

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Instituto de Biologia  
Ciências Biológicas – Bacharelado



Trabalho Acadêmico

**Avaliação toxicológica de diferentes  
concentrações da calda bordalesa em  
*Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta)**

**Louise Vargas Ribeiro**

Pelotas, 2013

**LOUISE VARGAS RIBEIRO**

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES  
DA CALDA BORDALESA EM *Eisenia andrei* (ANNELIDA,  
OLIGOCHAETA)**

Trabalho acadêmico apresentado ao  
Curso de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Pelotas, como  
requisito parcial à obtenção de título de  
Bacharel.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marla Piumbini Rocha

Co-Orientador: Dr. Gustavo Schiedeck

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:  
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901  
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

R484a      Ribeiro, Louise Vargas  
              Avaliação toxicológica de diferentes concentrações da calda bordalesa em *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) / Louise Vargas Ribeiro. – 45f. ; il – Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia. Pelotas, 2013. – Orientador Marla Piumbini Rocha ; co-orientador Gustavo Schiedeck.

1.Biologia. 2.Ecologia. 3.Ecotoxicologia. 4.Cobre.  
5.Insumos. 6.Minhocas. 7.*Eisenia andrei*. 8.Calda bordalesa.  
I. Schiedeck, Gustavo. II.Título.

CDD: 571.95

**Banca examinadora:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marla Piumbini Rocha

Prof. Dr. Edson Zefa

Msc. Volnei Knopp Zibetti

Prof. Dr. Eduardo Bernardi

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me permitir aproveitar as oportunidades da vida e por me ancorar de pessoas especiais;

Ao meu anjo da guarda (vó), por estar olhando por mim, e me guiando sempre, mesmo eu estando trabalhando com o animal que lhe causava pânico, sei que estaria se sentindo orgulhosa;

À minha mãe Jussanete Vargas por todo apoio, pelas noites viradas lendo meus trabalhos e principalmente pelo amor incondicional;

Ao meu pai Flávio Ribeiro pela dedicação e amor;

Aos meus irmãos Laura e Felipe pelo apoio, compreensão e paciência em escutar minhas apresentações;

Ao meu amor, amigo e motorista particular Tiago Bach, por ser meu porto seguro, a razão da minha vida e pelo grande apoio em tudo que eu faço;

Aos meus orientadores Marla Rocha e Gustavo Schiedeck, por acreditarem na minha capacidade, pela disposição, orientação e incentivo. Também ao pequeno João, pelos feriados compartilhando seus pais comigo e pelo acompanhamento do meu TCC desde que estava na barriga;

Às minhas colegas e amigas, Aline, Carol, Daiana, Flávia, Luana, Patrícia, Roberta e Suzane, sem vocês esta caminhada seria bem mais difícil;

Aos funcionários do Laboratório de Histologia da Ufpel, pelos ensinamentos e momentos de descontração;

Aos pesquisadores, funcionários, bolsistas e estagiários da Embrapa Clima Temperado EEC pela acolhida e principalmente pela amizade;

À Banca examinadora, pela participação e enriquecimento do meu trabalho;

Ao CNPQ (Processo 126355/2013-4) pela concessão de bolsa de iniciação científica;

À vida, à natureza, à Cascata, à música, à terra, às minhocas e a tudo e todos que contribuíram para mais esta etapa, meu muito obrigada!

## Resumo

RIBEIRO, Louise Vargas. **Avaliação toxicológica de diferentes concentrações da calda bordalesa em *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta)**. 2013. 45f. Trabalho Acadêmico. Graduação em Ciências Biológicas – Bacharelado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Verifica-se o grau de toxicidade e danos causados por diferentes concentrações de calda bordalesa em minhocas *E. andrei* por meio de testes ecotoxicológicos e análises histológicas. A calda bordalesa é um insumo utilizado no controle de doenças causadas por fungos em diversas culturas e seu uso é permitido na agricultura orgânica apesar de conter, o cobre, que é um metal pesado e se acumula no ambiente. As espécies *Eisenia fetida* Savigny, 1826 e *E. andrei* Bouché, 1972, foram escolhidas para diversos testes de toxicidade para fins de registro de agrotóxicos junto aos órgãos regulamentadores de diversos países, inclusive no Brasil. Trabalhos sobre efeitos dos agrotóxicos em minhocas são realizados, na sua maioria, sobre informações anatômicas, ecológicas e reprodutivas, porém, danos estruturais podem passar despercebidos em experimentos de rotina. Por isso, utilizando-se de métodos histológicos, busca-se fornecer dados úteis sobre o tecido antes da manifestação anatômica externa do dano. Os testes ecotoxicológicos foram realizados na Embrapa Clima Temperado/EEC e as análises histológicas, no Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Pelotas/RS, e compreenderam: teste preliminar agudo de contato com papel filtro para a determinação da concentração letal capaz de matar 50% dos indivíduos, onde se determinou valores de 0,2% de calda bordalesa em 48h e 0,09 em 72h; testes de Evitamento (fuga), onde se pode observar que em concentrações mais elevadas de Cu houve maior evitamento; Testes de toxicidade aguda (Mortalidade) sem resultados de mortalidade e redução de biomassa e; teste crônico (reprodução), onde as minhocas se reproduziram normalmente em todas as concentrações em SAT. Nas análises histológicas ocorreram variações significativas no comprimento dos tecidos epitelial de ambas as regiões estudadas, como também para o tecido cloragógeno da região do tiflosole. Já o tecido cloragógeno na região de continuação do tiflosole não apresentou diferença estatística. Para alguns dos testes abordados, a calda bordalesa não apresentou resultados significativos nos organismos, comprovando que, nestas condições, pode ser utilizada.

Palavras-chave: Cobre. Ecotoxicologia. Insumo. Minhoca.

## Abstract

RIBEIRO, Louise Vargas. **Avaliação toxicológica de diferentes concentrações da calda bordalesa em *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta)**. 2013. 45f. Trabalho Acadêmico. Graduação em Ciências Biológicas – Bacharelado. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

There is the degree of toxicity and damage caused by different concentrations of Bordeaux mixture in earthworms *E. andrei* through ecotoxicological tests and histological analyzes. The Bordeaux mixture is an input used to control fungal diseases in various crops and their use is allowed in organic agriculture, despite containing copper, which is a heavy metal and accumulates in the environment. The *Eisenia fetida* species Savigny, 1826 and *E. andrei* Bouché, 1972 were chosen for different toxicity tests for pesticide registration purposes with the regulatory agencies of several countries, including Brazil. Work on the effects of pesticides on earthworms are performed mostly on anatomical, ecological and reproductive information, however, structural damage can go undetected in routine experiments. Therefore, using histological methods, we seek to provide useful data on the fabric before anatomical manifestation of external damage. Ecotoxicological tests were carried out at Embrapa Clima Temperado / EEC and histological analyzes, the Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Pelotas / RS, and included: acute pretest contact with filter paper to determine the lethal concentration able to kill 50% individuals, where it was determined values of 0.2% Bordeaux mixture in 48h and 72h in 0.09; avoidance tests ( trail ), where one can observe that at higher concentrations of Cu was higher avoidance; acute toxicity tests ( mortality ) without mortality outcomes and reduced biomass and; chronic test ( playback ), where the worms are usually reproduced at all concentrations SAT. Histological analyzes were significant variations in the length of epithelial tissues in both regions studied, as well as to the fabric of the cloragógeno tiflossole region. Already cloragógeno tissue in the continuation of tiflossole not statistically significantly. For some of the tests discussed, the Bordeaux mixture showed no significant results in organisms, proving that under these conditions, can be used.

Keywords: Copper. Ecotoxicology. Feedstock. Earthworm.

## Lista de Figuras

Figura 1 Corte histológico de <i>E. andrei</i> .....	17
Figura 2 Epiderme com células glandulares.....	17
Figura 3 Criação de <i>E. andrei</i> em laboratório.....	23
Figura 4 Recipientes para testes.....	24
Figura 5 Teste de evitamento com minhocas.....	26
Figura 6 Mortalidades e deformidades de <i>E. andrei</i> em teste agudo com papel filtro.....	30
Figura 7 Número de indivíduos mortos por concentração de calda bordalesa em escala logarítmica.....	30
Figura 8 Resposta de evitamento de <i>E. andrei</i> a SAT tratado com diferentes concentrações de calda bordalesa.....	31
Figura 9 Biomassa de minhocas no teste agudo.....	33
Figura 10 Corte histológico de <i>E. andrei</i> , A – região do tiflossole (seta azul) e continuação do tiflossole (seta vermelha) em aumento de 100x. B – região do tiflossole em aumento de 400x, demonstrando os tecidos a serem mensurados.....	35



## Lista de Tabelas

Tabela 1 Teste agudo em papel filtro.....	29
Tabela 2 Biomassa de minhocas no teste agudo.....	33
Tabela 3 Número médio de juvenis de <i>E. andrei</i> , teste de reprodução.....	34
Tabela 4 Médias dos comprimentos ( $\mu\text{m}$ ) dos tecidos na região do tiflossole.....	35
Tabela 5 Médias dos comprimentos ( $\mu\text{m}$ ) dos tecidos na região de continuação do tiflossole.....	36

## **Lista de Abreviaturas e Siglas**

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

B. O. D – Demanda bioquímica de oxigênio

C - Celoma

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CL50 - Concentração letal para 50% dos indivíduos

E – Epitélio

ISO – International Organization for Standardization

MC – Musculatura circular

ML- Musculatura longitudinal

M.O – Microscópio óptico

OAC- Organismo de Avaliação da Conformidade Orgânica

OPAC - Organismo Participativo de Avaliação da Conformidade Orgânica

OECD - Organization for economic co-operation and development

SAT – Solo artificial tropical

T- Tiflosole

TC- Tecido cloragógeno

## Sumário

<b>1 Introdução .....</b>	<b>12</b>
<b>2 Objetivos .....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 Objetivo geral .....</b>	<b>14</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>14</b>
<b>3 Revisão de Literatura .....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Características de Oligoquetas .....</b>	<b>15</b>
<b>3.2 <i>Eisenia andrei</i> .....</b>	<b>16</b>
<b>3.3 O uso de agrotóxicos.....</b>	<b>19</b>
<b>3.4 Calda Bordalesa .....</b>	<b>20</b>
<b>4 Metodologia .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1 Obtenção, criação e manutenção dos organismos em laboratório .....</b>	<b>23</b>
<b>4.1.1 Substrato artificial para testes .....</b>	<b>24</b>
<b>4.2 Recipientes para testes.....</b>	<b>24</b>
<b>4.3 Bioensaios com minhocas <i>E. andrei</i>.....</b>	<b>25</b>
<b>4.3.1 Ensaio preliminar: Teste agudo com papel filtro.....</b>	<b>25</b>
<b>4.3.2 Teste de evitamento (fuga) .....</b>	<b>25</b>
<b>4.3.3 Teste de toxicidade aguda (mortalidade) .....</b>	<b>26</b>
<b>4.3.4 Teste crônico (reprodução) .....</b>	<b>27</b>
<b>4.3.5 Avaliação histológica.....</b>	<b>28</b>

