

Anais da IV Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental



ISSN 1517-3135

Março, 2008

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Amazônia Ocidental
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 58

Anais da IV Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental

*Ricardo Lopes
Luadir Gasparotto
Lucinda Carneiro Garcia
Marcos Vinícius Bastos Garcia
Marinice Oliveira Cardoso
Nelcimar Reis Sousa*
Editores Técnicos

Embrapa Amazônia Ocidental
Manaus, AM
2008

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Amazônia Ocidental

Rodovia AM-010, Km 29, Estrada Manaus/Itacoatiara
Caixa Postal 319
Fone: (92) 3621-0300
Fax: (92) 3621-0320
www.cpa.embrapa.br/sac/

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: *Celso Paulo de Azevedo*
Secretária: *Gleise Maria Teles de Oliveira*
Membros: *Carlos Eduardo Mesquita Magalhães*
Cheila de Lima Bojink
Cintia Rodrigues de Souza
José Ricardo Pupo Gonçalves
Luis Antonio Kioshi Inoue
Marcos Vinícius Bastos Garcia
Maria Augusta Abtibol Brito
Paula Cristina da Silva Ângelo
Paulo César Teixeira
Regina Caetano Quisen

Revisor de texto: *Carlos Eduardo M. Magalhães/Sígla Regina dos Santos Souza*

Normalização bibliográfica: *Maria Augusta Abtibol Brito*

Diagramação: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Arte: *Gleise Maria Teles de Oliveira*

Fotos da capa: *Maria José Tupinambá*

1ª edição

1ª gravação em CD-Room (2008): 50

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Cip-Brasil. Catalogação-na-publicação.
Embrapa Amazônia Ocidental.**

Lopes, Ricardo et al.

Anais da IV Jornada de Iniciação Científica da Embrapa
Amazônia Ocidental / (editado por) Ricardo Lopes et al.
- Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2008.
154 p. (Embrapa Amazônia Ocidental. Documentos; 58).

ISSN 1517-3135

1. Pesquisa. 2. Ciência. I. Título. II. Série.

CDD 501

Toxicidade de Fungicidas para Minhocas (*Eisenia fetida*)

Marcus Vinicius Torres de Brito
Terezinha Batista Garcia
Marcos Vinicius Bastos Garcia

Resumo

Os fungicidas à base de cobre e manganês são utilizados nas áreas de várzea próximas a Manaus para controle de doenças em plantas cultivadas. Esses defensivos, mesmo quando usados adequadamente, podem se acumular no ambiente e comprometer a atividade biológica do solo, fundamentais para o uso agrícola em longo prazo. Diante disso, o conhecimento do potencial ecotoxicológico desses fungicidas é necessário para o manejo da qualidade do solo. Neste projeto foi avaliada a toxicidade aguda de mancozebe e oxiclreto de cobre para o ambiente terrestre, usando a minhoca (*Eisenia fetida*) como organismo indicador. Além do parâmetro mortalidade, foi avaliado o efeito sobre o comportamento i.e., a capacidade que as minhocas têm para evitar solos contaminados com esses fungicidas. Os testes foram feitos em laboratório, em substratos (solo artificial) e em solo natural coletado em várzea. Os fungicidas apresentaram baixa toxicidade aguda para minhocas. Entretanto, os ensaios de repelência mostraram que as minhocas evitaram solos contaminados com esses fungicidas, mesmo quando em baixas concentrações, o que implica em provável efeito sobre a atividade desses organismos no solo. Os resultados obtidos neste projeto são parte de um conjunto de informações necessárias para a avaliação do risco de agrotóxicos para o solo.

Termos para indexação: ecotoxicologia, pesticidas, risco ambiental.

Introdução

Vários fatores têm sido apontados como riscos à diversidade biológica das regiões tropicais, mas o efeito de poluentes químicos sobre a biodiversidade do solo tem sido pouco considerado. A atividade agrícola na Amazônia, em geral, requer o uso intensivo de produtos químicos, devido a grande diversidade de pragas e doenças. Embora a agricultura nessa região seja em sua maioria baseada na agricultura familiar, em pequenas áreas cultivadas, o uso de agrotóxicos, sobretudo de fungicidas, faz parte da rotina dos sistemas de cultivo. Além disso, boa parte da atividade agrícola se concentra nas margens de rios, nas várzeas periodicamente inundadas. As várzeas amazônicas podem ser consideradas ecossistemas frágeis no ponto de vista ambiental, devido a sua interação com o ambiente aquático. Gomes (2002), define tais ambientes como regiões de alta vulnerabilidade ambiental i.e., áreas com grande probabilidade de ser exposta a contaminantes, tendo em vista suas características geológicas e proximidade dos corpos d'água.

