

UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA – UNIARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO
TERRITORIAL E MEIO AMBIENTE

Renata Muniz Missurini

AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO SOLO DE DIFERENTES MANEJOS
NO ASSENTAMENTO BELA VISTA DO CHIBARRO (ARARAQUARA-SP).

Araraquara
2018

Renata Muniz Missurini

**AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO SOLO DE DIFERENTES MANEJOS
NO ASSENTAMENTO BELA VISTA DO CHIBARRO (ARARAQUARA-SP).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Territorial e Meio Ambiente, curso de Mestrado, na Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Desenvolvimento Territorial e Meio Ambiente.

Área de Concentração: Desenvolvimento Territorial e Alternativas de Sustentabilidade.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Rossi Gorni

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria Lucia Ribeiro

**Araraquara
2018**

M663a Missurini, Renata Muniz

Avaliação ecotoxológica do solo de diferentes manejos no Assentamento Bela Vista do Chibarro (Araraquara-SP)/Renata Muniz Missurini. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2018. 91f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Territorial e Meio Ambiente- Universidade de Araraquara-UNIARA

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Rossi Gorni

1. Agrotóxicos. 2. Solo. 3. Ecotoxicologia. 4. Enchytraeus Crypticus. 5. Lactuca sativa. 6. Daphnia magna. I. Título.

CDU 577.4



FOLHA DE APROVAÇÃO

NOME DO(A) ALUNO(A): *Renata Muniz Missurini*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento Territorial e Meio Ambiente, curso de Mestrado, da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Desenvolvimento Territorial e Meio Ambiente.

Área de Concentração: Desenvolvimento Territorial e Alternativas de Sustentabilidade.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Guilherme Rossi Gorni
UNIARA – Araraquara

Prof. Dr. Olavo Nardy
UNIARA – Araraquara

Profa. Dra. Mara Rúbia de Lima e Silva
UNIARA - Araraquara

Dedico este trabalho à minha mãe, Débora Regina Muniz, por todo amor, apoio e incentivo, e por ter me ensinado a persistir e lutar com garra, mesmo diante das adversidades.

Agradeço, em primeiro lugar, a Deus, pelo dom da vida, pela força e coragem e por me guiar para o caminho da sabedoria.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Guilherme Rossi Gorni, que me acolheu de braços abertos, me conduzindo com paciência e maestria, por toda confiança e apoio e por ter acreditado em minha capacidade, até quando eu mesma não acreditava. Obrigada por ser meu amigo orientador e meu orientador mais que amigo!

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Maria Lucia Ribeiro, querida “Bilu”, por toda atenção e simpatia em todos os momentos.

A todos os professores deste programa, que me ensinaram tanto, não só na academia, mas também na vida. Vocês serão meus eternos mestres. Obrigada pela excelência!

As queridas secretárias Silvinha, Ivani, Fernanda e Tatiane, que sempre me receberam com um sorriso, e que mesmo indiretamente, contribuíram para a minha formação.

Aos professores da banca examinadora, Prof. Dr. Olavo Nardi e Profa. Dra. Mara Rúbia de Lima e Silva que com maestria possibilitaram melhorar e engrandecer esta pesquisa.

A Profa. Dra. Carolina Lourencetti e Doutoranda Mayara Felipe que contribuíram muito neste trabalho, sem vocês isso não seria possível.

A amiga e estagiária Rafaela Baldassari Silvestre, pelas incansáveis horas de laboratório, contando e cuidando de minhocas. Sem você este trabalho certamente não existiria!

A Mariana Futenma de Lima, amiga e futura mestre, que sempre dava um jeito de me animar, mesmo naqueles momentos que o pensamento era desistir. Obrigada por sempre me ouvir e me alimentar!

A todos amigos que sempre estiveram comigo, nos momentos bons e ruins, me lembrando as coisas importantes desta vida!

A todos que passaram pela minha vida durante esses 2 anos, meus sinceros sentimentos de gratidão.

