



FERNANDO PENA CANDELLO

**COMPORTAMENTO DE FUGA DE MINHOCAS NA  
PRESENÇA DO ANTIMICROBIANO  
SULFADIAZINA EM SOLO**

**CAMPINAS  
2014**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL, ARQUITETURA E URBANISMO**

**FERNANDO PENA CANDELLO**

**COMPORTAMENTO DE FUGA DE MINHOCAS NA  
PRESENÇA DO ANTIMICROBIANO  
SULFADIAZINA EM SOLO**

**Orientador: Prof. Dr. José Roberto Guimarães**

**Coorientador: Prof. Dr. Edson Aparecido Abdul Nour**

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Civil, na área de concentração Saneamento e Ambiente.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO ALUNO FERNANDO PENA CANDELLO E ORIENTADO PELO PROF. DR. JOSÉ ROBERTO GUIMARÃES.

ASSINATURA DO ORIENTADOR

---

**CAMPINAS  
2014**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura  
Luciana Pietrosanto Milla - CRB 8/8129

C16c Candello, Fernando Pena, 1980-  
Comportamento de fuga de minhocas na presença do antimicrobiano sulfadiazina em solo / Fernando Pena Candello. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: José Roberto Guimarães.  
Coorientador: Edson Aparecido Abdul Nour.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo.

1. Ecotoxicologia. 2. Sulfonamidas. 3. Minhoca. 4. Solo. 5. Antimicrobianos. I. Guimarães, José Roberto, 1958-. II. Nour, Edson Aparecido Abdul, 1961-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Earthworms avoidance behavior in presence of antimicrobial sulfadiazine on soil

**Palavras-chave em inglês:**

Ecotoxicology

Sulfonamides

Earthworm

Soil

Antimicrobial

**Área de concentração:** Saneamento e Ambiente

**Titulação:** Mestre em Engenharia Civil

**Banca examinadora:**

José Roberto Guimarães [Orientador]

Anne Hélène Fostier

Pedro Sérgio Fadini

**Data de defesa:** 03-07-2014

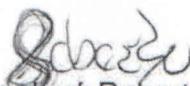
**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Civil

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA CIVIL, ARQUITETURA E URBANISMO

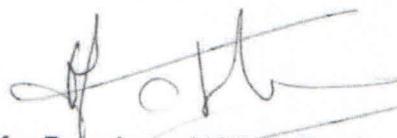
COMPORTAMENTO DE FUGA DE MINHOCAS NA PRESENÇA DO  
ANTIMICROBIANO SULFADIAZINA EM SOLO

Fernando Pena Candello

Dissertação de Mestrado aprovada pela Banca Examinadora, constituída por:



Prof. Dr. José Roberto Guimarães  
Presidente e Orientador//Unicamp



Profa. Dra. Anne Hélène Fostier  
Unicamp



Prof. Dr. Pedro Sérgio Fadini  
UFSCar

Campinas, 03 de julho de 2014

## RESUMO

Os fármacos veterinários utilizados para aumentar a produtividade agropecuária podem atingir o solo, via excreção animal, e causar impactos sobre os ecossistemas aquáticos e terrestres. Nesse trabalho, implantou-se o recente ensaio padronizado pela ABNT de comportamento de fuga com minhocas *Eisenia andrei* (representantes da macrofauna terrestre) para avaliar o efeito subletal do antimicrobiano sulfadiazina (fármaco sintético da classe das sulfonamidas), utilizada de forma extensiva na produção animal. Dessa forma, desenvolveu-se metodologia alternativa de cultivo dessa espécie de minhoca conhecida como vermelha-da-califórnia a partir de restos vegetais domésticos, visando à obtenção de organismos viáveis para os testes. Validou-se o ensaio com uma substância de referência, obtendo-se uma CE50-48h de 819 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> kg<sup>-1</sup> (intervalo a 95%: 628 a 1066 mg kg<sup>-1</sup>), caracterizando-o como uma ferramenta padronizada para avaliação ecotoxicológica rápida de solos contaminados. Também foram executados ensaios com a substância-teste sulfadiazina em solo artificial tropical, obtendo-se baixas respostas de fuga (máxima: 30%), afastando-se da curva concentração-resposta linear, mas permitindo uma discussão acerca dos efeitos assimétricos dos xenobióticos no ambiente.

Palavras chave: ecotoxicologia, sulfonamida, minhoca, solo, antimicrobianos.

## ABSTRACT

Veterinary pharmaceuticals used to increase agricultural productivity can reach soil via animal excretions, and cause impacts on aquatic and terrestrial ecosystems. In this work, the recent standardized ABNT avoidance behavior test was implanted using earthworms *Eisenia andrei* (terrestrial macrofauna representatives) to assess the sublethal effects of antimicrobial sulfadiazine (a sulfonamide synthetic drug), extensively used in animal production. It was developed an alternative cultivation method of this red worms species made of household vegetable wastes, in order to obtain viable organisms for testing. The escape essay was validated with reference substance, resulting in EC50-48h of 819 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> kg<sup>-1</sup> (95% confidence interval: 628-1066 mg kg<sup>-1</sup>), characterizing it as a standardized tool for rapid ecotoxicological screening of contaminated soil. Some essays were performed with the test-substance sulfadiazine in tropical artificial soil, resulting in low response avoidance (maximum 30 %), away from the linear concentration-response curve, but allowing a discussion on the xenobiotics asymmetric effects over the environment.

Keywords: ecotoxicology, sulfonamide, earthworm, soil, antimicrobials.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	3
2.1	Objetivo Geral.....	3
2.2	Objetivos específicos.....	3
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1	Qualidade do solo.....	4
3.2	A abordagem ecotoxicológica terrestre.....	5
3.2.1	Os sistemas de ensaios em solo.....	7
3.2.1.1	Ensaio comportamentais e de fuga.....	12
3.3	A detecção química em minhocas.....	17
3.4	Antimicrobianos sulfonamida.....	18
3.4.1	Sulfadiazina.....	20
3.4.2	Antimicrobianos no ambiente.....	22
3.5	<i>Eisenia andrei</i> .....	26
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	29
4.1	Organismo-teste.....	29
4.2	Substrato de cultivo.....	30
4.3	Solo-teste e análises físicas e químicas.....	31
4.4	Substância-teste.....	33
4.5	Ensaio de fuga.....	33
4.6	Análise dos dados.....	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1	Estabelecimento do cultivo dos organismos.....	38
5.2	Caracterização física e química do solo-teste.....	43
5.3	Validação do ensaio de fuga.....	44
5.4	Efeito de sulfadiazina sobre o comportamento de fuga.....	47
6	CONCLUSÃO.....	56
	REFERÊNCIAS.....	57
	APÊNDICE A.....	68
	APÊNDICE B.....	71

## **DEDICATÓRIA**

Ao meu sobrinho mais novo, Guilherme Ikki Candello Kozonoe, que com seus apenas três anos de vida, demonstra características de um futuro cientista: é metuculoso e curioso.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Roberto Guimarães (Tuca) pela oportunidade de trabalharmos juntos nesse projeto; pela autonomia e confiança a mim conferidas; pela leitura atenta, correções e discussões que permitiram elevar o nível desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Edson Aparecido Abdul Nour, na pessoa de coordenador do Labsan e chefe do Departamento de Saneamento e Ambiente (DSA/FEC), por permitir a realização dessa jornada concomitante de serviço público e Mestrado e por não medir esforços para torná-lo executável, ajudando em todos os possíveis entraves de espaço e material.

Aos professores da banca examinadora de qualificação e defesa, que vieram com muita boa vontade e disposição em contribuir: Profa. Dra. Anne Hélène Fostier, Prof. Dr. Pedro Sérgio Fadini, Prof. Dr. Adriano Luiz Tonetti.

À Dra. Milena Guedes Maniero, pela disponibilidade para as dúvidas, por ter ajudado muito na obtenção da substância sulfadiazina, pelas valiosas dicas na apresentação da qualificação e defesa.

À Dra. Angela dos Santos Barretto, por me estimular o gosto pelo cultivo dos organismos, pelo amplo compartilhamento de conhecimentos em microbiologia e ecotoxicologia. Pela ajuda com material para a formação do substrato das minhocas.

À Rede Brasileira de Ecotoxicologia Terrestre, de cuja fundação tive o privilégio de fazer parte durante o Congresso Ecotox 2012, em especial à Dra. Maria Edna Tenório Nunes, pela ajuda nas dúvidas por e-mail e pela excelente tese e subsequente artigo, que muito auxiliaram no delineamento dessa dissertação.

Aos colegas de trabalho (que atualmente estão se dedicando a outros desafios) Ligia Maria Domingues e Enelton Fagnani, pelos ensinamentos das teorias e práticas no Labsan, que muito contribuíram para o meu crescimento profissional; pela divisão das tarefas.

Ao doutorando Mario Foco, pelo auxílio na confecção de figuras do trabalho, pelas proveitosas discussões sobre redação científica durante o almoço.

Aos colegas do grupo de pesquisa em fármacos veterinários, e aos que contribuíram na minha decisão de iniciar a pós-graduação: Caio, Izabela, Sandra, Luciana Urbano; pelas conversas científicas.

Aos alunos do Labsan que me ajudaram indiretamente nessa pesquisa, especialmente às tecnólogas em saneamento Lidiane, Dayane e Luciana Vechi.

Ao pesquisador Osmar Hamilton Becere, do Laboratório de Materiais de Construção Civil do IPT, pela gentileza na doação dos sacos de areia normal brasileira no. 100.

Ao meu irmão Murillo e minha cunhada Giselle, pela disponibilidade e gentileza em retirar no IPT os sacos de 25 kg de areia (usados no solo artificial) e transportá-los de São Paulo a Indaiatuba.

Ao motorista Saul, funcionário da FEC, pelo profissionalismo e gentileza em me conduzir a São Paulo, quando da aquisição do fardo de mais de 100 litros de substrato de fibra de coco (usado no solo artificial).

Aos desenvolvedores dos programas Dropbox® e Mendeley®. Esses softwares auxiliaram na organização dos meus arquivos e no gerenciamento das referências utilizadas nesse trabalho. Ficou mais fácil fazer pesquisa assim.

No âmbito pessoal, agradeço a minha companheira de jornada Fabiane Mondini, pelo carinho, apoio e amor. Aos meus pais Carlos Alberto e Maria Auxiliadora, e aos meus irmãos Murillo, Patrícia e Andréa, pelas reuniões em família que sempre ajudam a aliviar a tensão e a reafirmar os valores que realmente importam na vida.

Aos meus grandes amigos e familiares, dos quais me ausentei ou tive pouco contato durante essa etapa, pela compreensão e apoio.

A Deus, por me conceder saúde e disposição para a execução deste trabalho.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Principais organismos utilizados em ecotoxicologia terrestre.....	10
<b>Figura 2.</b> Gradiente de condições ambientais.....	13
<b>Figura 3.</b> Fórmula estrutural de uma sulfonamida padrão.....	19
<b>Figura 4.</b> Fórmula estrutural da sulfadiazina.....	20
<b>Figura 5.</b> Diferença no padrão de coloração entre <i>E. fetida</i> e <i>E. andrei</i> .....	27
<b>Figura 6.</b> Minhocário em caixas: local de cultivo dos organismos. ....	30
<b>Figura 7.</b> Caixas sobrepostas para preparo do substrato de cultivo.....	31
<b>Figura 8.</b> Material para preparo do solo artificial tropical (SAT).....	33
<b>Figura 9.</b> Representações do recipiente-teste no ensaio de fuga.....	35
<b>Figura 10.</b> Esquema do ensaio de fuga, representando um recipiente-teste.....	36
<b>Figura 11.</b> Sequência de preparo do substrato.....	38
<b>Figura 12.</b> Substrato alternativo pronto, com detalhe para os casulos de <i>E. andrei</i> .....	41
<b>Figura 13.</b> Ensaio de controle dual: porcentagem de organismos.....	44
<b>Figura 14.</b> Ensaio de sensibilidade com a substância de referência.....	45
<b>Figura 15.</b> Ensaio com sulfadiazina: porcentagem de resposta de fuga.....	48
<b>Figura 16.a)</b> Esquema da ionização da sulfadiazina em equilíbrio ....	53
<b>Figura 16.b)</b> Especificação da sulfadiazina em relação ao pH do meio.....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Ensaio de toxicidade padronizados que empregam minhocas como organismo-teste.....	11
<b>Tabela 2.</b> Propriedades físico-químicas da sulfadiazina.....	22
<b>Tabela 3.</b> Toxicidade do antimicrobiano sulfadiazina a espécies terrestres e aquáticas.....	25
<b>Tabela 4.</b> Dados químicos e físicos do solo artificial tropical (SAT) preparado para uso nos ensaios de fuga.....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ASTM	American Society for Testing and Materials
CAS	Chemical Abstracts Service
CENO	Maior Concentração de Efeito Não Observado
CE	Concentração Efetiva
CEO	Menor Concentração de Efeito Observado
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CI	Concentração de Inibição
CL	Concentração Letal
CMRA	Capacidade Máxima de Retenção de Água
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
DIN	Deutsches Institut für Normung
EMEA	European Medicines Agency
EPA	Environmental Protection Agency
IPT	Instituto de Pesquisas Tecnológicas
ISO	International Organization for Standardization
LMR	Limite Máximo de Resíduo
MM	Massa Molar
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
PABA	Ácido Paraminobenzóico
PV	Pressão de Vapor
SAT	Solo Artificial Tropical
SDZ	Sulfadiazina
SINDAN	Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal
VICH	International Cooperation on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products

# 1 INTRODUÇÃO

A repelência que certas substâncias tóxicas causam à fauna terrestre é conhecida há muito tempo, tendo sido quantificada em diversos grupos animais. Diferentemente das plantas, a maioria dos animais se desloca para ambientes mais adequados as suas atividades de alimentação e reprodução, por exemplo, fazendo uso de sensores e sinais químicos que lhes permite igualmente evitar alimento ou ambiente deletério.

Tanto a atração quanto a repulsão são características que aumentam a aptidão ecológica de certas espécies animais e a observação de seus comportamentos em ensaios controlados constitui-se ferramenta útil na avaliação de risco ambiental para solos suspeitos ou sabidamente contaminados e na determinação da toxicidade de substâncias químicas.

O solo tem sido utilizado por gerações como receptor de substâncias resultantes da atividade antropogênica, mas suas características de depuração e imobilização são limitadas, podendo sua qualidade ser alterada devido ao efeito da disposição de resíduos urbanos, industriais e oriundos de práticas agrícolas desenfreadas.

O agronegócio brasileiro vem aumentando sua competitividade em nível nacional e internacional em parte devido à utilização em larga escala de medicamentos veterinários, que servem principalmente para prevenir e tratar doenças, incrementando a produção animal e a lucratividade.

Pertencendo a diferentes classes terapêuticas, os fármacos utilizados nos medicamentos podem apresentar atividades antimicrobianas, antiparasitárias, anti-inflamatórias, antissépticas, entre outras. Dentre os antimicrobianos, os fármacos sintéticos da classe das sulfonamidas têm sido amplamente empregados, com uso intensivo desde antes da descoberta da penicilina até os dias atuais.

Grande parte dos antimicrobianos administrados aos animais, no entanto, não é completamente absorvida, sendo que de 30 a 90% do fármaco original ou seus

metabólitos são excretados pelo organismo do animal, podendo atingir o meio ambiente e manter-se bioativo, podendo causar impactos sobre os ecossistemas aquáticos e terrestres, além de desencadear o surgimento de resistência bacteriana.

Considerada uma preocupação emergente na área das ciências ambientais, a falta de informações sobre o comportamento e destino de resíduos de antimicrobianos no solo impede correlações mais precisas entre o potencial de exposição e possíveis danos à saúde ambiental, e, por extensão, à saúde humana.

No contexto ecotoxicológico, os ensaios para aferir a qualidade do solo e o efeito de substâncias químicas sobre o comportamento animal surgem como uma ferramenta adicional, além das análises físicas e químicas, para o levantamento de características sobre a toxicidade no meio terrestre.

É recente o desenvolvimento de um ensaio de fuga com minhocas – principais organismos representantes da biota terrestre – em solo natural ou artificial, cujas vantagens incluem: alta sensibilidade; relativa facilidade de execução; capacidade de avaliação rápida do estresse subletal e medição de um parâmetro ecológico não aferido por ensaios agudos ou crônicos.

Tomando-se como modelo de antimicrobiano a sulfonamida sulfadiazina, utilizada de forma extensiva na produção animal, procura-se buscar respostas para a insegurança ambiental que permeia o uso desses medicamentos veterinários nos rebanhos animais por meio do emprego de ensaios de comportamento de fuga com a espécie de anelídeo *Eisenia andrei* (minhoca vermelha-da-califórnia), representante da fauna macroscópica terrestre.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

A presente pesquisa tem como objetivo geral a avaliação do efeito do antimicrobiano sulfadiazina em solo sobre o comportamento de fuga de minhocas (*Eisenia andrei*), de acordo com a NBR ISO 17512-1 (ABNT, 2011).

### 2.2 Objetivos específicos

Como objetivos específicos têm-se:

- ✓ Estabelecer uma metodologia alternativa de cultivo de *Eisenia andrei*, com controle zootécnico voltado à obtenção de organismos viáveis para ensaios ecotoxicológicos.

- ✓ Validar o ensaio de fuga com a substância de referência, ácido bórico ( $H_3BO_3$ ), visando à elaboração da carta-controle de sensibilidade e ao atendimento dos demais critérios de validação do método;

- ✓ Determinar a faixa de concentração subletal de sulfadiazina em solo artificial tropical (SAT) sobre as minhocas *Eisenia andrei* e comparar com os dados ambientais disponíveis;

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Nesse tópico será apresentada uma visão geral sobre a qualidade de solos, os princípios da abordagem ecotoxicológica, a biologia do organismo-teste *Eisenia andrei* e as características do antimicrobiano sulfadiazina.

#### 3.1 Qualidade do solo

O solo é um compartimento natural do ambiente que deve ser preservado porque serve, principalmente, como meio para a sustentação da vida e de habitat para animais, plantas e demais organismos.

Além de manter o ciclo de água e nutrientes, o solo é utilizado para produzir alimentos e outros bens primários de consumo, proteger as águas superficiais e subterrâneas e atuar como filtro natural, tampão e meio de adsorção, degradação e transformação de substâncias químicas e organismos (CONAMA, 2009).

Embora o homem venha utilizando o solo há décadas como receptor dos refugos de suas atividades, sua capacidade em depurar e imobilizar impurezas é limitada e suas características podem ser alteradas devido ao crescente efeito da disposição de resíduos urbanos, industriais, tóxicos e radioativos, além da aplicação de agrotóxicos e fertilizantes (CETESB, 2012).

Atualmente, a contaminação dos solos representa um problema ambiental que interfere negativamente nas funções ecológicas terrestres, podendo levar à contaminação das águas superficiais e subterrâneas e à bioacumulação e biomagnificação de compostos químicos nas cadeias tróficas, com potencial para afetar a saúde humana.

Na avaliação da qualidade do solo, os bioensaios surgem como ferramentas úteis para aferir a toxicidade potencial dos contaminantes, com foco em suas frações biodisponíveis (LOUREIRO; SOARES; NOGUEIRA, 2005).

### **3.2 A abordagem ecotoxicológica terrestre**

A ecotoxicologia estuda os efeitos de substâncias químicas sobre os organismos no ambiente, visando à proteção da estrutura e funcionamento dos ecossistemas. Esse objetivo pode ser alcançado avaliando-se os efeitos da substância de interesse sobre espécies isoladas de organismos-teste selecionados, com o intuito de extrapolar as concentrações de efeito observado (ou não observado) para níveis seguros às populações e comunidades.