Os fungicidas à base de cobre e manganês podem se acumular no ambiente e serem tóxicos aos organismos do solo, entretanto têm sido amplamente utilizados nas várzeas próximas de Manaus para controle de doenças em plantas cultivadas (Waichman et al., 2002). Os organismos de solo, sobretudo as minhocas, são essenciais para a manutenção dos processos químicos e biológicos do solo (Brown et al., 2000) e, em consequência, desempenham um importante papel na avaliação de risco ecotoxicológico para o ambiente terrestre. As minhocas possuem vários quimiorreceptores em seu tegumento, especialmente nos segmentos anteriores. Essas estruturas as tornam sensíveis às mudanças químicas no ambiente, sendo que a sensibilidade aliada à sua capacidade de locomoção permite que elas possam evitar áreas contaminadas (Stephenson et al., 1998). Portanto, o teste de repelência, uma alternativa para rápida avaliação da toxicidade, baseada na resposta comportamental desses organismos, tem sido proposta por Yeardeley et al. (1996) e Hund-Rinke et al. (2003). Embora outras substâncias, com diferentes modos de ação e propriedades, ainda devam ser testadas, o teste de repelência tem se mostrado bastante sensível na avaliação dos efeitos de pesticidas em solos tropicais e poderia substituir o teste de toxicidade aguda nos estudos para avaliação de risco ambiental (Garcia et al., 2007).

Neste trabalho foram estudados em laboratório os efeitos dos fungicidas oxicloreto de cobre e mancozebe para a minhoca *Eisenia fetida* referente aos parâmetros de mortalidade e comportamento de repelência em relação ao solo contaminado. Estudos toxicológicos de fungicidas bem como de outros agrotóxicos sobre a biota do solo são as bases para a elaboração de uma análise de risco ambiental.

Material e Métodos

Seleção de substratos

Os testes de toxicidade foram feitos em dois tipos de substratos:

- **Solo Artificial:** Mistura de areia (70 %), caulim (20 %) e matéria orgânica (10 %) (Garcia, 2004), cuja formulação foi baseada no protocolo internacional (OECD, 1984).
- **Solo Natural:** Tipo Gleissolo presente em áreas de várzeas misturado com areia fina (25 % dos grãos com até 200 micra) na proporção de 1:1 (m/m), cuja composição final foi de areia (58,2 %), silte (33,9 %) e argila (7,9 %). Características físicas e químicas deste solo são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização físico-química dos solos artificiais e naturais.

Variável	Unidade	Solo Artificial	Solo Natural
pH (CaCl ₂)		6,70	5,30
P	(mg/dm ³)	35,00	73,00
K	(mg/dm ³)	660,00	29,00
Na	(mg/dm ³)	160,00	23,00
Ca	(c.molc /dm ³)	2,46	6,09
Mg	(c.molc /dm ³)	0,56	2,20
N total	(%)	0,07	0,43
C org	(%)	3,59	0,25
Matéria Orgânica	(%)	6,17	0,43
Relação CN		51,3	0,58
Capacidade retenção de água	(%)	39,5	36,20

Seleção da espécie indicadora

Eisenia fetida (Oligochaeta, Lumbricidae): Espécie de minhoca comum em criações para produção de húmus e compostagem. Atualmente é o organismo recomendado em protocolos internacionais para uso em testes padronizados de toxicidade de substâncias químicas para o solo em regiões temperadas (OECD, 1984) e tropicais (IBAMA, 1990). Neste trabalho foram utilizadas culturas de *E. fetida* previamente estabelecidas no laboratório de Entomologia da Embrapa Amazônia Ocidental, as quais foram originalmente adquiridas de criadores de minhocas nos arredores de Manaus.

Seleção dos fungicidas

Testes de toxicidade foram feitos com duas substâncias usadas como ingredientes ativos em formulações dos seguintes fungicidas:

- **Fungitol Azul® (oxicloreto de cobre):** Um fungicida de ação de contato, do grupo químico cúprico, que contém 588 g/kg do ingrediente ativo oxicloreto de cobre, na formulação pó molhável. Possui amplo espectro de controle das doenças fúngicas em várias culturas, principalmente em horticultura e fruticultura.
- **Dithane® (mancozebe):** Um fungicida de contacto, do grupo químico ditiocarbamatos, de eficaz controle preventivo contra doenças de diversas culturas, possuindo também ação acaricida.

