



O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solo por pesticida organofosforado

Márjori Brenda Leite Marques^(1*); Juliana Heloisa Pinê Américo-Pinheiro⁽²⁾; Claudinei da Cruz⁽³⁾; Camila Aparecida Faleiros⁽⁴⁾.

^(1,2) Universidade Estadual Paulista; Ilha Solteira, São Paulo, Brasil, 15358-000 (marjori_brenda@hotmail.com).

⁽²⁾ Universidade Brasil, São Paulo, São Paulo, Brasil, 08.230 – 030 (americo.ju@gmail.com).

^(3,4) Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos, Barretos, São Paulo, Brasil, 14781-000 (claudineicruz@gmail.com); (camilafaleiros97@hotmail.com).

RESUMO: O clorpirifós é um pesticida da classe dos organofosforados utilizado para controlar vários tipos de pragas em lavouras, inibindo a transmissão dos receptores do sistema nervoso de insetos e, conseqüentemente, afetando outros organismos constituintes da meso e microfauna terrestre. Objetivou-se avaliar o uso de minhocas como organismos bioindicadores de contaminação de solo pelo pesticida clorpirifós. As minhocas da espécie *Eisenia fetida* foram submetidas a um bioensaio de toxicidade aguda com duração de 14 dias. Para os testes definitivos, os organismos adultos (com presença de clitelo) foram expostos as concentrações de: 0,7; 1,05; 1,5; 2,0; 3,5; e 5,0 mg.kg⁻¹ de clorpirifós e um controle (ausência de clorpirifós) todos utilizando areia como substrato. Cada concentração foi formulada em 105 ml de água de acordo com o cálculo teste de saturação de água em areia seca. O valor da concentração letal para 50% dos organismos (CL50) foi calculado pelo método estatístico Trimmed Spearman – Karber. Por meio do valor da CL50, classificou-se a toxicidade do clorpirifós para a espécie testada de acordo com as categorias ecotoxicológicas. O valor calculado para CL50 foi de 2,40 mg.kg⁻¹ classificando o produto como moderadamente tóxico para os organismos teste. A *Eisenia fetida* mostrou-se como um indicador sensível para avaliação da toxicidade do pesticida organofosforado clorpirifós em solo. Assim, devido à grande importância das funções biológicas da *E. fetida* para a mesofauna terrestre, o equilíbrio ecológico mantido por estes organismos torna-se ameaçado em solos contaminados por clorpirifós.

Palavras chave: areia, *Eisenia fetida*, toxicidade.

INTRODUÇÃO

O uso de pesticidas além de comprometer o meio ambiente, contribui com o empobrecimento do solo. Estudos mostram que a utilização de pesticidas reduz a eficiência da fixação de nitrogênio realizada por microrganismos, o que faz com que o uso de fertilizantes seja cada vez mais necessário (ANVISA, 2018).

Condições meteorológicas, composição das

populações de microrganismos no solo, presença ou ausência de plantas, localização do solo na topografia, e práticas de manejo dos solos podem também afetar o destino de pesticidas no ambiente. Além disso, a taxa e a quantidade de água movendo na superfície e através do perfil do solo têm um grande impacto no movimento do agrotóxico (EMBRAPA, 2018).

O clorpirifós (O,O-dietil-O-3,5,6-tricloropiridin-2-piridinilfosforato) é um dos pesticidas organofosforados de amplo espectro mais utilizados (FLASKOS, 2012). Os organofosforados intoxicam desde insetos à mamíferos principalmente pela fosforilação da enzima acetilcolinesterase (AChE) nas terminações nervosas. A enzima é crítica para o controle normal da transmissão do impulso nervoso das fibras nervosas para as células musculares e glandulares, e também para outras células nervosas nos gânglios automáticos e no cérebro (CHEREMISINOFF; KING, 1994).

Dentre os animais que vivem no solo, as minhocas são um dos mais importantes por serem consideradas engenheiras do ecossistema e realizarem vários serviços ambientais, incluindo o controle biológico, a decomposição da matéria orgânica, a ciclagem de nutrientes, a formação e a agregação do solo, fatores estes que afetam geralmente de forma positiva o crescimento das plantas (BROWN; DOMÍNGUEZ, 2010).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso de minhocas como organismos bioindicadores de contaminação de solo pelo pesticida organofosforado clorpirifós.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios de toxicidade foram realizados conforme as normas da ABNT NBR 15537 de 2014, para Ecotoxicologia terrestre – Toxicidade aguda – Método de ensaio com minhocas (Lumbricidae).

