

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Avaliação da toxicidade aguda dos fungicidas tebuconazol e trifloxistrobina,
isolados e em mistura, em minhocas da espécie *Eisenia fetida*

Júlia Dotoli Silva

Projeto de Trabalho de Conclusão de
Curso apresentado ao Departamento
de Ciências Biológicas como parte do
requisito de obtenção do título de
Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Professor Doutor
Valdemar Luiz Tornisielo.

**Piracicaba
Ano 2023**

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	3
2. OBJETIVOS	4
2.1. Objetivos Específicos	4
3. CRONOGRAMA	5
4. MATERIAL E MÉTODOS	5
4.1. Princípio do ensaio	5
4.2. Organismo teste e condições de cultivo	6
4.3. Seleção dos fungicidas	6
4.4. Equipamentos e materiais	6
4.5. Ensaio de aceitação ou rejeição de solo natural	7
4.6. Preparo da amostra	7
4.7. Ensaio preliminar	8
4.8. Ensaio Definitivo	8
4.9. Substância de referência	9
4.10. Validação do ensaio	9
5. ANÁLISE DOS RESULTADOS	9
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	10

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

No Brasil, o mercado de agrotóxicos expandiu muito nos últimos anos, em um ritmo acelerado (190%), colocando o país em primeiro lugar no ranking mundial desde o ano de 2008 (RIGOTTO *et al.*, 2014). Segundo o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA), A Lei Nº 7.802, de 11 de Julho de 1989, Art. 2º, define agrotóxico como um produto e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, que são destinados ao uso nos setores de produção de produtos agrícolas com a finalidade de preservar as culturas da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (BRASIL, 1989).

Os agrotóxicos englobam uma grande gama de substâncias químicas, que são classificadas de acordo com sua estrutura química, seus efeitos no ambiente, na saúde humana, no alvo, entre outros. A classificação quanto à periculosidade ambiental, realizada pelo IBAMA divide os agrotóxicos em classes que variam de I a IV: produtos altamente perigosos ao meio ambiente (Classe I); produtos muito perigosos ao meio ambiente (Classe II); produtos perigosos ao meio ambiente (Classe III); e produtos pouco perigosos ao meio ambiente (Classe IV) (PERES *et al.*, 2003).

Os agrotóxicos podem causar diversos danos à saúde e ao meio ambiente, dentre os impactos mais relevantes estão as poluições, contaminações e as intoxicações agudas e crônicas relacionadas à aplicação de agrotóxicos em diversas culturas. Além disso, podem causar alterações hormonais e reprodutivas, danos hepáticos e renais, disfunções imunológicas, distúrbios cognitivos e neuromotores e cânceres em seres humanos e desequilíbrio nos ecossistemas (CARNEIRO *et al.*, 2015)

No ambiente, o solo é o principal destino dos agrotóxicos. É um ecossistema complexo, o qual possui uma grande diversidade de organismos presentes que participam de processos diversos para a manutenção do meio ambiente. Os agrotóxicos podem ter diversos impactos sobre a população da fauna presente no solo (BELCHIOR *et al.*, 2014). Por isso, o estudo da toxicologia ambiental tem grande importância, pois estuda os efeitos adversos de diversas substâncias químicas em relação aos organismos vivos, visando o uso seguro de agrotóxicos. Os estudos de toxicidade são realizados a partir de

protocolos, utilizando organismos-teste padronizados, como no caso de uma avaliação do solo, onde as minhocas da espécie *Eisenia fetida* tem sido utilizada a fim de obter dados de como substâncias químicas se comportam no solo e na fauna que se apresenta (SISINNO; OLIVEIRA FILHO, 2021).

As minhocas desta espécie são preferidas como organismos-teste em ensaios ecotoxicológicos porque são comuns em muitos tipos de solos, são importantes representantes da fauna dos solos e por desempenhar atividades importantes dentro desse ecossistema, como o transporte de solo e a formação de galerias, favorecendo o aumento da porosidade do solo, a passagem de ar e nutrientes no mesmo, contribuindo com a qualidade do solo. Além disso, elas são muito sensíveis à substâncias químicas presentes no solo, devido a estruturas sensoriais na superfície de seu corpo (BIANCHI *et al.*, 2010). Dessa forma, se apresentam como uma boa alternativa na avaliação do impacto ambiental de agrotóxicos no solo.

2. OBJETIVOS

Determinar a toxicidade aguda dos fungicidas tebuconazol e trifloxistrobina, em ação individual e em mistura, para a espécie terrestre *Eisenia fetida* através do teste de toxicidade aguda (OECD,1984).