**5 Resultados e Discussão .....29**

**5.1 Teste agudo com papel filtro.....29**

**5.2 Teste de Evitamento.....31**

**5.3 Teste agudo .....32**

**5.4 Teste crônico (reprodução).....34**

**6 Conclusões .....38**

**Referências .....39**

## 1 Introdução

O processo produtivo agrícola sofre pressão da sociedade em prol de uma produção de alimentos de forma sustentável e sem agrotóxicos (STADINIK; TALAMINI, 2004). Por esta razão, existe uma busca contínua por alternativas que sejam capazes de auxiliar no controle de doenças, mas que não representem risco ao homem e ao meio ambiente. Seguindo a tendência da aplicação de fungicidas menos tóxicos, destaca-se a calda bordalesa. Segundo Galli et al. (1968), a calda é obtida pela mistura de sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) com cal virgem ou hidratada ( $\text{CaO}$ ), que reagindo com água, produz sulfato de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ) e hidróxido cúprico ( $\text{Cu}(\text{OH})_2$ ). Ela foi descrita pela primeira vez em 1882, na França, na região de Bordeaux, para o controle de doenças em videira. Possivelmente foi descoberta acidentalmente, devido às observações dos agricultores, que costumavam pulverizar suas videiras com água de cal para o controle de doenças. Foi constatado que o controle era mais eficiente quando a água de cal era preparada em vasilhas de cobre.

A calda bordalesa é um insumo utilizado em hortas e pomares orgânicos e seus defensores alegam que seus componentes são pouco tóxicos e ainda auxiliam no desempenho nutricional da planta (FELIX, 2005). Ela tem função de controle de **várias** doenças causadas por fungos em diversas culturas, também tem efeito secundário contra bacterioses e efeito repelente contra alguns insetos (MOTTA, 2008). Apesar de ser aceita na agricultura orgânica, é muito questionada sobre o impacto do acúmulo de cobre (Cu) no ambiente, pois, o uso indiscriminado destes tipos de insumo pode afetar negativamente a biota do solo, como por exemplo, as minhocas (EDWARDS; BOHLEN, 1996).

Buscando-se maneiras de entender como e qual o grau de toxicidade e danos causados nos organismos, recorre-se a ecotoxicologia, que estuda os efeitos de substâncias químicas tóxicas nos organismos, baseando-se em bioindicadores (dentre os quais se incluem as minhocas). Estes constituem a macrofauna, ou seja, os invertebrados com diâmetro corporal acima de 2mm (EDWARDS, 2004). Por sua grande importância no solo, alta sensibilidade a compostos químicos, ampla

distribuição, fácil colonização de áreas compostas por quantidades elevadas de matéria orgânica e capacidade de adaptação a diferentes temperaturas, as minhocas, principalmente as espécies *Eisenia fetida* Savigny, 1826 e *E. andrei* Bouché, 1972, foram escolhidas para diversos testes de toxicidade para fins de registro de agrotóxicos junto aos órgãos regulamentadores de diversos países, inclusive do Brasil (EDWARDS; ARANCON, 2004; ANDRÉA, 2010).

Trabalhos sobre efeitos dos agrotóxicos em minhocas são realizados, na sua maioria, sobre informações anatômicas, ecológicas e reprodutivas. Contudo, danos estruturais podem passar despercebidos em experimentos de rotina. A fim de minimizar esta possibilidade, é importante também que métodos sensíveis sejam usados, o que irá permitir a demonstração dos efeitos de produtos químicos no nível histológico dos indivíduos, pois os métodos histológicos podem fornecer dados úteis sobre o tecido antes da manifestação anatômica externa do dano (HINTON et al., 1973). Por serem vitais em oligoquetas, o tecido epitelial de revestimento intestinal e o tecido cloragógeno foram escolhidos para as avaliações histológicas, pois se considera que alterações geradas por estresse devem afetar primeiramente estes tecidos. Reitera-se esta escolha porque o tecido epitelial é o primeiro a entrar em contato com o material ingerido pelo organismo e o tecido cloragógeno exerce intensa atividade metabólica, absorção, transformação e mobilização de fontes de energia. (LAVERACK, 1963 apud VOGEL, J; SEIFERT, G, 1992).

## 2 Objetivos

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos da calda bordalesa sobre a mortalidade, preferência de substrato, densidade populacional e variações histológicas intestinais em *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta).

### 2.2 Objetivos específicos

- Identificar a taxa de mortalidade de *E. andrei* submetidas a diferentes concentrações de calda bordalesa;
- Determinar a concentração letal de calda bordalesa para 50% (CL50) dos indivíduos de *E. andrei*;
- Verificar a taxa de fuga de indivíduos em diferentes concentrações da calda bordalesa;
- Observar as possíveis variações nos tecidos epitelial de revestimento do intestino e cloragógeno.

### 3 Revisão de Literatura

#### 3.1 Características de Oligoquetas

Acredita-se que no mundo existam mais de 8 mil espécies diferentes de minhocas. No Brasil, são conhecidas entre 240 e 260 espécies, sendo que a maioria é composta de minhocas nativas (SCHIEDECK; GONÇALVES; SCHWENGBER, 2006). As minhocas foram classificadas em dez famílias dentro das quais, quatro possuem maior representatividade em relação ao número de espécies: Glossoscolecidae, Lumbricidae, Megascolecidae e Moniligastridae. Elas são cavadoras e encontradas em todos os ambientes terrícolas, exceto desertos. Vivem, em sua maioria, em ambientes onde há disponibilidade de matéria orgânica, ou pelo menos uma camada de húmus na superfície (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005).

Em 1881, Charles Darwin já havia relatado, que as atividades das minhocas têm efeito benéfico no solo. As galerias formadas por sua movimentação aumentam a drenagem e a aeração do solo e, ainda mais importante, promovem a mistura e o revolvimento deste. Reiterando a sua importância na formação do solo, Ingham (2006) registra algumas de suas funções:

[...] decomposição de resíduos de plantas e ciclagem de nutrientes da matéria orgânica; na formação do húmus e de agregados de solo, onde a atividade biológica é mais intensa; no melhoramento da estrutura, fertilidade, porosidade e capacidade de infiltração, drenagem e retenção de água, ar e também no transporte de microrganismos e nutrientes do solo por meio dos canais formados por sua escavação e seus deslocamentos no solo (INGHAM, 2006).

Em seu processo de digestão, as minhocas ajudam na formação do húmus e na fertilidade do solo e “também atuam no controle de patógenos que podem ser inibidos por produtos de seu metabolismo ou servir de alimentos, e ainda, na degradação de poluentes” (INGHAM, 2006).



### 3.2 *E. andrei* e estudos relacionados

Classifica-se taxonomicamente a espécie *E. andrei* da seguinte forma:

Reino: Animalia

Filo: Annelida

Classe: Clitellata

Ordem: Oligochaeta

Família: Lumbricidae

Gênero: *Eisenia*

Esta espécie apresenta corpo uniformemente avermelhado com listras pouco aparentes entre os segmentos. Sims; Gerard (1999), informam que o corpo de um espécime adulto pode variar entre 3 e 6mm de diâmetro e entre 60 a 120mm de comprimento. Segundo Dominguez (2004), a expectativa de vida desta espécie varia entre 4-5 anos em cativeiro, mas em condições naturais, pode ser alterada, devido a um grande número de parasitas e predadores.

*E. andrei* atinge a maturidade sexual entre 21-28 dias. A cópula ocorre próxima à superfície do alimento e a postura do primeiro casulo ocorre cerca de 48h após. Cada indivíduo produz entre 0,35 a 0,5 casulos por dia, sendo o tempo de incubação até o início da eclosão variável entre 18 e 26 dias. A taxa de viabilidade de eclosão oscila ao redor de 72% e 82%, sendo o número de descendentes estimado entre 2,5 e 3,8 por casulo, variando conforme a temperatura (DOMÍNGUEZ; EDWARDS, 2010).

A Fig. 1 demonstra um corte histológico de *E. andrei*, onde o celoma (C), tipo de cavidade corporal, surge durante o desenvolvimento embrionário, como uma cavidade dentro da mesoderme. O celoma é responsável por realizar a maior parte das funções de transporte de gases e materiais nutritivos. Ainda, fornece fluido para processar detritos excretorios, funciona também, como esqueleto hidrostático (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005).

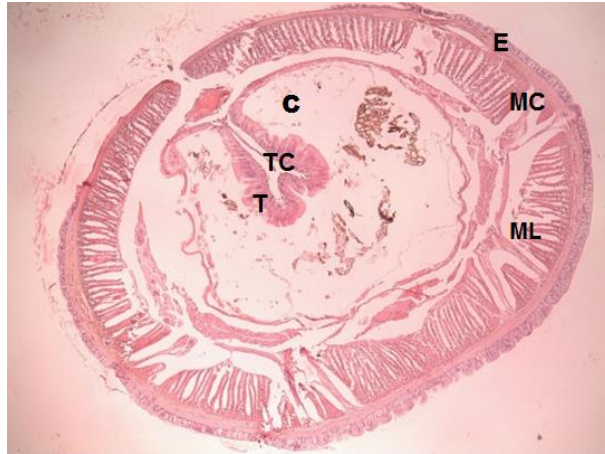


Figura 1 - Corte histológico de *E. andrei*. C = Celoma, E= Epiderme, MC= Musculatura circular, ML Musculatura Longitudinal), T= Tiflossole e TC = Tecido cloragógeno. Pelotas, 2012.

Fonte: Dr<sup>a</sup> Marla Piumbini Rocha.

Na sua histologia, segundo Selladurai (2012), a camada epidérmica (E), contém vários tipos de células, entre elas as de revestimento e as glandulares, ela é revestida por uma fina cutícula (Fig. 2). Músculos circulares (Mc) são bem desenvolvidos, ela também apresenta músculos longitudinais (ML). Os septos que dividem o celoma são relativamente completos.