Van Gestel (2012) distingue duas principais abordagens para a avaliação de riscos ecotoxicológicos. A abordagem preditiva (prognóstica) busca prever os possíveis efeitos de substâncias químicas (geralmente novas) visando regular seu uso ou impedir sua introdução no mercado. Esta abordagem utiliza ensaios laboratoriais para obter os dados de toxicidade, que são utilizados para determinar os níveis de segurança para os produtos químicos no ambiente.

A segunda abordagem (diagnóstica) busca avaliar o dano ecológico real em caso de poluição. Essa abordagem permite estabelecer prioridades para a remediação e redução de riscos, e pode fornecer estratégias para a gestão de solos contaminados.

O prognóstico inicia-se a partir dos paradigmas empregados também em toxicologia humana. Assume-se que o risco que substâncias químicas apresentam para os ecossistemas pode ser estimado a partir de sua toxicidade a um número de ensaios alternativos ou espécies indicadoras, expostas em ensaios de toxicidade padronizados (VAN GESTEL, 2012).

A meta de tais ensaios é a de avaliar o potencial de toxicidade dos compostos químicos, que é expressa em termos de relação dose-resposta para efeitos sobre parâmetros selecionados como sobrevivência, crescimento e reprodução.

A toxicidade pode ser quantificada por parâmetros como CL10 e CL50 (a concentração que, respectivamente, mata 10% e 50% dos organismos-teste expostos), CE10 e CE50 (a concentração que causa, respectivamente, 10% e 50% de redução em um parâmetro observado, como por exemplo, mobilidade, crescimento ou número de

organismos jovens produzidos) e CENO e CEO (concentração de efeito não observável e de menor efeito observável, respectivamente).

Como não existe a "espécie mais sensível", uma bateria de ensaios de toxicidade é necessária para obter um panorama adequado do risco potencial de determinado produto químico para o ecossistema. Na abordagem prognóstica, os resultados dos ensaios são usados para estabelecer níveis seguros de concentração de substâncias químicas no solo, que podem ser comparados com os dados de concentrações medidas ou estimadas, para avaliação de risco.

Uma parte crítica desse processo é a derivação de níveis de segurança para substâncias químicas baseada em dados disponíveis de toxicidade. Quando dados referentes a um número limitado de espécies ou apenas dados de toxicidade aguda (letalidade, por exemplo) estão disponíveis, fatores de aplicação (de certa forma arbitrários) são utilizados na determinação dos níveis de segurança considerados a proteger os ecossistemas.

Quando apenas um ou dois valores de CL50 estão disponíveis, pode-se dividir o menor valor de CL50 por 1000; tal procedimento parece ser suficiente para extrapolar os efeitos de agudo para crônico (1ª divisão do valor de CL50 por 10), de uma ou poucas para várias espécies (2ª divisão por 10), e de laboratório para campo (3ª divisão por 10). Quando dados de toxicidade subletais (crônicos) estão disponíveis para três ou mais espécies, a simples divisão por 10 do valor mais baixo é considerado suficientemente protetor. Quando muitos dados de toxicidade (preferencialmente  $\geq 8$ ) encontram-se disponíveis para espécies representativas de diferentes grupos taxonômicos, métodos estatísticos podem ser aplicados a esses dados, adotando-se o limite inferior a 95% de confiança como o nível seguro que supostamente protege pelo menos 95% das espécies do ecossistema (POSTHUMA et al . 2002, apud VAN GESTEL, 2012).

Dada essas informações, vale pontuar o histórico recente da ecotoxicologia terrestre, que teve seu início na década de 1960, com trabalhos que relataram efeitos negativos do uso de agrotóxicos na diversidade e abundância de invertebrados do solo (EDWARDS, 1969; FOX, 1964). Tais observações desencadearam o surgimento e

desenvolvimento de ensaios de toxicidade com organismos selecionados, visando estimar em laboratório os efeitos adversos da utilização em campo de substâncias perigosas (VAN GESTEL, 2012).

Comparado ao desenvolvimento da ecotoxicologia aquática, a terrestre teve sua importância reconhecida tardiamente pela comunidade científica, o que também influenciou a escassa quantidade de métodos de ensaios padronizados até o momento (ROMBKE; KNACKER, 2003).

Segundo Van Gestel (2012), os primeiros trabalhos propondo ensaios de toxicidade em solo datam de 1967 e empregaram colêmbolos e minhocas em contato com pesticidas, mas somente após quinze anos houve o primeiro esforço de padronização internacional de um ensaio de toxicidade com invertebrados, pela Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD, 1984), focando apenas efeito agudo (letalidade) em oligoquetas do gênero *Eisenia* spp.

O início das discussões sobre os ensaios interlaboratoriais e a padronização do primeiro ensaio de toxicidade aguda com minhocas (OECD, 1984) catalisou a emergência do uso dos oligoquetas como organismos-chave em toxicologia ambiental e tornou a espécie *Eisenia fetida* um organismo modelo para a avaliação de efeitos de substâncias químicas sobre invertebrados saprófitas terrestres (SPURGEON; WEEKS; VAN GESTEL, 2003).

Atualmente, pode-se pontuar que o gênero *Eisenia* spp está para a ecotoxicologia terrestre assim como o gênero *Daphnia* spp está para a ecotoxicologia aquática, considerando o grande número de trabalhos publicados que empregam esses modelos animais em seus sistemas de ensaio, para aferir a toxicidade de substâncias químicas ou amostras ambientais.

### **3.2.1 Os sistemas de ensaios em solo**

Por não demonstrarem a magnitude de efeitos sobre o ecossistema, as análises químicas isoladamente falham em retratar o grau de impacto ambiental dos poluentes, enquanto os sistemas biológicos de ensaio, constituídos por organismos ou

parte deles, são capazes de detectar a toxicidade das substâncias químicas sobre o ambiente terrestre.

À medida que aumenta o nível de complexidade das novas substâncias que são constantemente desenvolvidas e lançadas no ambiente, mais importante torna-se a utilização de ensaios de toxicidade na avaliação ambiental. Os resultados de tais ensaios agregam informações sobre o potencial de interação entre substâncias (efeitos aditivos, antagônicos e sinérgicos) e sua biodisponibilidade (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

Os sistemas ecotoxicológicos terrestres são utilizados para obter informação acerca dos efeitos dos contaminantes no solo e são propostos como uma complementação à análise química convencional (ABNT, 2011).

Os sistemas aquáticos de ensaio que utilizam como amostras eluatos de solo aplicam-se à obtenção de informações sobre a fração dos contaminantes que tem potencial de atingir a água subterrânea. Nesses sistemas são avaliadas a função de retenção, que é a habilidade do solo em absorver os poluentes de tal forma que eles não possam ser mobilizados por via aquática e transportados através da cadeia trófica (HUND-RINKE; WIECHERING, 2001).

Já os sistemas terrestres de ensaio são utilizados para avaliar a função de habitat dos solos, definida como a habilidade de determinado solo ou material de solo em servir de abrigo para microrganismos, vegetais e demais organismos habitantes desse meio e suas interações (ABNT, 2011).

Tal função pode ser prejudicada pela presença de contaminantes, que podem se apresentar em distintas frações no solo, sendo algumas delas biodisponíveis e, portanto, capazes de serem absorvidas por organismos que dependem tanto das condições físico-químicas do solo (pH, teor de argila, capacidade de troca catiônica e quantidade de matéria orgânica), quanto da forma química do elemento ou substância considerada.

No entanto, a determinação do conteúdo total das substâncias químicas presentes em um solo, além de inviável financeira e operacionalmente, não é suficiente para avaliar o risco ecológico inerente de um solo contaminado.

Ensaio agudos e crônicos foram os primeiros a serem desenvolvidos e têm se mostrado ferramentas úteis na avaliação ecotoxicológica. Em relação aos ensaios com organismos terrestres, as minhocas – os principais representantes da macrofauna terrestre – têm sido empregadas com frequência. No entanto, recomenda-se o desenvolvimento e a padronização de ensaios com outros grupos da fauna terrestre, principalmente porque alguns, como os artrópodes, estão mal representados no rol de ensaios atualmente disponíveis e constituem a maioria dos invertebrados no ambiente (VAN GESTEL, 2012).

O efeito agudo, geralmente indicado pela mortalidade ou letalidade, representa o dano máximo que determinado organismo pode sofrer e a concentração do agente tóxico que é necessária para provocar o efeito observado (HUND-RINKE; WIECHERING, 2001).

O efeito subletal, também conhecido por efeito crônico, é geralmente representado pelo impacto sobre a reprodução e o crescimento do organismo, e geralmente tem preferência sobre a resposta aguda na obtenção de informação sobre efeitos ambientais, além de ser considerado mais relevante em relação aos efeitos em nível populacional (MORIARTY, 1983; VAN GESTEL, 2012).

Os ensaios padronizados de reprodução com minhocas *Eisenia fetida* ou *Eisenia andrei* (ISO, 1998; OECD, 2004b) e com o enquitreídeo *Enchytraeus albidus* (ISO, 2004; OECD, 2004a) consistem em expor os organismos adultos por 21 e 28 dias, respectivamente, no solo, após o que são retirados e os casulos são incubados por mais 28 e 21 dias, respectivamente, para permitir determinar o número de juvenis produzidos.

A ecotoxicologia terrestre explorou, após a década de 1980, possibilidades de desenvolvimento de ensaios de toxicidade com diferentes invertebrados do solo, incluindo minhocas, enquitreídeos, colêmbolos, nematoides, besouros estafilinídeos, quilópodes (centopeias), diplópodes (piolhos-de-cobra) e isópodos (tatuzinho de

jardim), envolvendo interação entre espécies e respostas baseadas em efeitos subletais (LOKKE; VAN GESTEL, 1998). Imagens de alguns desses representantes da meso e macrofauna terrestres podem ser conferidas na **Figura 1**.

É fato que a lista dos ensaios disponíveis não está completa nem balanceada, encontrando-se mais ensaios empregando determinado grupo de organismos e raros estudos empregando outros grupos. Ainda, são recomendáveis futuras adaptações nas metodologias dos ensaios para que eles tornem-se aplicáveis à detecção de novas e emergentes substâncias, como as nanopartículas.



a) Minhoca  
(*Eisenia andrei*)



b) Colêmbolo  
(*Folsomia candida*)



c) Enquitreídeo  
(*Enchytraeus albidus*)



d) Isopoda  
(*Porcelio scaber*)

**Figura 1.** Principais organismos utilizados em ecotoxicologia terrestre

Fonte das imagens (organismos fora de escala):

- a) <http://img687.imageshack.us/img687/7362/efetidalg.jpg>
- b) <http://enfo.agt.bme.hu/drupal/sites/default/files/DSCN8200.jpg>
- c) [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fa/Enchytraeus\\_albidus.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/fa/Enchytraeus_albidus.jpg)
- d) [http://www.gardensafari.net/pics/duizendpoten/porcellio\\_scaber\\_hs3\\_0806.jpg](http://www.gardensafari.net/pics/duizendpoten/porcellio_scaber_hs3_0806.jpg)

Atualmente há diversos ensaios de toxicidade em que se avaliam efeitos subletais em invertebrados terrestres como minhocas, enquitreídeos e colêmbolos, padronizados por órgãos internacionais, tais como *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) e *International Standardization Organization* (ISO); além de métodos similares propostos por *Environment Canada*; *United States*

*Environmental Protection Agency (EPA) e ASTM International* (anteriormente conhecida como *American Society for Testing and Materials*), dos quais os testes com oligoquetas são os mais conhecidos, devido ao fato das minhocas serem consideradas organismos representativos da biocenose terrestre.

Uma seleção das versões atuais dos protocolos padronizados de ensaios de toxicidade disponíveis com minhocas, elaborados por instituições reconhecidas, é apresentada na **Tabela 1**.

**Tabela 1.** Ensaio de toxicidade padronizados que empregam minhocas como organismo-teste.

<b>Efeito</b>	<b>Duração (dias)</b>	<b>Espécie</b>	<b>Documento / Norma</b>	<b>Referência</b>
Letalidade	14	<i>Eisenia fetida</i>	OECD 207	OECD (1984)
			ISO 11268-1	ISO (1993)
			ABNT NBR 15537	ABNT (2007)
Reprodução	28 (+28) <sup>(1)</sup>	<i>Eisenia fetida</i>	ISO 11268-2	ISO (1998)
			OECD 222	OECD (2004)
Fuga / Evitamento	2	<i>Eisenia andrei</i>	ISO 17512-1	ISO (2008)
			ABNT NBR ISO 17512-1	ABNT (2011)
Bioacumulação	Até 21 (+21) <sup>(2)</sup>	<i>Eisenia fetida</i>	OECD 317	OECD (2010)
	7 a 28		ASTM E1676-12	ASTM (2012)
Abundância e diversidade em campo	Até 365	Múltiplas espécies	ISO 11268-3	ISO (1999)

<sup>(1)</sup>: 28 dias para produção de casulos + 28 dias para eclosão de juvenis.

<sup>(2)</sup>: 1ª etapa: até 21 dias para absorção da substância-teste; 2ª etapa: 21 dias para eliminação.

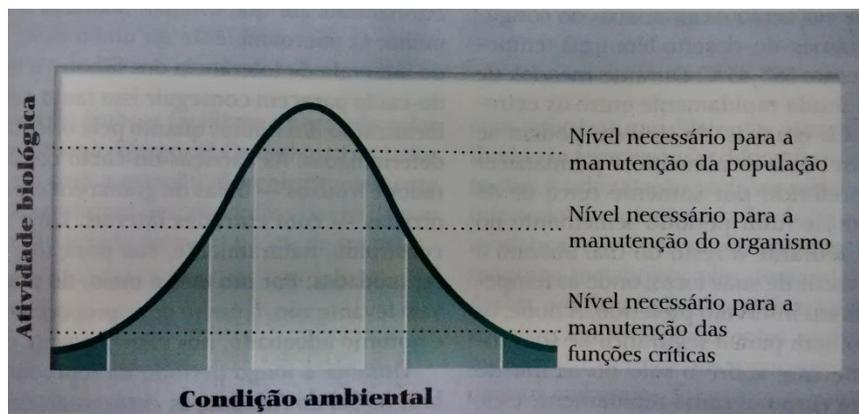
### 3.2.1.1 Ensaios comportamentais e de fuga

A despeito da popularidade dos ensaios de toxicidade aguda e crônica com minhocas, para avaliar o risco potencial de substâncias químicas na função de habitat do solo, existe a ressalva de que tais ensaios foram desenvolvidos principalmente para regiões temperadas, sendo que o comportamento químico de certas substâncias pode ser alterado quando em regiões tropicais. A norma brasileira (ABNT, 2007) que trata do ensaio agudo com minhocas é uma tradução da norma ISO 11268-1 publicada em 1993, e a primeira versão em português não descreve adaptações metodológicas para as condições tropicais.

Além disso, restrições relacionadas à dificuldade de se avaliar efeitos populacionais com os testes agudos e o longo período de duração dos testes de reprodução (56 dias), além do fato de serem trabalhosos, têm chamado a atenção para o desenvolvimento de testes mais rápidos e que sejam sensíveis e ecologicamente relevantes (SILVA; VAN GESTEL, 2009).

Os testes comportamentais configuram-se como uma alternativa na avaliação da toxicidade de substâncias químicas, fornecendo respostas baseadas na alteração do comportamento do organismo frente às condições subótimas de exposição.

As condições ambientais requeridas por determinado organismo apresentam faixas de tolerância e níveis adequados para a manutenção das atividades biológicas, como exposto na **Figura 2** (RICKLEFS, 2001).



**Figura 2.** Gradiente de condições ambientais (ex: pH, temperatura, toxicidade) que regem os níveis de atividade biológica dos organismos. Fonte: RICKLEFS (2001).

Estressores químicos ou condições naturais extremas podem comprometer os processos biológicos, desviando a faixa ótima de variação requerida pelo organismo, que pode exibir uma resposta induzida pelo estresse. A toxicologia comportamental estuda as alterações de comportamento dos organismos associada a essas situações.

Representando a interação de processos fisiológicos com estímulos ambientais, a resposta comportamental reflete o efeito de todos os níveis do organismo: molecular, celular, fisiológico (GRUE et al., 2002).

Classes de comportamentos como a escolha de habitat, captura de presas e fuga de predadores afetam os padrões de dinâmica populacional e estrutura de comunidades, por alterar variáveis demográficas fundamentais como nascimento e morte. A toxicologia comportamental pode, portanto, auxiliar na predição dos possíveis efeitos tóxicos de certas substâncias na aptidão das espécies testadas e suas consequências em nível populacional (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

A resposta comportamental é fundamentalmente um efeito em nível do organismo, que pode ser definida como a ação, reação ou ativação de determinado sistema, sob um conjunto de condições específicas que representa a integração dos processos bioquímicos e fisiológicos. Além disso, o comportamento como *endpoint* (parâmetro final de observação) em ecotoxicologia está ganhando cada vez mais reconhecimento devido a sua sensibilidade ser considerada dez a mil vezes maior que

a convencional concentração letal mediana, a CL50 (HELLOU et. al, 2008; HELLOU, 2011; ROBINSON, 2009).

Quando expostos a determinados contaminantes, os organismos podem exibir certas respostas comportamentais em potencial, tais como: fuga; senso de equilíbrio ou direção alterado; escavação anormal do substrato; fobias; alimentação, locomoção e respiração alteradas, entre outras, sendo que o comportamento de fuga normalmente é o primeiro sinal prontamente demonstrado pelo organismo, como mecanismo de defesa, antes de sucumbir a outros efeitos menos imediatos da exposição a condições adversas (HELLOU, 2011).

O comportamento de fuga em minhocas já foi também relatado na atividade comercial da minhocultura. Segundo Guimarães (2007), a reação de repelência que uma minhoca exibe sob condições adversas acaba sendo replicada pelas demais que vivem no mesmo substrato. Causas como substrato ressecado ou exageradamente hidratado, escassez de alimento, acidez elevada do substrato, substrato mal preparado ou em processo de fermentação, presença de contaminantes e temperatura baixa fazem com que as minhocas rejeitem permanecer em determinado local e busquem por outro mais adequado.

A tigmotaxia positiva é a necessidade que a minhoca possui de sentir seu corpo constantemente envolto por um substrato. Por isso, durante a fuga nos criatórios, podem se formar aglomerações de minhocas em determinados pontos, pois, com esse comportamento de fuga interrompida, o conjunto de minhocas faz o papel de um próprio substrato, embora tais condições não permitam a alimentação e podem causar asfixia, além de sujeitar os indivíduos ao ressecamento, o que pode causar a morte do grupo em curto prazo (GUIMARÃES, 2007).

Estudos sobre os parâmetros de observação em ecotoxicologia comportamental geralmente fazem um ranqueamento dos sinais demonstrados pelos organismos quando expostos a condições adversas, ou seja, uma lista dos sintomas que primeiro surgem, e as reações demonstradas na sequência. No caso da mais comumente estudada contaminação do solo por metais, a sequência de efeitos em caranguejos foi descrita por Hebel et al. (1997). Por exemplo, o cobre (produzido a

partir da mineração, encontrado em tintas anti-incrustantes, fungicidas, preservantes de madeira e pastilhas de freio) pode causar uma série de resultados deletérios começando com a fuga e progredindo para uma redução no ritmo de alimentação e, eventualmente, produção de hormônios sexuais, alterando em seguida a função cardíaca e respiratória, seguida por danos celulares levando à morte. Quando analisadas em conjunto, esta sucessão de “parâmetros tóxicos” demonstra a importância do comportamento de fuga como um sinal de alerta precoce e a ligação desse parâmetro com os efeitos em nível populacional.

Já os produtos farmacêuticos, juntamente com os de higiene pessoal, vem sendo estudados há poucos anos e não há dados disponíveis que correlacionem a presença de antimicrobianos às eventuais alterações do comportamento animal. No campo dos contaminantes emergentes, os estudos focam em geral o igualmente importante mecanismo da desregulação endócrina, provocada pela presença de hormônios sexuais, antidepressivos ou pesticidas no ambiente (HELLOU, 2011). Uma série de estudos toxicológicos sobre interferentes endócrinos demonstra também a interessante diferença entre as curvas monotônicas de dose-resposta convencionalmente esperadas em resultados ecotoxicológicos e as curvas em forma de “U” ou de U invertido – “∩” – associadas aos compostos emergentes (CLOTFELTER et al., 2004; ZALA; PENN, 2004).