2.1. Objetivos Específicos

- Avaliar a toxicidade aguda dos ingredientes ativos Trifloxistrobina e Tebuconazol para a espécie terrestre *Eisenia fetida*;
- Determinar a CL50 da substância;
- Analisar o comportamento de *Eisenia fetida* quando expostos a diferentes concentrações deste composto.

3. CRONOGRAMA

Tabela 1. Cronograma de atividades que serão realizadas no período de 6 meses do projeto de pesquisa.

Atividades	1° mês	2° mês	3° mês	4° mês	5° mês	6° mês
Revisão de Literatura	X	X	X	X	X	X
Preparo do material e organismos		X				
Montagem do ensaio		X				
Ensaio Preliminar		X				
Monitoramento e avaliação		X				
Ensaio Definitivo		X	X			
Monitoramento e avaliação		X	X			
Análise de dados				X	X	
Escrita do TCC		X	X	X	X	X

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para avaliar a toxicidade aguda em *Eisenia fetida* nos ingredientes ativos selecionados, será utilizado o ensaio de toxicidade aguda padronizado 207 da Organization for Economic Co-operation and Development (OECD, 1984), que descreve a metodologia para determinação do efeito letal de substâncias contaminantes a oligoquetas, através da exposição de espécimes adultos a solos tratados com várias concentrações da substância alvo do estudo.

4.1. Princípio do ensaio

O princípio do ensaio de toxicidade aguda é manter indivíduos da espécie *Eisenia fetida*, todos adultos com clitelo e peso entre 300 mg a 600 mg, em substrato artificial contaminado com concentrações determinadas da substância estudada por um período de 14 dias.

Após o período de 7 e 14 dias do teste, a mortalidade dos organismos expostos é determinada. Outros parâmetros também podem ser avaliados, como alterações no peso corporal, alterações morfológicas e comportamentais.

Os resultados obtidos são comparados com os resultados do solo controle e utilizados para análise de dados.

O teste é conduzido em duas partes: uma preliminar e uma definitiva. No teste preliminar vai ser realizada a exposição e a avaliação da mortalidade nos sete dias de contato dos organismos com o solo-teste, além de indicar as concentrações de mortalidade total e ausência de mortalidade, determinando o intervalo de concentrações a serem utilizadas no teste definitivo. Já o teste definitivo determina as concentrações que causam entre 10% e 90% de mortalidade.

4.2. Organismo teste e condições de cultivo

O organismo teste recomendado para este ensaio consiste em minhocas adultas da espécie *Ensenia fetida*, com pelo menos 2 meses de idade, apresentando clitelo e pesando de 300 mg a 600 mg. Possui um ciclo de vida curto, eclodindo dos casulos entre 3 e 4 semanas e atingindo a maturidade em 7 a 8 semanas em aproximadamente 20°C, além de ser disponível comercialmente e poder ser criada facilmente em uma grande gama de orgânicos.

4.3. Seleção dos fungicidas

Serão utilizados os ingredientes ativos Tebuconazol e Trifloxistrobina.

4.4. Equipamentos e materiais

- Cultura de minhocas;

- Substrato para solo artificial: 10% de turfa de esfagno, 20% de argila de caulino e 70% de areia industrial. O ph deve ser ajustado para 6,0 por adição de carbonato de cálcio, os componentes secos todos misturados nas proporções corretas e o teor de umidade deve estar em cerca de 35% do peso seco;

- Recipientes de vidro de aproximadamente 1 litro, cobertos com tampas de vidro ou plástico perfuradas;
- Câmara iluminada com intensidade luminosa de 400 a 800 lux;
- Balança analítica e semi-analítica;
- Estufa de secagem;
- Luxímetro;
- Medidor de pH;
- Termômetros.

4.5. Ensaio de aceitação ou rejeição de solo natural

Para conduzir o teste em minhocas da espécie *E. fetida*, é necessário realizar um teste rápido de aceitação do solo artificial devido à baixa mortalidade máxima (10%) permitida. Serão colocadas 10 minhocas em um recipiente-teste com 500 g de solo artificial por 48 horas, para verificação de comportamento anormal ou rejeição do solo.

4.6. Preparo da amostra

No início do ensaio será efetuado o preparo da amostra a ser analisada, dissolvendo a quantidade necessária da substância-teste em metade do volume de água necessário para corrigir a umidade do solo para 40-60% da capacidade de retenção de água.

A solução da substância-teste será aplicada sobre o solo e misturada até completa homogeneização.

Se a substância-teste for insolúvel em água, deverá ser diluída em pequenas quantidades de algum solvente orgânico volátil (acetona ou hexano) e misturada à porção de areia correspondente ao solo artificial. É necessário deixar o solvente ser evaporado nos recipientes abertos por cerca de 1 hora, protegendo os organismos-teste de gases tóxicos resultantes da mistura entre soluto e solvente. Com isso, mistura-se os ingredientes constituintes do solo artificial e a substância-teste diluída e a umidade é ajustada para 40% - 60%.