RESUMO

Ao longo dos anos, o solo tem recebido diversos contaminantes que podem comprometer os organismos e o ambiente. O modelo de agricultura convencional é o maior responsável por estas ações, principalmente no Brasil, que hoje é considerado um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo. Em vista disso, a investigação desses contaminantes e suas interações com o ecossistema são de extrema importância. Este estudo tem por objetivo avaliar a ecotoxicidade do extrato da fração solúvel do solo de dois manejos, convencional e orgânico, no assentamento Bela Vista do Chibarro. Para tanto, foi proposto nesta pesquisa, o desenvolvimento de uma nova metodologia de bioensaios ecotoxicológicos de solo utilizando um sistema multi-espécies em microcosmos (MS-2) com dois organismos indicadores, sendo eles adultos de *Enchytraeus crypticus* e sementes de *Lactuca sativa*. Foi realizada a extração da fração solúvel do solo e, a partir do extrato, foi determinada a presença de glifosato e seu principal metabolito, por cromatografia líquida de alta eficiência, além dos ensaios ecotoxicológicos com o MS-2 e um teste complementar com *Daphnia magna*. Na determinação cromatográfica dos compostos, as concentrações encontram-se abaixo do limite de quantificação do método. Os ensaios ecotoxicológicos com a metodologia MS-2 não mostraram diferença significativa entre os manejos e no teste com *D. magna*, dois pontos apresentaram toxicidade mediana. Portanto, os manejos agrícolas não diferem, uma vez que o assentamento é uma área heterogênea, com complexidade de manejos empregados no local.

Palavras – chave: Agrotóxicos; Solo; Ecotoxicologia; *Enchytraeus crypticus*; *Lactuca sativa*; *Daphnia magna*; Araraquara.

ABSTRACT

Over the years, the soil has received several contaminants that can compromise organisms and the environment. The conventional agriculture model is the main responsible for these actions, especially in Brazil, which today is considered one of the largest consumers of pesticides in the world. In view of this, the investigation of these contaminants and their interactions with the ecosystem are extremely important. The objective of this study was to evaluate the ecotoxicity of the extract of the soluble fraction of the soil of two managements, conventional and organic, in the Bela Vista do Chibarro settlement. In order to do so, it was proposed in this research the development of a new methodology of soil ecotoxicological bioassays using a multi-species system in microcosmos (MS-2) with two indicating organisms, being *Enchytraeus crypticus* adults and *Lactuca sativa* seeds. The soluble fraction of the soil was extracted and the presence of glyphosate and its main metabolite was determined by high performance liquid chromatography, besides the ecotoxicological tests with MS-2 and a complementary test with *Daphnia magna*. In the chromatographic determination of the compounds, the concentrations are below the limit of quantification of the method. The ecotoxicological tests with the MS-2 methodology showed no significant difference between the treatments and in the *D. magna* test, two points presented medium toxicity. Therefore, the agricultural management does not differ, since the settlement is a heterogeneous area, with complexity of managements employed in the place.