Experimento I: Toxicidade Aguda

O sistema para determinação da toxicidade aguda de fungicidas para *Eisenia fetida* foi baseado nos protocolos internacionais OECD no. 207 (OECD, 1984) e ISO 11268-1 (1993), que descrevem um método para a determinação de toxicidade aguda para *E. fetida* por via cutânea e por ingestão, usando solo artificial.

Antes do teste, as minhocas foram mantidas para aclimação no substrato de teste por 24 horas em caixas de plástico (25 cm x 36 cm de área e 12 cm de altura).

As diferentes concentrações dos fungicidas foram preparadas com base na massa seca (ms) do substrato i.e., cada concentração representando a quantidade do ingrediente ativo em mg por kg do substrato. O ingrediente ativo foi diluído em água destilada, misturado em 500g (ms) de substrato e colocado em frasco de vidro (vol. 1,3 L) com tampa de plástico, perfurada. A umidade do substrato foi ajustada para 35 ± 5

% (ms). Após a contaminação em diferentes concentrações, amostras foram retiradas para cálculo da umidade e pH do substrato, em uma réplica de cada tratamento. Em seguida, 10 indivíduos de *E. fetida* pesando entre 300 a 600 mg foram colocados sobre a superfície do substrato e incubados a temperatura de $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, na ausência de luz. Após sete dias foi avaliada a mortalidade e pesagem dos indivíduos (juntos) para medição da alteração da biomassa das minhocas. Aos 14 dias de incubação foi feita a avaliação final com procedimento similar, mas pesando os indivíduos separadamente.

Experimento II: Teste de repelência

O princípio deste teste é a exposição simultânea das minhocas no solo que se quer avaliar (contaminado) e no solo controle, permitindo a migração entre ambos. Após o período de dois dias a localização dos indivíduos é determinada. Esses testes têm sido também recomendados na avaliação de solos contaminados que estejam em processo de restauração.

Os testes de repelência usando *E. fetida* foram feitos em cinco concentrações de cada fungicida em 4 réplicas em solo artificial e natural. Caixas de plástico (área 11 cm x 15,5 cm e 6 cm de altura) foram preenchidas com 250 g (ms) de solo em cada metade, uma com substrato contaminado e outra com não contaminado. Durante o preenchimento foi usada uma lâmina divisória para evitar a mistura dos substratos. Em seguida a lâmina foi retirada e dez indivíduos de *E. fetida* pesando entre 300 mg a 600 mg foram colocados na região central do recipiente sobre o substrato e aguardou-se o tempo necessário para as minhocas entrarem no substrato. Em seguida, foram incubadas por 48 horas a $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, na ausência de luminosidade. Ao término da incubação cada recipiente foi cuidadosamente examinado e, separando-se as seções (controle e tratamento), foram registrados o número de indivíduos que migraram para o controle. A resposta de repelência foi quantificada pela diferença entre as proporções de indivíduos em cada uma das seções. Em cada réplica a repelência (R) (expressa em porcentagem) foi calculada pela fórmula $R = [(C - T) / 10] \times 100$; onde (C) é o total de indivíduos observados no solo controle; (T) é o total de indivíduos observados no solo contaminado e "10" representa o número de indivíduos por réplica.

Desenho experimental e análises estatísticas

Os experimentos foram feitos em delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e controle, com quatro repetições. Para avaliação da toxicidade aguda dos fungicidas foi estimada a concentração letal mediana (CL_{50}) através do método de Probit (Finney, 1971). A estimativa da concentração de efeito mediana (CE_{50}), usada para os testes de repelência ao substrato contaminado, foi feita pelo método Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1977). Os parâmetros de toxicidade CL_{50} e EC_{50} são apresentados em massa do ingrediente ativo (mg) por massa de solo (kg), e quanto menor o seu valor, maior a toxicidade da substância. Os programas de análises de Probit e para o método Spearman-Kärber foram obtidos no servidor Internet da U.S.EPA (<http://www.epa.gov/nlerleerd/stat2.htm>). As curvas de dose resposta, geradas após análise de Probit foram feitas no programa ToxRat[®]. Diferenças entre o controle e tratamentos foram avaliadas através da análise de variância (ANOVA) e para comparação de médias foi utilizado o teste de Dunnett, a 5 % de significância.