4.7. Ensaio preliminar

O ensaio preliminar é realizado para estabelecer o intervalo de concentrações a ser utilizado no ensaio definitivo, com duração de 7 dias. Os recipientes são preparados com o substrato artificial em duplicatas para cada concentração e para o controle, este sem os contaminantes que serão avaliados, em cada recipiente serão colocados 10 organismos-teste. Serão utilizadas no mínimo cinco concentrações com um fator de progressão geométrica (0,1, 1, 10, 100 e 1.000), em miligramas da substância-teste para cada quilograma do substrato (matéria seca) (mg kg⁻¹) e o solo controle. Ao final do teste preliminar será determinada a menor concentração que causa 100% de letalidade e a maior concentração em que não se observa letalidade.

4.8. Ensaio Definitivo

O ensaio definitivo será realizado a partir dos resultados do teste preliminar. Serão avaliadas no mínimo cinco concentrações da substância-teste, em progressão geométrica entre a maior concentração que não causou letalidade e a menor concentração que causou 100% de mortalidade no ensaio preliminar, juntamente dos controles. Todas as concentrações-teste e controle vão ser preparados com 4 repetições cada um.

Em cada recipiente preparado com solo artificial contaminado e controle vão ser adicionadas 10 minhocas, os recipientes-testes serão pesados para o monitoramento e reposição semanal da umidade. O ensaio tem duração de 14 dias, a temperatura de 20° ± 2°C e em luz contínua, sendo que no 7° e 14° dia serão avaliadas as características de redução da biomassa corporal, letalidade, alterações morfológicas e letargia. Além disso, serão identificados indivíduos mortos através da ausência de reação a um leve estímulo mecânico na parte frontal.

Para avaliar a biomassa corporal, os organismos devem ser pesados no início, no 7° dia e no fim do teste, individualmente.

4.9. Substância de referência

Para confirmar a sensibilidade dos organismos-teste à exposição dos contaminantes, será realizado um ensaio com cloroacetamida como substância de referência. O ensaio é conduzido da mesma forma que o ensaio definitivo.

4.10. Validação do ensaio

Para os ensaios terem validade, é preciso obedecer a dois principais critérios, o primeiro é que no controle, a média de mortalidade de minhocas deve ser inferior a 10% e o segundo é que no mesmo, a média da perda de biomassa deve ser inferior a 20%.

5. ANÁLISE DOS RESULTADOS

Na análise de dados, serão utilizados alguns parâmetros para avaliar os resultados dos ensaios, sendo eles: a CL50 (concentração da substância letal para 50% das minhocas durante o período de teste), CENO (maior concentração testada, sem efeitos significativos observados) e CEO (menor concentração testada, com efeitos significativos observados). Os resultados são comparados aos resultados do controle, para serem considerados significativos devem possuir diferenças estatísticas na comparação.

A CL50 será calculada através da análise de Probit, além de ser realizada a análise de variância (ANOVA) (OECD, 1984).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

SISINNO, Cristina Lúcia Silveira; OLIVEIRA FILHO, Eduardo Cyrino. **Princípios de Toxicologia Ambiental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2021.

OECD (1984), *Test No. 207: Earthworm, Acute Toxicity Tests*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264070042-en>.

CARNEIRO, Fernando Ferreira et al (Org.). Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

RIGOTTO, Raquel Maria *et al*. Pesticide use in Brazil and problems for public health. **Cadernos de Saúde Pública**, [S.L.], v. 30, n. 7, p. 1360-1362, jul. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0102-311xpe020714>.

Ministério da Agricultura e Pecuária. **Legislação**. 2017. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/legislacao>. Acesso em: 06 maio 2023.

BRASIL. Constituição (1989). Lei nº 7802, de 11 de abril de 1989. DISPÕE SOBRE A PESQUISA, A EXPERIMENTAÇÃO, A PRODUÇÃO, A EMBALAGEM E ROTULAGEM, O TRANSPORTE, O ARMAZENAMENTO, A COMERCIALIZAÇÃO, A PROPAGANDA COMERCIAL, A UTILIZAÇÃO, A IMPORTAÇÃO, A EXPORTAÇÃO, O DESTINO FINAL DOS RESÍDUOS E EMBALAGENS, O REGISTRO, A CLASSIFICAÇÃO, O CONTROLE, A INSPEÇÃO E A FISCALIZAÇÃO, DE AGROTÓXICOS, SEUS COMPONENTES, E AFINS, E DÁ OUTRAS PROVIDÊNCIAS. Brasília, 1989.