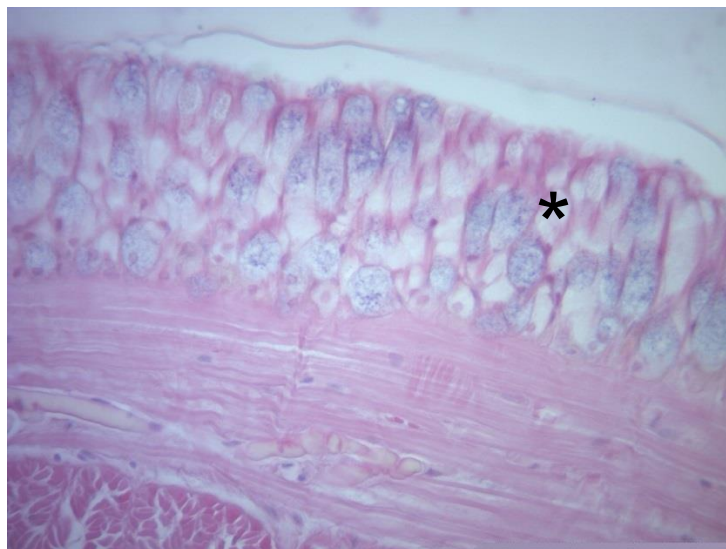


Figura 2 - Epiderme com células glandulares(\*). Pelotas, 2013

Fonte: Acervo da autora

Conforme Ruppert, Fox e Barnes (2005), o trato digestório de oligoquetas é reto e relativamente simples, onde:

O intestino ciliado forma o restante do trato digestivo e se estende como um tubo reto por todo o corpo, exceto o quarto anterior. A metade anterior do intestino é o principal local de secreção de enzimas e digestão e a metade posterior é primariamente para absorção. Além dos tipos comuns de enzimas digestivas, o epitélio intestinal das minhocas também secreta celulose (para digerir a parede celular das plantas) e quitinase (para digerir a parede celular de fungos). Os materiais alimentares absorvidos são passados para os seios sanguíneos que ficam entre o epitélio do trato digestivo e os músculos intestinais. A superfície do intestino é aumentada em muitas minhocas, por uma crista ou dobra, chamada tiflossole (T), que se projeta para o lúmen do intestino a partir da parede mediana dorsal. Além de seu papel no preparo para absorver nutrientes favorecido pela presença das microvilosidades, o intestino é a primeira linha de defesa contra químicos, através de via oral. O sistema circulatório está intimamente associado ao trato intestinal (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005, p. 536).

Ao redor do intestino e revestindo o vaso dorsal de Oligoqueta há uma camada de células mesoteliais amareladas denominadas células cloragógenas. O tecido cloragógeno (TC) desempenha papel vital no metabolismo intermediário, semelhante àquele do fígado em vertebrados, bem como é o principal centro de síntese de glicogênio e lipídeos (ROOTS, 1960). Exerce ainda várias funções, incluindo nutrição, excreção, bem como a produção citotóxica e moléculas antibacterianas (VALEMBOIS et al., 1985; DALES; KALAC, 1992). A síntese de hemoglobina, catabolismo de proteínas e formação de amônia e a síntese de uréia também ocorrem neste tecido (ROOTS, 1960). Ainda atua no armazenamento e desintoxicação, apresentando grânulos citoplasmáticos denominados de cloragossomos que acumulam grandes quantidades de cálcio, zinco, fósforo, cloro, potássio, enxofre e ferro. Estes elementos são liberados em fluidos do corpo para aumentar a osmorregulação durante o estresse (FISCHER; MOLNAR, 1992).

Alguns estudos já foram realizados com o objetivo de demonstrar as alterações do epitélio de revestimento do intestino de minhocas, assim como no tecido cloragógeno. Morowati (2000) em estudo histoquímico e histopatológico do intestino da minhoca *Pheretima elongata* exposto a uma dose de campo do herbicida

glifosato, demonstrou que o mesmo pode provocar a morte celular e interferir com a atividade da esterase não específica da mucosa epitelial do intestino, causando a morte de pelo menos 50% da população.

A espessura radial do tecido cloragógeno de *Lumbricus terrestris* que habitam solos vulcânicos ativos foi comparada com as espécies que vivem em solos vulcânicos inativos por Amaral et al. (2006), onde determinaram que a biodisponibilidade dos metais (Cd e Zn) é maior em área vulcânica ativa, forçando os indivíduos que vivem nesta área a adaptar a morfometria de alguns tecidos, como o cloragógeno, que se verificou mais espesso.

Gobi e Gunasekaran (2010) em teste agudo (mortalidade) com *E. fetida* verificaram efeitos do herbicida butaclor® no intestino, principalmente no epitélio, onde se as vilosidades se fundiram e ocorreu o aumento das células glandulares. Também ocorreu a redução de biomassa dos indivíduos e do número de casulos.

Sharma e Satyanarayan (2011) avaliaram metais pesados em *Eudrillus eugenia* e verificaram que cobre e chumbo causaram efeitos mais deletérios na cabeça, moela e intestino. O cromo causou dano celular na região intestinal e o zinco não mostrou efeito deletério sobre os tecidos.

### 3.3 O uso de agrotóxicos

De acordo com BRASIL, Lei 7.802/ 89 (1990), os agrotóxicos são definidos como:

[...] 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 (BRASIL, 1990. Art. 2).

A classificação dos agrotóxicos, por finalidade de uso, é definida pelo poder de ação do ingrediente ativo sobre organismos-alvo, como: inseticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas, reguladores e inibidores de crescimento, etc.

Compostos orgânicos de uso e fórmula variada, pelo conjunto de seus efeitos no meio ambiente e na saúde humana, foram agrupados sob a sigla POPs (Poluentes Orgânicos Persistentes). Estes são causadores de danos ambientais mesmo em baixas concentrações (BERNES, 2005). A sua estabilidade, e, portanto persistência, faz com que seus efeitos perdurem e possam ser largamente dispersos antes de se decomporem; bioacumulem, devido a sua solubilidade em gorduras favorecendo sua acumulação nos tecidos e; biomagnifiquem, pela capacidade de aumentar sua concentração na direção do topo da cadeia alimentar (WANIA; MACKAY, 1997).

Embora a indústria de agrotóxicos tenha surgido após a Primeira Guerra Mundial, seu uso foi difundido nos Estados Unidos e na Europa após a Segunda Guerra Mundial, e no Brasil durante o período que ficou conhecido como a *modernização da agricultura nacional*, situado entre 1945 e 1985. Foi também neste período, notadamente após 1975, que se efetivou a instalação da indústria de agrotóxicos no país, conformada pelas principais empresas fabricantes destes produtos em nível mundial (TERRA, 2008).

Entre as décadas de 1960 e 1970 efetivava-se a Revolução Verde, programa com o propósito de aumentar a produção agrícola através do desenvolvimento de pesquisas em sementes, fertilização do solo e utilização de máquinas no campo que aumentassem a produtividade (PRIMAVESI, 1997). Esta disseminação de produtos agrotóxicos preocupou ambientalistas e cientistas e gerou um crescente fluxo de estudos sobre os seus efeitos nocivos.

Buscando maneiras mais sustentáveis, a agricultura orgânica contrapõe-se ao uso abusivo de insumos agrícolas industrializados, dissipando o conhecimento tradicional, sob novas bases tecnológicas (ASSIS; ROMEIRO, 2002).

### 3.4 Calda Bordalesa

A aplicação de calda bordalesa é muito utilizada em viticultura e é feita há muitos anos, sendo uma das principais práticas fitossanitárias adotadas neste cultivo; apesar de ser aceita pela corrente orgânica, esta prática está se constituindo num problema ambiental, contaminando o solo e a água, pois contém cobre, que é um metal pesado. No solo, o teor total de cobre varia de 2 a 100mg kg<sup>-1</sup> (PINTA, 1975). No Brasil, em áreas cultivadas em videira, na serra gaúcha, são feitas

aproximadamente dez aplicações de calda bordalesa por ano, que aportam ao vinhedo entre 30 e 65kg ha<sup>-1</sup> ano de cobre (NOGUEIROL; NACHTIGALL; ALLEONI, 2005).

A quantidade máxima a ser aplicada: é de 6kg de cobre/ha/ano. É um fungicida de uso proibido em pós-colheita e necessita de autorização pela OAC instituição que avalia, verifica e atesta que produtos ou estabelecimentos produtores ou comerciais atendem ao disposto no regulamento da produção orgânica podendo ser uma certificadora ou OPAC (BRASIL, 2011).

Grande parte do cobre adicionado anualmente nas folhas das videiras atinge o solo e permanece complexado na camada superficial ligado principalmente à matéria orgânica (FLORES-VELEZ et al., 1996), podendo ser extremamente prejudicial aos organismos que ali vivem.

### 3.5 Testes utilizando minhocas como bioindicadores

Os testes de toxicidade podem ser classificados de acordo com o tempo de exposição (agudo ou crônico), o modo de ação (mortalidade, crescimento ou reprodução) ou o efeito de resposta (letal ou sub-letal) (KAPANEN; ITAVÄÄRA, 2001).

O comportamento de fuga (efeito sub-letal) de minhocas pelo teste de evitamento tem sido indicado como um dos testes requeridos para o registro de comercialização de agrotóxicos na Europa e nos Estados Unidos. As principais vantagens de se utilizar o comportamento de fuga para avaliar riscos ecológicos são a curta duração do teste (48h), quando comparado a testes crônico de reprodução que são efetuados durante oito semanas (OECD, 2004); e o fato deste teste ser menos trabalhoso, pois não há necessidade de se efetuar a contagem de indivíduos juvenis (AMORIM; RÖMBKE; SOARES, 2005).

Existe uma quantidade considerável de resultados obtidos em estudos de fuga de minhocas a contaminantes. Citando-se Lukkari e Haimi (2005), que estudaram a rejeição de três espécies de minhocas (*Aporrectodea tuberculata*, *Lumbricus rubellus* e *Dendrobaena octaedra*) a solos naturais contaminados com os metais Cu e Zn e verificaram que as três espécies de minhoca evitaram claramente os solos contaminados com estes elementos.

O comportamento de fuga de minhocas *E. andrei* já foi verificado para solos tratados com sulfato de cobre nas concentrações de 40, 80, 160 e 320mg/kg de solo, e demonstrou que houve diferenças significativas pelo teste de tukey entre 320mg/kg e todas as outras concentrações testadas e também entre 40 e 160mg/kg. (LOUREIRO; SOARES; NOGUEIRA, 2005).