Resultados e Discussão

Testes de toxicidade aguda mostraram que ambos os fungicidas têm baixa letalidade para minhocas. Os valores da CL_{50} estimados para oxiclureto de cobre foram >4.700 mg i.a./kg e 1.900 mg i.a./kg para solos artificiais e naturais, respectivamente (Tabela 2). Maboeta et al. (2004) avaliaram a toxicidade de oxiclureto de cobre em solo artificial em 883 mg i.a./kg. No presente estudo, desenvolvido em condições de maior temperatura ($28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), a toxicidade desse fungicida foi ainda menor, i.e., praticamente não tóxico. Entretanto, foi observado o efeito de redução da biomassa dos indivíduos quando expostos a concentrações subletais (Tabelas 3 e 4; Figura 1).

Tabela 2. Toxicidade aguda de fungicidas para *Eisenia fetida* em diferentes substratos.

Fungicida	Substrato	CL50 (IC – 95 %) mg i.a. / kg solo
Mancozebe	Solo Artificial (OECD)	950 (900 – 1.000)
Mancozebe	Solo Natural (Várzea)	870 (700 – 1.000)
Oxicloreto de cobre	Solo Artificial (OECD)	> 4.700
Oxicloreto de cobre	Solo Natural (Várzea)	1.900 (1.600 – 2.300)

Tabela 3. Toxicidade aguda de oxicloreto de cobre para *Eisenia fetida* em solo artificial.

Tratamento (mg/kg)	Mortalidade [%] 14° Dia	Biomassa (mg) 1° Dia	Biomassa (mg) 14° Dia	% do peso inicial 14° Dia	Umidade do solo [%] 14° Dia	pH 14° Dia
Controle	0,0	405,2	257,5	63,5	31,5	6,8
294	0,0	403,7	253,2	62,7	32,7	6,7
588	2,5	409,8	230,8	56,3*	32,6	6,6
1.176	2,5	417,1	196,8	47,2*	31,1	6,5
2.352	5,0	409,2	178,5	43,6*	30,0	6,3
4.704	10,0	411,7	165,1	40,1*	32,1	6,4

*Estatisticamente diferente do controle (ANOVA, Teste Dunnett, $P < 0,01$).

Tabela 4. Toxicidade aguda de oxicloreto de cobre para *Eisenia fetida* em solo natural.

Tratamento (mg/kg)	Mortalidade [%] 14° Dia	Biomassa (mg) 1° Dia	biomassa (mg) 14° dia	% do peso inicial 14° Dia	Umidade do solo [%] 14° Dia	pH 14° Dia
Controle	2,5	403,0	256,6	63,7	17,5	5,3
168	2,5	412,3	264,3	64,1	20,3	5,9
336	5,0	398,9	229,1	57,4*	18,9	6,0
672	5,0	402,7	210,8	52,3*	17,9	6,1
1.344	22,5	408,7	n.d.	n.d.	18,9	6,4
2.016	55,0	411,0	n.d.	n.d.	18,9	6,6

*Estatisticamente diferente do controle (ANOVA, Teste Dunnett, $P < 0,01$); n.d. = não determinado.

Neste estudo, valores da CL_{50} estimada para mancozebe foram de 950 mg i.a./kg e 870 mg i.a./kg para os solos artificiais e naturais, respectivamente (Tabela 2). Os valores da CL_{50} de mancozebe para ambos os solos não foram estatisticamente diferentes. Entretanto, no solo artificial a resposta (mortalidade) foi significativa, acima de 800 mg, enquanto que no solo natural a resposta ocorreu desde a menor concentração – 200 mg/kg (Tabelas 5, 6 e 2; Fig. 2 e 3). Tal diferença pode ser explicada pela maior biodisponibilidade desse fungicida, influenciado pelas características físico-químicas do solo natural. Esses resultados confirmam a baixa toxicidade de mancozebe para *E. fetida* ($CL_{50} = 1,26$ g i.a./kg) em solo artificial, encontrada por Vermeuler et al., 2001. Pesticidas com valores de concentração letal mediana (CL_{50}) maiores que 1.000 mg i.a./kg são consideradas não-tóxicos para minhocas no campo (Kokta, 1992). Considerando essa regra, os

fungicidas testados, sobretudo o oxicleto de cobre, representam baixo risco para a biota do solo. Entretanto, deve-se ter cuidado ao se interpretar os resultados de letalidade (CL_{50}) sem considerar os possíveis efeitos crônicos (e.g. crescimento e reprodução) e os efeitos sobre comportamento (repelência).