Keywords: Agrochemicals; Soil; Ecotoxicology; *Enchytraeus crypticus*; *Lactuca sativa*; *Daphnia magna*; Araraquara.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Lactuca sativa</i> L. (alface)	27
Figura 2 - <i>Enchytraeus crypticus</i> . A - Indivíduos adultos; B – Clitelo evidente; C – Casulos em diversas fases do desenvolvimento embrionário; D – Eclosão de um juvenil e E – Desenho esquemático.....	30
Figura 3 - Diferentes estágios de vida de <i>Daphnia magna</i> (embrião, neonato, macho, fêmea, efípio).....	31
Figura 4 - Localização do Assentamento Bela Vista do Chibarro, no município de Araraquara/SP.....	34
Figura 5 - Mapa do solo do município de Araraquara/SP.	37
Figura 6 - Assentamento Bela Vista do Chibarro e propriedades amostradas.	43
Figura 7 - Pontos de coleta localizados em duas propriedades do Assentamento Bela Vista do Chibarro - Araraquara/SP.	44
Figura 8 - A – Lote nº 161 do Assentamento Bela Vista; B – Ponto 1 e C – Ponto 2....	45
Figura 9 - A – Lote nº 15 do Assentamento Bela Vista; B – Ponto 3 e C – Ponto 4.....	46
Figura 10 - Precipitação média mensal do ano de 2017 no município de Araraquara-SP.	47
Figura 11 - Coleta das amostras de solo. A – Método ziguezague de amostragem de solos; B – amostras de solo coletadas de 0-10 cm de profundidade.....	48
Figura 12 - Processamento da amostra do solo em câmara de germinação (BOD).	49
Figura 13 - Extração da fração solúvel do solo (A – Solução em incubadora shaker; B – Filtragem da solução e C – extratos da fração solúvel do solo).	50
Figura 14 - Coleção de culturas de <i>Enchytraeus crypticus</i> em ágar bacteriológico.	52
Figura 15 - Metodologia MS-2. A – Preparação dos frascos com meio de cultura; B – Primeiro dia do bioensaio; C – Após 21 dias.	55
Figura 16 - Ensaio de ecotoxicidade aguda com <i>D. magna</i>	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resumo do Registro de agrotóxicos e afins no MAPA, de 2010 a 2017.	16
Tabela 2 - Diferentes classificações dos herbicidas.	18
Tabela 3 - Coordenadas geográficas dos pontos de coleta no Assentamento Bela Vista do Chibarro – Araraquara/SP.	41
Tabela 4 - Sais e concentração das soluções adicionadas ao ágar bacteriológico para manutenção das culturas.	52
Tabela 5 - Métricas ecotoxicológicas.	56
Tabela 6 - Análise de Glifosato e AMPA por CLAE-DF.	60
Tabela 7 - Transformação da análise de Glifosato e AMPA para variável categórica ordinal.	61
Tabela 8 - Média e erro padrão dos parâmetros da metodologia MS-2.	62
Tabela 9 - Média e erro padrão da porcentagem de sobrevivência de <i>D. magna</i>	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos, segundo ANVISA.	17
Quadro 2 - Classificação dos agrotóxicos quanto ao seu Potencial de Periculosidade Ambiental, segundo IBAMA.....	17
Quadro 3 - Resumo da classificação dos herbicidas, incluindo forma de aplicação e translocação, mecanismo de ação e grupos químicos.....	20
Quadro 4 - Escala de toxicidade relativa para porcentagem de sobrevivência de <i>Daphnia magna</i>	59
Quadro 5 - Toxicidade relativa (%) em <i>D. magna</i>	63

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	12
1.1. Relação da agricultura e o uso de agrotóxicos.....	13
1.2. Herbicida glifosato e seu metabólito AMPA	21
1.3. Agricultura orgânica como alternativa	22
1.4. Ecotoxicologia como ferramenta de análise	24
1.4.1. Sistema multi-espécies de análise de solo	25
1.4.2. <i>Daphnia magna</i> (Cladocera, Crustacea).....	31
1.5. O Assentamento Bela Vista do Chibarro	33
1.5.1. Caracterização ambiental.....	36
II. JUSTIFICATIVA	39
III. HIPÓTESE	40
IV. OBJETIVOS.....	40
4.1 Objetivo Geral.....	40
4.2 Objetivos Específicos	40
V. METODOLOGIA	41
5.1. Pontos de Amostragem	41
5.2. Coleta das Amostras de Solo	47
5.3. Processamento das amostras de solo	48
5.4. Extração da Fração Solúvel do Solo	49
5.5. Determinação dos Agrotóxicos.....	50
5.6. Desenvolvimento das culturas de <i>Enchytraeus crypticus</i> (Enchytraeidae, Oligochaeta).....	51
5.7. Bioensaios ecotoxicológicos do solo	52
5.8. Sistema multi-espécies de análise de solo em microcosmos (MS-2)	53
5.9. Ensaio de ecotoxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i> (Crustacea, Cladocera).57	

5.10. Análise dos dados	59
VI. RESULTADOS	60
6.1. Determinação de Glifosato e seu metabolito AMPA.....	60
6.2. Bioensaios ecotoxicológicos do solo	61
6.2.1. Sistema multi-espécies de análise de solo em microcosmos (MS-2)	61
6.2.2. Ensaio de toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i> (Crustacea, Cladocera).	
63	
VII. DISCUSSÃO.....	64
7.1. Reflexões sobre os manejos convencional e orgânico.....	67
VIII. CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
REFERÊNCIAS	70
APÊNDICE A	89

I. INTRODUÇÃO

Historicamente, o solo tem sido utilizado como receptor de substâncias resultantes das atividades antrópicas, que introduzem diversos compostos no ambiente, sejam eles insumos ou outros contaminantes (MARION, 2011). Boa parte destes compostos atinge o ambiente por aplicação direta ou dispersão, comprometendo a saúde dos organismos e do próprio ambiente (ANDRÉA, 2010).