Amostras de áreas contaminadas com diferentes concentrações de hidrocarbonetos provindas de uma garagem de ônibus foram analisadas por meio do teste de evitamento. Os resultados mostraram que 96% dos organismos fugiram da seção que continha a amostra contaminada (SISINNO et al., 2006).

Stefani (2009) estudou o comportamento de fuga de minhocas *E. andrei* a solos tratados com um fungicida sintético (clorotalonil) e com a fração metanólica de extrato de *Polymnia sonchifolia* (planta com atividade antifúngica) e verificou que apenas o clorotalonil provocou a rejeição das minhocas.

Ramos et al. (2007), trabalhando com teste agudo sobre os efeitos letais dos solos em três áreas contaminadas com mercúrio, observaram que apesar de não ter registrado morte das minhocas durante o experimento, houve mudança de coloração do corpo, o que indica um possível efeito subletal.

Marion (2011) em teste agudo, estudou solos coletados na área de cultivo olerícola convencional e de bases ecológicas e demonstrou que o uso de agrotóxicos no sistema de produção olerícola convencional, causou toxicidade no solo, causando mortalidade dos indivíduos expostos.

Cantelli (2011) em estudo agudo de dois agrotóxicos, Carbendazim e Carbofurano percebeu que *E. andrei* sobreviveu no tratamento controle e mostrou sensibilidade aos agrotóxicos, o que possibilitou a determinação de CL50 de 8,67mg kg<sup>-1</sup> e 4,27mg kg<sup>-1</sup> de solo, respectivamente, para ambos agrotóxicos, em solo natural.

A influência dos compostos na reprodução das minhocas, que é avaliada pela progênie, isto é, pela contagem de indivíduos juvenis no solo, também é de extrema importância, neste sentido, Lukkari et al. (2005), em teste crônico, determinaram que a presença dos metais Cu e Zn exerce efeito sobre a reprodução da minhoca *Aporrectodea nocturna*, pois ocorreu inibição na produção de casulos e a diminuição da biomassa das minhocas.

## 4 Metodologia

### 4.1 Obtenção, criação e manutenção dos organismos em laboratório

O estudo foi realizado na Embrapa Clima Temperado, Estação Experimental Cascata (EEC) e no Departamento de Morfologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas.

A escolha do organismo teste, sua manutenção em laboratório e exigências para a sua utilização nos testes foi baseada nas recomendações dos protocolos OECD (1984; 2004); ISO (1993; 1998); CETESB (1990); ABNT (2007) e em GARCIA (2004).

Minhocas da espécie *E. andrei* foram obtidas do minhocário experimental da unidade EEC, sendo todos os indivíduos adultos (clitelados). Estes foram mantidos no Laboratório da Casa da Minhoca na EEC, acomodados em caixa de plástico resistente, com substrato de pó de fibra de coco e esterco bovino (50:50 v/v)(Fig.3), com pH neutro.



Figura 3 - Criação de *E. andrei* em laboratório. Pelotas, 2013.

Fonte: Acervo da autora.

O esterco foi seco ao sol, processado em um triturador e peneirado para obtenção de partículas menores. A umidade foi ajustada e monitorada semanalmente de forma empírica, apertando-se o substrato e verificando se a



água não escorreria entre os dedos. Também foi adicionado esterco para suprir a alimentação das minhocas. A criação foi mantida a  $20 \pm 2^{\circ}$  C. Antes de serem submetidos aos ensaios, os organismos foram aclimatados aos substratos-teste (solo artificial tropical) com antecedência de 24h.

#### 4.1.1 Substrato artificial para testes

Para a realização dos testes toxicológicos com a minhoca *E. andrei*, foi utilizado um substrato artificial preparado em laboratório. Umedecido com água destilada, foi utilizado como controle ou para aclimação dos organismos 24h antes de serem introduzidos nos substratos a serem avaliados.

Segundo o protocolo nº. 207 (1984) e o protocolo nº. 222 (2004), ambos da OECD, a norma ISO 11268-1 (1993), ISO 11268-2 (1998), ISO 17512-1 (2007) e a norma da ABNT NBR 15537 (2007), o solo artificial deve ser constituído por 70% de areia industrial, 20% Caulin PA (Labsynth) e 10% de matéria orgânica, os quais devem ser totalmente misturados. Como matéria orgânica foi utilizada pó fibra de coco (Amafibra)(GARCIA, 2004).

O pH do substrato foi verificado em 5,7 e como estava dentro dos parâmetros das normas ( $6,0 \pm 0,5$ ) não precisou ser corrigido. A umidade foi ajustada também de forma empírica, já que a indicação de 40% a 60% da capacidade de retenção do substrato exigida pela norma não se mostrou viável para a sobrevivência dos organismos.

#### 4.2 Recipientes para testes

Os recipientes utilizados nos testes foram de plástico, retangulares, com tampa perfurada para permitir a entrada de ar e ao mesmo tempo retardar o ressecamento (Fig. 4).



Figura 4 - Recipientes para testes. Pelotas, 2013.

Fonte: Acervo da autora.

### 4.3 Bioensaios com minhocas *E. andrei*

#### 4.3.1 Ensaio preliminar: teste agudo com papel filtro

O teste toxicológico agudo foi realizado baseado na norma da OECD 207/1984, no qual se utiliza como substrato o papel filtro embebido da substância a ser testada. Para o ensaio foram selecionadas minhocas adultas, criadas e mantidas em esterco de gado de procedência de sistema de produção orgânica.

As minhocas foram lavadas e acondicionadas em um recipiente forrado com papel filtro para a limpeza do conteúdo intestinal por um período de 3h. Em caixas Gerbox, também forradas com papel filtro, foram adicionados 2,5mL de solução teste. Após a secagem da substância, cerca de 1h, foram adicionados 1,5mL de água destilada por amostra e em seguida, adicionada uma minhoca por recipiente, tampado, em seguida, com filme plástico perfurado. A substância teste utilizada foi a calda bordalesa, adquirida comercialmente (Bordatec). Dilui-se 5g de Bordatec em 100mL de água destilada e se prosseguiu a diluição de forma logarítmica (5%, 0,5%, 0,05%, 0,005%, 0,0005% e controle ou 0%), com 10 repetições por concentração.

O teste foi mantido em estufa B.O.D no escuro e com temperatura de  $20 \pm 2^\circ$  C. A primeira verificação se realizou quando completadas 48h e foram analisados os efeitos e o número de letalidade. Após mais 24h, quando totalizou 72h, foi feita uma segunda verificação e o teste foi encerrado.

A  $CL_{50}$ , concentração capaz de matar 50% dos animais avaliados no ensaio, para ambos os períodos, foi determinada por meio do método estatístico *Trimmed Spearman-Kärber* (HAMILTON; RUSSO; THURTON, 1977) *Program Version 1.5*.

#### 4.3.2 Teste de evitamento (fuga)

O teste de fuga foi realizado tendo como base a norma ISO 17512-1 (2007). O teste teve como principal objetivo avaliar o comportamento de fuga das minhocas, para isto, elas foram expostas simultaneamente a uma amostra de substrato teste e uma amostra de substrato controle.

Os tratamentos foram preparados pela diluição inicial de 20g de calda bordalesa comercial com 25% de Cu em 500mL de água destilada, seguidas de

mais quatro diluições seriadas. Dessa forma, foram obtidas as seguintes concentrações (%): 4; 0,4; 0,04; 0,004 e 0,0004.

Os substratos testes foram umedecidos com 84mL das respectivas concentrações da calda bordalesa, enquanto no substrato controle foi aplicado apenas água destilada. Em seguida, 500g de substrato teste e 500g de substrato controle foram colocados em lados opostos de um recipiente plástico e separados por um divisor na região central. Ao se retirar o divisor formou-se uma linha neutra, conforme a (Fig. 5), na qual foram adicionadas 10 minhocas adultas. O teste teve duração de 48 h e o ambiente foi mantido à temperatura de  $20 \pm 2$  °C. As minhocas não receberam alimentação durante o teste.



Figura 5 - Teste de evitamento com minhocas. Pelotas, 2013.

Fonte: Acervo da autora.

Foi utilizado o delineamento experimental completamente casualizado, com cinco repetições. A resposta de evitamento às diferentes concentrações foi obtida através da fórmula (ISO, 2007):  $RL = [(C - T) / 10] \times 100\%$ , onde RL é a resposta líquida; C, a soma de minhocas observadas no controle; T, a soma de minhocas observadas no solo tratado; e 10, o número total de minhocas por repetição. Uma RL positiva significa evitamento e uma RL negativa significa "não resposta" ou "atração" pela substância química testada. A significância dos resultados foi obtida pelo Teste Exato de Fisher ( $p < 0,05$ ).

#### 4.3.3 Teste de toxicidade aguda (mortalidade)

Os testes de toxicidade aguda seguiram as recomendações da norma ISO 11268-1 (1993). Nos recipientes sugeridos anteriormente foram adicionados 1,5kg de

substrato seco e 252mL da solução foram utilizados para umedecer o solo-teste, onde foi diluído em escala logarítmica 80g de Bordatec® em 2L de água destilada. Em cada recipiente foram adicionados 10 minhocas, todas adultas, as quais foram previamente aclimatadas, no mínimo 24h antes, em substrato artificial (SAT) produzido em laboratório, conforme recomendação das normas anteriormente citadas. Foram feitas cinco réplicas para cada concentração de calda bordalesa.

A mortalidade das minhocas foi avaliada após 7 e 14 dias, retirando-as do meio de teste e testando suas reações com pinça à estímulos mecânicos na parte frontal. Os ensaios foram realizados sob temperatura de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$ .

Para os testes de toxicidade aguda, não havendo diferença estatisticamente significativa na mortalidade em relação ao controle, o resultado é "não tóxico", e havendo diferença significativa o resultado deve ser "tóxico" (ABNT, 2007). Também foi comparada a perda de peso na primeira semana e após 14 dias transcorridos do início da análise. As minhocas não receberam alimentação neste período.

#### 4.3.4 Teste crônico (reprodução)

Os testes de reprodução, devido à otimização de trabalho e tempo, foi uma continuação do ensaio agudo, baseado na norma ISO 11268-2 (1998), e no protocolo nº 222 da OECD (2004). A montagem do teste e as condições de manutenção se mantiveram as mesmas do teste de toxicidade aguda, diferindo na suplementação alimentar adicional de 15g de esterco umedecido com 15mL de água destilada, semanalmente. Os recipientes também foram pesados semanalmente, adicionando-se água em quantidade correspondente a diferença de peso.