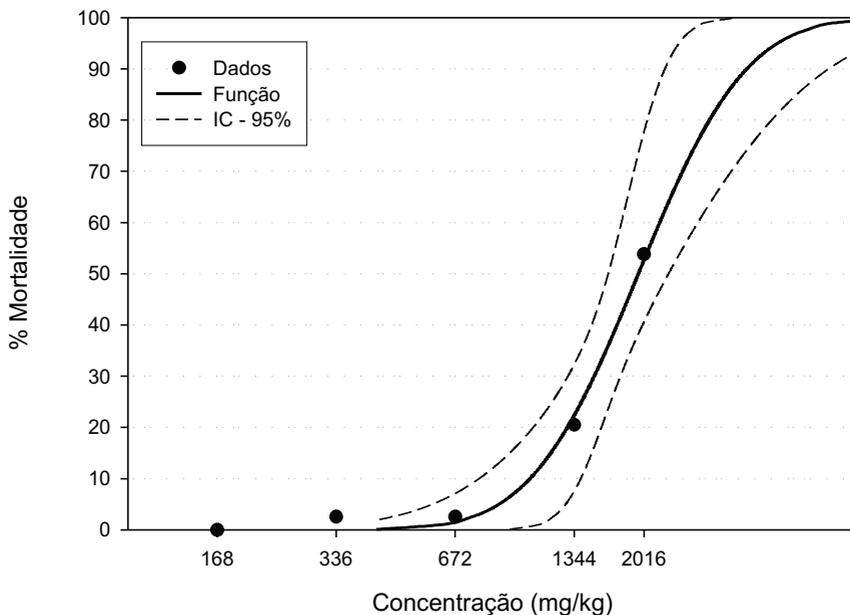


Fig. 1. Curva dose-resposta de toxicidade aguda de oxicleto de cobre para *Eisenia fetida* em solo natural.

Tabela 5. Toxicidade aguda de mancozebe para *Eisenia fetida* em solo artificial.

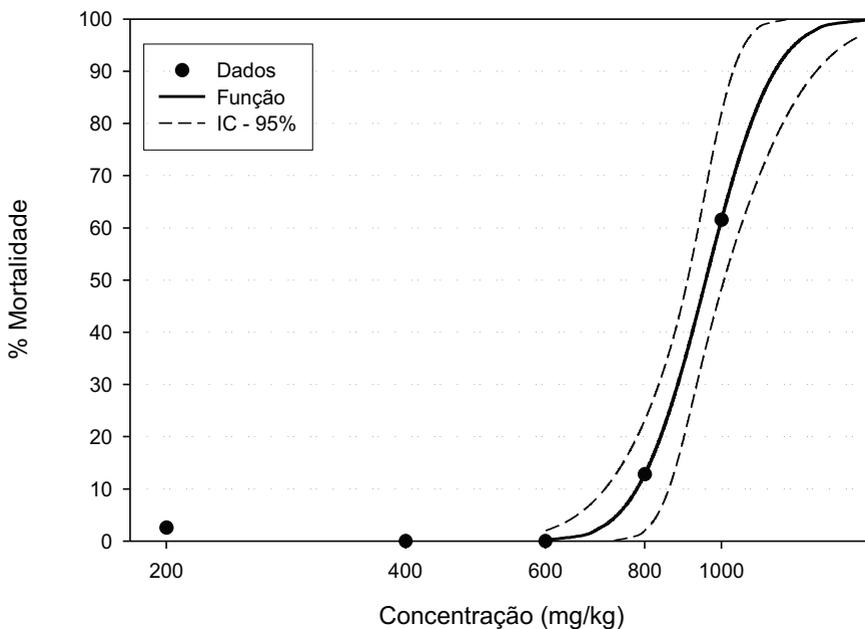
Treatamento (mg/kg)	Mortalidade [%] 14° Dia	Biomassa (mg) 1° Dia	Biomassa (mg) 14° Dia	% do peso inicial 14° Dia	Umidade do solo [%] 14° Dia	pH 14° Dia
Controle	2,5	405,3	278,5	68,7	36,7	6,7
200	2,5	413,7	274,7	66,4	38,6	6,6
400	0,0	403,9	274,9	68,0	38,7	6,4
600	0,0	423,5	277,4	65,5	36,9	6,2
800	15,0	411,1	271,2	66,0	38,2	6,1
1.000	62,5	399,7	n.d.	n.d.	41,0	6,0

n.d. = não determinado

Tabela 6. Toxicidade aguda de mancozebe para *Eisenia fetida* em solo natural.