No ensaio para avaliação da toxicidade aguda do clorpirifós para a minhoca da espécie *Eisenia fetida*, foi utilizada a formulação comercial Capataz® BR, (480 g.L⁻¹) registrada no ministério

da Agricultura, Pecuária e Abastecimento sob o número 01512 para controle de pragas da parte aérea.

Considerado como acaricida e inseticida de contato do grupo químico dos organofosforados, o clorpirifós é classificado como extremamente tóxico (classe I) e altamente perigoso ao meio ambiente (classe I) (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2018).

O clorpirifós apresenta uma massa molecular de 350,58 g.mol⁻¹ e solubilidade moderada de 1,05 mg.L⁻¹ em água a 20 °C (PPDB, 2018).

Volume de aplicação

Para quantificar o volume de aplicação para cada concentração desejada, realizou um teste de saturação na areia. Pesou-se 500 g de areia seca colocando em um vaso com furos em sua base. Preencheu-se uma proveta de 500 ml com água e foi adicionando aos poucos a água no vaso com areia, atentando-se no momento do vazamento de água pela parte de baixo do vaso. A quantidade de água suficiente para saturação de 500g de areia foi de 150 ml de água.

Tratamentos e amostragens

Para a realização dos ensaios foram utilizados exemplares adultos de minhocas da espécie *Eisenia fetida*, cultivadas na estufa em tanque abastecido com esterco bovino, coberto com material vegetal seco e aclimatadas em laboratório. As minhocas utilizadas possuíam idade superior a dois meses, apresentando clitelo.

O teste de sensibilidade foi realizado com a substância de referência cloroacetamida, de acordo com a norma ABNT NBR 15537:2014 (ABNT, 2014) a fim de avaliar a sanidade e sensibilidade das minhocas baseando-se na carta controle de cultivo da espécie.

Em seguida, testes preliminares com areia seca foram realizados com concentrações crescentes de clorpirifós, obtendo-se a menor concentração que provocou 100% de mortalidade e a maior que resultou 0% de mortalidade dos animais, bem como a faixa de concentração utilizada nos testes definitivos.

Para os testes definitivos, os organismos foram expostos às concentrações de: 0,7; 1,05; 1,5; 2,0; 3,5; e 5,0 mg.Kg⁻¹ de clorpirifós e um controle (ausência de clorpirifós) todos utilizando areia como substrato. Cada concentração foi formulada em 105mL de acordo com o cálculo teste de saturação de água em areia seca.

O ensaio foi realizado em laboratório com temperatura de 25 °C ± 2°C, com três repetições em recipientes de vidro cilíndrico, com duração de 14 dias. A letalidade foi registrada no sétimo dia e ao final do ensaio.

Utilizou-se 500g de areia fina obtida comercialmente. Posteriormente, foram adicionados cinco organismos vivos com peso médio de 7,45 g.

Análise estatística

A CL50 é a concentração de um agente no meio que causa mortalidade de cinquenta por cento (50%) da população exposta, durante um determinado período de tempo (CETESB, 2018).

A CL50 foi calculada pelo método estatístico *Trimmed Spearman – Karber*. Por meio do valor da CL50, classificou-se a toxicidade do produto para a espécie testada (Tabela 1), de acordo com as categorias ecotoxicológicas da USEPA (2017).

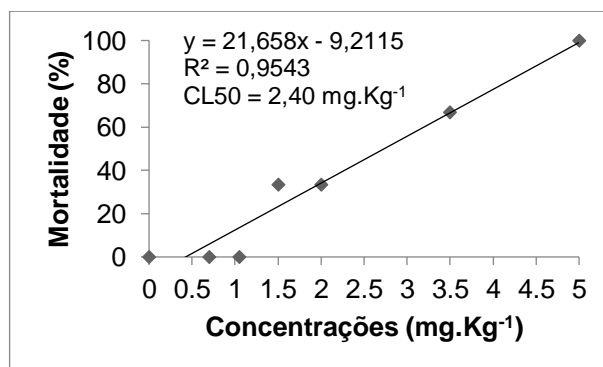
Tabela 1: Categorias para classificação ecotoxicológica dos valores de concentração letal 50% (CL50) para organismos não alvos segundo USEPA (2017).

