 1989. p. 24–32.

CASALI-PEREIRA, M. P. et al. Toxicity of Vertimec® 18 EC (active ingredient abamectin) to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Chemosphere**, v. 139, p. 558–564, nov. 2015.

CHAPIN III, F. S. et al. Consequences of changing biodiversity. **Nature**, v. 405, n. 6783, p. 234–242, 11 maio 2000.

CHEMINOVA BRASIL LDТА. **Ficha de informação de segurança de produto químico**, de outubro de 2014. Disponível em: <<http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/kraft.pdf>>

COLEMAN, D. C.; WHITMAN, W. B. Linking species richness, biodiversity and ecosystem function in soil systems. **Pedobiologia**, v. 49, n. 6, p. 479–497, 30 nov. 2005.

COX, C.; SURGAN, M. Unidentified inert ingredients in pesticides: Implications for human and environmental health. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 12, p. 1803–1806,

⁶ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).

2006.

DE BELLO, F. et al. Towards an assessment of multiple ecosystem processes and services via functional traits. **Biodiversity and Conservation**, v. 19, n. 10, p. 2873–2893, 2010.

DE BOER, W. et al. *Collimonas fungivorans* gen. nov., sp. nov., a chitinolytic soil bacterium with the ability to grow on living fungal hyphae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 857–864, 2004.

DIAS, M. C. Phytotoxicity: An Overview of the Physiological Responses of Plants Exposed to Fungicides. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1–4, 2012.

FERREIRA, J. et al. Towards environmentally sustainable agriculture in Brazil: Challenges and opportunities for applied ecological research. **Journal of Applied Ecology**, v. 49, n. 3, p. 535–541, 2012.

FLETCHER, R. A. Plant Growth Regulating Properties of Sterol-Inhibiting Fungicides. In: PUROHIT, S. S. (Ed.). . **Hormonal Regulation of Plant Growth and Development**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1987. p. 103–113.

FLETCHER, R. A.; HOFSTRA, G.; GAO, J.-G. Comparative fungitoxic and plant growth regulating properties of triazole derivatives. **Plant and Cell Physiology**, v. 27, n. 2, p. 367–371, 1986.

FLORES, L. et al. Effects of a fungicide (imazalil) and an insecticide (diazinon) on stream fungi and invertebrates associated with litter breakdown. **Science of the Total Environment**, v. 476–477, p. 532–541, 2014.

FRANKLIN, R. B.; MILLS, A. L. Introduction. In: FRANKLIN, R. B.; MILLS, A. L. (Eds.). . **The Spatial Distribution of Microbes in the Environment**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 1–30.

GAZZIERO, D. L. P. Misturas de agrotóxicos em tanque nas propriedades agrícolas do Brasil. **Planta Daninha**, v. 33, p. 83–92, 2015.

GEISEN, S. et al. The soil food web revisited: Diverse and widespread mycophagous soil protists. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 94, p. 10–18, mar. 2016.

GRAHAM-BRYCE, I. J. Crop Protection: A Consideration of the Effectiveness and Disadvantages of Current Methods and of the Scope for Improvement. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 281, n. 980, p. 163, 25 nov. 1977.

HALLEY, B. A.; NESSEL, R. J.; LU, A. Y. H. Environmental Aspects of Ivermectin Usage in Livestock: General Considerations. In: CAMPBELL, W. C. (Ed.). . **Ivermectin and Abamectin**. New York, NY: Springer New York, 1989. p. 162–172.

HALLEY, B. A.; VANDENHEUVEL, W. J. A.; WISLOCKI, P. G. Environmental effects of the usage of avermectins in livestock. **Veterinary Parasitology**, v. 48, n. 1, p. 109–125, 1 jun. 1993.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Levantamento sistemático**

da produção agrícola: pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil. Rio de Janeiro: IBGE, Fev 2017. Disponível em: <ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Levantamento_Sistematico_da_Producao_Agricola_[mensal]/Fasciculo/lspa_201702.pdf>.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Soil quality - Determination of the effects of pollutants on soil flora. Part 2: Effects of contaminated soil on the emergence and early growth of higher plants**, 2005.