Tratamento (mg/kg)	Mortalidade [%] 14° Dia	Biomassa (mg) 1° Dia	Biomassa (mg) 14° Dia	% do peso inicial 14° Dia	Umidade do solo [%] 14° Dia	pH 14° Dia
Controle	0,0	373,4	270,8	72,5	17,3	5,3
200	5,0	400,5	268,0	66,9	17,1	5,6
300	5,0	386,8	268,8	69,5	17,0	5,5
400	20,0	381,7	n.d.	n.d.	18,3	5,8
600	30,0	390,0	n.d.	n.d.	17,9	5,8
800	47,5	386,9	N.d.	N.d.	16,7	5,8

n.d. = não determinado

**Fig. 2.** Curva dose-resposta de toxicidade aguda de mancozebe para *Eisenia fetida* em solo artificial.

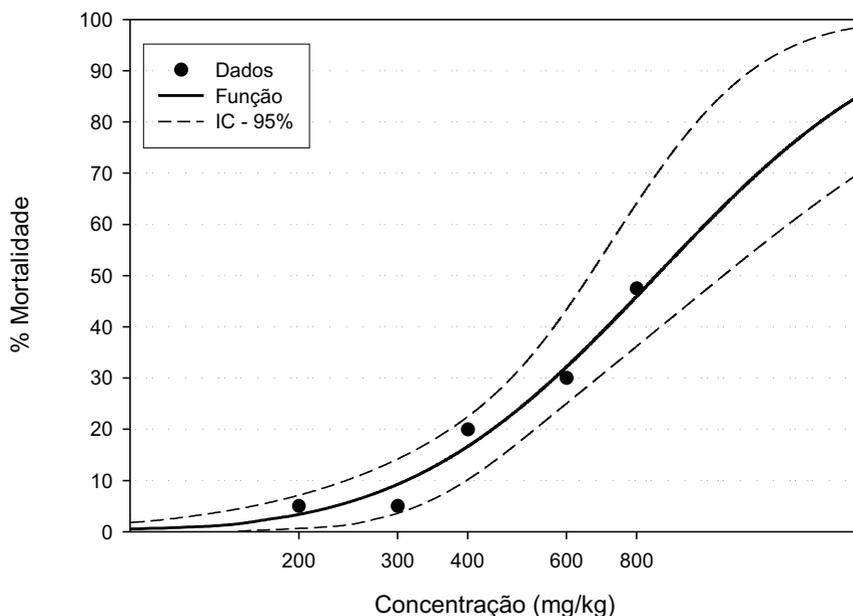


Fig. 3. Curva dose-resposta de toxicidade aguda de mancozebe para *Eisenia fetida* em solo natural.

Os resultados dos testes de repelência (Tabela 7 e Figuras 4, 5, 6 e 7) mostraram que as minhocas evitaram solos contaminados por estes fungicidas, mesmo quando em baixas concentrações no solo. Para o mancozebe foram estimados os valores de concentração de efeito mediana (EC_{50}) de 8,3 e 12,4 mg i.a./kg para solos artificial e natural, respectivamente. Para o oxicloreto de cobre este efeito foi menos pronunciado no solo artificial ($EC_{50} = 162,4$ mg i.a./kg), mas bastante evidente no solo natural ($EC_{50} = 34,8$ mg i.a./kg), o que demonstra maior biodisponibilidade do pesticida no substrato natural (Tabela 6).

Tabela 6. Efeito de fungicidas sobre o comportamento de repelência em *Eisenia fetida* em diferentes substratos.

Fungicida	Substrato	CL50 (IC – 95 %) mg i.a. / kg solo
Mancozebe	Solo Artificial (OECD)	8,3 (6,3 – 10,9)
Mancozebe	Solo Natural (Várzea)	12,4 (10,3 – 15,0)
Oxicloreto de cobre	Solo Artificial (OECD)	162,4 (146 – 180)
Oxicloreto de cobre	Solo Natural (Várzea)	34,8 (31,3 – 38,8)