Com o aparecimento dos processos de transformação em grande escala, a partir da Revolução Industrial, a liberação de poluentes para o ambiente e sua consequente acumulação no solo e sedimentos sofreu mudanças drásticas, de forma e de intensidade. Mudanças estas explicadas pelo uso intensivo dos recursos naturais e dos resíduos gerados pelo aumento das atividades urbanas, industriais e agrícolas (CETESB, 2016).

Ao longo dos anos, a agricultura mundial aumentou sua produtividade e área cultivada. O constante crescimento da população e a crise de alimentos no mundo têm levado a um aumento no uso de agrotóxicos para o controle de ervas daninhas, doenças e pragas, e por consequência muitas substâncias foram desenvolvidas, com funcionalidades diferenciadas e comportamentos ambientais distintos. Deste modo, devido à intensiva utilização destes produtos químicos e pela capacidade de formação de grandes quantidades de resíduos, há uma maior preocupação em conhecer o comportamento e o destino dos agrotóxicos nos diversos ecossistemas (ARAÚJO, 2002; ARMAS e MONTEIRO, 2005).

De acordo com Nunes (2010), a possibilidade de contaminação de águas superficiais e subterrâneas justifica o grande interesse pelo comportamento dos agrotóxicos no solo, uma vez que esses compostos, quando são introduzidos, apresentam como destino final os corpos d'água. Nesse contexto a poluição destes ecossistemas pode ter consequências importantes para todas as formas de vida, como a alteração da qualidade da atmosfera, da água e do solo (ANDRÉA, 2010).

Cassal *et al.* (2014), afirmam que níveis elevados de contaminação humana e ambiental por agrotóxicos, têm sido encontrados em regiões agrícolas no Brasil. São vários os fatores que contribuem para essa estatística, como, por exemplo, a ampla utilização destes compostos, o desrespeito às normas de segurança e a livre comercialização. Além disso, o padrão de desenvolvimento da agricultura tem

contribuído significativamente na degradação dos recursos naturais, em virtude do consumo exacerbado destes produtos.

1.1. Relação da agricultura e o uso de agrotóxicos

O início da agricultura está ligado a uma série de transformações no conceito de produzir, passando por várias revoluções agrícolas, que visavam diminuir as restrições do ambiente e a necessidade de trabalho (DE ASSIS e ROMEIRO, 2002).

A partir dos anos 50, a agricultura moderna priorizou um modelo tecnológico denominado de Revolução Verde, com base no uso intensivo da mecanização, adubos minerais de alta solubilidade e agroquímicos. Esse tipo de agricultura pode provocar contaminação de solos, água e ar, além de causar resistência de pragas. Durante esse período, a agricultura se desenvolveu expressivamente provocando inúmeros impactos ao ambiente. (KAMIYAMA *et al.*, 2011).

Esse modelo de agricultura praticado é direcionado aos grandes produtores e contribui tanto para o aumento da produção no meio rural como para a liberação de mão de obra e o crescimento das indústrias (MARIANI e HENKES, 2015).

De acordo com o Art. 2º da Lei nº 7.802, de 11 de Julho de 1989, a “Lei dos agrotóxicos”, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, são considerados agrotóxicos:

- a) os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos;
- b) substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 1989).

Regulamentando essa lei, o Decreto nº. 4.074, de 04 de Janeiro de 2002, estabelece que as avaliações dos produtos ou substâncias para fins de registro ou reavaliação de registro são competências da ANVISA, vinculada ao Ministério da Saúde, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, vinculado ao Ministério do Meio Ambiente, e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA (BRASIL, 2002).