Por ser um sintoma facilmente detectado em diversos animais expostos a contaminantes, o comportamento de fuga pode ser estudado em bioensaios controlados. Um teste comportamental dos mais conhecidos e empregados em ecotoxicologia terrestre é o ensaio de fuga com minhocas, também denominado teste de evitamento, escape ou *avoidance test* (YEARLEY; LAZORCHAK; GAST, 1996; STEPHENSON et al., 1998). Neste trabalho é utilizada a expressão ensaio de fuga, presente na recente norma editada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2011). De utilização ainda incipiente no país, o ensaio faz uso da capacidade seletiva das minhocas de, por meio de seu sistema sensorial, preferir determinado substrato em detrimento de outro, “fugindo” então do meio menos adequado, segundo critério fisiológico animal, em determinado período de tempo.

Estudos prévios demonstraram a capacidade das minhocas em detectar compostos como: óleo mineral, hidrocarbonetos poliaromáticos, de petróleo (óleo cru) e em misturas complexas; substâncias como cloreto de potássio, cloreto de amônio, sulfato de cobre; elementos como zinco, manganês e misturas contendo metais potencialmente tóxicos; além de agrotóxicos de controle prioritário, tais quais: benomila, carbendazim, lambda-cialotrina e mancozebe (HUND-RINKE; WIECHERING, 2001; REINECKE et. al, 2002; SCHAEFER, 2001; SCHAEFER, 2003; STEPHENSON et. al, 1998)

Garcia et. al (2008) avaliaram a resposta de fuga de *Eisenia fetida* a três pesticidas de importância para a Amazônia brasileira (benomila, carbendazim e lambda-cialotrina), comparando os resultados de toxicidade obtidos com aqueles de letalidade (ensaio agudo) e reprodução (crônico), executados em paralelo, e concluíram que o ensaio de fuga fornece resultados confiáveis e reprodutíveis e cujos resultados encontram-se na ordem de grandeza semelhante aos resultados dos ensaios de reprodução, com duração de 56 dias, embora seja prematuro recomendar sua substituição. Os autores fazem ressalva acerca do nível de abrangência do ensaio de fuga, cuja extensão depende da substância química e do tipo de solo utilizados.

De acordo com Aldaya et al. (2006), há algumas limitações para a larga utilização dos ensaios de fuga como alternativa a uma avaliação direta da toxicidade. Algumas substâncias, como os sais de cádmio, não são percebidos como repelentes, embora sejam tóxicos quando os animais são forçosamente expostos a eles, o que significa que embora a substância tóxica não possa ser detectada e evitada no ambiente, ela pode destruir populações inteiras, diferente de outras substâncias das quais os animais conseguem escapar (GREENSLADE; VAUGHAN, 2003).

Não se conhece publicação – em nível internacional – relatando efeito de antimicrobianos sobre o comportamento de fuga em minhocas, no que a proposta do presente trabalho tenta suprir essa lacuna. Os efeitos residuais dos antimicrobianos no ambiente são pouco estudados e os dados ecotoxicológicos relevantes infelizmente são escassos, e, quando disponíveis, tratam em sua maioria de efeitos agudos.

Sabe-se, no entanto, que os antimicrobianos podem apresentar efeitos adversos sobre organismos não-alvos, por isso a necessidade de verificar efeitos menos intensos, subagudos, em representantes da biocenose terrestre.

### **3.3 A detecção química em minhocas**

As minhocas possuem a capacidade de distinguir de maneira rápida diferentes tipos de alimento e reagir a uma diversidade de estímulos químicos. Tais reações provavelmente auxiliam na procura por alimento, fornecem alertas sobre condições adversas do ambiente (como a acidez do solo) e ajudam na cópula pela detecção de secreções mucosas dos outros indivíduos (EDWARDS; BOHLEN, 1996).

O elevado número de quimiorreceptores, concentrados no prostômio (proeminência dorsal que recobre a boca) e nos segmentos anteriores do corpo das minhocas, assim como a distribuição de papilas epidérmicas e terminações nervosas ao redor dos segmentos corporais, contribuem para a capacidade das minhocas responderem aos estímulos químicos do ambiente (SCHAEFER, 2003).

Essa região corporal também se relaciona com a capacidade olfatória dos anelídeos e já foi testada na identificação de sacarose, glicose e quinina e sugerida como envolvida na coordenação do movimento coletivo e nas estratégias de forrageamento: fungos terrestres constituem fontes de alimento particularmente importantes para as minhocas, em especial as espécies epigéicas, que consomem folhas em decomposição colonizadas por fungos (ZIRBES et al., 2011).

O epitélio da região bucal abriga grupos de células sensoriais que podem ser estimuladas por substâncias químicas relacionadas à palatabilidade. Tais sensores entram em contato com o alimento quando a câmara bucal everte-se na tomada de alimento. Essa sensibilidade de detecção química, aliada às habilidades locomotoras, confere às minhocas a capacidade de evitar habitats adversos (STEPHENSON et al., 1998).

### 3.4 Antimicrobianos sulfonamidas

Apenas a comercialização de antimicrobianos no Brasil representa um terço do mercado de medicamentos veterinários (SINDAN, 2013).

O agronegócio brasileiro tem na produção animal uma de suas atividades de maior expressão, cuja produtividade e competitividade do setor são comumente asseguradas devido à utilização de medicamentos com finalidades terapêuticas e profiláticas.

Dentre os antimicrobianos utilizados pela indústria veterinária, as sulfonamidas são ácidos orgânicos fracos, sintéticos, de aplicação agropecuária. São amidas de ácidos sulfônicos, de fórmula geral  $R-SO_2NH-R'$ . Dentre os exemplos de sulfonamidas destacam-se a sulfadiazina, sulfametazina, sulfametoxazol, sulfaquinoxalina, entre outras sulfas (como são conhecidas) de amplo espectro contra bactérias Gram positivas, Gram negativas e protozoários. São indicadas para tratamento e prevenção de infecções intestinais, urinárias, respiratórias e dermatites em animais de corte (frangos, bovinos e suínos), sendo utilizadas no tratamento auxiliar de várias patologias causadas por microrganismos (MARQUES, 2010).

Os microrganismos sensíveis às sulfonamidas exigem a presença de ácido paraminobenzóico (PABA) extracelular para a síntese de ácido fólico, necessário à produção de precursores do material genético. Com estrutura semelhante ao PABA, as sulfonamidas competem pela enzima diidropteroato sintetase, agindo como antimetabólitos e formando análogos não funcionais do ácido fólico. Em consequência, não há formação do material genético bacteriano, o que interfere na replicação celular (GARCÍA-GALÁN; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2009).

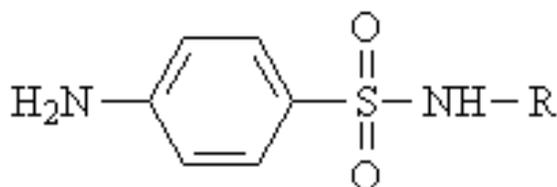
Há diferenças entre os tipos de sulfonamidas com relação ao nível de ligação às proteínas plasmáticas, sendo que quanto menos ligante, mais eficientemente o fármaco consegue transpor as membranas celulares ou se difundir. É a fração livre que exhibe efeitos farmacológicos e que pode ser metabolizada ou excretada (MARQUES, 2010).

Geralmente utilizadas na forma oral, embora existam preparações para uso parenteral, as sulfonamidas são parcialmente metabolizadas no fígado, sendo eliminadas principalmente pelas fezes e urina, na forma original ou de seus metabólitos, alcançando o ambiente diretamente em sistemas de aquicultura ou por animais de pasto, e indiretamente quando da aplicação de esterco e lixiviado de aterro sanitário no solo (SUKUL; SPITELLER, 2006).

Quimicamente, as sulfonamidas são formadas por um anel benzênico, um radical amina (-NH<sub>2</sub>) e um grupo sulfonamida (-SO<sub>2</sub>NH-) (**Figura 3**). De caráter anfotérico, possuem grupos funcionais que podem doar ou receber um próton, dependendo do pH da solução em relação aos valores de pK<sub>a</sub>, podendo assumir característica catiônica, neutra ou aniônica. Os grupos amina e sulfonamida devem estar na posição *para* em relação um ao outro para que a sulfonamida apresente atividade antimicrobiana (SARMAH et al., 2006).

De solubilidade moderada em água (**Tabela 2**), as sulfonamidas são caracterizadas por dois valores de pK<sub>a</sub>: o pK<sub>a1</sub> representa o valor de pH em que ocorre a protonação do grupo básico amina (-NH<sub>2</sub>) e o pK<sub>a2</sub> o valor de pH em que ocorre a desprotonação do grupo ácido sulfonamida (-SO<sub>2</sub>NH). As sulfonamidas anfotéricas se encontram geralmente na forma de sais em fortes soluções ácidas ou básicas.

Devido ao aporte ambiental disseminado pela aplicação de esterco no solo e à atividade biológica remanescente, os medicamentos veterinários estão se tornando alvo da avaliação ecotoxicológica de riscos, no que estudos de sorção podem contribuir na avaliação da mobilidade desses fármacos em solo e demais compartimentos ambientais.



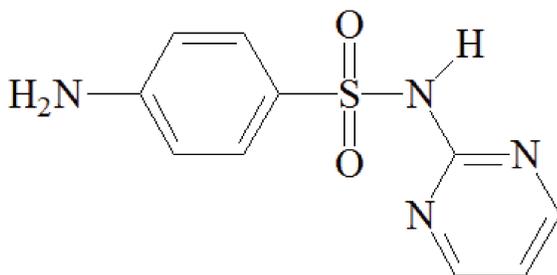
**Figura 3.** Fórmula estrutural de uma sulfonamida padrão

### 3.4.1 Sulfadiazina

As sulfonamidas são classificadas de acordo com sua capacidade de absorção, excreção e ação. A sulfadiazina, um dos tipos mais utilizados em rebanhos de suínos, apresenta ação de duração intermediária (10 a 12 horas) e absorção e excreção relativamente rápidas, implicando em um curto período de carência (aproximadamente 5 dias).

Dentre todos os produtos sulfonamídicos com licença brasileira vigente, a sulfadiazina é a substância com maior número de apresentações e consta da lista de prioridades da Coordenação de Fiscalização de Produtos Veterinários (CPV) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2013).

A sulfadiazina, cuja estrutura química pode ser observada na **Figura 4**, apresenta os menores valores de forças de ligação às proteínas plasmáticas e alta lipossolubilidade, que, segundo Marques (2010), lhe conferem elevada biodisponibilidade (85 a 90,3%).



**Figura 4.** Fórmula estrutural da sulfadiazina

Nas excretas de animais tratados, a sulfadiazina pode ser encontrada na forma de seu composto parental ou como um de seus quatro metabólitos, dos quais os principais são a N-acetilsulfadiazina (inativa do ponto de vista microbiológico) e a 4-hidroxisulfadiazina, que apresenta atividade antimicrobiana.

Antes da aplicação no campo, geralmente o esterco usado como fertilizante do solo fica estocado por várias semanas, sendo que a sulfadiazina e seus metabólitos

podem ser enzimaticamente degradados durante esse período, mas também seus metabólitos podem ser reativados, tornando-se substâncias biologicamente ativas.

Fator importante a se considerar quando da relação interativa fármaco x ambiente é o grau de sorção do antimicrobiano às partículas de solo, que pode ser tão variável quanto sua mobilidade.

Segundo Doretto (2012), a sulfadiazina possui alta mobilidade, de acordo com os baixos valores experimentais obtidos para os coeficientes de distribuição ( $K_D$ ) e de Freundlich ( $K_F$ ) em quatro tipos de solo do Estado de São Paulo, indicando baixa capacidade de adsorção e maior potencial de lixiviação.

As sulfonamidas são compostos polares e sua carga pode variar conforme o pH do solo, sendo que seu valor de  $pK_{a2}$  encontra-se geralmente na mesma faixa de pH do solo, influenciando no comportamento de adsorção-dessorção.

Na **Tabela 2** são apresentadas algumas propriedades físico-químicas da sulfadiazina, como sua massa molar e seus valores de  $pK_a$  mais frequentes na literatura. Os baixos valores de pressão de vapor e constante de Henry, aliados à solubilidade baixa, indicam igualmente baixo potencial de volatilização, mas tendência de adsorção a materiais particulados e sedimentos (COSTA et al., 2008).

No entanto, o baixo valor de coeficiente de partição octanol-água da sulfadiazina, em parte devido aos seus grupos funcionais ionizáveis, sugere maior mobilidade no solo e menor potencial de bioacumulação nos tecidos de organismos e, conseqüentemente, na cadeia trófica (REGITANO; LEAL, 2010).

**Tabela 2.** Propriedades físico-químicas da sulfadiazina

<b>MM</b> <b>(g mol<sup>-1</sup>)</b>	<b>Solubilidade</b> <b>em água</b> <b>(mg L<sup>-1</sup>)</b>	<b>pK<sub>a1</sub></b>	<b>pK<sub>a2</sub></b>	<b>PV</b> <b>(mmHg)</b>	<b>K<sub>ow</sub></b>	<b>Constante de</b> <b>Henry</b> <b>(atm m<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup>)</b>
250,3	77 (25°C)	1,6	6,4	4,31 10 <sup>-8</sup>	0,813	1,60 10 <sup>-10</sup>

MM: massa molar; pK<sub>a1</sub> e pK<sub>a2</sub>: constante de basicidade e acidez; PV: pressão de vapor; K<sub>ow</sub>: coeficiente de partição octanol-água. Fonte: CAS (2013); Thiele-Bruhn et. al (2004).

### 3.4.2 Antimicrobianos no ambiente

Embora a eliminação de resíduos de antimicrobianos seja uma preocupação constante de produtores, principalmente com relação a animais destinados ao abate, o uso impróprio de medicamentos, com doses e duração do tratamento acima do recomendado pelos fabricantes e o desrespeito aos períodos de carência tem levado a uma crescente preocupação acerca da presença de medicamentos acima do limite máximo residual (LMR) permitido pela legislação.

A Agência Europeia para Avaliação de Produtos Medicinais fixou um limite genérico de 100 µg kg<sup>-1</sup> para fármacos veterinários em solo (EMEA, 2008), no entanto, pouco se conhece sobre a presença das sulfonamidas no ambiente, proveniente de resíduos da excreção direta dos animais medicados ou das excretas humanas após consumo dos produtos de origem animal (leite e carne), e seus consequentes efeitos tóxicos sobre o ecossistema como um todo, apresentando efeitos adversos na biota aquática e terrestre.

Os fármacos administrados aos animais por via oral ou parenteral não são completamente absorvidos, sendo que até 75% da concentração dosada pode ser eliminada pelo sistema digestório e até 90% pelo trato urinário do organismo, tanto na forma do composto original, quanto na forma de metabólitos que podem se transformar no composto parental e atingir o ambiente em sua forma ativa (HALLING-SORENSEN, 2001). A taxa de excreção depende das propriedades físico-químicas do

antimicrobiano, da forma de aplicação, da espécie animal considerada, da duração do tratamento, entre outros fatores (KEMPER, 2008).

Dentre as possíveis vias de entrada de fármacos no ambiente, destacam-se as águas residuárias dos processos de manufatura dos compostos veterinários, que na ausência ou ineficiência de tratamento, contaminam o ambiente aquático no seu lançamento. Também na atividade comercial da aquicultura, fármacos administrados aos peixes, geralmente adicionados à ração, podem igualmente contaminar a água. Já no caso dos fármacos administrados via oral ou injeção, cuja excreção se dá pela urina e fezes dos animais tratados, a disposição do esterco contaminado no solo representa a principal rota de aporte dos resíduos antimicrobianos no ambiente (DORETTO, 2012), assim como a disposição de biossólidos provenientes de estações de tratamento de esgoto (SUKUL; SPITELLER, 2006).

As agências regulamentadoras internacionais preocuparam-se primeiramente em estabelecer programas de monitoramento dos resíduos de antimicrobianos em alimentos comercializados e apenas recentemente os estudos têm focado no impacto desses no ambiente, uma vez que são escassas as informações sobre o comportamento e destino dos antimicrobianos no solo (DÍAZ-CRUZ; LÓPEZ; BARCELÓ, 2003; SARMAH; MEYER; BOXALL, 2006).

Assim, quantidades vultosas dessas substâncias são lançadas ano após ano no ambiente e o impacto de suas dispersões pode alcançar os compartimentos ambientais e os organismos aquáticos e terrestres, além de disseminar o surgimento de resistência bacteriana (DORETTO, 2012).

Até o momento, não há registro de legislação que defina limites específicos para a concentração de fármacos veterinários, incluindo os antimicrobianos, no solo. Segundo abordagem proposta na Conferência Internacional de Harmonização dos Medicamentos Veterinários (VICH), e de acordo com a concentração ambiental preditiva do antimicrobiano ou seus metabólitos, recomenda-se avaliar os efeitos sobre organismos aquáticos e terrestres se o teor for observado acima de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ .

Os valores de concentração de sulfonamidas em esterco já foram reportados em uma faixa de  $10 \mu\text{g kg}^{-1}$  a  $91 \text{ mg kg}^{-1}$  (YANG et al., 2011). Com o estrume sendo

aplicado em campo como fertilizante na dosagem máxima de  $50 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1}$ , os resíduos de sulfonamida no solo podem atingir a concentração de  $1 \text{ kg ha}^{-1}$ , que representa a mesma ordem de magnitude da taxa de aplicação dos pesticidas modernos (SUKUL; SPITELLER, 2006).

Os estudos de toxicidade recomendados para a avaliação de impacto ambiental dos antimicrobianos em organismos aquáticos e terrestres geralmente compreendem a realização de ensaios de toxicidade aguda com peixes e microcrustáceos do gênero *Daphnia* sp (letalidade), enquanto os ensaios terrestres são conduzidos utilizando minhocas (letalidade) e plantas (germinação e crescimento). Todavia, por determinar o dano máximo que o organismo pode suportar, a mortalidade não seria um bom parâmetro a ser empregado nas avaliações, uma vez que sua função protetiva do ambiente é questionável, devendo-se refletir acerca da adoção de parâmetros de observação mais sensíveis, como a alteração do comportamento animal: reação imediata a um estresse químico.

As informações sobre ensaios ecotoxicológicos avaliando concentrações subletais (crônicas) de antimicrobianos são escassas. Na **Tabela 3** são apresentados os resultados disponíveis de ensaios ecotoxicológicos já realizados com o antimicrobiano sulfadiazina.

Demonstra-se que a presença do antimicrobiano no ambiente pode causar efeitos adversos em diferentes organismos pertencentes a distintos níveis tróficos, conforme os dados expostos na **Tabela 3**. Além disso, pode causar alterações nas comunidades microbianas naturais, pela aquisição da resistência bacteriana aos antimicrobianos e a possível transferência dessa característica, alterando a função do solo de servir como um reservatório para microrganismos importantes na manutenção da imobilização mineral e nos processos de decomposição (KEMPER, 2008).