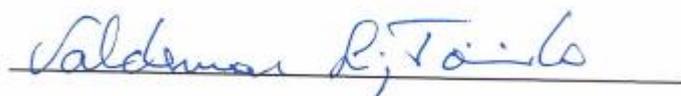
BELCHIOR, Diana Cléssia Vieira *et al*. IMPACTOS DE AGROTÓXICOS SOBRE O MEIO AMBIENTE E A SAÚDE HUMANA. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 34, n. 1, p. 135-151, abr. 2014.

LOPES, Carla Vanessa Alves; ALBUQUERQUE, Guilherme Souza Cavalcanti de. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, [S.L.], v. 42, n. 117, p. 518-534, jun. 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0103-1104201811714>.

Peres, Frederico; Moreira, Josino Costa; Dubois, Gaetan Serge. É veneno ou é remédio: agrotóxicos, saúde e ambiente. Rio de Janeiro, FIOCRUZ, 2003. p.21-41, tab.

BIANCHI, Miriam de Oliveira *et al.* Importância de estudos ecotoxicológicos com invertebrados do solo. **Embrapa**, Seropédica, Rj, v. 1, p. 32, dez. 2010.

NIVA, Cintia Carla *et al* (ed.). **Ecotoxicologia Terrestre**: métodos e aplicações dos ensaios com oligoquetas. Brasília, Df: Embrapa, 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1115956/ecotoxicologia-terrestre-metodos-e-aplicacoes-dos-ensaios-com-oligoquetas>. Acesso em: 06 maio 2023.



Orientador: Profº Doutor Valdemar Luiz Tornisielo



Aluna: Júlia Dotoli Silva

**TERMO DE RESPONSABILIDADE DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL E DEMAIS
PESQUISADORES ENVOLVIDOS NO PROJETO DE PESQUISA**

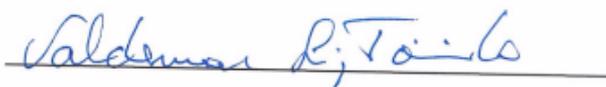
À Comissão de Coordenação do Curso de Ciências Biológicas, Coc CB
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, ESALQ-USP

Com relação ao projeto de título “Avaliação da toxicidade aguda dos fungicidas tebuconazol e trifloxistrobina, isolados e em mistura, em minhocas da espécie *Eisenia fetida*”, desenvolvido para cumprimento das atividades da Disciplina LCB0525, sob supervisão de Valdemar Luiz Tornisielo e com execução parcial ou total sob responsabilidade de Júlia Dotoli Silva, declaramos que:

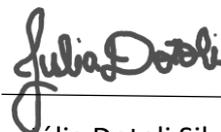
1. Estamos cientes do conteúdo e assumimos o compromisso de cumprir os termos das Leis e Decretos complementares (Lei No 6.894 de dezembro de 1980, Lei N 7.803 de 18 de julho de 1989, Lei No 9.985 de 18 de julho de 2000, Lei No 9.974 de 6 de junho de 2000, Decreto No 99.556 de 1 de Outubro de 1990, Decreto No 4.340 de 22 de agosto de 2002, Instrução Normativa N 154 de 01 de março de 2007, Decreto N 4.074 de 4 de janeiro de 2002, Instrução Normativa N 169/2008, ABNT-NBR10004 2004, Resolução ANVISA RDC 306 - 07 de dezembro de 2004, Resolução No 358, de 29 de abril de 2005) acrescida dos dispositivos e alterações, bem como os demais decretos e instruções normativas posteriores relativos aos assuntos ambientais pertinentes. Também cientes, que apresentaremos todas as declarações e documentos exigidos pela Comissão de Ética Ambiental na Pesquisa CEAP-ESALQ se solicitados;
2. Todos os procedimentos, organismos, insumos, equipamentos e quaisquer outros itens que serão utilizados direta ou indiretamente nesta pesquisa serão adquiridos e empregados segundo a legislação/normas dos órgãos competentes;
3. O projeto prevê recursos financeiros, se necessários, para o gerenciamento dos resíduos oriundos da pesquisa;
4. Todo impacto ambiental decorrente da má condução do projeto é de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos no projeto;
5. Estamos cientes das normas estabelecidas pelo Programa de Gerenciamento de Resíduos Químicos da ESALQ (PGRQ-ESALQ) e comprometemo-nos com o seu cumprimento na sede da instituição responsável pela condução do projeto, colaborando para sua adequada realização;
6. Comprometemo-nos a providenciar, quando exigido em função da natureza do projeto de pesquisa, todos os documentos/autorizações exigidos por órgãos públicos ou privados.

Piracicaba, 27 de Maio de 2023

Assinam:



Valdemar Luiz Tornisielo
Docente Orientador(a)



Júlia Dotoli Silva
Aluna(o)