Após 28 dias do início do teste, os indivíduos adultos foram retirados manualmente dos potes, verificando-se a ocorrência de mudanças morfológicas (afilamento e descoloração da parte posterior, estrangulamentos em diferentes regiões do corpo, fragmentação e perda de segmentos) e comportamentais (letargia ou lentidão a estímulos mecânicos). Passando-se mais 28 dias, os indivíduos juvenis também foram retirados dos potes através do método de extração por aquecimento em banho-maria<sup>1</sup> (GARCIA, 2004) seguido pela

---

<sup>1</sup> Os recipientes entraram em contato com água à  $60^\circ\text{C}$ , até os juvenis subirem à superfície.

seleção manual e contagem dos indivíduos em cada pote. Os testes de toxicidade crônica compararam o número de juvenis.

#### 4.3.5 Avaliação histológica

A avaliação histológica foi realizada utilizando-se as minhocas adultas após 28 dias de exposição aos tratamentos do teste de reprodução. Foram selecionadas três minhocas de cada concentração. Estas foram identificadas e fixadas em formol 10% por um período de 24h. Logo após, o material foi cortado transversalmente aproximadamente no 28° segmento e a peça foi colocada em frasco contendo álcool 70%, 80% e 90% por 40 minutos cada uma. A seguir as peças levaram três banhos de 40min de álcool absoluto e também de xilol e foram colocadas em cassete histológico de plástico e banhadas em parafina, mantidas em estufa, para o processo de inclusão. Depois de parafinado o material foi cortado em micrótomo a 0,7 $\mu$ m, colocado em lâminas e levado à estufa. Em seguida se fez o processo de coloração com Hematoxilina e Eosina e a montagem da lâmina.

Para a análise histológica, foram visualizadas e fotografadas três lâminas por concentração. Foi medido o comprimento do tecido cloragógeno e epitélio de revestimento do intestino através do software Image Pro-Plus®. Foram feitas três medidas por fotografia para a região do tiflossole e três para uma região próxima ao tiflossole, tanto para o epitélio intestinal quanto para as células cloragógenas.

## 5 Resultados e Discussão

### 5.1 Teste agudo com papel filtro.

O teste agudo com papel filtro avalia a exposição via dermal dos organismos. Na contagem dos indivíduos mortos em 48h (tab.1), observa-se uma relação diretamente proporcional entre as concentrações de calda bordalesa com a letalidade dos organismos, exceto para a concentração de 0,05%, onde não obteve efeito. Nas concentrações de calda bordalesa 0,005, 0,5 e 5% observaram-se alterações na morfologia das minhocas, tais como constrições, partição, mudança de coloração e afilamento do corpo, conforme a (Fig. 6). As minhocas que sobreviveram nestas condições nas 48h morreram quando completadas 72h. Tais observações também foram verificadas por Martins (2008), que avaliou a exposição das minhocas em papel filtro com a adição do inseticida Aldicarbe.

A  $CL_{50}$ , concentração capaz de matar 50% dos animais avaliados no ensaio, para ambos os períodos foi de 0,2% de calda bordalesa em 48h e 0,09% para 72h.

Tabela 1 – Teste agudo em papel filtro. Pelotas, 2013.

Concentrações	N° de minhocas mortas	
	48h	72h
Controle	0	0
0,0005%	0	2
0,005%	2	3
0,05%	0	2
0,5%	7	9
5%	10	10



Figura 6 – Mortalidade e deformidades de *E. andrei* em 5% (A), 0,5% (B e C) e 0,005% (D) de calda bordalesa. Pelotas, 2013.

Fonte: Acervo da autora

A fig.7 representa graficamente os resultados de mortalidade de *E. andrei* em 48h e 72h, baseando-se nos resultados, se determinou as doses utilizadas em testes com SAT.

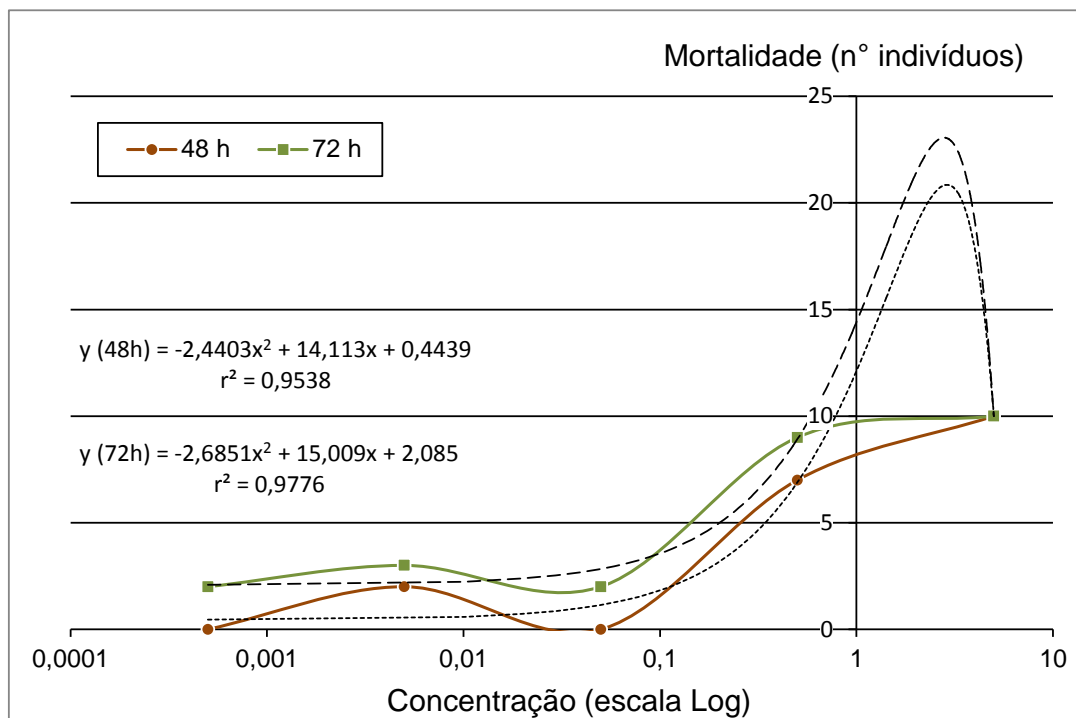


Figura 7 – Número de indivíduos de *E. andrei* mortos por concentração de calda bordalesa em escala logarítmica. Pelotas, 2013.

Sendo assim, determinou-se para os testes com solo artificial, concentrações de calda bordalesa entre 4% (porcentagem que provavelmente afeta as minhocas e concentração máxima utilizada por agricultores) e 0,0004%.

Testes agudos de contato dérmico, como o que utiliza o papel filtro, são eficientes e rápidos para a avaliação de um contaminante em minhocas, porém, os organismos bioindicadores são expostos de maneira mais agressiva, pois entram em contato direto com o contaminante a ser avaliado. Portanto, testes agudos com solos são mais indicados por apresentarem melhores respostas (MUNIZ, 2006).

## 5.2 Teste de Evitamento (Fuga)

As concentrações de 4, 0,4 e 0,04% de calda bordalesa produziram respostas significativas de evitamento das minhocas pelo teste de Fischer, ao contrário das concentrações de 0,004 e 0,0004% (Fig. 8).

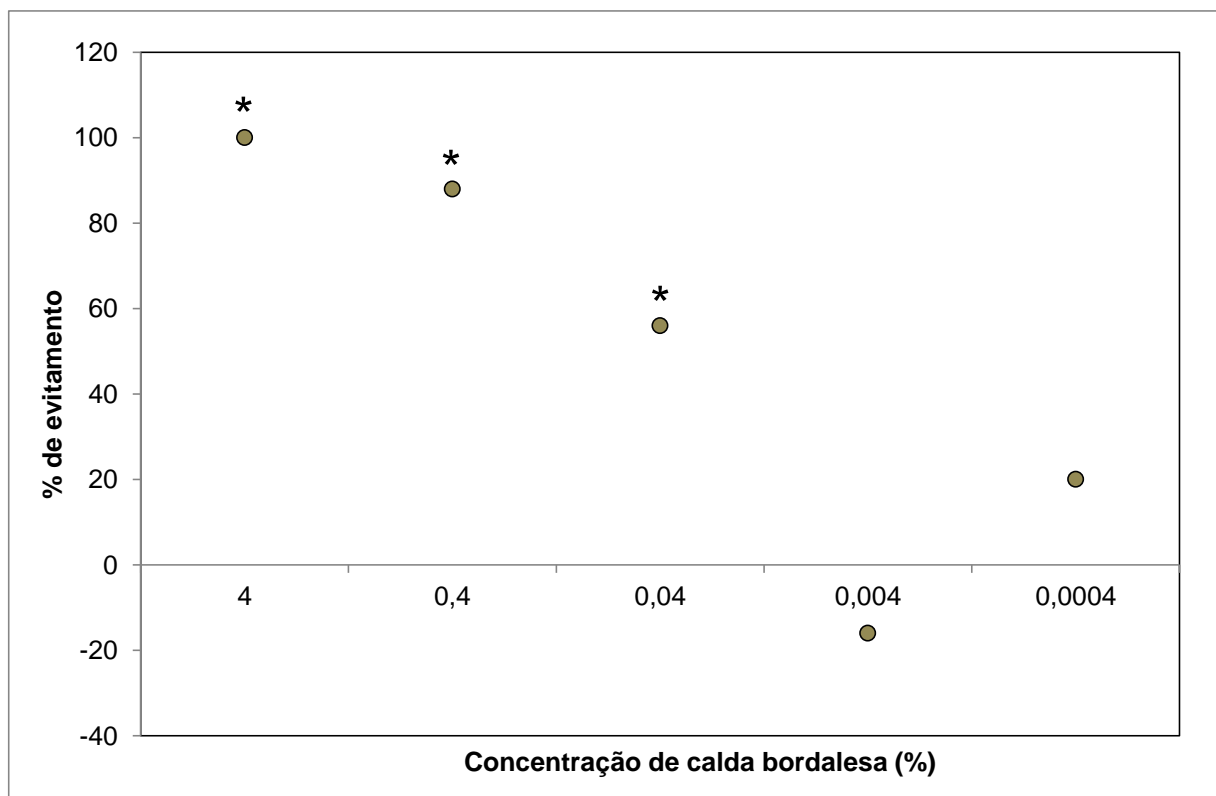


Figura 8 - Resposta de evitamento de *E. andrei* a SAT tratado com diferentes concentrações de calda bordalesa. Pelotas, 2013.