JENSEN, J.; SCOTT-FORDSMAND, J. J. Ecotoxicity of the veterinary pharmaceutical ivermectin tested in a soil multi-species (SMS) system. **Environmental Pollution**, v. 171, p. 133–139, 2012.

KIM, H. J. et al. Defined spatial structure stabilizes a synthetic multispecies bacterial community. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 47, p. 18188–18193, 25 nov. 2008.

KOŁODZIEJSKA, M. et al. Aquatic toxicity of four veterinary drugs commonly applied in fish farming and animal husbandry. **Chemosphere**, v. 92, n. 9, p. 1253–1259, Agosto 2013.

KRAEHMER, H. et al. Herbicides as Weed Control Agents: State of the Art: I. Weed Control Research and Safener Technology: The Path to Modern Agriculture. **Plant Physiology**, v. 166, n. 3, p. 1119–1131, 2014.

LEVEAU, J. H. J.; PRESTON, G. M. Bacterial mycophagy: definition and diagnosis of a unique bacterial–fungal interaction. **New Phytologist**, v. 177, n. 4, p. 859–876, 1 mar. 2008.

MENEZES-OLIVEIRA, V. B. et al. Development of ecosystems to climate change and the interaction with pollution—Unpredictable changes in community structures. **Applied Soil Ecology**, v. 75, p. 24–32, mar. 2014.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Relatório de produtos formulados: Kraft 36 EC**, maio de 2015a.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Relatório de produtos formulados: Score 250 EC**, maio de 2015b.

MOREIRA, F. M. DE S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006.

MOREIRA, R. A. et al. Toxicity of abamectin and difenoconazole mixtures to a Neotropical cladoceran after simulated run-off and spray drift exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 185, p. 58–66, 2017.

MUTHUKUMARASAMY, M.; PANNEERSELVAM, R. Amelioration of NaCl stress by triadimefon in peanut seedlings. **Plant Growth Regulation**, v. 22, n. 3, p. 157–162, 1997.

NOVELLI, A. et al. Field and laboratory studies to assess the effects of Vertimec® 18EC on *Daphnia similis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 75, p. 87–93, 1 jan. 2012.

NUNES, M. E. T.; DAAM, M. A.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Survival, morphology and reproduction of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) as affected by Vertimec® 18 EC (a.i.

abamectin) in tests performed under tropical conditions. **Applied Soil Ecology**, v. 100, p. 18–26, abr. 2016.

NUNES, M. E. T.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 4, p. 1063–1071, 2012.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD Guidelines for the testing of chemicals: Terrestrial Plant Test - Seedling Emergence and Seedling Growth Test**, 19 jul. 2006.

PANIZZI, S.; SUCIU, N. A.; TREVISAN, M. Combined ecotoxicological risk assessment in the frame of European authorization of pesticides. **Science of the Total Environment**, v. 580, p. 136–146, 2017.

PEREIRA, J. L. et al. Toxicity evaluation of three pesticides on non-target aquatic and soil organisms: commercial formulation versus active ingredient. **Ecotoxicology**, v. 18, n. 4, p. 455–463, 2009.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. (EDS.). **É veneno ou é remédio?: agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.

PETIT, A.-N. et al. Fungicide impacts on photosynthesis in crop plants. **Photosynthesis Research**, v. 111, n. 3, p. 315–326, 2012.

PFEIFER, K. et al. **Abamectin: risk characterization document** California Environmental Protection Agency, 12 ago. 1993. Disponível em: < goo.gl/V9dEhL >

PIMENTEL, D. Amounts of pesticides reaching target pests: Environmental impacts and ethics. **Journal of Agricultural and Environmental Ethics**, v. 8, n. 1, p. 17–29, 1995.

PIMENTEL, D.; BURGESS, M. Small amounts of pesticides reaching target insects. **Environment, Development and Sustainability**, v. 14, n. 1, p. 1–2, 2012.

SANTOS, M. J. G. et al. Evaluation of the joint effect of glyphosate and dimethoate using a small-scale terrestrial ecosystem. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 7, p. 1994–2001, 2011.