A utilização dos agrotóxicos na agricultura iniciou-se na década de 1920, quando ainda eram pouco conhecidos do ponto de vista ecotoxicológico. Durante a Segunda Guerra Mundial foram empregados como arma química, a partir de então, seu uso se expandiu imensamente e a produção industrial mundial chegou a produzir milhares de toneladas de agrotóxicos por ano. No Brasil, primeiramente foram utilizados em programas de saúde pública, como combate a vetores e controle de parasitas e, a partir de 1960, seu uso foi intensificado na agricultura (OPAS/OMS, 1996).

Em 2003 foi criado o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da ANVISA através da RDC 119/03, com o objetivo de avaliar e promover a qualidade dos alimentos em relação ao uso de agrotóxicos e afins. Desde então, esse programa contribui para a segurança alimentar, visando prevenir intoxicações agudas ou crônicas que podem resultar da exposição dietética indevida a esses compostos (ANVISA, 2016). Segundo um dossiê realizado pela Associação Brasileira de Saúde Coletiva – ABRASCO, um terço dos alimentos consumidos cotidianamente pelos brasileiros está contaminado pelos agrotóxicos (CARNEIRO *et al.*, 2015).

De acordo com Ministério do Meio Ambiente, o comportamento destes compostos no ambiente é complexo. Independente do modo de aplicação podem atingir o solo e os corpos d'água, devido principalmente às chuvas, que promovem a deriva, a lavagem das folhas tratadas e a lixiviação. Essas substâncias sofrem processos físicos, químicos ou biológicos, que podem modificar as suas propriedades e influenciar no seu comportamento, inclusive com a formação de subprodutos com propriedades absolutamente distintas do produto inicial e cujos danos à saúde ou ao ambiente também são diferenciados (BRASIL, 2016).

Gordon *et al.* (2005) consideram a agricultura convencional uma das principais atividades humanas consumidoras de água. Estima-se que 70% da água doce do planeta são destinadas a irrigação, sendo esta atividade apontada como uma relevante fonte poluidora dos recursos hídricos (DIAZ & ROSENBERG, 2008).

Sob determinadas condições de solo e clima, o uso excessivo ou o manejo inadequado dos fertilizantes, pode promover a eutrofização das águas. A erosão e outras formas de degradação do solo são outros problemas proporcionados pela agricultura intensiva. (Rosset *et al.* 2014; Mori *et al.*, 2009).

Ademais, o desmatamento das florestas com mata nativa, em vista da abertura de novas fronteiras agrícolas vem ocorrendo ano após ano (EHLERS, 1996). Com a retirada da vegetação, o ciclo natural é rompido e o retorno de matéria orgânica para o solo é minimizado. Com o passar do tempo, a qualidade do solo diminui, a matéria orgânica deixada pelas culturas não é suficiente e as propriedades do solo vão se desgastando. O revolvimento excessivo destrói sua estrutura, tornando o solo mais suscetível ao processo erosivo e de desertificação, além de sua compactação (POSSENTI *et al.*, 2007).

Parte destes compostos tem a capacidade de se dispersar no ambiente, e outra parte pode se acumular no organismo humano, inclusive no leite materno, que ao ser consumido pelos recém-nascidos pode provocar agravos à saúde, uma vez que eles são mais vulneráveis e por se alimentarem, quase exclusivamente desse alimento até os seis meses de idade (CARNEIRO *et al.*, 2015).

O uso indiscriminado de agrotóxicos também tem como resultado intoxicações entre os trabalhadores rurais, expostos diretamente a estes produtos, bem como entre pessoas que se contaminam por meio da ingestão de alimentos com elevadas doses de agrotóxicos, tornando-se um problema de saúde pública (PIGNATI, 2011). São inúmeros os estudos que associam o uso de agrotóxicos aos efeitos nocivos na saúde humana (ANDREOLI *et al.*, 2000; MOREIRA *et al.*, 2002; HIROMI HOSHINO *et al.*, 2008; CASSAL *et al.*, 2014)

Carneiro *et al.* (2015) demonstram que os efeitos observados sobre essa exposição envolvem sintomas neurológicos menos severos como dor de cabeça, tontura, náusea, vômito e excessivo suor, e os mais perigosos como o desenvolvimento de fraqueza muscular e bronquiespasmos, podendo progredir para convulsões e coma. Pode levar também ao aumento do risco de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Parkinson. Algumas manifestações de intoxicação por agrotóxicos observadas são a diminuição das defesas imunológicas, anemia, impotência sexual masculina, cefaleia, insônia, alterações da pressão arterial, alterações do humor e distúrbios do comportamento, como surtos psicóticos.