**Tabela 3.** Toxicidade do antimicrobiano sulfadiazina a espécies terrestres e aquáticas.

<b>Espécie não-alvo</b>	<b>Dado de toxicidade</b>	<b>Metodologia</b>	<b>Referência</b>
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> <sup>(1)</sup> (alga unicelular)	Ensaio de inibição do crescimento CE50 = 2,2 mg L <sup>-1</sup>	OECD 201 (1993)	Eguchi et al. (2004)
<i>Cirrhinus mrigala</i> (peixe ciprenídeo)	Taxa de crescimento = 20 mg/100 g (crônico)	não disponível	Ramaiah et al. (1989)
<i>Vibrio fischeri</i> (bactéria marinha)	Ensaio de inibição luminescente CE50 > 25 mg L <sup>-1</sup>	DIN 38412-L34 (1991), modificado	
<i>Arthrobacter globiformis</i> (bactéria terrestre)	Ensaio de inibição enzimática CE50 > 125 mg L <sup>-1</sup>	DIN 38412-L48 (2002), modificado	Bialk-Bielińska et al. (2011)
<i>Scenedesmus vacuolatus</i> (alga unicelular)	Ensaio de inibição de reprodução (crônico) CE50 = 2,22 mg L <sup>-1</sup>	Altenburger et al. (1990), modificado	
<i>Lemna minor</i> (macrófita)	Ensaio de inibição de crescimento (crônico) CE50 = 0,07 mg L <sup>-1</sup>	Drost et al. (2007), modificado	
<i>Triticum aestivum</i> (trigo)	Elongação radicular = CI50 = 28,1 mg kg <sup>-1</sup>		
<i>Brassica campestris</i> (repolho chinês)	Elongação radicular = CI50 = 31,3 mg kg <sup>-1</sup>	OECD 208 (1984)	Jin et al. (2009) <sup>(2)</sup>
<i>Cyphomandra betacea</i> (tomate)	Elongação radicular = CI50 = 92,9 mg kg <sup>-1</sup>		
<i>Daphnia magna</i> (microcrustáceo)	Ensaio agudo CE50-48h = 212 mg L <sup>-1</sup>	OECD 202 (2004)	Liguoro et al. (2009)
	Ensaio agudo CE50-48h = 221 mg L <sup>-1</sup>	ISO 6341 (1989)	Wollenberger et al. (2000)
	Ensaio crônico CE50-21d = 13,7 mg L <sup>-1</sup>	OECD 211 (1996)	

<sup>(1)</sup>: O artigo consultado refere-se à espécie como *Selenastrum capricornutum*.

<sup>(2)</sup>: No trabalho foi utilizada a sulfadiazina sodiada.

No Brasil, há uma recente legislação que estabelece critérios e valores orientadores de qualidade do solo em relação à presença de substâncias químicas,

assim como diretrizes para o gerenciamento de solos contaminados (CONAMA, 2009). Nesse documento não é explicitado os valores referentes à concentração de fármacos veterinários. Mesmo assim, no texto de suas disposições gerais, recomenda que se busque a proteção do solo, além da forma corretiva, também de maneira preventiva, objetivando a manutenção de sua funcionalidade.

Em uma livre interpretação da supracitada resolução, o pesquisador ambiental encontra respaldo para estudar substâncias de interesse ambiental, embora ainda não legisladas, visando a uma futura proposição de inclusão de seus valores orientadores atualizados, sejam elas poluentes de controle prioritário ou contaminantes emergentes.

### **3.5 *Eisenia andrei***

A minhoca *Eisenia andrei* (Annelida: Oligochaeta) é um dos organismos mais utilizados em vermicompostagem, ensaios ecotoxicológicos e estudos genéticos. De comportamento epigéico, não habita necessariamente o solo mineral, mas a camada de folhas secas e material em decomposição (liteira ou serapilheira), da qual se alimenta (hábito alimentar detritívoro).

Embora originária de países de clima temperado, é uma espécie cosmopolita, possuindo ciclo de vida curto e grande tolerância às variações de temperatura e umidade (DOMINGUEZ; VELANDO; FERREIRO, 2005).

Devido à capacidade de assimilar diversos tipos de substrato, a minhoca vermelha-da-califórnia, grupo que engloba as espécies *E. andrei* e *E. fetida*, vem sendo utilizada na reciclagem de resíduos orgânicos, possuindo importância histórica na atividade da minhocultura, seja visando à comercialização de húmus ou à produção de iscas para pesca.

Com similaridades morfológicas entre ambas as espécies, *Eisenia andrei* Bouche, 1972 apresenta corpo uniformemente avermelhado e listras claras pouco aparentes entre seus segmentos corporais (**Figura 5**). Essa espécie é mais prolífica, apresentando taxas mais elevadas de desenvolvimento e reprodução em comparação à

sua assemelhada *Eisenia fetida* (Savigny, 1826), que, equivocadamente, acaba por ser o nome mais utilizado e conhecido (GUIMARÃES, 2006). Em vários estudos foi concluído tratar-se de espécies biologicamente distintas – uma vez que o cruzamento entre elas não gera descendentes viáveis – e que podem, portanto, responder diferentemente aos efeitos de poluentes em ensaios ecotoxicológicos (DOMINGUEZ; VELANDO; FERREIRO, 2005; JÄNSCH; AMORIM; RÖMBKE, 2005).



**Figura 5.** Diferença no padrão de coloração entre *E. fetida* (esquerda) e *E. andrei* (direita).

Fonte: <http://www.minhobox.com.br/materias6-jm.htm>

A criação massal de minhocas vermelhas-da-califórnia para uso em ensaios biológicos faz uso de técnicas adaptadas a partir daquelas empregadas na atividade comercial da minhocultura.

A criação de minhocas com finalidade comercial geralmente visa à produção de húmus e/ou à produção de organismos para a pesca esportiva e para alimentação de peixes, aves e répteis em cativeiro. Em virtude da larga utilização de substrato para promover a alimentação e conseqüente reprodução das matrizes de minhocas, busca-se utilizar matéria-prima do entorno da área para evitar gastos desnecessários com transporte e logística de materiais volumosos e de pouco valor econômico em seu estado bruto.

O termo vermicompostagem é também encontrado na literatura para descrever a ação das minhocas sobre a matéria orgânica contida nos esterco, na porção “orgânica” do lixo domiciliar e nos resíduos vegetais, mas a atividade é focada

na geração do vermicomposto ou húmus de minhoca, conhecido fertilizante natural de solos por conter nutrientes biodisponíveis (LANDGRAF et al., 2005).

No tocante ao relativo rigor no cultivo para fins de ensaios laboratoriais, torna-se difícil o acesso à fonte segura de esterco para substrato, que teoricamente seria aquele emitido por rebanhos animais mantidos isentos de aplicação de hormônios e antibióticos e alimentados a partir de vegetais cultivados de forma “orgânica”.

O substrato utilizado no cultivo das espécies *Eisenia* spp quase sempre se compõe de esterco de gado semi-curtido ou de material oriundo de compostagem – processo controlado de degradação aeróbia e exotérmica da substância orgânica biodegradável, por ação da microbiota autóctone, com liberação de gás carbônico e vapor d’água e produção de composto final estabilizado e rico em matéria orgânica (MASSUKADO, 2008).

Ao contrário do que popularmente se dissemina, não é recomendado fornecer às minhocas esterco fresco como alimento, pois este pode fermentar e elevar a temperatura do minhocário, causando fuga ou mesmo a morte das minhocas. Por isso a necessidade do esterco ter sido submetido a uma pré-compostagem, caracterizando seu estado semi-curtido (SCHIEDECK et al., 2006).

Para o preparo do substrato, é necessário utilizar matéria-prima de procedência conhecida, isenta de substâncias químicas indesejáveis que podem causar repulsa aos organismos e modificar suas taxas metabólicas. Além disso, o material não deve conter outras espécies de minhocas, nem predadores, aranhas e formigas, sob risco de inviabilizar o cultivo controlado e mono-específico.

Para tanto, torna-se interessante o desenvolvimento de uma técnica simples e adequada para o cultivo de minhocas viáveis à demanda dos ensaios laboratoriais.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Organismo-teste

Para a implantação do ensaio de fuga com minhocas no Laboratório de Saneamento (Labsan) da Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo (FEC), da Universidade Estadual de Campinas, campus de Campinas – SP, optou-se pela aquisição de um minhocário e um lote matriz de minhocas da espécie *Eisenia andrei* da empresa Minhobox®, situada em Juiz de Fora – MG.

A escolha do organismo-teste e os requisitos para sua utilização nos ensaios basearam-se nas recomendações da norma brasileira ABNT ISO 17512-1 (ABNT, 2011).

Os organismos adquiridos foram inicialmente mantidos em substrato oriundo de compostagem, conforme recomendação da empresa fornecedora dos animais. Após o primeiro ciclo de consumo, os organismos foram transferidos para um substrato preparado no laboratório a partir de sobras vegetais domésticas e desenvolvido nesse trabalho (ver item 4.2).

O cultivo foi mantido a temperatura ambiente e fotoperíodo natural. As caixas contendo as minhocas dispõem de uma cobertura de tecido com elástico nas bordas, responsável por diminuir a luminosidade no interior e manter a umidade do substrato. Nos ensaios foram utilizadas minhocas adultas, com presença de clitelo e massa corporal individual de 300 a 600 mg (**Figura 6**).



**Figura 6.** Minhocário em caixas: local de cultivo dos organismos.

#### 4.2 Substrato de cultivo

O substrato utilizado para cultivar (alimentar) os organismos foi preparado a partir de restos vegetais domésticos (cascas, sementes e talos) de frutas, legumes, hortaliças e chás, misturados a folhas e galhos secos triturados de árvores e arbustos.

A mistura foi realizada em caixa reforçada de polipropileno, medidas internas: 14 cm x 30 cm x 37 cm (A x L x C), capacidade 15,5 L, com fundo perfurado e sobreposta a outra caixa de igual dimensão e fundo íntegro. No interior da caixa superior foram adicionados semanalmente 4 L de restos vegetais domésticos e 4 L de folhas e galhos secos triturados, durante um mês.

A caixa superior teve seu fundo (base) perfurado em 80 orifícios de 5 mm de diâmetro, distribuídos de forma equidistante para permitir a drenagem do líquido resultante da degradação do composto para a caixa inferior (**Figura 7**).

De forma a manter a umidade necessária para o processo de degradação do material, duas vezes por semana foi adicionada água da rede de abastecimento (~500 mL) sobre a mistura e a mesma revolvida com o auxílio de uma pá.

Após o primeiro mês, considerado de preenchimento da caixa, cessou-se a adição de material e foram realizadas apenas as tarefas de adição de água (umedecimento) e revolvimento do substrato por mais um mês, de forma a preparar o substrato para o fornecimento aos organismos.

Periodicamente, a caixa inferior foi drenada manualmente de forma a retirar o

líquido proveniente da degradação dos compostos da caixa superior.

O sistema constituído pelas caixas sobrepostas foi mantido à temperatura ambiente e fotoperíodo natural, sendo a caixa superior recoberta por tecido de porosidade fina (tipo voal) a fim de evitar a aproximação de insetos e permitir a imprescindível aeração do composto.

O método escolhido de preparo do substrato foi empregado após observações decorrentes dos experimentos de Carvalho (2012) em cultivar minhocas vermelhas-da-califórnia no mesmo substrato desde o início do processo de degradação da mistura composta por resíduos vegetais domésticos e folhas secas.



**A:** caixa superior com base perfurada para drenagem de líquido; **B:** caixas sobrepostas antes do início do preparo do substrato; **C:** caixa superior após 1<sup>a</sup> semana de preenchimento.

**Figura 7.** Caixas sobrepostas para preparo do substrato de cultivo. Fonte: CARVALHO (2012)

### 4.3 Solo-teste e análises físicas e químicas

O solo utilizado para os ensaios com a substância de referência (ácido bórico) e o antimicrobiano avaliado (sulfadiazina) é o chamado solo artificial tropical (SAT), constituído por uma mistura de areia fina (70%), argila branca ou caulim (20%) e pó de fibra de coco (10%). O SAT foi proposto por Garcia (2004) a partir de adaptação do solo artificial preconizado pelas normas OECD (1984) e ISO (1993). Tal adaptação refere-se à substituição da turfa de esfagno (porção orgânica do solo) pela fibra de casca de coco.

A areia fina (n<sup>o</sup> 100, granulometria 0,1 mm) foi adquirida junto ao Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo (IPT), onde foi submetida à lavagem

para retirada de material orgânico, secagem em forno rotativo (~250°C) e peneiramento. Foi utilizada argila branca (caulim em pó U.S.P. 26) da marca Synth e fibra de coco: substrato agrícola Golden Mix granulado T-80, da Amafibra (**Figura 8**).

Antes do preparo do solo artificial, porções de fibra de coco foram mantidas em bandejas plásticas, peneiradas em malha de 2 mm e submetida à secagem natural (temperatura ambiente) por uma semana, com revolvimento diário, para garantir que o material estivesse visivelmente seco antes da mistura à areia e à argila para a formação do SAT seco.

Antes da mistura dos materiais, utilizando-se de uma balança digital, tomaram-se quantidades de areia, argila e fibra de coco (em bandejas) suficientes para o preparo de porções de 6 kg de SAT. O conteúdo das bandejas foi cuidadosamente vertido para um saco plástico (autoclavável, 20 L, Alfa), o qual foi fechado e agitado manualmente por 5 minutos para permitir uma homogeneização adequada dos componentes do chamado SAT.

Como já descrito, para o adequado desenvolvimento, a espécie *E. andrei* prefere ambiente na faixa de pH variando de neutro a ligeiramente ácido (JÄNSCH; AMORIM; RÖMBKE, 2005). Quando necessário, o pH do solo-teste foi ajustado para  $6,0 \pm 0,5$  com adição de quantidades suficientes de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ), Synth. A determinação do pH do solo foi baseada em ISO (1994) (Apêndice A).

Após a mistura do material seco, o solo foi distribuído em porções de 1 kg (em bandejas plásticas menores) para aguardar a adição da água (no caso do controle) ou da solução-teste, antes do início do ensaio. A umidade foi ajustada para 60% da capacidade máxima de retenção de água (CMRA). A determinação da umidade e da CMRA do solo foi realizada segundo Monteiro e Frighetto (2000) (Apêndice A).



**Figura 8.** Material para preparo do solo artificial tropical (SAT)

#### 4.4 Substância-teste

O antimicrobiano sulfadiazina (SDZ; 4-amino-N-pirimidina-2-il-benzenosulfonamida; registro CAS no. 68-35-9; 99%) foi adquirido de Sigma- Aldrich, Bélgica. No dia anterior ao ensaio, uma solução-estoque a  $250 \text{ mg L}^{-1}$  de SDZ foi preparada utilizando água ultrapura (milli-Q), proveniente de um sistema de purificação *Millipore*® (EUA). Em béquer de vidro, 0,5 L de água contendo a substância-teste foi aquecida a  $60^{\circ}\text{C}$ , sobre chapa aquecedora com agitação magnética constante, sob exaustão.

As soluções-teste para o ensaio de fuga foram preparadas no dia do ensaio a partir da diluição da solução-estoque ( $250 \text{ mg L}^{-1}$ ). A própria solução-estoque também foi utilizada como a solução-teste mais concentrada. Portanto, as concentrações utilizadas foram de 0,025; 0,25; 2,5; 25 e  $250 \text{ mg}_{\text{SDZ}} \text{ L}^{-1}$ .

#### 4.5 Ensaio de fuga

Para o ensaio de comportamento de fuga, as soluções aquosas de sulfadiazina (400 mL) foram incorporadas ao solo artificial tropical manualmente de uma única vez no início do ensaio e o material revolvido com auxílio de espátula, resultando nas concentrações de 0,01; 0,1; 1, 10 e  $100 \text{ mg}_{\text{SDZ}} \text{ kg}^{-1}$  no SAT. No solo controle adicionou-se apenas água ultrapura. Os volumes de água para incorporação ao SAT foram calculados de forma a ajustar a umidade para 60% da capacidade máxima de

retenção de água (CMRA) do solo, determinada previamente.

Uma vez que a solubilidade da sulfadiazina é baixa ( $77 \text{ mg L}^{-1}$  a  $20^\circ\text{C}$ ) e também depende da forma como foi cristalizada, durante sua solubilização, preferiu-se adotar uma temperatura mais elevada ( $60^\circ\text{C}$ ) e agitação constante – condições que não são suficientes para degradar a molécula (Doretto, comunicação pessoal<sup>1</sup>). Outra opção seria dissolvê-la em solvente orgânico (metanol, acetona), porém tal procedimento poderia resultar em possíveis efeitos indesejáveis aos ensaios de fuga.

Os ensaios de fuga foram realizados segundo a norma NBR ISO 17512-1 (ABNT, 2011), uma tradução do protocolo ISO (2008). Visando ao atendimento de condições tropicais, modificou-se a temperatura de exposição, de  $20^\circ \text{C}$  para  $25^\circ \text{C}$ . Mesma adaptação foi empregada por Garcia et al. (2008) e Nunes et al. (2012), em ensaio com solo artificial com a mesma constituição do utilizado no presente estudo, em temperatura de  $28 \pm 2^\circ \text{C}$  e  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  respectivamente, não verificando problemas com a validação do método.

Nesse trabalho foram realizados 4 ensaios de fuga com o antimicrobiano sulfadiazina e 4 ensaios com a substância de referência (ácido bórico), sendo que cada ensaio, realizado em dias diferentes, demandou o uso de 12 kg de SAT (em massa seca) e 240 organismos (minhocas adultas cliteladas).

Cada série de ensaios foi realizada utilizando-se 5 concentrações diferentes do composto teste, sendo cada uma delas em quadruplicata, ou seja, com 4 recipientes-teste. Conforme a **Figura 9**, os recipientes são frascos de polipropileno, de base circular, diâmetro basal de 12 cm e altura de 9 cm, com capacidade para 1000 mL. A tampa dos recipientes é perfurada e seu volume interior pode ser dividido ao meio pela inserção de um divisor plástico removível.

Uma das seções dos recipientes foi preenchida com aproximadamente 350 g de solo controle (SAT + água), enquanto a outra metade foi preenchida com a mesma

---

<sup>1</sup>. Keity Margareth Doretto concluiu seu doutorado em 2012 no Instituto de Química da Unicamp e sua tese tratou, entre outros temas, sobre a sorção de sulfadiazina em solos. A autora contribuiu com informações para o presente trabalho.

quantidade de solo-teste (SAT + solução aquosa da substância química).

O divisor foi removido e, em seguida, foram colocadas 10 minhocas (previamente aclimatadas por 24 horas em 1 kg de solo controle) na linha divisória entre os dois substratos que se encontram no mesmo recipiente, lado a lado (**Figura 8**). As minhocas foram selecionadas ao acaso da bandeja de aclimatação e adicionadas diretamente aos recipientes-teste, sem qualquer tratamento.

Diferentemente da recomendação encontrada em alguns trabalhos, os organismos-teste não foram lavados e secos em papel absorvente antes da utilização no ensaio, para evitar liberação de líquido celomático pelo epitélio e possível estresse do organismo.



**Figura 9.** Representações do recipiente-teste no ensaio de fuga.

Todas as réplicas foram mantidas por 48 horas em equipamento incubadora, em condições controladas de fotoperíodo (12 h de luz: 12 h de escuro) e temperatura de  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

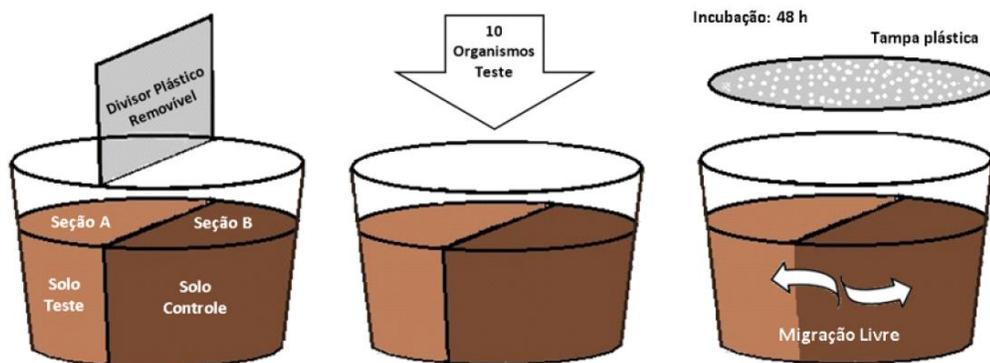
Após o período de exposição, o divisor plástico foi reintroduzido nos recipientes, separando os solos controle e tratamento e foi realizada a contagem visual do número de organismos presentes em cada seção do frasco. Na eventualidade de algum organismo sofrer corte em seu corpo durante o procedimento de inserção do divisor nos recipientes, considerou-se a presença desse organismo na seção contendo a parte anterior do corpo. O princípio do método esquematizado pode ser conferido na **Figura 10**.