\* efeito significativo



O teste de duplo controle se mostrou dentro dos padrões da norma com intervalos de distribuição de 40 a 60%. Quando a porcentagem de animais vivos no solo contaminado for inferior a 20%, considera-se que houve efeito no comportamento dos animais testados e assim o solo é considerado como tóxico ou com baixa qualidade (função de habitat limitada) (ISO, 2007).

Doses mais elevadas de calda bordalesa demonstraram maior evitamento, pois de acordo com REINECKE et al. (2002), as minhocas apresentam alta sensibilidade a produtos químicos devido a quimiorreceptores nos segmentos anteriores, tornando-as bons bioindicadores ecotoxicológicos.

De forma geral, as aplicações de calda bordalesa pelos agricultores variam a concentração de cobre entre 4% e 0,25%, conforme a espécie tratada e a época do ano (SCHWENGBER; SHIEDECK; GONÇALVES, 2007). Pelos resultados obtidos, a concentração de cobre a partir da qual não houve resposta de rejeição das minhocas foi equivalente à concentração de 0,004% de calda bordalesa, ou seja, bastante inferior à menor concentração recomendada de aplicação.

Mesmo não apresentando resultados significativos em concentrações mais baixas, Buratini e Brandelli (2006) e Andréa (2008) verificaram que as minhocas podem bioacumular resíduos de agrotóxicos. Esse processo inclui a absorção a partir de todas as vias de exposição (ingestão, contato dérmico) dos compostos ou poluentes presentes nos compartimentos ambientais em que foram introduzidos (água, sedimento, outros organismos) (SOUSA, 2010). Assim pesquisas sobre efeitos de agrotóxicos, sejam eles sintéticos ou de fontes minerais ou biológicas, também devem ser realizados no intuito de avaliar possíveis efeitos sobre a mortalidade, crescimento e reprodução.

### 5.3 Teste de toxicidade aguda (Mortalidade)

Neste ensaio não ocorreu mortalidade, como também não houve alterações comportamentais e morfológicas dos indivíduos. No entanto, a ausência de efeitos letais não descarta a possibilidade dos organismos estarem submetidos a uma situação de estresse. PIETZ et al. (1984) e Kruse & Barret (1985) detectaram em distintos biomonitoramentos, elevadas concentrações de zinco, Cobre, chumbo e Cádmio em oligoquetas presentes em solos acrescidos de lodo de esgoto, sugerindo

possíveis efeitos subletais (mudanças citogenéticas e fisiológicas) nos organismos estudados.

No ensaio, avaliou-se somente a biomassa dos organismos, percebe-se redução da biomassa, tanto da total, quanto da individual em todos os tratamentos. A tab. 2 apresenta valores em gramas da biomassa total e individual de minhocas para os tratamentos testados.

Tabela 2 – Biomassa de minhocas no Teste Agudo

Tratamentos	Biomassa total (g) <sup>ns</sup>			Biomassa individual (g) <sup>ns</sup>		
	Inicial	7 dias	14 dias	inicial	7 dias	14 dias
Controle	6,44	6,32	5,32	0,64	0,63	0,56
0,4%	6,22	6,10	5,20	0,62	0,61	0,52
0,04%	5,92	5,68	4,80	0,59	0,56	0,51
0,004%	5,86	5,40	4,80	0,58	0,56	0,50
0,0004%	6,16	5,34	4,90	0,61	0,54	0,52
P valor	0,6009	0,2629	0,6253	0,6009	0,3229	0,3252
CV %	10,28	13,99	13,23	10,28	12,11	9,19

ns – não significativo pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

A Fig. 9 apresenta a perda de peso (g) ao decorrer dos 14 dias.

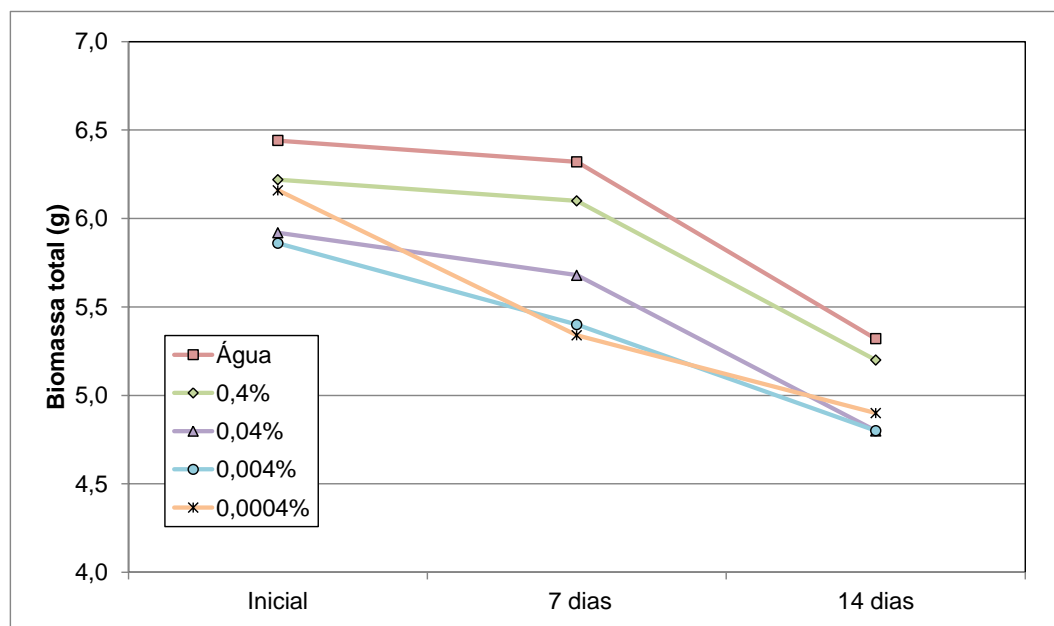


Figura 9 - Biomassa de minhocas no teste agudo. Pelotas, 2013.

A análise de variância que comparou os tratamentos demonstrou que não houve diferença estatística significativa ( $p>0,05$ ) entre as biomassas.

#### 5.4 Teste crônico (reprodução).

A tab.3 apresenta a média dos indivíduos juvenis (unidades) de *E. andrei* por tratamento. Pelo teste de reprodução realizado, observa-se que a presença de calda bordalesa não afetou a reprodução dos organismos. Em testes similares, Alves (2010) estudou os inseticidas Fipronil, Thiameroxam e os fungidas Captan + Thiran, sobre *E. andrei*, e os agrotóxicos foram tóxicos, porém em concentrações superiores às recomendadas.

Tabela 3 – Número médio de juvenis de *E. andrei*, teste de reprodução. Pelotas, 2013.

Tratamento	Média
Controle	102.2
0,4	104.0
0,04	104.2
0,004	107.8
0,0004	116.2

## 5.5 Histologia

A Fig 10 demonstra as regiões utilizadas para a análise.

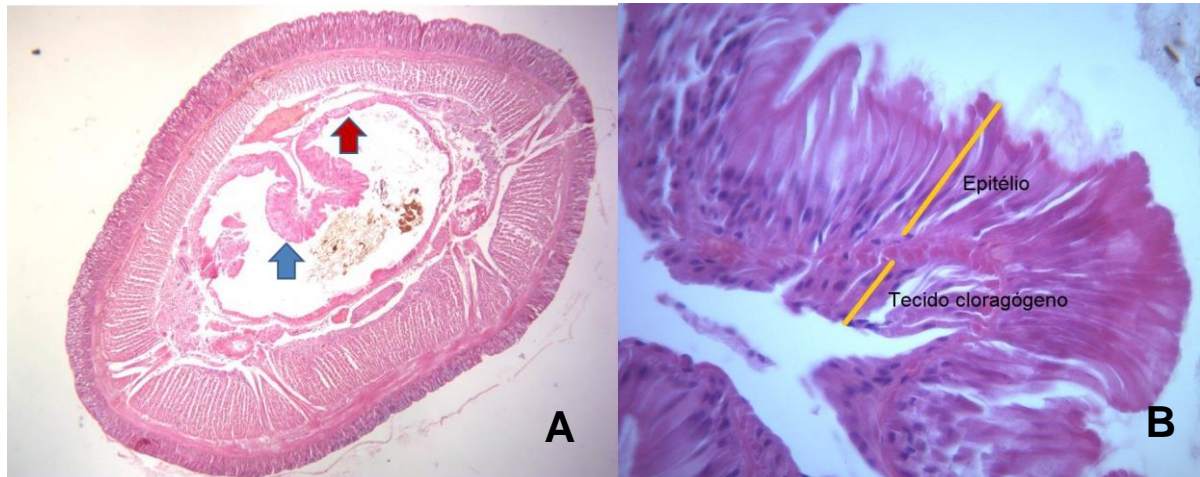


Figura 10 – Corte histológico *E. andrei*. A - região do tiffosole (seta azul) e continuação do tiffosole (seta vermelha) em aumento de 100x. B – região do tiffosole em aumento de 400x em M.O, demonstrando os tecidos a serem mensurados. Pelotas, 2013.

Fonte: Acervo da autora.

Cada tecido foi comparado entre si. As tab. 4 e 5 apresentam as médias dos comprimentos dos tecidos submetidos à análises pelas concentrações testadas pelo teste de Kruskal - Wallis.

Tabela 4 – Médias dos comprimentos ( $\mu\text{m}$ ) dos tecidos na região do tiffosole. Pelotas, 2013.

Tratamento	Epitélio	Tecido cloragógeno
Controle	4.080759 a	3.768837 a
0,4	4.955679 a	3.783509 a
0,04	6.957966 b	1.363483 b
0,004	5.640227 ab	1.845449 ab
0,0004	4.632774 a	1.722547 ab
P valor	0.0003	0.004

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Kruskal - Wallis.

Tabela 5 – Médias dos comprimentos ( $\mu\text{m}$ ) dos tecidos na região de continuação do tiflosole. Pelotas, 2013.