SCHAEFFER, A. et al. (EDS.). **Semi-Field Methods for the Environmental Risk Assessment of Pesticides in Soil**. [s.l.] CRC Press, 2010.

SHAKIR, S. K. et al. Effect of some commonly used pesticides on seed germination, biomass production and photosynthetic pigments in tomato (*Lycopersicon esculentum*). **Ecotoxicology**, v. 25, n. 2, p. 329–341, 2016.

SILVA, E. E. DA; AZEVEDO, P. H. S. DE; DE-POLLI, H. **Comunicado Técnico 98 - Determinação do carbono da biomassa microbiana do solo (BMS-C)** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, , de setembro de 2007. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/625010>>

SILVA, M. R. **Gestão de embalagens de agrotóxicos - logística reversa em pequenos**

municípios brasileiros: o caso do município de Bom Repouso, MG. Dissertação de mestrado—São Carlos: Universidade de São Paulo, 2016.

SILVEIRA, A. P. D. DA; FREITAS, S. DOS S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental.** Campinas: Instituto Agronômico, 2007.

SPARLING, G. P.; WEST, A. W. A direct extraction method to estimate soil microbial C: calibration in situ using microbial respiration and ¹⁴C labelled cells. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 20, n. 3, p. 337–343, 1988.

SURGAN, M.; CONDON, M.; COX, C. Pesticide risk indicators: Unidentified inert ingredients compromise their integrity and utility. **Environmental Management**, v. 45, n. 4, p. 834–841, 2010.

SYNGENTA PROTEÇÃO DE CULTIVOS LTDA. **Ficha de Informação de Segurança de Produto Químico: Score 250 EC**, de agosto de 2002. Disponível em: <https://www.extrapratica.com.br/BR_Docs/Portuguese/FISPQ/SCORE.pdf>

THOM, E.; OTTOW, J. C. G.; BENCKISER, G. Degradation of the fungicide difenoconazole in a silt loam soil as affected by pretreatment and organic amendment. **Environmental Pollution**, v. 96, n. 3, p. 409–414, 1 jan. 1997.

TREVES, D. S. et al. A Two-Species Test of the Hypothesis That Spatial Isolation Influences Microbial Diversity in Soil. **Microbial Ecology**, v. 45, n. 1, p. 20–28, 2003.

UNTIEDT, R.; BLANKE, M. M. Effects of fungicide and insecticide mixtures on apple tree canopy photosynthesis, dark respiration and carbon economy. **Crop Protection**, v. 23, n. 10, p. 1001–1006, out. 2004.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D. S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 703–707, 1987.

VOS, M. et al. Micro-scale determinants of bacterial diversity in soil. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 37, n. 6, p. 936–954, 1 nov. 2013.

WANG, Z. H. et al. Determination and dynamics of difenoconazole residues in Chinese cabbage and soil. **Chinese Chemical Letters**, v. 19, n. 8, p. 969–972, ago. 2008.

WISLOCKI, P. G.; GROSSO, L. S.; DYBAS, R. A. Environmental Aspects of Abamectin Use in Crop Protection. In: CAMPBELL, W. C. (Ed.). **Ivermectin and Abamectin**. New York, NY: Springer New York, 1989. p. 182–200.

WU, Y.; VON TIEDEMANN, A. Impact of fungicides on active oxygen species and antioxidant enzymes in spring barley (*Hordeum vulgare* L.) exposed to ozone. **Environmental Pollution**, v. 116, n. 1, p. 37–47, jan. 2002.

ZHOU, S. et al. Individual and combined toxic effects of cypermethrin and chlorpyrifos on earthworm. **Journal of Environmental Sciences**, v. 23, n. 4, p. 676–680, 2011.