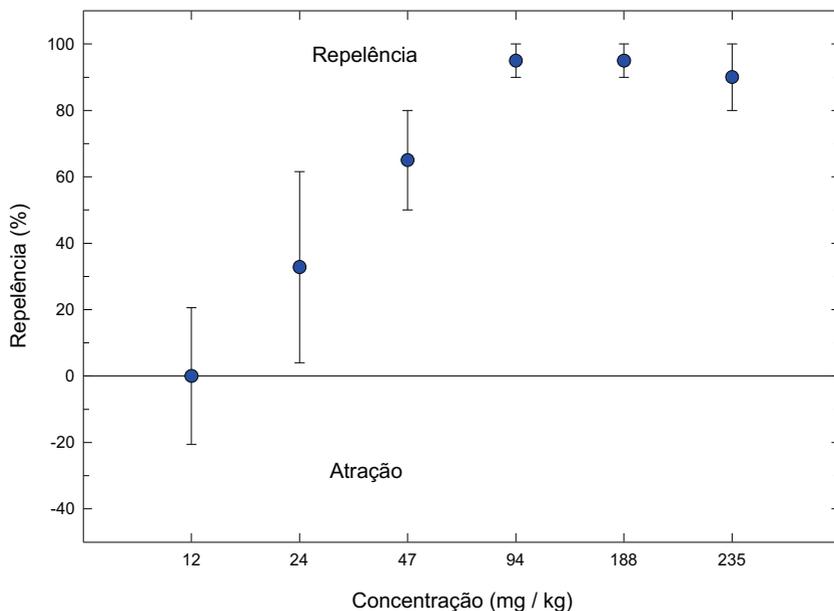


Fig. 4. Resposta de repulência de *Eisenia fetida* a diferentes concentrações de oxiclreto de cobre em solo natural (média e erro padrão).

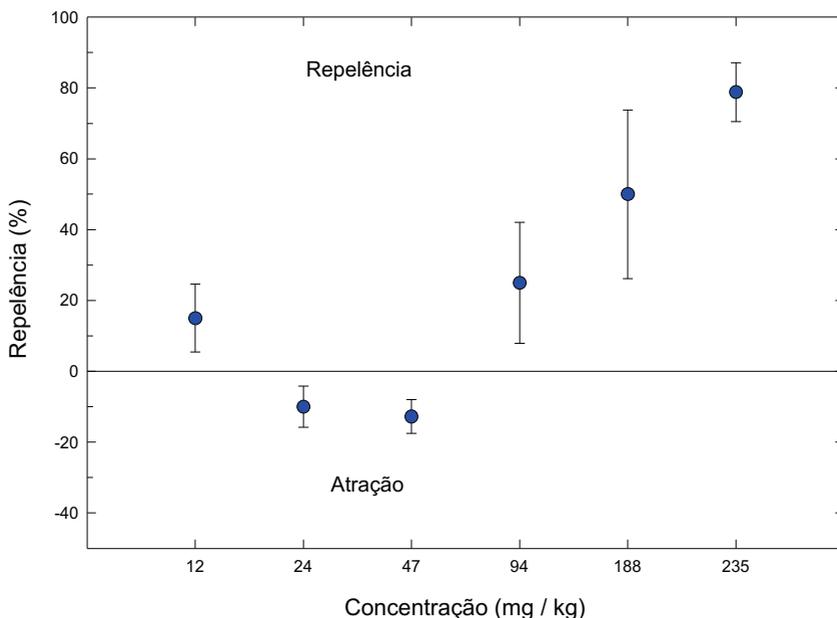


Fig. 5. Resposta de repulência de *Eisenia fetida* a diferentes concentrações de oxiclreto de cobre em solo artificial (média e erro padrão).

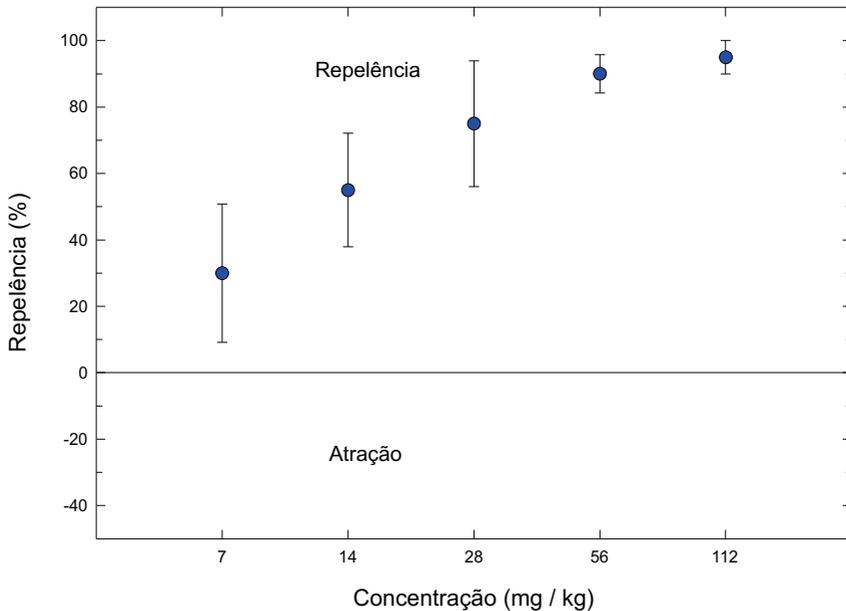


Fig. 6. Resposta de repelência de *Eisenia fetida* a diferentes concentrações de mancozebe em solo natural (Média e erro padrão).