Foi executado concomitantemente aos ensaios, o teste de controle dual, em

que 4 replicatas contém solo controle em ambas as metades (seções) do recipiente-teste. O teste verifica o atendimento a um dos critérios de validação do ensaio: a distribuição homogênea dos organismos nos recipientes-teste, na ausência de contaminantes.

Anotou-se o número de minhocas mortas ou perdidas durante o período de ensaio, se aplicável, uma vez que o mesmo é considerado invalidado se esse número for superior a 10% em cada uma das concentrações avaliadas.

Os ensaios de sensibilidade realizados periodicamente visam estabelecer a carta-controle para o organismo-teste e foram executados de forma semelhante, no entanto a substância química utilizada foi o ácido bórico ( $H_3BO_3$ ) P.A., 99,5 a 100,5%, Nuclear (substância de referência) e as soluções-teste foram preparadas no dia de início do ensaio, nas concentrações de 312,5; 625; 1250; 1875 e 3750  $mg\ L^{-1}$  de  $H_3BO_3$ , para se obter, no solo-teste, as respectivas concentrações de 125, 250, 500, 750 e 1500  $mg_{H_3BO_3}\ kg^{-1}$ .



**Figura 10.** Esquema do ensaio de fuga, representando a sequência de ações em um recipiente-teste.

#### 4.6 Análise dos dados

A resposta dos ensaios com SAT contendo sulfadiazina ou ácido bórico é calculada em termos de porcentagem de fuga por concentração, de acordo com a fórmula (ABNT, 2011):

$$\% = [(nC - nT) / N] \times 100$$

Em que:

% = porcentagem de fuga

nC = número de minhocas encontradas na seção B (solo-controle)

nT = número de minhocas encontradas na seção A (solo-teste)

N = número total de minhocas (soma das replicatas por concentração)

Respostas negativas (ou seja, as minhocas preferem o solo-teste) são consideradas como 0% de fuga.

O solo é considerado tóxico quando mais que 80% dos organismos expostos preferem o solo controle (fuga >60%).

Foi escolhida a prova exata de Fisher para analisar a significância da resposta de fuga, utilizando o teste unicaudal, com a hipótese nula de que, na ausência de efeito adverso, 50% dos organismos se encontram no solo contaminado (NATAL-DA-LUZ; RÖMBKE; SOUSA, 2008). As análises foram realizadas com auxílio do programa BioEstat 5.4 e os gráficos construídos utilizando o MS Excel 2010. A Concentração Efetiva Mediana após 48 horas de exposição (CE50-48h) foi estimada pelo método Spearman-Kärber (ABNT, 2011).

Para o ensaio de controle dual, foi considerada a média mais ou menos o desvio padrão do número de organismos encontrados em cada seção do recipiente-teste. Para validar o ensaio, as minhocas devem apresentar uma distribuição homogênea, compreendida entre 40 a 60% de presença em cada seção.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A seguir são apresentados os resultados obtidos no estabelecimento do cultivo de *Eisenia andrei* e os dados referentes aos ensaios de fuga utilizando o antimicrobiano sulfadiazina e a substância de referência ácido bórico.

### 5.1 Estabelecimento do cultivo dos organismos

O método de preparo do substrato para fornecimento aos anelídeos baseou-se na pré-compostagem em caixas. De acordo com as condições e prazos estipulados de preparo (ver item 4.2), a mistura controlada de restos vegetais domésticos e matéria vegetal seca foi suficiente para o preparo do substrato de cultivo (**Figura 11**).



- A: camada inicial de matéria vegetal seca cobrindo todo o fundo da caixa.
- B: adição de 2 L de resíduos vegetais domésticos.
- C: adição de 2 L de matéria vegetal seca. Caixa após sucessivos preenchimentos.
- D: Adição de 0,5 L de água da rede de abastecimento.
- E: Aspecto do substrato após 1 mês de preenchimento e degradação do material.

**Figura 11.** Sequência de preparo do substrato.

O substrato preparado a partir de cascas, sementes e talos de frutas, legumes, hortaliças e chás, misturados com folhas e galhos secos atingiu um estado aqui chamado de pré-composto após 2 meses do início do preenchimento da caixa,

quando já se encontrava com uma coloração mais escura e sem a geração de líquido oriundo da decomposição da matéria, tampouco exalação de odores.

É importante que se faça a adição semanal de água e o revolvimento do material para propiciar as condições adequadas para a degradação aeróbia característica do processo de compostagem. A quantidade de água adicionada sofreu leve ajuste em decorrência da temperatura e umidade do ar, de forma a umedecer bem todo o composto até perceber o gotejamento de água na caixa inferior.

Vários materiais foram usados como matéria-prima durante o preenchimento da caixa. De fato, quanto maior a diversidade de alimentos utilizados (dentre os permitidos para o processo), maior será a riqueza nutricional do substrato e, conseqüentemente, fornecerá organismos saudáveis, gerando um húmus igualmente rico em nutrientes (LANDGRAF et al., 2005).

Não faz parte das metas do presente trabalho um estudo profundo sobre o substrato ideal para o cultivo dos anelídeos, mas descrever uma forma de preparo simples que se mostrou adequada para cultivar organismos em área reduzida e com material de procedência conhecida. Variações nos tipos de matéria seca e alimentos utilizados podem fornecer substratos com diferentes características.

Dentre os procedimentos e materiais inicialmente testados, o substrato proposto demonstrou resultados satisfatórios na criação das minhocas e foi preparado intercalando-se restos dos vegetais abaixo discriminados com uma camada de folhas ou galhos secos triturados, até o preenchimento da caixa plástica. Os vegetais foram adicionados na seguinte ordem:

- Cascas de batata (2 L)
- Cascas de cenoura (2 L)
- Cascas de mandioca ou batata-doce (2 L)
- Folhas verdes (alface, agrião, rúcula, couve) (2 L)
- Partes de frutas (banana, maçã, pêra, caqui, tomate) (2 L)

Sugere-se que a adição seja feita 2 vezes por semana em caixa reforçada de polipropileno, medidas internas: 14 cm x 30 cm x 37 cm (A x L x C), com fundo perfurado e sobreposta a outra caixa de igual dimensão e fundo íntegro e, a cada nova adição, cobrir distribuindo igual volume de matéria seca e adicionar água (500 mL). Quando a caixa estiver cheia (o que deve acontecer ao final da 2ª semana), diminuir a frequência de adição de material para 1 vez por semana. Dessa forma, há tempo suficiente para que o material inicialmente adicionado entre em estado de decomposição e conseqüente diminuição do volume, para a adição de novos substratos, que devem ser misturados dessa vez ao material já presente na caixa e coberto com matéria seca.

O procedimento acima deve ser repetido até o final da 4ª semana. Durante o mês seguinte, enquanto se prepara uma nova caixa, na primeira devem ser realizadas apenas as tarefas de revolvimento e umedecimento. O líquido que naturalmente é drenado para a caixa inferior do conjunto deve ser esgotado periodicamente.

O composto escuro proveniente da caixa superior após 2 meses de início do preparo apresenta características de um substrato pré-degradado, ou seja, mostrou-se úmido, grosseiramente particulado e não totalmente homogêneo. O revolvimento periódico do composto foi importante para evitar processos anaeróbios de degradação e evitar exalação de mau cheiro das caixas.

Trata-se de um composto descaracterizado (não se reconhece mais as partes vegetais inicialmente adicionadas), embora não seja considerado totalmente homogêneo, uma vez que o processo de sua formação não é uma compostagem completa.

A aceitação das minhocas pelo substrato foi verificada pelo chamado “teste das quatro”, em que 4 animais adultos são colocados na superfície do substrato pronto, em ambiente escuro, uma em cada canto da caixa, e verifica-se o comportamento dos organismos. Se pelo menos uma delas se deslocar pela superfície do substrato, procurando as bordas da caixa para sair daquele ambiente, pode se considerar um indicativo de que o substrato não está totalmente pronto ou maduro, devendo retornar para a etapa de preparo. No entanto, se as minhocas rapidamente adentram o

substrato, deixando a superfície para porções abaixo, é sinal de que o substrato está adequado para ser utilizado na alimentação e cultivo dos organismos.

De fato, o método básico acima descrito tem seu valor prático, uma vez que a presença da substância catequina, um polifenol de aspecto cristalino, incolor e solúvel em água, presente em partes vegetais vivas, causa repulsa às minhocas, provavelmente devido a sua impalatabilidade que naturalmente as inibe de se alimentar de folhas íntegras e raízes de plantas, por exemplo. No entanto, à medida em que a degradação da matéria vegetal se processa, decresce a concentração de catequina, aumentando a aceitação do substrato pelas minhocas (GUIMARÃES, 2003).

Outra evidência da aceitação do substrato pelos organismos foi a elevada presença de casulos (pequenas bolsas amareladas que contém os ovos) após um período de consumo pelas minhocas adultas, indicativo da ocorrência de reprodução (**Figura 12**). Conforme já comentado na revisão da literatura, a energia é comumente alocada para reprodução quando primeiramente se atendem às condições ambientais que permitem a sobrevivência e o crescimento. A presença de inúmeros casulos de minhocas, que futuramente darão origem a filhotes, indica a aceitabilidade do substrato pelos organismos e permite o estabelecimento de um cultivo adequado para suprir às necessidades de ensaios biológicos e o desenvolvimento de várias gerações de organismos, desde que atendidas as necessidades básicas de manejo, segundo as técnicas da minhocultura.



**Figura 12.** Substrato alternativo pronto, com ampliação para os casulos de *E. andrei*.

A presença de elevada granulação e espaços vazios no substrato descrito, além de favorecer o deslocamento e o encontro dos organismos, com consequente alinhamento para cópula, também é responsável por arejar suficientemente o substrato, evitando problemas decorrentes da anoxia que afeta substratos muito compactados.

Por suas características, o substrato desenvolvido nesse trabalho simula as condições naturais de habitat das minhocas detritívoras, como *E. andrei*, que habitam extratos superficiais e mais porosos do solo, onde encontram maior abundância de alimento.

O desenvolvimento de um substrato de cultivo alternativo para esse trabalho justifica-se pela necessidade de evitar a presença de eventuais concentrações de antibióticos, agrotóxicos, hormônios ou patógenos inerentes à matéria-prima do esterco, tão utilizada na vermicultura tradicional.

Ainda, como a substância de interesse avaliada no presente trabalho é um antimicrobiano de administração na pecuária, difícil seria garantir sua ausência nos dejetos dos animais, ou seria necessário proceder à quantificação química do mesmo na matriz do esterco, afastando-se do foco desse trabalho. A sulfadiazina já foi detectada em amostras de esterco proveniente de avicultura em concentrações próximas a  $100 \text{ mg kg}^{-1}$  (MARTÍNEZ-CARBALLO et al., 2007), sendo essa a concentração mais elevada utilizada nos ensaios de fuga com o solo contaminado artificialmente.

Certamente a utilização de folhas e cascas de frutas, legumes e verduras não afasta completamente a presença de substâncias químicas indesejadas no substrato, mas diminui essa possibilidade, uma vez que tais insumos são lavados e/ou cozidos antes da utilização doméstica e posterior segregação das porções não aproveitadas, que serão direcionadas ao preparo do substrato.

O método de realização dessa pré-compostagem caseira em caixas mostrou-se suficiente para o preparo do substrato de cultivo a partir de restos vegetais domésticos e matéria vegetal seca, no prazo e condições estipuladas. O substrato foi adequado ao crescimento, reprodução e desenvolvimento das minhocas *E. andrei*, para atingir condição requerida para os ensaios ecotoxicológicos.

## 5.2 Caracterização física e química do solo-teste

A umidade do solo-teste foi ajustada para 60% da capacidade máxima de retenção de água (CMRA = 77,5%, **Tabela 4**). Nos primeiros ensaios, notou-se o solo demasiadamente úmido, de forma que, ao comprimi-lo, ainda se visualizava água. No entanto, nos ensaios seguintes adotou-se o correto procedimento de secagem natural da fibra de coco (a porção orgânica do solo artificial tropical, SAT) em bandejas, por uma semana e com revolvimento diário, seguida de peneiramento. Com o procedimento de secagem e a adição de 465 mL de água/ kg SAT seco (60% da CMRA) obteve-se um solo adequadamente úmido pra o ensaio.

A norma brasileira que trata do ensaio de fuga, ABNT (2011), recomenda umidade do solo-teste em torno de 60% da CMRA, mas ressalta que a umidade ideal é alcançada quando o solo não mais libera água após compressão. Os protocolos de ensaio ISO 11268-1 (1993), ISO 11268-2 (1998), ISO 17512-1 (2008) e OECD 222 (2004) recomendam umidade ajustada de 40% a 60% da CMRA. Nunes (2010), cujo trabalho também contemplou ensaios de fuga de minhocas em SAT, adotou umidade a 50% da CMRA.

Na **Tabela 4** é apresentada uma caracterização inicial do solo-teste empregado nesse estudo. Visando o ajuste do pH no valor alvo de 6,0, para evitar efeito no comportamento dependente de condições abióticas inadequadas, adicionou-se 0,5 g de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) durante a mistura dos componentes para o preparo de 1000 g de SAT seco.

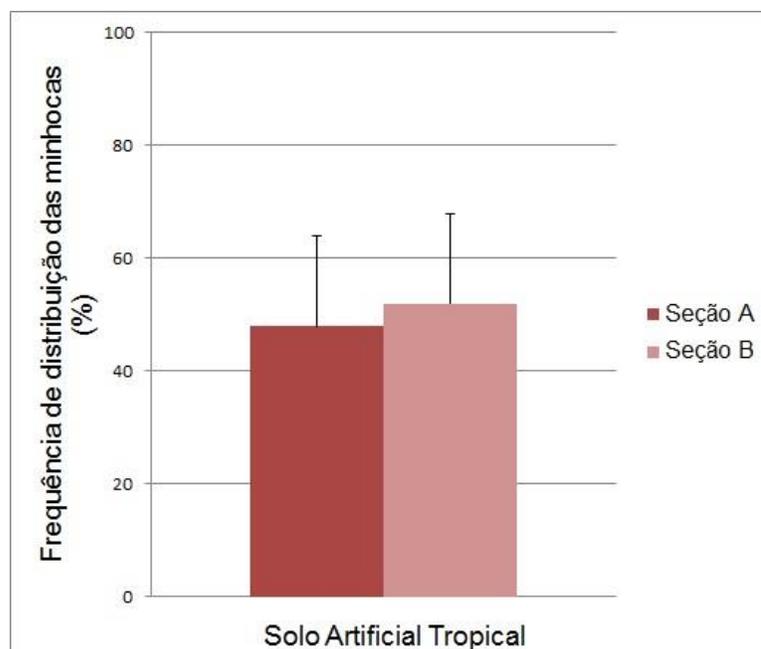
**Tabela 4.** Dados químicos e físicos do solo artificial tropical (SAT) preparado para uso nos ensaios de fuga.

pH		Capacidade máxima de retenção de água (%)	Umidade antes da adição de água (%)	Umidade após adição de água (%)
$\text{CaCl}_2$ 0,01 mol L <sup>-1</sup>	H <sub>2</sub> O			
5,8 ± 0,07	6,6 ± 0,14	77,5	0,3	51

### 5.3 Validação do ensaio de fuga

Os critérios de validação do ensaio de fuga (item 4.5, página 34) foram atendidos, uma vez que não foi observada mortalidade ou perda de organismos e, durante o ensaio de controle dual, os mesmos distribuíram-se de maneira equitativa em ambas as seções dos recipientes-teste (**Figura 13**).

A norma que trata desse ensaio de fuga estipula um limiar de distribuição das minhocas entre 40 a 60% de presença em cada lado do recipiente, quando se utiliza o mesmo solo em ambas as seções (ABNT, 2011). Portanto, com uma distribuição obtida de 48% dos organismos na seção A e 52% organismos na seção B, o ensaio fica validado, demonstrando a adequação das condições de exposição.

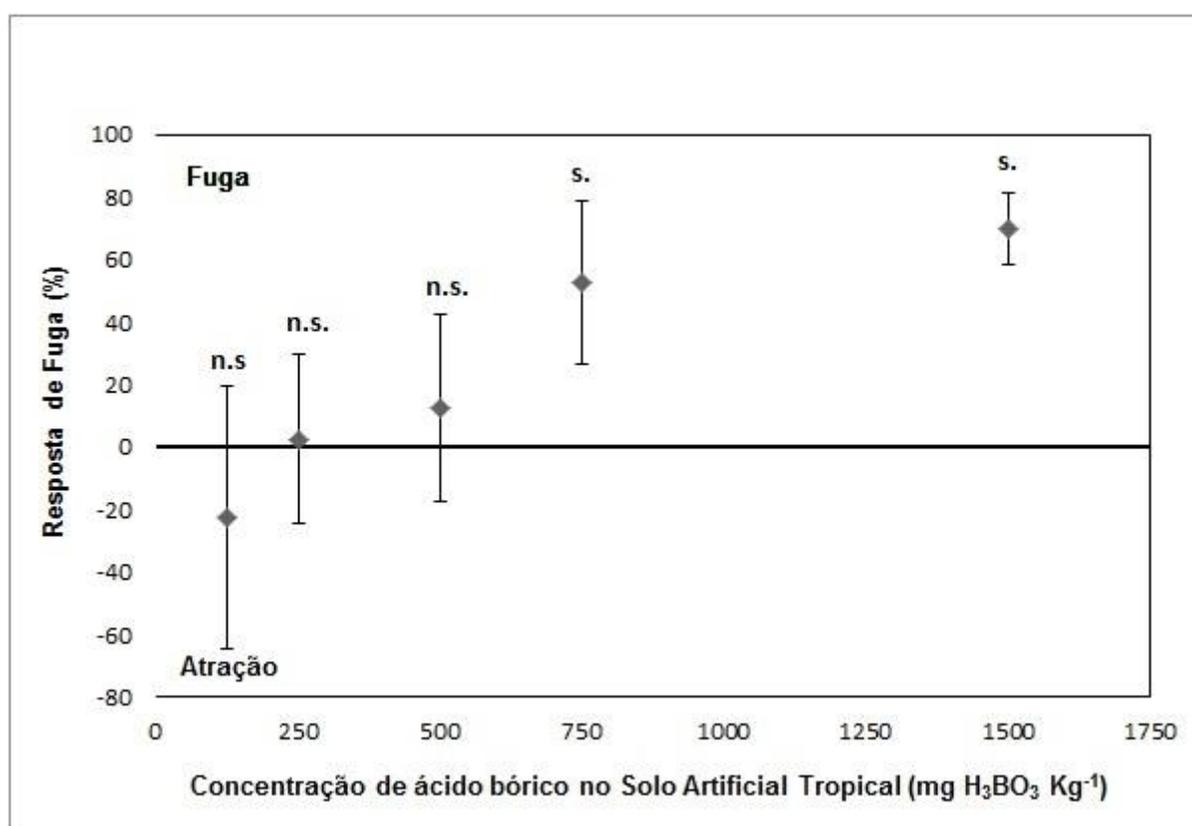


**Figura 13.** Ensaio de controle dual: porcentagem de organismos (média + desvio padrão, n = 20) em cada seção do recipiente-teste. Não houve diferença estatística na distribuição dos organismos na prova exata de Fisher ( $p \geq 0,05$ ).

Em relação ao ensaio de sensibilidade, para aferir o funcionamento e reprodutibilidade do método, ensaios com a substância de referência foram executados e as respostas aferidas resultaram no gráfico da **Figura 14**.