APÊNDICE A – Anova de duas vias da biomassa microbiana de carbono

Comparações entre tratamentos nos mesmos tempos				Comparações do mesmo tratamento entre tempos			
	Comparação	Diferenças			Comparação	Diferenças	
		entre médias	P-valor			entre médias	P-valor
Entre tratamentos no tempo 0	S vs. C	65,11	0,235	Entre tempos para o Controle	84 vs. 0	601,61	<0,001
	S vs. KS	44,43	0,417		28 vs. 0	394,34	<0,001
	K vs. C	40,22	0,462		56 vs. 0	377,10	<0,001
	S vs. K	24,89	0,649		84 vs. 56	224,52	<0,001
	KS vs. C	20,68	0,705		84 vs. 28	207,27	<0,001
	K vs. KS	19,53	0,72		28 vs. 56	17,25	0,752
Entre tratamentos no tempo 28	K vs. S	247,27	<0,001	Entre tempos para o Kraft	28 vs. 0	522,31	<0,001
	K vs. KS	180,92	0,001		84 vs. 0	502,31	<0,001
	K vs. C	168,18	0,003		56 vs. 0	340,49	<0,001
	C vs. S	79,09	0,151		28 vs. 56	181,82	0,001
	KS vs. S	66,36	0,227		84 vs. 56	161,82	0,004
	C vs. KS	12,74	0,816		28 vs. 84	20,01	0,714
Entre tratamentos no tempo 56	KS vs. C	184,52	0,001	Entre tempos para o Score	56 vs. 0	429,23	<0,001
	KS vs. K	180,91	0,001		84 vs. 0	319,22	<0,001
	S vs. C	117,24	0,035		28 vs. 0	250,14	<0,001
	S vs. K	113,63	0,041		56 vs. 28	179,08	0,002
	KS vs. S	67,28	0,22		56 vs. 84	110,00	0,047
	K vs. C	3,61	0,947		84 vs. 28	69,08	0,208
Entre tratamentos no tempo 84	C vs. S	217,28	<0,001	Entre tempos para a Mistura	56 vs. 0	540,94	<0,001
	KS vs. S	159,10	0,005		84 vs. 0	522,75	<0,001
	K vs. S	158,19	0,005		28 vs. 0	360,93	<0,001
	C vs. K	59,09	0,281		56 vs. 28	180,01	0,002
	C vs. KS	58,18	0,289		84 vs. 28	161,83	0,004
	KS vs. K	0,91	0,987		56 vs. 84	18,18	0,739

Os valores-p em negrito denotam diferenças significativas (P<0,05).

CAPÍTULO IV

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após apresentados os resultados e discussões gerados por esta dissertação, é importante finalizar esta pesquisa relacionando brevemente o que fora delineado no seu início e as informações já existentes sobre os efeitos dos agrotóxicos Kraft e Score no ambiente terrestre com as conclusões e novas informações trazidas por este trabalho, incluindo seus êxitos, obstáculos e imprecisões.

No Capítulo I, foi apresentada a problemática da presença de xenobióticos no ambiente e, especificamente, de agrotóxicos no solo, informações de grande importância durante a análise e discussão dos resultados dos capítulos posteriores. Nestes, foram levantadas maiores considerações sobre o comportamento, destino e efeitos de agrotóxicos no ambiente terrestre. Especificamente, foram analisados os efeitos dos produtos Kraft e Score sobre a germinação e o crescimento do tomate, a reprodução de enquitreídeos em diferentes densidades, as comunidades microbianas do solo e a relação trófica entre os enquitreídeos e tais comunidades.

Considerando os objetivos iniciais deste trabalho, em relação à hipótese de que os agrotóxicos Kraft e Score pudessem afetar as comunidades microbianas do solo, foi possível concluir que eles exerceram certa influência nos parâmetros microbianos. Entretanto, o sistema microbiano como um todo parece ter passado por um processo de redundância funcional e, considerando os tipos de efeitos observados ao longo dos 84 dias de experimento, as possíveis variações decorrentes da aplicação dos agrotóxicos não se revelaram motivo de grande preocupação. Além disso, variações semelhantes no solo-controle indicaram que os experimentos foram influenciados pelo tempo de estabilização das comunidades microbianas, fato pelo qual recomenda-se, para trabalhos posteriores, um tempo maior do que 5 dias para a estabilização do inóculo microbiano.