Tratamento	Epitélio	Tecido Cloragógeno
Controle	5.418660 a	3.365231 a
0,4	2.394445 b	2.775463 a
0,04	3.570575 a b	4.538005 a
0,004	4.197567 a b	5.339181 a
0,0004	2.098271 b	2.973362 a
P valor	0.0005	0.700

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Kruskal – Wallis

Pelo teste de Kruskal – Wallis, o epitélio de ambas as regiões tiveram alterações significativas quanto ao comprimento, corroborando com GUIZARDI et al. (2010) que registraram alterações na espessura da parede intestinal em minhocas submetidas à solos acrescidos de resíduos de marmorarias. Porém tais observações só foram possíveis, nos grupos tratados com a dose mais elevada do resíduo (70%).

Comparando a maior concentração testada (0,4%) de calda bordalesa com o tratamento controle, observou-se que no epitélio da região de continuação do tiflosole o tratamento de maior concentração de calda bordalesa diferiu do controle, já na região do tiflosole, o tratamento controle não diferiu do tratamento 0,4%. As medidas do tecido cloragógeno na maior concentração também não diferiram do tratamento controle para ambas as regiões estudadas.

Em estudos desta magnitude, Muthukaruppan e Gunasekaran (2010) avaliaram minhocas expostas a esterco contendo doses do herbicida Butachlor. A estrutura da camada epitelial foi grosseiramente destruída, aumentando e fundindo as vilosidades. Foram encontrados restos celulares originados pela ruptura celular por necrose. Ocorreu a expressão de núcleos picnóticos e o tecido cloragógeno foi destruído com pouca inclusão de reserva.

Morowati (2000) em estudo com o glifosato observou que algumas minhocas *Pheretima elongata* que sobreviveram à exposição do herbicida, regeneraram suas células da mucosa intestinal e na quarta semana de exposição, o revestimento epitelial recuperou características e arquitetura, sugerindo o alto poder regenerativo das minhocas.

Quatro semanas também foi o tempo em que as minhocas do estudo em questão permaneceram em contato com a calda bordalesa antes das análises histológicas. Isto significa, que para as avaliações histológicas, o tempo de exposição é fator que deve ser reavaliado.

Reiterando, testes apresentados com SAT são úteis na avaliação da contaminação do solo, porém, ainda recebem algumas críticas pela forma que são executados, no que se refere ao solo artificial e condições, já que não refletem a realidade à campo. Outro ponto a ser observado, é que os testes são conduzidos com espécies padrão (*E. foetida* ou *E. andrei*) e muitos estudos ainda às confundem devido a grande semelhança entre as mesmas (ANDRÉA, 2010; BROWN, DOMÍNGUEZ, 2010). Estas espécies não são nativas e vivem em ambientes com grandes quantidades de matéria orgânica de origem animal ou vegetal e não sobrevivem à solos tropicais. Porém, mesmo *E. andrei* não sendo nativa, os resultados obtidos pelos testes aqui abordados servem de indicação, pois Buch, Sauter e Brown (2010) realizaram estudos com minhocas nativas em testes ecotoxicológicos e perceberam que a *Pontoscolex corethrurus* teve sensibilidade similar à espécie padrão na maioria dos testes ecotoxicológicos agudos e comportamentais avaliados.

Cong et al. (2010 apud HAMMAD; GÜRKAN, 2012) concluíram que fungicidas não apresentaram toxicidade significativa para as minhocas, quando aplicados apenas uma vez, mas os seus efeitos tóxicos aumentaram com a frequência de aplicação.

Assim, a partir deste trabalho, pretende-se ampliar os estudos com o produto abordado e também com outros insumos orgânicos, servindo de subsídio para a aplicação controlada pelos produtores agrícolas de base ecológica, conhecimento para possível regulamentação ou retirada destes insumos do mercado pelos órgãos competentes, como também proporcionar maior avaliação dos impactos ambientais.

## 6 Conclusões

- A calda bordalesa, mesmo sendo um produto utilizado em sistemas de produção agrícola de base ecológica, possui potencial de produzir impacto ambiental devido ao cobre ser um metal pesado;
- Fica evidente que minhocas são importantes bioindicadores acerca de testes ecotoxicológicos;
- O contato dérmico direto em papel filtro com a calda bordalesa causou mortalidade dos organismos em concentrações mais elevadas; A CL50 em 48h foi de 0,2% e em 72h de 0,09%;
- Quando existe a possibilidade de escolha de substrato, as minhocas evitam o solo tratado com a calda bordalesa;
- A dose mais elevada testada em SAT não provoca efeito de mortalidade como tampouco redução de biomassa significativa em *E. andrei*;
- Estudos agudos com doses mais elevadas são necessários para a determinação da CL50;
- A calda bordalesa nas concentrações testadas não afetou a reprodução de *E. andrei*;
- Ocorreram variações significativas no comprimento dos tecidos epitelial de ambas as regiões estudadas, como também para o tecido cloragógeno na região do tiflossole. Já o tecido cloragógeno na região de continuação do tiflossole não apresentou diferença estatística;
- A maioria dos ensaios demonstrou que a calda bordalesa, nestas condições pode ser utilizada sem causar maiores danos aos organismos, no entanto este é apenas o início de um estudo para subsidiar pesquisas futuras, portanto ajustes de metodologia e análises são requeridos.

## Referências

- ALVES, Paulo Roger Lopes. **Avaliação ecotoxicológica de agrotóxicos em Eisenia andrei (Oligochaeta) e Folsomia cándida (Collembola)**. 2010. 134f. Dissertação (Programa de Pós- graduação em Agronomia) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina.
- AMARAL, A.; SOTO, M.; CUNHA, R; MARIGÓMEZ, I ; RODRIGUES, A. Bioavailability and cellular effects of metals on Lumbricus terrestris inhabiting volcanic soils. **Environmental Pollution**. n. 142 p. 103-108, 2006.
- AMORIM, M. J. B; RÖMBKE, J.; SOARES, A. M. V. M. Avoidance behaviour of *Enchytraeus albidus*: Effects of benomyl, carbendazim, phenmedipham and different soil types. **Chemosphere**, v. 59, p. 501–510, 2005.
- ANDRÉA, M. M. O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos **Acta Zoológica Mexicana** (nueva serie), Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, México. n. 2, p. 95-107, 2010.
- ANDRÉA, Mara Mercedes de. Bioindicadores ecotoxicológicos de agrotóxicos. Instituto Biológico [internet]. Disponível em: [http://www.biologico.sp.gov.br/artigos\\_ok.php?id\\_artigo=83](http://www.biologico.sp.gov.br/artigos_ok.php?id_artigo=83). 2008. Acesso em: 22 jun. 2012.
- ASSIS, R.; ROMEIRO, A. Agroecologia e agricultura orgânica: controvérsias e tendências. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, n. 6, p. 67-80, 2002.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. Norma Brasileira. **Ecotoxicologia terrestre - Ecotoxicidade aguda - Método de ensaio com minhocas**. ABNT NBR 15537: 2007. 11 p.
- BERNES, Claes. The Swedish Enviromental Protection Agency. In: Persistent Organic Pollutants. Disponível em: <[www.internat.environ.se/documents/pollutants/orggift/organe.html](http://www.internat.environ.se/documents/pollutants/orggift/organe.html)>. Acesso em 21 jun 2012.
- BRASIL. Lei n. 7802. 11 jul.1989: *Lei dos agrotóxicos*. Brasília: IBAMA, 1990.
- BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Instrução normativa nº 46, de 6 de outubro de 2011. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Desenvolvimento\\_Sustentavel/Organicos/Produtos%20Fitossanit%C3%A1rios/Home/IN\\_46\\_Prod\\_Animal\\_e\\_Vegetal\\_Organic\\_a-revoga\\_IN\\_64.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Desenvolvimento_Sustentavel/Organicos/Produtos%20Fitossanit%C3%A1rios/Home/IN_46_Prod_Animal_e_Vegetal_Organic_a-revoga_IN_64.pdf)>. Acesso em 8 dez, 2013.



BROWN, G .G; DOMÍNGUEZ, J. Uso das minhocas como bioindicadoras ambientais: Princípios e Práticas- O 3º Encontro Latino Americano de Ecologia e Taxonomia de Oligoquetas (ELAETAO3). **Acta Zoológica Mexicana** (n. s) n. Especial 2. p. 1-18, 2010.

BUCH, A. C.; SAUTER. K. D. ; BROWN G.G. Minhocas nativas em testes ecotoxicológicos. In: 4º Encontro Latino-Americano de Ecologia e Taxonomia de Oligoquetas. Curitiba, Brasil, 2010.

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

CANTELLI, Katy Boniza. **Toxicidade aguda de carbofurano e carbendazim a minhocas em solo natural**. 2011. 43f. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) Departamento de Solos e Engenharia Agrícola, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. **Solo: teste de toxicidade com *Eisenia foetida* (minhoca): método de ensaio**. Norma Técnica L6.401. São Paulo: Cetesb. 13p. 1990.

DALES, R. P; KALAC, Y. Phagocytic defence by the earthworm *Eisenia foetida* against certain pathogenic bacteria. **Biochem Physiol**, p. 487-490, 1992.

DARWIN, C. R. **The Formation of Vegetable Mould through the Action of Worms with Observations on their Habits**. London: John Murray.1881.

DOMÍNGUEZ, J.2004. **State of the art and new perspectives on vermicomposting research**.In: EDWARDS, C. (Ed.). *Earthworm ecology*, 2 Ed. Boca Raton: CRC Press, 2004. p. 401-424.

DOMÍNGUEZ, J.; EDWARDS, C.A. **Biology and ecology of earthworm species used for vermicomposting**. In: EDWARDS, C.A.; ARANCON, N.Q.; SHERMAN, R. (Ed.) *Vermiculture technology*. Boca Raton: CRC Press, 2010. p.27-40.

EDWARDS, C.A.; BOHLEN, P.J. **Biology and ecology of earthworms**. 3.ed. London: Chapman & Hall, 1996. 426p.

EDWARDS, C. A.; ARANCON, N. Q. **The use of earthworms in the breakdown of organic wastes to produce vermicomposts and animal feed protein**. In: EDWARDS, C. A. *Earthworm ecology*. 2. ed. Florida: CRC Press, 2004. p. 345-379.

EDWARDS, C.A. **The importance of earthworms as key representatives of the soil fauna**. In: EDWARDS, C. A. (Ed). *Earthworm ecology*.2. ed. Boca Raton, London, New York: CRC. Press, 2004. p. 213-239.

FELIX, Fabiana Ferreira. **Comportamento do cobre aplicado no solo por calda bordalesa**. 2005. 74f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade de São Paulo, São Paulo.