Conclusões

Apesar da baixa toxicidade aguda para minhocas, a contaminação do solo por estes fungicidas pode resultar em considerável impacto ao ambiente devido aos efeitos crônicos resultantes da bioacumulação.

Os testes de repelência são bioensaios bastante sensíveis que permitem avaliar o potencial tóxico de substâncias químicas para o solo. Além disto, produz informações de relevância ecológica de modo mais rápido que os testes de toxicidade aguda.

Agradecimentos

Os autores são gratos à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo suporte financeiro ao projeto e pela concessão da bolsa de iniciação científica.

Referências

BROWN, G.G.; BAROIS, I.; LAVELLE, P. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. **European Journal of Soil Biology**, 36, 177-198, 2000.

FINNEY, D.J. **Probit analysis**. Cambridge University Press, 1971. 333 p.

GARCIA, M. **Effects of pesticides on soil fauna: Development of ecotoxicological test methods for tropical regions**. Cuvillier Verlag, Goettingen. Tese de doutorado. 2004. 281p.

GARCIA, M.; RÖMBKE, J.; BRITO, M.V.T.; SCHEFFCZYK, A. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions, *Environmental Pollution*. 2007, (no prelo), [doi:10.1016/j.envpol.2007.08.007].

GOMES, M.A.F. **Herbicidas no meio ambiente Uma abordagem para regiões de alta vulnerabilidade natural**. Comitê de Meio Ambiente, Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas. 2002 [online] Disponível em: <http://www.cnpma.embrapa.br/herbicidas/> [Acesso em: 04/08/2003].

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, v.11, p.714-719, Correction (1978) 12, 417, 1997.

HUND-RINKE, K.; ACHAZI, R.; RÖMBKE, J.; WARNECKE, D. Avoidance test with *Eisenia fetida* as indicator for the habitat function of soils: Results of a laboratory comparison test. **Journal of Soils and Sediments**, v. 3, n. 1, p. 7-12, 2003.

IBAMA **Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos**. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis, 2ª. ed. Brasília, 1990. 351p.

ISO-11268-1 **International organization for standardization**. Soil-quality Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate. Geneve, Switzerland. 1993. 6p.

KOKTA, C. Measuring effects of chemicals in the laboratory: effect criteria and end points. In: Greig-Smith, P.W., Becker, H., Edwards, P.J., Heimbach, F. (Eds.), **Ecotoxicology of Earthworms**. Springer Verlag, Intersept, UK, pp. 5562, 1992.

OECD **Organisation for economic cooperation and development**: OECD-Guideline for testing of chemicals No. 207. Earthworm acute toxicity test, Paris, 1984. SHEPPARD, S.C., BEMBRIDGE, J.D., HOLMSTRUP, M., POSTHUMA, L., 1997. Advances in earthworm ecotoxicology. In: Proceedings from the Second International Workshop on Earthworm Ecotoxicology. SETAC, Amsterdam.

STEPHENSON, G.L.; KAUSHIK, A.; KAUSHIK, N.K.; SOLOMON, K.R.; STEELE, T.; SCROGGINS, R.P. Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: SHEPPARD, S.; BEMBRIDGE, J.; HOLMSTRUP, M.; POSTHUMA, L. (Ed.). **Advances in earthworm ecotoxicology**. Setac Press, Pensacola, USA, 1998. p. 67-81.

VERMEULEN, L.A.; REINECKE, A.J.; REINECEK, S.A. Evaluation of the fungicide manganesezinc ethylene bis (dithiocarbamate) (Mancozeb) for sublethal and acute toxicity to *Eisenia fetida* (*Oligochaeta*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, 48, 183189, 2001.

WAICHMAN, A.V.; RÖMBKE, J.; RIBEIRO, M.O.A.; NINA, N.C.S. Use and fate of pesticides in the Amazon state, Brazil: Risk to human health and the environment. **ESPR - Environmental Science and Pollution Research**, v. 9, n. 6, p. 423-428, 2002.

YEARLEY, R.B.; LAZORCHAK, J.M.; GAST, L.C. The potential of an earthworm avoidance test for evaluation of hazardous waste sites. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, p. 1532-1537, 1996.