Em relação às hipóteses de que os agrotóxicos Kraft e Score pudessem afetar a reprodução de enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*), concluiu-se que nas concentrações testadas, estes importantes organismos do solo não foram prejudicados diretamente pela aplicação dos agrotóxicos, quaisquer que fossem as densidades testadas. A importância das comunidades microbianas na dieta dos enquitreídeos foi verificada, mas uma vez que os produtos não apresentaram toxicidade aos microrganismos, possíveis efeitos indiretos na sobrevivência dos enquitreídeos não foram observados.

Em relação à hipótese de que os agrotóxicos Kraft e Score pudessem afetar a germinação e o crescimento do tomate (*Lycopersicon lycopersicum*), não houve influência negativa dos produtos sobre tais parâmetros nas doses testadas, seja em momentos específicos ou sob a perspectiva temporal ao longo dos 84 dias. Além disso, foi corroborada a hipótese

levantada no Capítulo II de que as comunidades microbianas ainda não se encontravam totalmente estabilizadas no início do experimento.

Conforme já descrito nos capítulos anteriores, embora este trabalho não tenha demonstrado efeitos nocivos diretos dos agrotóxicos Kraft e Score à fauna e flora edáficas, reitera-se que se deve ter muita cautela ao analisar o potencial de tais produtos em oferecer riscos ao meio ambiente. Ambos os produtos são muito utilizados em algumas regiões do Brasil, como é o caso do município de Bom Repouso (MOREIRA et al., 2017; NOVELLI et al., 2012, 2016; NUNES; ESPÍNDOLA, 2012; SILVA, 2016), cujo contexto de utilização indiscriminada de agrotóxicos foi um dos motivos de realização desta pesquisa. Sabe-se que muitas vezes os agricultores não seguem as recomendações de aplicação, como as doses máximas, o número de repetições por safra, o intervalo mínimo entre as aplicações, o intervalo mínimo entre a última aplicação e a colheita, o descarte adequado das embalagens de agrotóxicos etc (CARNEIRO et al., 2015; SILVA, 2016). Além disso, conforme mencionado no Capítulo I, ambos os produtos se ligam fortemente ao solo. Todas estas informações reforçam a necessidade de precaução quanto a conclusões extraídas deste trabalho e quanto ao uso de tais produtos, uma vez que a toxicidade deles às comunidades edáficas pode ser consideravelmente maior em condições reais de cultivo.

Nesse sentido, destaca-se a carência de estudos de ecotoxicologia terrestre com a abamectina e o difenoconazol, uma vez que a grande maioria dos estudos ecotoxicológicos com tais produtos são realizados com organismos aquáticos (CASALI-PEREIRA et al., 2015; MOREIRA et al., 2017; NOVELLI et al., 2012, 2016). Sabe-se, porém, que este cenário não se limita a esses dois ingredientes, mas que decorre da maior expressividade histórica da ecotoxicologia aquática frente à terrestre (BOUDOU; RIBEYRE, 1997; VAN GESTEL, 2012). Daí a importância do fortalecimento da ecotoxicologia terrestre no cenário mundial e, em especial, no Brasil, cujo contexto agrícola e a carência de informações sobre os solos já foram destacados anteriormente.

No que concerne aos dois agrotóxicos estudados, em relação ao Kraft, a abamectina já está proibida na União Europeia e passa por processo de reavaliação no Brasil (CARNEIRO et al., 2015). Na União Europeia e nos Estados Unidos, por exemplo, o registro dos ingredientes ativos expira a cada 10 e 15 anos, respectivamente (PELAEZ; DA SILVA; ARAÚJO, 2013). No Brasil, porém, a permissão de uso de agrotóxicos não tem validade e o processo de reavaliação ocorre apenas quando requerido pelas agências executivas do Ministério do Meio Ambiente (MMA), do Ministério da Saúde (MS) ou do Ministério da

Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (CARNEIRO et al., 2015; PELAEZ; DA SILVA; ARAÚJO, 2013).