As concentrações de ácido bórico no solo causaram respostas de fuga com tendência crescente ao aumento da concentração, sendo significativas as concentrações de 750 e 1500 mg<sub>H3BO3</sub> kg<sup>-1</sup>, de acordo com a prova exata de Fisher, e não significativas as concentrações mais baixas, de 125, 250 e 500 mg<sub>H3BO3</sub> kg<sup>-1</sup>, por resultarem em respostas de fuga próximas à faixa considerada de distribuição normal dos organismos.

A concentração de 125 mg<sub>H3BO3</sub> kg<sup>-1</sup> provocou atração dos organismos (23%), no entanto, a norma ABNT preconiza considerar 0% de fuga sempre que houver entre 0 e 80% de preferência pelo solo com tratamento em detrimento do controle. Não obstante, optou-se por manter no gráfico o valor negativo da resposta de fuga (atração), pois dependendo da magnitude do efeito atrativo, este também deve ser investigado.



**Figura 14.** Ensaio de sensibilidade com a substância de referência: porcentagem de resposta de fuga (médias + desvio padrão, n = 8) de *Eisenia andrei* em solo artificial tropical (SAT) com diferentes concentrações de ácido bórico. As barras representam os desvios-padrão. (ns) = resposta não significativa ( $p \geq 0,05$ ); (s) = resposta significativa ( $p < 0,05$ ), segundo a prova exata de Fisher.

Princz e Scroggins (2003) obtiveram resposta negativa (10% de atração) para a concentração de 250 mg<sub>H3BO3</sub> kg<sup>-1</sup>, quando utilizada *E. andrei* exposta a um solo de referência coletado em campo e baixa resposta positiva (7% de fuga) para a concentração de 125 mg<sub>H3BO3</sub> kg<sup>-1</sup>.

O fenômeno da atração pode ser devido à ausência de efeito repelente naquela concentração testada ou à otimização de alguma condição abiótica proporcionada pela substância química quando em baixas concentrações no SAT.

De fato, o ensaio de sensibilidade indicou que os organismos responderam, segundo uma curva dose-resposta, ao efeito repelente da substância de referência ácido bórico. A concentração efetiva mediana, após 48 h de exposição (CE50-48h) resultou em 819 mg<sub>H3BO3</sub> kg<sup>-1</sup>, com intervalo de confiança (a 95%) de 628 a 1066 mg<sub>H3BO3</sub> kg<sup>-1</sup>.

Essa concentração de 819 mg<sub>H3BO3</sub> kg<sup>-1</sup>, é portanto, segundo o método estatístico Spearman-Kärber, a concentração responsável por causar a fuga de 50% dos organismos expostos ao ácido bórico, no solo artificial tropical, após 48 horas de exposição nas condições específicas do ensaio realizado no presente trabalho.

No trabalho desenvolvido por Princz & Scroggins (2003), em que foram realizados diversos ensaios comparativos em solo de referência (chernozem negro de Alberta) e utilizado recipiente-teste de duas seções, o valor de CE50-48h para a resposta de fuga de *Eisenia andrei* ao ácido bórico foi de 794 mg<sub>H3BO3</sub> kg<sup>-1</sup>, (limites de 537 a 1202 mg<sub>H3BO3</sub> kg<sup>-1</sup>), semelhante ao obtido nesse estudo (819 mg<sub>H3BO3</sub> kg<sup>-1</sup>), atendendo assim ao critério da norma ABNT (2011).

Devido à faixa obtida de sensibilidade à substância de referência e à ausência de mortalidade durante o ensaio em quaisquer das réplicas, assegura-se a aptidão e sensibilidade da população de minhocas *Eisenia andrei* cultivadas pelo método alternativo exposto, em área do Laboratório de Saneamento – DSA – FEC – Unicamp, para utilização em ensaios de fuga.

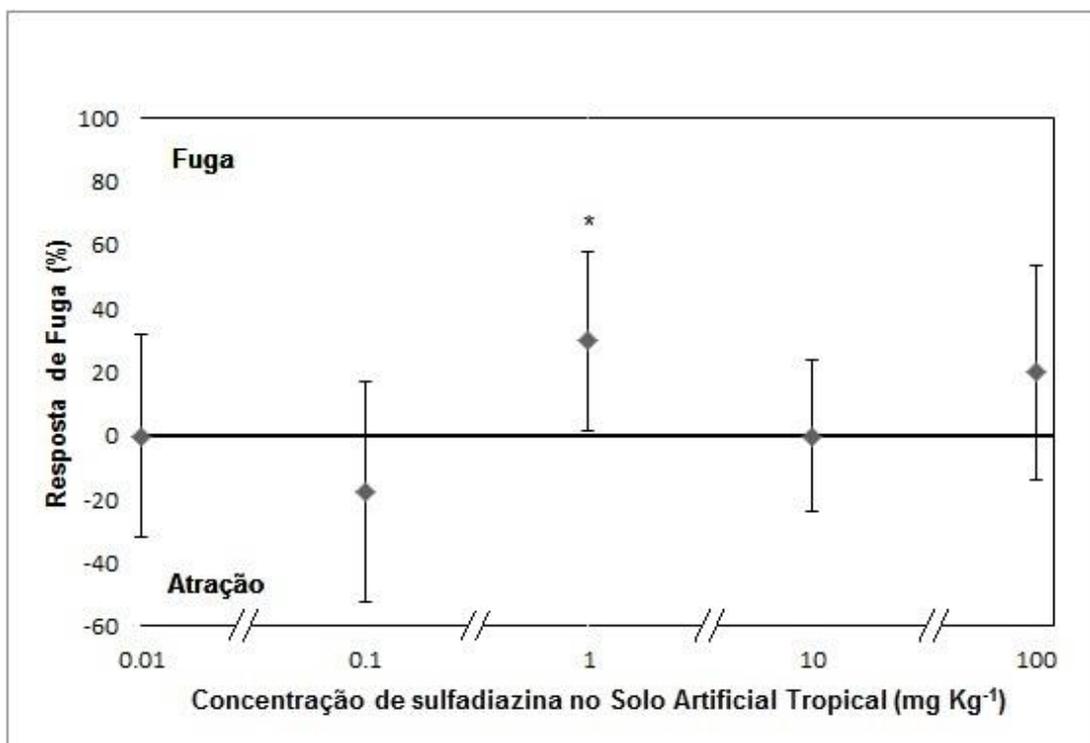
Um modelo de formulário para auxiliar no preparo e execução do ensaio de fuga com ácido bórico, desenvolvido neste trabalho, assim como o resultado do programa estatístico, encontra-se no APÊNDICE B.

#### **5.4 Efeito de sulfadiazina sobre o comportamento de fuga**

Foram executados uma série de ensaios para estabelecer a faixa de comportamento de fuga apresentada pelo organismo-teste para a substância estudada (sulfadiazina), cujos resultados podem ser conferidos na **Figura 15**. Os resultados obtidos em ensaios preliminares com a substância-teste indicavam um comportamento de fuga dos organismos a partir da concentração de  $1,0 \text{ mg}_{\text{SDZ}} \text{ kg}^{-1}$ . Nos ensaios definitivos, contudo, esse comportamento não foi reproduzido, ou seja, os resultados foram diferenciados.

Norr e Riepert (2007) reportaram uma evidente absorção, e, também, uma bioacumulação não significativa de sulfadiazina (marcada com carbono 14) em minhocas *E. fetida*, concluindo ser a discreta bioacumulação devida às próprias características químicas do antimicrobiano (baixo coeficiente de partição octanol-água) e seu comportamento no solo dependente da presença de colóides e substâncias orgânicas dissolvidas no dejetos líquido de suínos contendo o fármaco.

O ensaio de respiração induzida pelo substrato (RIS) é frequentemente utilizado como um parâmetro funcional para o estudo da comunidade microbiana do solo. Verificou-se que a sulfadiazina atrasa o início da RIS por vários dias, em concentração de  $1 \text{ mg}_{\text{SDZ}} \text{ kg}^{-1}$  (a dose mais baixa estudada), constatação apoiada por alterações na composição da comunidade microbiana. Já clortetraciclina não afetou a RIS mesmo em concentração de  $50 \text{ mg} \text{ kg}^{-1}$  (ZIELEZNY et al., 2006).



**Figura 15.** Ensaio com sulfadiazina: porcentagem de resposta de fuga (médias + dp, n = 8) de *Eisenia andrei* em solo artificial tropical (SAT) com diferentes concentrações de sulfadiazina. \*1 mg kg<sup>-1</sup>: única resposta significativa, segundo a prova exata de Fisher.

Analisando-se os resultados obtidos, foi observado que as respostas não estavam associadas à curva concentração-resposta tradicional. Mesmo em concentrações mais elevadas que àquelas normalmente encontradas no ambiente, não se obteve resposta de fuga maior que 30%, na média dos ensaios com SAT.

Uma curva do tipo concentração-resposta ou dose-resposta é a relação quantitativa entre a concentração experimental e os efeitos adversos. Para a maioria das substâncias químicas, essa relação é sigmoideal, de tal forma que os efeitos aumentam abruptamente acima de uma determinada concentração limiar (CLOTFELTER et al., 2004).

Tal abordagem parece funcionar bem quando a toxicidade da substância é imediatamente aparente e há uma relação monotônica simples entre a dose e a resposta. No entanto, diversos contaminantes emergentes e interferentes endócrinos diferem dos poluentes clássicos nessa relação. Primeiro porque nem sempre o dito

popular “a diferença entre remédio e veneno é a dose” se aplica a essa classe de compostos e, segundo, porque o efeito de alguns deles são mais acentuados quando em baixas concentrações (CLOTFELTER et al., 2004).

As relações concentração-resposta não usuais, como as em forma de “U” e “U invertido -  $\cap$ ” ocorrem com alguns xenobióticos. A curva em “U” ocorre quando o máximo efeito é produzido em concentrações muito baixas e muito altas, mas não em concentrações intermediárias; na curva em “U invertido” ocorre o contrário.

Tais curvas são bastante controversas em ecotoxicologia, pois contradizem a arraigada crença de que as doses ou concentrações e suas respectivas respostas seguem uma relação de linearidade. Não por acaso, a maioria das substâncias químicas têm seus níveis de segurança ambiental estabelecidos com base nesse pressuposto.

Acredita-se que ocorra uma subnotificação das relações concentração-resposta não lineares, com pouca representatividade de publicação, devido ao seu desvio em relação ao dogma toxicológico (CALABRESE; BALDWIN, 2003). A detecção dessas relações é um campo no qual os estudos comportamentais podem contribuir de forma significativa com a ecotoxicologia.

Os resultados obtidos com *Eisenia andrei* exposta à sulfadiazina, foram apresentados e discutidos com base nas explicações acima colocadas. Não houve uma preocupação na utilização de outro organismo-teste para obtenção de uma curva concentração-resposta linear e comparação de resultados.

Dados de toxicidade da sulfadiazina utilizando-se diferentes testes e organismos estão mostrados na Tabela 3 (página 25), em que se sobressai o valor de  $CE50 = 70 \mu\text{g L}^{-1}$  para ensaio crônico de inibição do crescimento da macrófita *Lemna minor* (BIALK-BIELIŃSKA et al., 2011), o que sugere uma concentração protetiva para o ambiente abaixo desse valor.

Embora poucos trabalhos tenham demonstrado efeitos tóxicos diretos aos invertebrados terrestres, não se pode excluir a possibilidade de efeitos indiretos sobre

os organismos de solo em concentrações mais baixas devido às alterações na cadeia alimentar terrestre (SCHMITT; RÖMBKE, 1998).

De fato, a relação dos antibióticos com a ecotoxicologia é pouco explorada, devido aos trabalhos serem direcionados principalmente às alterações nas comunidades bacterianas (alvo dos antimicrobianos) e pouca atenção é dada aos organismos não-alvo, para os quais são esperados, geralmente, mais efeitos indiretos (relacionados às alterações no equilíbrio microbiano do solo) e raros efeitos diretos.

Embora Boleas et al. (2005) tenham reportado a ausência de mortalidade em minhocas expostas a concentrações de até 100 mg de sulfaclopiridazina por kg de solo utilizando-se de sistemas de ensaio multiespécies, este dado está longe de significar a inocuidade ambiental das sulfonamidas. É importante esclarecer que, ao exibir efeitos inibidores do crescimento de bactérias e protozoários, as sulfonamidas podem afetar de forma desconhecida outros organismos não alvo em diferentes níveis tróficos, expostos a outros compartimentos ambientais, em concentrações diversas.

Até o momento não há dados na literatura especializada envolvendo a execução de um ensaio de fuga com minhocas expostas a antimicrobianos. Evidentemente, tais compostos devem ser muito mais ativos para microrganismos, pela própria definição. No entanto, há um desafio na discussão de temas pouco explorados, como no caso aqui estudado, mas alguns fatores serão mais bem discutidos nos tópicos abaixo:

- Microbiota do solo-teste:

O fato de os antimicrobianos agirem sobre as bactérias no solo pode, por si só, influenciar o comportamento direcional dos oligoquetas nos ensaios de fuga. A opção pela utilização de solo artificial, em detrimento de matrizes naturais, que já foram descritas na literatura (GARCÍA-GALÁN; DÍAZ-CRUZ; BARCELÓ, 2009; SCHAUSS et al., 2009), justifica-se devido à pobre microbiota esperada no SAT.

Se fosse utilizado solo natural com sulfadiazina para o ensaio de fuga (cujo resultado baseia-se na observação da preferência do organismo por dois solos lado a

lado – tratamento e controle), apenas o efeito antimicrobiano, mesmo na possível ausência de qualquer efeito tóxico, já poderia selecionar o solo controle como o mais adequado e, portanto, preferido dos organismos.

Segundo estudos de Zirbes et al. (2011), os microrganismos são considerados os principais componentes das dietas das minhocas e a principal fonte de emissão de compostos orgânicos voláteis em ecossistemas terrestres, sugerindo que o senso olfativo desses anelídeos exerça importante papel no forrageamento. De acordo com os autores, as estratégias alimentares de várias espécies de minhocas sugerem orientação e locomoção direcionada a determinadas fontes de alimento, incluindo espécies de protozoários, bactérias, fungos e plantas.

Principalmente para espécies epigéicas como *E. andrei*, que se alimentam na liteira/serapilheira, os fungos terrestres são considerados fonte importante de alimento. Nos ensaios de preferência alimentar conduzidos por Bonkowski et al. (2000), postulou-se que a preferência das minhocas por diferentes espécies de fungos pode ser devida ao valor nutricional da espécie fúngica ou à presença de substâncias antibióticas ou metabólitos no micélio.

Kotzerke et al. (2010) concluíram que o esterco contaminado com sulfadiazina reduzia a abundância de bactérias desnitrificantes no sistema digestório de *E. fetida* em até dez vezes pela exposição a solo contendo  $100 \text{ mg}_{\text{SDZ}} \text{ kg}^{-1}$ , afetando também as bactérias desnitrificantes do solo.

Considerando o solo artificial utilizado no presente trabalho, seus principais constituintes (areia fina e argila branca) passam por processos que reduzem ou eliminam a presença de microrganismos, uma vez que a areia é submetida a forno rotativo ( $250^{\circ} \text{C}$ ) e a argila é esterilizada, representando 90% do solo artificial composto por material com baixa carga microbiológica esperada.

Caso fosse utilizado solo natural nos ensaios, a seção do recipiente contendo sulfadiazina poderia ter parte de sua microbiota natural reduzida pelo efeito esperado do antimicrobiano, direcionando os anelídeos ao solo controle (sem a sulfonamida), o que poderia resultar em uma resposta de fuga não relacionada à

toxicidade, uma vez que os organismos estão apenas a buscar um solo microbiologicamente mais rico, na procura por alimento e abrigo.

- pH:

Em relação às características toxicológicas relacionadas ao pH do meio, este estudo fez uso de solo artificial tropical, com valores de pH compreendidos entre 5,8 e 6,6 (**Tabela 4**, página 43). Considerando os valores de  $pK_a$  da sulfadiazina nos trabalhos consultados:  $pK_{a1} = 1,6$  a  $2,4$  e  $pK_{a2} = 5,8$  a  $6,5$  (THIELE-BRUHN et. al, 2004; ZARFL, 2008), pode-se afirmar que suas formas neutra e negativamente carregada são aquelas encontradas majoritariamente durante os ensaios de fuga. Isso pode ter uma influência direta nas características toxicológicas do composto.

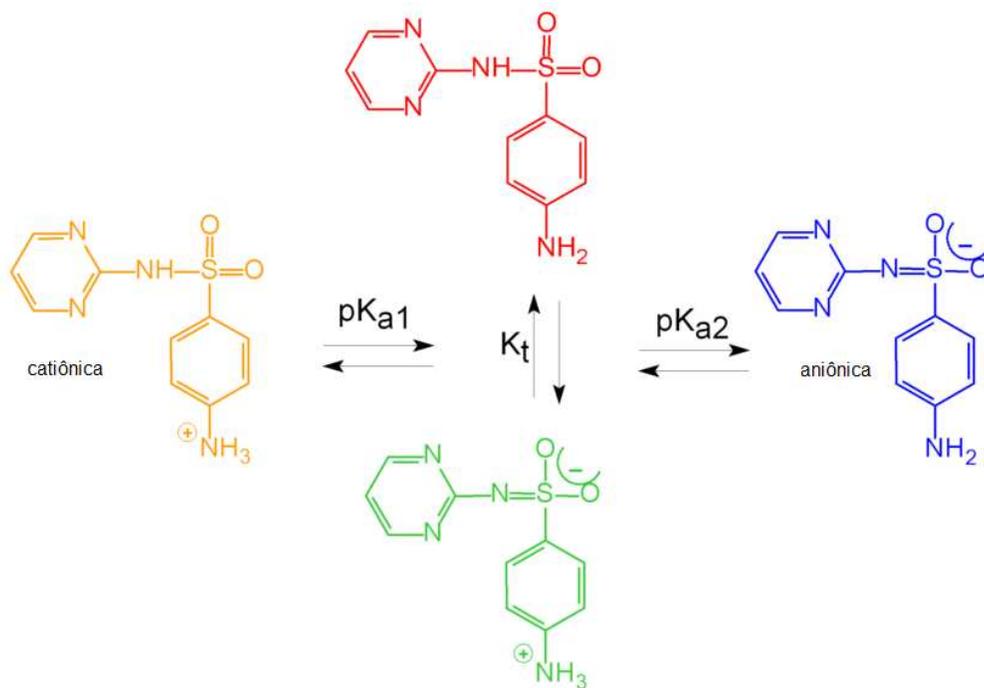
A **Figura 16** ilustra a especiação da sulfadiazina e a fração relativa de suas formas químicas principais, relacionadas ao pH do meio.

O  $pK_{a1}$  representa o valor de pH em que ocorre a protonação do grupo básico amina ( $-NH_2$ ) e o  $pK_{a2}$  o valor de pH em que ocorre a desprotonação do grupo ácido sulfonamida ( $-SO_2NH$ ).