FISCHER, E.; MOLNAR, L. Environmental aspects of the chloragogenous tissue of earthworms. **Soil Biol Biochem.** v. 24, n. 12. p. 1723–1727. 1992,

FISCHER, E.; TROMBITAS, K. X-ray microprobe analysis of chloragosomes of untreated and of EDTA treated *Lumbricus terrestris* by using air dried smears. **Acta histochemica.** v. 66, p. 237–242. 1980.

FLORES-VELEZ, L. M; DUCAROIR, J; JAUNET, A. M; ROBERT, M. Study of the distribution of copper in an acid sandy vineyard soil by three different methods. **European Journal of Soil Science**, Oxon, v. 47, n. 4, p. 523-532, 1996.

GALLI, F.; TOKESHI, H.; CARVALHO, P. de C.T. de. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas e seu controle.** São Paulo: Agronômica Ceres, 1968. 640 p.

GARCIA, M. **Effects of pesticides on soil fauna: development of ecotoxicological test methods for tropical regions.** 2004. 291 f. Tese (Doutorado) – Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät, Universidade de Bonn. Bonn.

GOBI, M; GUNASEKARAN, P. Effect of Butachlor Herbicide on Earthworm *Eisenia fétida*-Its Histological Perspicuity. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2010. p. 1-4, 2010.

GUIZARDI, P. S.; SILVA, D.; NUNES, E. T.; PRADO, A. C. A.; FREITAS, E.; NEVES, M. A.; BRAGA, A. Resíduos de rochas ornamentais e suas implicações morfológicas no sistema digestório e na oviposição de minhocas *Eisenia foetida*. Disponível em: <[www.inicepg.univap.br/cd/INIC\\_2010/anais/.../0731\\_1032\\_01.pdf](http://www.inicepg.univap.br/cd/INIC_2010/anais/.../0731_1032_01.pdf)> Acesso em 6 abr 2013.

HAMMAD A. M. A.; GÜRKAN, M. O. Side effects of some crop protection products on non-target soil invertebrates. **Dergisi-Turkish Journal.** v.36, n.2, p. 169-176, 2012.

HAMILTON, M.A. RUSSO, R.C.; THURTON, R.V. Trimed Spearman - Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, New York, v. 11, n. 7, p. 714-719, 1977.

HINTON, D.E., KENDALL, M.W. AND SILVER, B.B. Use of histological and histochemical assessment in the prognosis of the effects of aquatic pollutants. In *Biological methods for assessment of water quality* \_Cairns, J., Jr. and Dickson, K.L., eds. **American Society for Testing and Materials**, Special technical publication 528, p. 194-208, 1973.

INGHAM, E. R. 2006. The soil biology primer. Disponível em: <[http://soils.usda.gov/sqi/concepts/soil\\_biology/fw&soilhealth.html](http://soils.usda.gov/sqi/concepts/soil_biology/fw&soilhealth.html)> Acesso em: 20 jun 12.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11268-1. **Soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using soil substrate.** Genebra: ISO. 1993.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO-17512: **Soil Quality e Avoidance test for evaluating the quality of soils and the toxicity of chemicals. Test with earthworms (*Eisenia fetida/andrei*).** Genebra. 1996.

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

INTERNACIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO/FDIS 17512-1:2007: Soil quality – Avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals on behaviour – Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*),** Geneva, 2007.

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

KRUSE, E. A. & BARRET, G. W. Effects of Municipal Sludge and Fertilizer on Heavy Metal Accumulation in Earthworms. **Environmental Pollution**, v.38, p. 235-244, 1985.

LOUREIRO, S.; SOARES, A. M. V. M.; NOGUEIRA, A. J. A. Terrestrial avoidance behaviour tests as screening toll to assess soil contamination. **Environmental Pollution**, v. 138, p. 121- 131, 2005.

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

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

MARTINS, Matheus Eduardo. **Aplicação de bioensaios de toxicidade para avaliação da eficiência do reator anaeróbio horizontal de Leito fixo (RAHLF) na detoxificação do Aldicarbe.** 2008. 57f. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

MARION, Luís Fernando. **Avaliação da qualidade do solo em propriedades agrícolas familiares em sistema de cultivo convencional e de bases ecológicas, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil.** 2011. 83f. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul.

MORGAN, A. J. A morphological and electron microprobe study of the inorganic composition of the mineralized secretory product of the calciferous gland and chloragogenous tissue of the earthworm, *Lumbricus terrestris* L. **Cell and Tissue Research**. v. 220, p. 829–844. 1981.

MORGAN, A. J.; WINTERS, C. The elemental composition of the chloragosomes of two earthworm species *Lumbricus terrestris* and *Allolobophora longa* determined by electron probe X-ray microanalysis of freeze-dried cryosection. **Histochemistry**, v. 73, p. 589–598. 1982.

MOROWATI, M. Histochemical and histopathological study of the intestine of the earthworm (*Pheretima elongata*) exposed to a field dose of the herbicide glyphosate. **The Environmentalist**, v.20, p. 105-111, 2000.

MOTTA, Ivo de Sá. *Calda Bordalesa: utilidades e preparo*. Disponível em: <<http://www.cpao.embrapa.br/publicacoes/online/zip/FOL200837.pdf>>. Acesso em: 23 jan. 2013.

MUNIZ, Karen. Bioensaio de toxicidade aguda com o oligoqueta *Eisenia foetida* utilizando o Cromo (VI) como substância-teste. Disponível em: <[http://www.cetem.gov.br/publicacao/serie\\_anais\\_XIV\\_jiv\\_2006/Karen%20Muniz.pdf](http://www.cetem.gov.br/publicacao/serie_anais_XIV_jiv_2006/Karen%20Muniz.pdf)>. Acesso em: 18 mai 2013.

MUTHUKARUPPAN, G.; JANARDHANAN, S.; VIJAYALAKSHMI, G. S. Sublethal Toxicity of the Herbicide Butachlor on the Earthworm *Perionyx sansibaricus* and its Histological Changes. **JSS – J Soils & Sediments**. v. 2. p. 82-86. 2005.

NOGUEIROL, Roberta Corrêa.; NACHTIGALL, Gilmar Ribeiro.; ALLEONI, Luís Reynaldo Ferracciú. Distribuição dos teores de cobre em profundidade em diferentes tipos de solos com vinhedos no Rio Grande do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 30. 2005, Anais do Congresso Brasileiro de Ciência do solo. 2005. Recife.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD Nº 207**. Earthworm, Acute Toxicity Tests. 1984. 9p.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **OECD Nº 222**. Guideline for the testing of chemicals. Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida*/ *Eisenia andre*). 2004. 18p.

PIETZ, R.I.; PETERSON, J.R.; PRATER, J.E. & ZENZ, D.R. Metal Concentrations in Earthworms From Sewage Sludge-Amended Soils at a Strip Mine Reclamation Site. *Journal of Environmental Quality*, v. 13, p.651-654, 1984

PINTA, M. **Atomic absorption spectrometry**. London : Adam Hilger, 1975. 730p.

PRIMAVESI, A. **A agroecologia, ecosfera, tecnosfera e agricultura**. São Paulo: Nobel, 1997. 199p.

PRENTO, P. Metals and phosphate in the chloragosomes of *Lumbricus terrestris*

and their possible physiological significance. **Cell and Tissue Research**. v. 196, p. 123–124. 1979.

RAMOS, A; EGLER, S; CESAR, R. G; RODRIGUES, A. C; XAVIER, J. L. C; CASTILHOS, Z.C. Testes de ecotoxicidade utilizando minhocas da espécie *Eisenia foetida* para avaliação da contaminação mercurial em solos. **XI Congresso Brasileiro de Geoquímica**. Centro de Tecnologia Mineral, Laboratório de Ecotoxicologia CETEM/MCT – Rio de Janeiro: 2007.

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

ROOTS, B. I. Some observations on the chloragogenous tissue of earthworms. **Biochem. Physiol**. v. 1, p. 218-226, 1960.

RUPPERT, Edward. E.; FOX, Richard. S.; BARNES, Robert. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 7. ed. São Paulo: Roca. 2005.

SELLADURAI, G. Histological studies of earthworms on the treatment of industrial sludge. 2012. <[http://www.shodhganga.inflibnet.ac.in/.../19\\_chapter%209.pdf](http://www.shodhganga.inflibnet.ac.in/.../19_chapter%209.pdf)> Acesso em 2 dez. 2013.1

SHARMA, V. J.; SATYANARAYAN, S. Effect of selected heavy metals on the histopathology of different tissues of earthworm *Eudrillus eugeniae*. **Environ Monit Assess**. v. 180, p. 257-267. 2011.

SCHIEDECK, Gustavo.; GONÇALVES, Márcio de Medeiros.; SCHWENGBER, José Ernani. **Minhocultura e produção de húmus para a agricultura familiar**. Embrapa Clima Temperado Circular Técnica 57. Pelotas Dezembro, 2006.

SCHWENGBER, José Ernani.; SHIEDECK, Gustavo.; GONÇALVES, Márcio de Medeiros. **Preparo e utilização de caldas nutricionais e protetoras de plantas**. Embrapa Clima Temperado, 1ª edição, 2007.

SIMS, R.W.; GERARD, B .M. **Earthworms**. London: The Linnean Society fo London. (Synopses of the British Fauna – New Series, 31) 1999. 169p.

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

SOUSA, Ana Paula Alves de. **Influência de três tipos de solos sobre o efeito do inseticida cipermetrina em minhocas *Eisenia andrei***. 2010. 70f. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio) – Instituto Biológico, São Paulo.

STADNIK M.J; TALAMINI, V. **Manejo Ecológico de Doenças de Plantas**. Florianópolis: UFSC, Centro de Ciências Agrárias, 2004. 293p.

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

TERRA, Fabiano Henrique Bittes. **A Indústria de Agrotóxicos no Brasil**. 2008. 156f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Econômico da Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

VALEMBOIS, P; LASSÈGUES, M; ROCH, P. H; VAILLIER, J. Scanning electron-microscopic study of the involvement of coelomic cells in earthworm antibacterial defense. **Cell Tissue**. n. 240, p. 479–484. 1985.

VOGEL, J.; SEIFERT, G. Histological Changes in the Chloragogen Tissue of the Earthworm *Eisenia fetida* after Administration of Sublethal Concentrations of Different Fluorides. **Journal of invertebrate pathology**. v. 60. p. 192-196. 1992.

WANIA, F. E MACKAY, D. **Global Distillation**, Our Planet, v. 8, n. 6. UNEP, Nairobi, 1997.