Os processos de reavaliação costumam ser bastante morosos, havendo ingredientes ativos que permanecem nesse estágio por mais de 10 anos. Recentemente foi aprovada pelo governo federal uma medida provisória elaborada em parceria com as indústrias de agrotóxicos e entidades que representam produtores rurais, determinando novos critérios para aprovação de agrotóxicos com vistas a agilizar a colocação de novos produtos no mercado e reduzir o número de reavaliações no país (WALENDORFF, 2017). Além disso, as empresas produtoras de agrotóxicos possuem grande poder de negociação com os poderes executivos, legislativos e judiciário, o que auxilia na manutenção dos produtos no mercado enquanto estão sendo reavaliados e na reversão de decisões judiciais que limitem o uso dos seus produtos (LONDRES, 2011). Especificamente em relação aos possíveis efeitos indesejados da abamectina, soma-se o fato de que outras avermectinas podem ser encontradas no ambiente terrestre, sobretudo em razão da presença no solo de fezes de gado tratados com tais produtos (HALLEY; VANDENHEUVEL; WISLOCKI, 1993).

Em relação ao Score, o difenoconazol não tem previsão para ser reavaliado no Brasil, não sendo um ingrediente ativo de muito destaque em relação aos seus riscos ambientais. Contudo, é interessante que a comunidade científica se atente para seus possíveis efeitos, sobretudo em virtude do tempo de permanência do composto no solo.

Embora os elementos deste trabalho não sejam suficientes para conclusões definitivas a respeito das misturas dos agrotóxicos Kraft e Score, é sempre importante destacar o potencial de risco ambiental que diversos compostos adquirem quando presentes de modo simultâneo. O alerta a respeito do uso dos agrotóxicos deve ser constante pois a quantidade e a diversidade de produtos dispersados no ambiente terrestre são bastante grandes. Nesse contexto, pode-se considerar este trabalho como uma contribuição à ecotoxicologia terrestre e às ciências do solo como um todo, áreas tão importantes num país com uma expressividade agrícola tão grande, como é o caso do Brasil.

REFERÊNCIAS⁷

- BOUDOU, A.; RIBEYRE, F. Aquatic ecotoxicology: From the ecosystem to the cellular and molecular levels. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, n. SUPPL. 1, p. 21–35, 1997.
- CARNEIRO, F. F. et al. (EDS.). **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde** EPSJV/Expressão Popular, , 2015.
- CASALI-PEREIRA, M. P. et al. Toxicity of Vertimec® 18 EC (active ingredient abamectin) to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Chemosphere**, v. 139, p. 558–564, nov. 2015.
- HALLEY, B. A.; VANDENHEUVEL, W. J. A.; WISLOCKI, P. G. Environmental effects of the usage of avermectins in livestock. **Veterinary Parasitology**, v. 48, n. 1, p. 109–125, 1 jun. 1993.
- LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: um guia para ação em defesa da vida**. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011.
- MOREIRA, R. A. et al. Toxicity of abamectin and difenoconazole mixtures to a Neotropical cladoceran after simulated run-off and spray drift exposure. **Aquatic Toxicology**, v. 185, p. 58–66, 2017.
- NOVELLI, A. et al. Field and laboratory studies to assess the effects of Vertimec® 18EC on *Daphnia similis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 75, p. 87–93, 1 jan. 2012.
- NOVELLI, A. et al. Impact of runoff water from an experimental agricultural field applied with Vertimec® 18EC (abamectin) on the survival, growth and gill morphology of zebrafish juveniles. **Chemosphere**, v. 144, p. 1408–1414, fev. 2016.
- NUNES, M. E. T.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 4, p. 1063–1071, 2012.
- PELAEZ, V.; DA SILVA, L. R.; ARAÚJO, E. B. Regulation of pesticides: A comparative analysis. **Science and Public Policy**, v. 40, n. 5, p. 644–656, 2013.
- SILVA, M. R. **Gestão de embalagens de agrotóxicos - logística reversa em pequenos municípios brasileiros: o caso do município de Bom Repouso, MG**. Dissertação de mestrado—São Carlos: Universidade de São Paulo, 2016.
- VAN GESTEL, C. A. M. Soil ecotoxicology: State of the art and future directions. **ZooKeys**, v. 176, n. SPECIAL ISSUE, p. 275–296, 2012.
- WALENDORFF, R. Governo vai mudar regras para registro de novos agrotóxicos. **Canal Rural**, 17 jul. 2017.

⁷ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 6023).