CL50 (mg.Kg ⁻¹)	Categorias ecotoxicológicas
< 0,1	Extremamente tóxico
0,1 - 1,0	Muito tóxico
1 - 10	Moderadamente tóxico
10 – 100	Pouco tóxico
>100	Praticamente não tóxico

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A CL50 calculada no teste definitivo foi de 2,40 mg.Kg⁻¹ com limite inferior (LI) de 2,03 mg.Kg⁻¹ e limite superior (LS) de 2,85 mg.Kg⁻¹ (Figura 1).

Figura 1: Representação gráfica da porcentagem de mortalidade da minhoca *Eisenia fetida* em função das concentrações do inseticida clorpirifós no ensaio de toxicidade aguda.



De acordo com a classificação da USEPA (2017), quando se tem uma CL50 entre 1 e 10 mg.Kg⁻¹ a substância avaliada é classificada como moderadamente tóxica. Ressalta-se que não ocorreu mortalidade nos organismos do controle (areia sem clorpirifós).

Segundo De Lima et al (2018), testes com fungicidas realizados com *E. fetida* em concentrações inferiores ao permitido pela legislação, ocasionou



efeitos deletérios aos organismos, com uma faixa de mortalidade após 72h de aplicação.

Piola et al (2009), demonstrou dificuldade em analisar teste de fuga com minhocas da espécie *Eisenia andrei* em solos tratados com clorpirifós, por não apresentar resultados de fuga significativos.

Aamodt (2005), comparou a atividade da colinesterase (ChE) e quebras de fita de DNA entre grupos de minhocas das espécies *E. fetida* e *E. andrei* expostas à clorpirifós e chumbo. Não houve diferença significativa na atividade enzimática e nas fitas de DNA de ambas as espécies.

CONCLUSÃO

A *Eisenia fetida* mostrou-se como um indicador sensível para avaliação da toxicidade de pesticidas organofosforados. O produto foi considerado como moderadamente tóxico para a espécie testada.

Devido à grande importância das funções biológicas da *E. fetida* para a mesofauna terrestre, o equilíbrio ecológico mantido por estes organismos torna-se ameaçado implicando em prejuízos para o ecossistema terrestre e para a qualidade de solo com finalidade agrícola.

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa de mestrado concedida à primeira autora e a equipe LEEA pelo aprendizado e colaboração no laboratório

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAMODT, S. Effects of chlorpyrifos and lead (Pb) on the earthworm *Eisenia fetida*: a biomarker comparison and a characterisation of recovery. 2005. Tese (Mestrado em Biologia) – Instituto de Biologia, Universidade de Oslo, Oslo.

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 15537) 2014. Ecotoxicologia terrestre – Toxicidade aguda – Método de ensaio com minhocas (Lumbricidae). São Paulo. 17p.

ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA). Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/agrotoxicos>>. Acesso em 27 mar. 2018.

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, 2: 1-18, 2010.

CHEREMISINOFF, N. P., KING, J. A., Toxic properties of pesticides, Journal of contaminants hydrology, 18: 30-33, 1994.

CETESB (COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO). Informações ecotoxicológicas Disponível em: <http://sistemasinter.cetesb.sp.gov.br/produtos/ECO_HEL_P.htm>. Acesso em 30, set. 2018.

DE LIMA, F.M. Avaliação da toxicidade do fungicida pirimetanil, utilizando a espécie *Eisenia fetida* (oligochaeta: lumbricidae). Revista Brasileira Multidisciplinar, 21: 1-5, 2018.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA). Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_39_210200792814.html>. Acesso em 22, mar. 2018.

FLASKOS, J., The developmental neurotoxicity of organophosphorus insecticides: A direct role for the oxonmetabolites. Toxicology Letters, 209: 86-96, 2012.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/acesso-a-informacao/acoes-e-programas/cartas-de-servico/defesa-agropecuaria-agrotoxicos/agrotoxicos-registrados-no-agrofit>> Acesso em 28 set. 2018.

PIOLA, et al. Biomarcadores para a avaliação dos efeitos de clorpirifós em minhocas e em parâmetros funcionais do solo. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 44: 1-7, 2009.

PPDB (Pesticide Properties Data Base). Properties of chlorpyrifos. Disponível em: <<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/>> Acesso em 28 set. 2018.

USEPA (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). Technical Overview of ecological risk. Assessment – Analysis Phase: Ecological Effects characterization. Disponível em: <<https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/technical-overview-ecological-risk-assessment-0>> Acesso em 29 set. 2018.