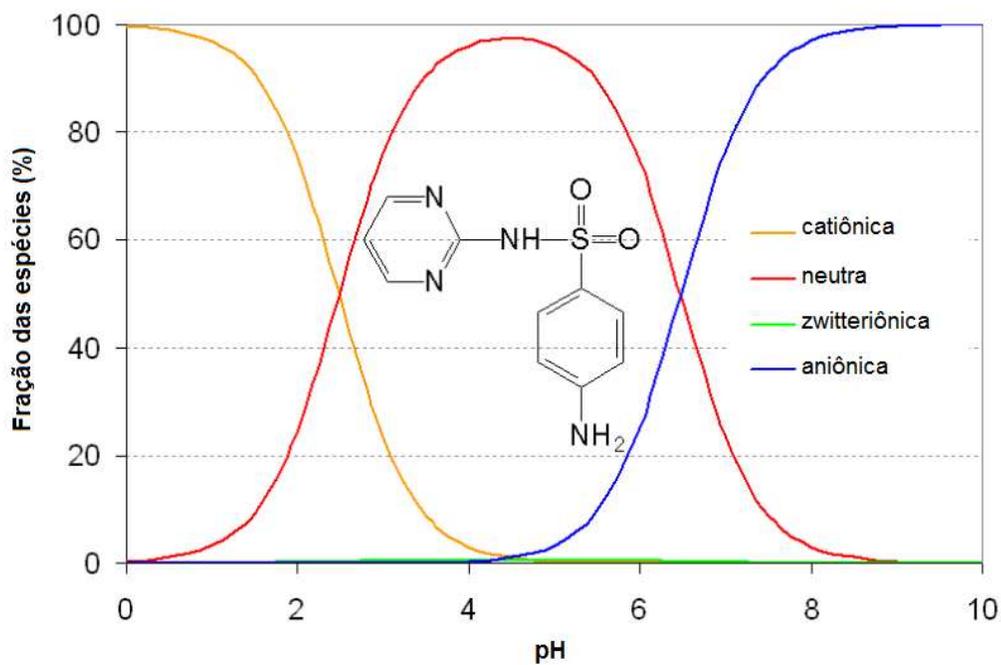
A molécula de sulfadiazina também pode existir como uma espécie zwitteriônica (híbrida), ou seja, que apresenta simultaneamente carga positiva e negativa. Como a fração neutra representa a soma das formas zwitteriônica e sem cargas, que possuem distintos comportamentos ambientais, a constante tautomérica ( $K_t$ ) é utilizada para suplementar a equação de ionização da sulfadiazina (ZARFL, 2008).

Anskjær, Rendal e Kusk (2013) relataram que a especiação da sulfadiazina tem impacto na toxicidade aguda em *Daphnia magna*. No valor do  $pK_{a2}$  ocorre a dissociação do composto neutro para o negativamente carregado, tendo efeito relevante no ambiente, onde pequenas alterações no valor de pH próximo ao  $pK_{a2}$  podem representar um grande impacto no equilíbrio entre as formas neutra e ionizada do composto.

a)



b)



**Figura 16.a)** Esquema da ionização da sulfadiazina em equilíbrio

**b)** Especificação da sulfadiazina em relação ao pH do meio

[ $pK_{a1} = 2,49$ ,  $pK_{a2} = 6,48$ ,  $K_t = 147,9$ , (SAKURAI & ISHIMITSU, 1980, apud ZARFL, 2008)]. Adaptado de: ZARFL (2008)

Os pesquisadores também determinaram que em pH de 6,0 a sulfadiazina apresentou 11 vezes mais toxicidade ( $CE_{50}$ -48h) que em pH de 8,5, estando ambos os valores de pH dentro da faixa de tolerância para o referido microcrustáceo. Portanto, um aumento na toxicidade é esperado quando o pH do meio permite a predominância da forma neutra da sulfadiazina.

De acordo com a **Figura 16**, na faixa de pH utilizada nesse trabalho, são encontradas sobretudo as espécies neutra e aniônica da sulfadiazina. Nos solos brasileiros, tipicamente ácidos, a sulfadiazina poderia assumir, majoritariamente, sua forma neutra, ressalvados diversos fatores de interação.

Devido às similaridades físicas e químicas, é possível que essa toxicidade dependente do valor de pH se estenda à toda classe das sulfonamidas.

Face à essa discussão, fica evidente o alerta de se planejar futuros trabalhos com valores de pH bem definidos quando do estudo dos antimicrobianos e sua relação com o ambiente, assim como a importância de se avaliar não apenas um único valor de pH quando dos estudos toxicológicos com organismos, dado o caráter anfótero das sulfonamidas.

- **Adsorção/dessorção:**

As características físicas e químicas do solo podem interferir na biodisponibilidade da substância, principalmente quando se trata de um antimicrobiano anfótero.

Em relação às propriedades de sorção do solo, este estudo fez uso de solo artificial tropical, com 70% de areia em sua composição. De acordo com Doretto (2012), o solo do tipo areia quartzosa (com características semelhantes ao solo artificial tropical utilizado nesse estudo) foi o que apresentou menor capacidade de adsorção da sulfadiazina, quando comparado a outros três tipos de solos representativos do Estado de São Paulo. Em geral, a adsorção das sulfonamidas é maior em solos com alto teor de argila e carbono orgânico.

Em geral, as sulfonamidas podem ser consideradas muito móveis e lixiviáveis e, portanto, o SAT utilizado nos ensaios de fuga não teria influência sobre uma possível redução da biodisponibilidade do antimicrobiano estudado, que apresenta baixa capacidade de sorção nesse tipo de solo.

Para melhor elucidar o destino ambiental da sulfadiazina no ambiente, mais pesquisas são necessárias, uma vez que sua estrutura molecular complexa e extensa confere uma dinâmica muito variável em solos. A referida mobilidade das sulfonamidas pode ser uma característica desejada para a proteção do solo, mas certamente não o é para o controle da poluição hídrica.

Recomendam-se futuros estudos utilizando solos naturalmente contaminados com sulfadiazina comercial por meio da aplicação de excretas animais, como forma de comprovação das inferências discutidas nesse estudo.

## 6 CONCLUSÃO

O substrato alternativo para o cultivo de *Eisenia andrei* mostrou-se adequado e de preparo simples. Pelo método da pré-compostagem em caixas, o substrato elaborado a partir de restos vegetais domésticos e matéria vegetal seca foi aceitável para o crescimento e reprodução das minhocas *E. andrei*, visando suprir a demanda por organismos com condição requerida aos ensaios biológicos.

O ensaio de comportamento fuga atendeu aos critérios de validação do método (ABNT, 2011) e teve sua sensibilidade aferida com o emprego da substância de referência ácido bórico. A resposta de fuga, estimada pela CE50-48h em 819  $\text{mg}_{\text{H}_3\text{BO}_3} \text{kg}^{-1}$  mostrou correlação com outros trabalhos em condições semelhantes.

A ausência de resposta de fuga evidente nos ensaios com o antimicrobiano sulfadiazina não permitiu estimar, sob as condições de ensaio, um valor exato de CE50-48h para minhocas *Eisenia andrei*, em solo artificial tropical.

O trabalho propiciou, no entanto, uma discussão acerca dos efeitos assimétricos dos contaminantes emergentes sobre os organismos. Para os xenobióticos, como os antimicrobianos, nem sempre as relações dose-resposta se configuram como uma tradicional curva sigmoideal, na qual os efeitos são extremamente adversos acima de uma concentração limiar.

Além disso, fatores edáficos como pH, microbiota, composição do solo e propriedades relativas à sorção, podem alterar a toxicidade das sulfonamidas, quimicamente anfóteras.

No ambiente, embora sejam raros os efeitos tóxicos diretos das sulfonamidas aos invertebrados de solo, não se pode excluir a possibilidade de efeitos indiretos devido às alterações na cadeia alimentar terrestre, no que os ensaios comportamentais podem contribuir como um sinal de alerta precoce de proteção ambiental.

## REFERÊNCIAS

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15537. **Ecotoxicologia terrestre. Ecotoxicidade aguda. Método de ensaio para minhocas.** Rio de Janeiro: ABNT, 11p., 2007.

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO 17512-1. **Qualidade do solo – Ensaio de fuga para avaliar a qualidade de solos e efeitos de substâncias químicas no comportamento. Parte 1: Ensaio com minhocas (*Eisenia fetida* e *Eisenia andrei*).** Rio de Janeiro: ABNT, 26p., 2011.

ALDAYA, M. M.; LORS, C.; SALMON, S.; PONGE, J. F. Avoidance bio-assays may help to test the ecological significance of soil pollution. **Environmental Pollution**. v. 140, p. 173-180, 2006.

ALTENBURGER, R.; BODEKER, W.; FAUST, M.; GRIMME, L. H. Evaluation of the isobologram method for the assessment of mixtures of chemicals: combination effect studies with pesticides in algal biotests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 20, p. 98-114, 1990.

ANSKJÆR, G. G.; RENDAL, C.; KUSK, K. O. Effect of pH on the toxicity and bioconcentration of sulfadiazine on *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 91, nº 8, p. 1183-1188, 2013.

ASTM International. ASTM E1676-12. **Standard guide for conducting laboratory soil toxicity or bioaccumulation tests with the lumbricid earthworm *Eisenia fetida* and the enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*.** ASTM International, West Conshohocken, PA, 2012. Disponível em: <<http://www.astm.org>>. Acesso em 21 fev 2013.

BIALK-BIELIŃSKA, A.; STOLTE, S.; ARNING, J.; UEBERS, U.; BÖSCHEN, A.; STEPNOWSKI, P.; MATZKE, M. Ecotoxicity evaluation of selected sulfonamides. **Chemosphere**, v. 85, nº 6, p. 928-933, 2011.

BOLEAS, S.; ALONSO, C.; PRO, J.; BABIN, M. M.; FERNANDEZ, C.; CARBONELL, G.; TARAZONA, J. V. Effects of sulfachlorpyridazine in MS3-arable land: a multispecies soil system for assessing the environmental fate and effects of veterinary medicines. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, nº 4, p. 811-819, 2005.

BONKOWSKI, M.; GRIFFIN, B. S.; RITZ, K. Food preferences of earthworms for soil fungi. **Pedobiologia**, v. 44, p. 666-676, 2000.

CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A. Toxicology rethinks its central belief. **Nature**, v. 421, p. 691-692, 2003.

CARVALHO, L. V. **Redução da concentração de fenol presente em águas residuárias utilizando sistema anaeróbio-aeróbio: desempenho e toxicidade residual**. 109p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia civil, Arquitetura e Urbanismo – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

CAS, SciFinder Scholar. **Chemical Abstract Service**, American Chemical Society, Washington, DC, 2013.

CLOTFELTER, E. D.; BELL, A. M.; LEVERING, K. R. The role of animal behaviour in the study of endocrine-disrupting chemicals. **Animal Behaviour**, v. 68, p. 665-678, 2004.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL – CETESB. **Solo: poluição**. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/solo/poluicao.asp>>. Acesso em 21 dez 2012.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. **Resolução n. 420, de 28 de dezembro de 2009**. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, nº 7, p. 1820-1830, 2008.

DÍAZ-CRUZ, M. S.; LÓPEZ, M. J.; BARCELÓ, D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. **Trends in analytical chemistry**, v. 22, p. 340-344, 2003.

DOMINGUEZ, J.; VELANDO, A.; FERREIRO, A. Are *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* Bouché (1972) (Oligochaeta, Lumbricidae) different biological species? **Pedobiologia**, nº 49, p. 81-87, 2005.

DORETTO, K. M. **Desenvolvimento de métodos visando a quantificação de sulfonamidas em medicamentos de uso veterinário e estudos de sorção/dessorção em solos**. 168p. Tese (Doutorado) – Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

DROST, W.; MATZKE, M.; BACKHAUS, T. Heavy metal toxicity to *Lemna minor*: studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure. **Chemosphere**, v. 67, nº 1, p. 36-43, 2007.

EDWARDS, C. A., BOHLEN, P. J. **Biology and Ecology of Earthworms**. Chapman and Hall, Londres, 3ª edição, 426 p., 1996.

EDWARDS, C. A. Soil pollutants and soil animals. **Scientific American**, v. 220, nº 4, p. 88-99, 1969. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5780686>>. Acesso em 08 fev 2013.

EGUCHI, K.; NAGASE, H.; OZAWA, M.; ENDOH, Y. S.; GOTO, K.; HIRATA, K.; MIYAMOT, K.; YOSHIMURA, H. Evaluation of antimicrobial agents for veterinary use in the ecotoxicity test using microalgae. **Chemosphere**, v. 57, p. 1733-1738, 2004.

EMA – European Medicines Agency: Veterinary Medicines and Inspections. Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP). EMA/CVMP/ERA/418282/2005-Rev.1, **Revised Guideline on Environmental Impact Assessment for Veterinary Medical Products in Support of the VICH Guidelines GL6 and GL38**. 2008.

FOX, C. J. S. The effects of five herbicides on the number of certain invertebrate animals in grassland soil. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 44, nº 1159, p. 405-411, 1964.

GARCIA, M. V., 2004. **Effects of pesticides on soil fauna: development of ecotoxicological test methods for tropical regions**. Ecology and Development Series No. 19, 281 pp, Zentrum für Entwicklungsforschung, Universidade de Bonn, Alemanha, 2004.

GARCIA, M.; RÖMBKE, J.; BRITO, M. T.; SCHEFFCZYK, A. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. **Environmental Pollution**, v. 153, nº 2, p. 450-456, 2008.

GARCÍA-GALÁN, M. J.; DÍAZ-CRUZ, M. S.; BARCELÓ, D. Combining chemical analysis and ecotoxicity to determine environmental exposure and to assess risk from sulfonamides. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, nº 6, p. 804-819, 2009.

GREENSLADE, P.; VAUGHAN, G. T. A comparison of Collembola species for toxicity testing of Australian soils. **Pedobiologia**, v. 47, p. 171-179, 2003.

GRUE, C. E.; GARDNER, S. C.; GIBERT, P. L. On the significance of pollutant-induced alterations in the behaviour of fish and wildlife. *In*: Dell’Omo, G. (ed.), **Behavioural Ecotoxicology**. John Wiley & Sons Ltd, Reino Unido, 463 p., 2002.

GUIMARÃES, A. A. *Eisenia fetida* ou *andrei*? **Jornal da minhoca**, v. 43, 2003.

GUIMARÃES, A. A. As raízes e a minhoca. **Jornal da minhoca**, v. 53, 2006.

GUIMARÃES, A. A. Suicídio coletivo em minhocas?? **ZooNews – O Portal da Informação de Agronegócios**. 2007. Disponível em: <<http://www.zoonews.com.br/noticiax.php?idnoticia=116270&a=view>>. Acesso em 08 fev 2013.

HALLING-SORESEN, B. Inhibition of aerobic growth and nitrification of bacteria in sewage sludge by antibacterial agents. **Archives of Environmental Contamination Toxicology**, v. 40, p. 451-460, 2001.

HEBEL, S. D. K.; JONES, M. B.; DEPLEDGE, M. H. Responses of crustaceans to contaminant exposure: a holistic approach. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 44, p. 177-184, 1997.

HELLOU, J.; CHEESEMAN, K.; DESNOYERS, E.; JOHNSTON, D.; JOUVENELLE, M. L.; LEONARD, J.; ROBERTSON, S.; WALKER, P. A non-lethal chemically based approach to investigate the quality of harbour sediments. **Science of the Total Environment**, v. 389, p. 178-187, 2008.

HELLOU, J. Behavioural ecotoxicology, an “early warning” signal to assess environmental quality. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 18, n° 1, p. 1-11, 2011.

HUND-RINKE, K.; WIECHERING, H. Earthworm avoidance test for soil assessments: an alternative for acute and reproduction tests. **Journal of Soils and Sediments**, v. 1, p. 15-20, 2001.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 10390. **Soil quality – determination of pH**. Genebra: ISO. 1994.

ISO – 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.

ISO – 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.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11268-3. **Soil quality – effects of pollutants on earthworms. Part 3: Guidance on the determination of effects in field situations**. Genebra: ISO. 1999.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 16387. **Soil quality – effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.) – Determination of effects on reproduction and survival**. Genebra: ISO. 2004.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 17512-1. **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*)**. Genebra: ISO. 2008.

JIN, C.; CHEN, Q.; SUN, R.; ZHOU, Q.; LIU, J. Eco-toxic effects of sulfadiazine sodium, sulfamonomethoxine sodium and enrofloxacin on wheat, Chinese cabbage and tomato. **Ecotoxicology**, v. 18, p. 878-885, 2009.

JÄNSCH, S.; AMORIM, M. J.; RÖMBKE, J. Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. **Environmental Review**, v. 13, p. 51-83, 2005.

KEMPER, N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. **Ecological Indicators**, v. 8, p. 1-13, 2008.

KOTZERKE, A.; KLEMER, S.; KLEINEIDAM, K.; HORN, M. A.; DRAKE, H. L.; SCHLOTTER, M.; WILKE, B. Manure contaminated with the antibiotic sulfadiazine impairs the abundance of nirK- and nirS-type denitrifiers in the gut of the earthworm *Eisenia fetida*. **Biology and Fertility of Soils**, v. 46, p. 415-418, 2010.

LANDGRAF, M. D.; MESSIAS, R. A.; REZENDE, M. O. O. **A importância ambiental da vermicompostagem: vantagens e aplicações**. Rima, São Carlos, 106 p., 2005.

LIGUORO, M.; FIORETTO, B.; POLTRONIERI, C.; GALLINA, G. The toxicity of sulfamethazine to *Daphnia magna* and its additivity to other veterinary sulfonamides and trimethoprim. **Chemosphere**, v. 75, p. 1519-1524, 2009.

LIMA, N. C. **Avaliação do impacto da contaminação do solo de áreas agrícolas de Bom Repouso (MG) por meio de ensaios ecotoxicológicos**. 130p. Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

LOKKE, H.; VAN GESTEL, C. A. M. **Handbook of soil invertebrate toxicity tests**. Willey and Sons, Chichester, 281 p., 1998.

LOUREIRO, S.; SOARES, A. M. V. M.; NOGUEIRA, A. J. A. Terrestrial avoidance behaviour tests as screening tool to assess soil contamination. **Environmental Pollution**, v. 138, nº 1, p. 121-131, 2005.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, nº 3, p. 355-381, 2008.

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/produtos-veterinarios>>. Acesso em 28 mar 2013.

MARQUES, B. Sulfonamidas. *In: Revista porkworld*, nº 59. p. 82-85. Campinas, Nov-Dez 2010. Disponível em: <[http://www.formil.com.br/pork59\\_sanidade.pdf](http://www.formil.com.br/pork59_sanidade.pdf)>. Acesso em 03 jun 2012.

MARTÍNEZ-CARBALLO, E.; GONZALEZ-BARREIRO, C.; SCHARF, S.; GANS, O. Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria. **Environmental Pollution**, v. 148, p. 570-579, 2007.

MASSUKADO, L. M. **Desenvolvimento do processo de compostagem em unidade descentralizada e proposta de software livre para o gerenciamento municipal dos resíduos sólidos domiciliares**. 182p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

MONTEIRO, R. T. R.; FRIGHETTO, R. T. S. Determinação da umidade, pH e capacidade de retenção de água do solo. *In: FRIGHETTO, R. T. S.; VALARINI, P. J. Indicadores Biológicos e Bioquímicos da Qualidade do Solo: Manual Técnico*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. p. 37-40, 2000.

MORIARTY, F. **Ecotoxicology: the Study of Pollutants in Ecosystems**. Academic Press. Londres, 233p., 1983.

NATAL-DA-LUZ T.; RÖMBKE J.; SOUSA, J. P. Avoidance tests in site-specific risk assessment: influence of soil properties on the avoidance response of collembola and earthworms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, p. 1112-1117, 2008.

NORR, C.; RIEPERT, F. Bioaccumulation studies with *Eisenia fetida* using an established degradation test system. **Journal of Soils and Sediments**, v. 7, nº 6, 393-397, 2007.

NUNES, M. E. T. **Avaliação dos efeitos de agrotóxicos sobre a fauna edáfica por meio de ensaios ecotoxicológicos com *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) e com comunidade natural de solo**. 175p. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

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

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD.  
**Guidelines for the testing of chemicals nº 207: Earthworm acute toxicity test.**  
Paris: OECD. 1984.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD.  
**Guidelines for the testing of chemicals nº 220: Enchytraeid reproduction test.**  
Paris: OECD. 2004a.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD.  
**Guidelines for the testing of chemicals nº 222: earthworm reproduction test.** Paris:  
OECD. 2004b.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD.  
**Guidelines for the testing of chemicals nº 317: bioaccumulation in terrestrial oligochaetes.** Paris: OECD. 2010.

PRINCZ, J.; SCROGGINS, R. Toxicological comparison of different soil test options – earthworm lethality, avoidance and reproduction. Apresentação de poster, **13<sup>th</sup> Society of Environmental Toxicology and chemistry (SETAC) Europe Meeting**, Hamburg, 2003.

RAMAIAH, N.; MANOHAR. L; SEENAPPA, D. Effect of three sulphonamides on the growth of mrigal *Cirrhinus mrigala* (Ham). **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 59, nº 3, p. 388-391, 1989.

REGITANO, J. B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, p. 601-616, 2010.

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, nº 6, p. 779-786, 2002.

RICKLEFS, R. E. **A Economia da Natureza**. Guanabara- Koogan, 5ª edição. 503 p, 2001.

ROBINSON, P. D. Behavioural toxicity of organic chemical contaminants in fish: application to ecological risk assessments (ERAs). **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 66, p. 1179-1188, 2009.

ROMBKE, J.; KNACKER, T. Standardisation of terrestrial ecotoxicological effect methods: an example of successful international co-operation. **Journal of Soils and Sediments**, v. 3, nº 4, p. 237-238, 2003.

SARMAH, A. K.; MEYER, M. T.; BOXALL, A. B. A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. **Chemosphere**, v. 65, p.725-759, 2006.

SCHAEFER, M. Earthworms in crude oil-contaminated soils: toxicity tests and effects on crude oil degradation. **AEHS: Contaminated soil sediment and water**, p. 35-37. 2001.

SCHAEFER, M. Behavioural endpoints in earthworm ecotoxicology. **Journal of Soils and Sediments**, v. 3, nº 2, 79-84, 2003.

SCHIEDECK, G.; GONÇALVES, M. M.; SCHWENGBER, J. E. **Minhocultura e produção de húmus para a agricultura familiar**. Embrapa Clima Temperado-Pelotas-RS, Circular Técnica 57, 2006.

SINDAN – SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL. Disponível em: <<http://www.sindan.org.br/sd/base.aspx?controle=8>>. Acesso em 28 mar 2013.

SILVA, P. M. C. S.; VAN GESTEL, C. A. M. Comparative sensitivity of *Eisenia andrei* and *Perionyx excavatus* in earthworm avoidance tests using two soil types in the tropics. **Chemosphere**, v. 77, nº 11, p. 1609-1613, 2009.

SCHMITT, H.; RÖMBKE, J. The ecotoxicological effects of pharmaceuticals (antibiotics and antiparasitocides) in the terrestrial environment – a review. *In*: KÜMMERER, K. (Ed). **Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks**, 3<sup>a</sup> ed., Springer.com, 1998. Part III - Effects, Cap. 18, p. 285-303.

SPURGEON, D. J.; WEEKS, J. M.; VAN GESTEL, C. A. M. A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology. **Pedobiologia**, v. 47, nº 5-6, p. 588-606, 2003.

STEPHENSON, G.; KAUSHIK, A.; KAUSHIK, N. K.; SOLOMON, K. R.; STEELE, T.; SCOGGINS, 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. (eds). **Advances in Earthworm Ecotoxicology**, p. 67-81, Pensacola: SETAC Press, 1998.

SUKUL, P.; SPITELLER, M. Sulfonamides in the environment as veterinary drugs: present status and future scopes – a review. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 187, p. 67-101, 2006.

THIELE-BRUHN, S.; SEIBICKE, T.; SCHULTEN, H. R.; LEINWEBER, P. Sorption of sulfonamide pharmaceutical antibiotics on whole soils and particles-size fractions. **Journal of Environmental Quality**, v. 33, p. 1331-1342, 2004.

VAN GESTEL, C. A. M. Soil ecotoxicology: state of the art and future directions. **ZooKeys**, v. 176, p. 275-296, 2012.

WOLLENBERGER, L.; HALLING-SORENSEN, B.; KUSK, K.O. Acute and chronic toxicity of veterinary antibiotics to *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v. 40, p. 723-730, 2000.

YANG, J. F.; YING, G. G.; YANG, L. H.; ZHAO, J. L.; LIU, F.; TAO, R.; YU, Z. Q.; PENG, P. Degradation behavior of sulfadiazine in soils under different conditions. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 44, p. 241-248, 2011.

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, n° 9, p. 1532-1537, 1996.

ZALA, S. M.; PENN, D. J. Abnormal behaviours induced by chemical pollution: a review of the evidence and new challenges. **Animal Behaviour**, v. 68, p. 649-664, 2004.

ZARFL, C. **Chemical fate of sulfadiazine in soils: mechanisms and modelling approaches**. 104p. Tese (Doutorado) – Institut für Umweltsystemforschung – Universität Osnabrück, Aachen, 2008.

ZIELEZNY, Y.; GROENEWEG, J.; VEREECKEN, H.; TAPPE, W. Impact of sulfadiazine and chlorotetracycline on soil bacterial community structure and respiratory activity. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 38, p. 2372-2380, 2006.

ZIRBES, L.; MESCHER, M.; VRANCKEN, V.; WATHELET, J. P.; VERHEGGEN, F. J.; THONART, P.; HAUBRUGE, E. Earthworms use odor cues to locate and feed on microorganisms in soil. **PlosOne**, v. 6, n<sup>o</sup> 7, p. 1-7, 2011.

## APÊNDICE A

### 1. Capacidade máxima de retenção de água (MONTEIRO e FRIGHETTO, 2000)

Para determinar a capacidade máxima de retenção de água (CMRA), utilizando-se de uma balança analítica, toma-se em duplicata, 20 g de solo artificial tropical (SAT) e coloca-se sobre papel-filtro acondicionado em funil de vidro e apoiado sobre um frasco coletor (Erlenmeyer 500 mL) de massa conhecida.

Adiciona-se, em pequenas porções, 100 g de água destilada sobre o solo contido no filtro.

Cobre-se o aparato com um filme plástico para evitar a evaporação e deixa-se descansar por uma noite. Posteriormente, verifica-se a presença de gotas d'água na haste do funil e, se for o caso, aplicam-se leves batidas na haste para auxiliar a liberação dessas gotas para o frasco coletor.

Toma-se a massa novamente do frasco coletor em balança analítica.

Realizar um controle da determinação de CMRA, também em duplicata, seguindo o mesmo procedimento, exceto pela ausência de solo no filtro.

Para cada aparato com solo montado, calcula-se a capacidade máxima de retenção de água pela seguinte fórmula:

$$\text{CMRA (\%)} = [(100 - A_p) + A_i] / M_s \times 100 \quad (1)$$

sendo:

$A_p$  = água percolada (g): massa do frasco coletor ao final do ensaio – massa do frasco coletor no início do ensaio

$A_i$  = água inicial (g): teor de água existente inicialmente na amostra (umidade inicial: verificar **item 2** desse apêndice)

$M_s$  = massa do solo seco (g)

Para cada aparato controle montado, calcula-se a capacidade de retenção de água:

$$\text{CRA (\%)} = (100 - A_p) \quad (2)$$

sendo:

$A_p$  = água percolada (g): massa do frasco coletor ao final do ensaio – massa do frasco coletor no início do ensaio

Para se obter a CMRA (%) final do solo, calcula-se a média das porcentagens obtidas nas duplicatas com solos e subtrai-se da média dos controles.

## 2. Umidade

Para determinar o teor de umidade do solo, utilizando-se de uma balança analítica, toma-se aproximadamente 5 g do solo em recipiente (cápsula ou cadinho) de massa conhecida.

Leva-se à estufa por 24 horas a 105 °C.

Posteriormente, coloca-se o conjunto em dessecador e após algumas horas toma-se a massa do recipiente e solo seco.

A umidade, em porcentagem correspondente à massa de solo, é obtida pela fórmula:

$$U (\%) = [(W_2 - W_3) / (W_3 - W_1)] \times 100 \quad (3)$$

sendo:

$W_1$  = massa do recipiente (g)

$W_2$  = massa do recipiente + substrato (g)

$W_3$  = massa do recipiente + substrato seco (g)

### 3. pH

Para determinar o pH do solo artificial tropical (SAT), toma-se uma porção do mesmo e deixa-se secar ao ar, à temperatura ambiente, por no mínimo 12 h.

Posteriormente, prepara-se uma suspensão 1:5 (em volume): 5 mL de solo seco para 25 mL de água desionizada ou  $\text{CaCl}_2$   $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ . Agita-se vigorosamente por 5 minutos e mantém-se em repouso por 2 horas.

O pH do sobrenadante é medido após vigorosa agitação, em equipamento pHmetro calibrado.

## APÊNDICE B

### 1. Exemplo de formulário para preparo e execução do ensaio de fuga

Ensaio de sensibilidade ao Ácido Bórico ( $H_3BO_3$ ) – *Eisenia andrei*

Início: 27/07/2013

#### Resumo:

Concentrações de ácido bórico (base seca):

125 mg/kg / 250 mg/kg / 500 mg/kg / 750 mg/kg / 1500 mg/kg

Substrato: solo artificial tropical (**SAT**) (ISO 11268-1, com modificações<sup>2</sup>)

Água de diluição da substância de referência: água desionizada

Duração: 48 horas

Cada concentração: 4 réplicas

500 g de substrato (base seca) por réplica (250 g seção A: tratamento / 250 g seção B: controle)

10 organismos por réplica

Mantidos à 25° C / fotoperíodo 12h claro: 12 h escuro (400 a 800 lux)

Organismos: adultos de *E. andrei* com mais que 2 meses de idade e presença de clítelo.

---

<sup>2</sup> Duas alterações foram feitas no substrato SAT em relação às recomendações dos protocolos internacionais: uso de fibra de casca de coco como fonte de matéria orgânica, em substituição à turfa de esfagno, e ensaio realizado a temperatura de  $25 \pm 1^\circ C$ . O mesmo foi relatado por Garcia et al. (2008) e Nunes et al. (2012), em ensaio com solo artificial com a mesma constituição do utilizado no presente estudo, em temperatura de  $28 \pm 2^\circ C$  e  $25 \pm 2^\circ C$  respectivamente, não verificando problemas com a validação do método.

### **Preparo dos organismos:**

No dia anterior, selecionar ao acaso 240 minhocas adultas e cliteladas.

Manter por 24h no solo controle com umidade ajustada.

### **Preparo do SAT:**

O ensaio utiliza ao todo 13 kg de SAT (massa seca), sendo:

- Aclimação dos organismos: 1 kg;
- Recipientes-teste: seção A: 6 kg; seção B: 6 kg

(5 concentrações + ensaio de controle dual – 4 réplicas com solo controle em ambas as seções – realizado juntamente com o ensaio definitivo)

Guia para preparo do SAT em porções:

	3 kg	4 kg	5 kg	6 kg	7 kg
Areia fina (70%)	2,1 kg	2,8 kg	3,5 kg	4,2 kg	4,9 kg
Argila branca (20%)	0,6 kg	0,8 kg	1,0 kg	1,2 kg	1,4 kg
Fibra de coco (10%)	0,3 kg	0,4 kg	0,5 kg	0,6 kg	0,7 kg
CaCO <sub>3</sub> (0,05%)	1,5 g	2,0 g	2,5 g	3,0 g	3,5 g

Juntar toda a parte seca em bandejas ou sacos plásticos e homogeneizar bem.

Despejar em bandejas para ajustar a umidade com água ou solução-teste.

### **Medição do pH do solo após o preparo** (mais detalhes, vide APÊNDICE A):

Procedimento para o solo controle e o solo-teste (5 concentrações):

Identificar 6 placas de Petri e 6 béqueres de 50 mL:

Adicionar cerca de 10 g de solo na placa e secar naturalmente, por no mínimo 12 h

Transferir 5 g de solo seco para o béquer

Adicionar 25 mL de água desionizada

Agitar vigorosamente por 5 min.

Manter o béquer em repouso por no mínimo 2 h.

Medir o pH no sobrenadante (agitar e verificar se o pH se altera)

Obs: o pH do SAT deve estar entre 5,5 e 6,5.

**Medição da umidade do solo após o preparo** (mais detalhes, vide APÊNDICE A):

Condicionar em estufa uma cápsula de porcelana pequena por 1 h.

Aguardar esfriar em dessecador e pesar a cápsula vazia ( $W_1$ ).

Pesar ~5 g de solo na cápsula ( $W_2$ ) e levar à estufa por 24 horas a 105 °C.

Aguardar esfriar em dessecador e tomar a massa da cápsula + solo seco ( $W_3$ ).

A umidade, em porcentagem correspondente à massa de solo, é obtida pela fórmula:

$$U (\%) = [(W_2 - W_3) / (W_3 - W_1)] \times 100$$

sendo:

$W_1$  = massa do recipiente: cápsula pequena (g) = 21,882 g

$W_2$  = massa do recipiente + substrato (g) = 26,954 g

$W_3$  = massa do recipiente + substrato seco (g) = 25,296 g

U = 48,6% de umidade

Parâmetros físico-químicos do solo:

	<b>Controle</b>	<b>125 mg/kg</b>	<b>250 mg/kg</b>	<b>500 mg/kg</b>	<b>750 mg/kg</b>	<b>1500 mg/kg</b>
pH	6,6	6,6	7,0	7,1	6,9	7,0
Umidade (%)	48,6					

### Preparo das soluções-estoque de ácido bórico:

Preparar soluções estoque de ácido bórico em água desionizada, de acordo com as concentrações-teste (em mg/kg) requeridas:

$$\text{Solução-estoque (mg/L)} = \frac{\text{concentração - teste(mg/kg)} \times M}{V \text{ (mL)}} \times 1000$$

Sendo:

M = 1 kg (massa de substrato seco, em kg).

V = 400 mL (volume da solução-estoque a ser adicionado ao substrato, em cada concentração).

Utilizar bandejas para o preparo das concentrações e um recipiente-teste de 1000 mL por réplica.

Concentração-teste no substrato seco (mg/kg)	Concentração da solução-teste (mg/L)	Peso final do substrato úmido 1,4 kg	
		Massa de substrato seco (g)	Vol <sup>(*)</sup> para ajustar a umidade a 60% da CMRA (mL)
Controle	Água desionizada	1000	400
125	312,5	1000	400
250	625	1000	400
500	1250	1000	400
750	1875	1000	400
1500	3750	1000	400

(\*) Vol. de água desionizada ou solução-estoque a ser adicionada no início do ensaio.

**Replicatas:** frascos de polipropileno (1000 mL) divididos ao meio, em duas seções.

Seção A: solo tratamento (SAT + ácido bórico). Seção B: solo controle (SAT).

**Preparar inicialmente duas soluções de ácido bórico:**

<b>Solução (mg/L)</b>	<b>Ácido bórico (g)</b>	<b>Avolumar para (balão volumétrico – mL)</b>
A: 3750	3,750	1000
B: 1250	1,250	1000

As soluções acima são, ao mesmo tempo, soluções-teste e soluções-estoque usadas para preparar as demais concentrações, de acordo com a tabela abaixo:

<b>Solução (mg/L)</b>	<b>Alíquota da solução-estoque A (mL)</b>	<b>Alíquota da solução-estoque B (mL)</b>	<b>Avolumar para (balão volumétrico – mL)</b>
1875	250	--	500
625	--	250	500
312,5	--	250	500

Volume utilizado de solução-teste por concentração-teste: 400 mL

**Cálculo do volume de água a ser adicionada:**

Umidade-alvo para o ensaio: 60% da Capacidade Máxima de Retenção de Água.

CMRA medida: 77,5% → 60% da CMRA = 465 g de água para 1000 g de SAT seco.

Juntar 65 mL de água aos 400 mL de solução-teste, antes da adição ao SAT.

Parâmetros físicos de incubação:	0 h	48 h
U.R. do ar (%)	36	39
Temperatura câmara (°C)	25,3	25,0
Temperatura ambiente (°C)	27	26
Luminosidade câmara (lux)	~650	~650

**Lavagem do material e vidraria:**

Material novo: lavagem com solução de ácido nítrico ou clorídrico a 10%, água de torneira e água processada (purificada).

Vidraria utilizada para as amostras: detergente neutro, água de torneira, acetona, solução de ácido nítrico ou clorídrico a 10%, água de torneira e água processada.

**Preparo de material geral:**

- 24 frascos plásticos 1000 mL (recipientes-teste) para a exposição dos organismos
- 13 kg de substrato artificial seco;
- 6 L de água desionizada;
- 2 balões volumétricos 1000 mL e 3 balões volumétricos 500 mL
- 3 provetas 250 mL e 1 proveta 100 mL
- 2 béqueres 1000 mL e 3 béqueres 500 mL
- espátula;
- bagueta;
- bandejas
- balança analítica
- câmara incubadora ajustada para 25°C e iluminação

### Anotação das observações referentes ao final do ensaio de fuga

No.	Identificação das réplicas	Conc. H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	No. org. seção A	No. org. seção B	Total seção A	Total seção B	Fuga (%)
1	Controle A	0 mg/kg	3	7	22	18	-10
2	Controle B	0 mg/kg	6	4			
3	Controle C	0 mg/kg	7	3			
4	Controle D	0 mg/kg	6	4			
5	125 A	125 mg/kg	6	4	25	15	-25
6	125 B	125 mg/kg	3	7			
7	125 C	125 mg/kg	8	2			
8	125 D	125 mg/kg	8	2			
9	250 A	250 mg/kg	6	4	19	21	5
10	250 B	250 mg/kg	5	5			
11	250 C	250 mg/kg	4	6			
12	250 D	250 mg/kg	4	6			
13	500 A	500 mg/kg	4	6	15	25	25
14	500 B	500 mg/kg	5	5			
15	500 C	500 mg/kg	3	7			
16	500 D	500 mg/kg	3	7			
17	750 A	750 mg/kg	3	7	11	29	45
18	750 B	750 mg/kg	3	7			
19	750 C	750 mg/kg	4	6			
20	750 D	750 mg/kg	1	9			
21	1500 A	1500 mg/kg	2	8	6	34	70
22	1500 B	1500 mg/kg	1	9			
23	1500 C	1500 mg/kg	1	9			
24	1500 D	1500 mg/kg	2	8			

10 organismos por réplica.

**Fuga (%) = [(seção B – seção A)/n]x100** (mais detalhes, vide item 4.6)

Calcular o número de organismos que a porcentagem de fuga representa, pois esse número será usado no cálculo estatístico, como representado abaixo.

CE50-48h = 880 mg<sub>H3BO3</sub> kg<sup>-1</sup>. (Spearman-Karber Method)

(95% lower confidence = 680 mg kg<sup>-1</sup>; 95% upper confidence = 1138 mg kg<sup>-1</sup>)

```
C:\Users\LABSAN~1\CYB\Desktop\ESTATS~1\jspear\GWBASIC.EXE
ENTER THE NUMBER OF INDIVIDUALS AT EACH CONCENTRATION: 40
ENTER UNITS FOR DURATION OF EXPERIMENT
(HOURS, DAYS, ETC.): hours
ENTER DURATION OF TEST: 48
ENTER THE NUMBER OF MORTALITIES AT EACH CONCENTRATION
1: 0
2: 2
3: 10
4: 18
5: 28
WOULD YOU LIKE A DATA GRAPH (Y/N)? n
WOULD YOU LIKE THE AUTOMATIC TRIM CALCULATION (Y/N)? y
DATE 27-07-20 TEST NUMBER 3 DURATION 48 hours
CHEMICAL H3BO3 SPECIES Eisenia andrei
RAW DATA
CONCENTRATION(mg kg) 125.00 250.00 500.00 750.00 1500.00
NUMBER EXPOSED 40 40 40 40 40
MORTALITIES 0 2 10 18 28
SPEARMAN-KARBER TRIM 30.00
SPEARMAN-KARBER ESTIMATES EC50 879.7719727
95% LOWER CONFIDENCE 680.27
95% UPPER CONFIDENCE 1137.79
-----
WOULD YOU LIKE TO HAVE A COPY SENT TO THE PRINTER(Y/N)?
1[LIST] 2[RUN] 3[LOAD] 4[SAVE] 5[CONT] 6[QUIT] 7[TRON] 8[TROFF] 9[KEY] 0[SCREEN]
```