O uso de agrotóxicos tem se difundido na agricultura, especificamente no Brasil onde são extremamente relevantes no modelo de desenvolvimento da agricultura. Atualmente, o país é considerado um dos maiores consumidores do mundo, sendo 60% dos produtos comercializados no país, os herbicidas e inseticidas (CASSAL *et al.*, 2014).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) apresenta um resumo dos registros de agrotóxicos e afins, todos disponibilizados ao agricultor brasileiro. Somente no ano de 2016, 277 produtos obtiveram registro, sendo destes 75 químicos formulados, ou seja, aqueles obtidos a partir de produto técnico já registrado, e 24 orgânicos, formulados para agricultura orgânica, e até o final de 2017, já foram registrados mais 405 produtos para o consumo (Tabela 1) (BRASIL, 2018a).

Tabela 1 - Resumo do Registro de agrotóxicos e afins no MAPA, de 2010 a 2017.

	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
PT	3	2	1	3	4	2	2	4
PTE	35	62	64	45	80	43	160	178
PF	32	20	15	23	23	15	28	52
PF/PTE	28	49	72	28	33	50	47	127
Pré-Mistura	2	0	0	0	0	0	1	4
Biológico	4	10	4	5	0	5	14	19
Extrato	0	0	0	1	1	0	1	0
Biológico/Orgânico	0	3	12	5	7	23	24	21
Extrato/Orgânico	0	0	0	0	0	1	0	0
Total Geral	104	146	168	110	148	139	277	405

Legenda: PT = Produto Técnico; PTE = Produto Técnico Equivalente; PF = Produto Formulado; PF/PTE = Produto formulado a base de produto técnico equivalente; Biológico = Produto Formulado Biológico ou Microbiológico; Extrato = Produto Formulado a base de Extrato Vegetal; Biológicos/Orgânicos e Extrato/Orgânico = Produtos Formulados para a Agricultura Orgânica.

Fonte: Adaptado de Brasil (2018a).

Os agrotóxicos são classificados quanto a sua toxicidade e quanto a sua periculosidade ambiental. O Ministério da Saúde emite um parecer quanto às classes toxicológicas destes produtos, e em seu rótulo deve constar uma faixa colorida referente a essa classificação (Quadro 1) (ANVISA, 1992). Já o sistema de Avaliação do potencial de periculosidade ambiental desenvolvido no IBAMA compreende os parâmetros transporte, persistência, bioconcentração e ecotoxicidade, onde cada um é classificado em função dos correspondentes resultados dos estudos físico-químicos e ecotoxicológicos (Quadro 2) (IBAMA, 2018).

Quadro 1 - Classificação toxicológica dos agrotóxicos, segundo ANVISA.

Classe toxicológica		Cor da faixa
Classe I	Produtos Extremamente Tóxicos	Vermelho
Classe II	Produtos Altamente Tóxicos	Amarelo
Classe III	Produtos Medianamente Tóxicos	Azul
Classe IV	Produtos Pouco Tóxicos	Verde

Fonte: ANVISA (1992).

Quadro 2 - Classificação dos agrotóxicos quanto ao seu Potencial de Periculosidade Ambiental, segundo IBAMA.

Classe I	Produto ALTAMENTE PERIGOSO ao meio ambiente
Classe II	Produto MUITO PERIGOSO ao meio ambiente
Classe III	Produto PERIGOSO ao meio ambiente
Classe IV	Produto POUCO PERIGOSO ao meio ambiente

Fonte: IBAMA (2018).

Dentre os agrotóxicos, os herbicidas são os mais utilizados nas lavouras com o objetivo de controlar as ervas daninhas e aumentar a eficiência na produção agrícola, seja na pré ou pós-emergência das culturas (SILVA, 2009).

Segundo Oliveira Jr., Constantin e Inoue, (2011) e Marchi, Marchi e Guimarães (2008), os herbicidas podem ser classificados de acordo com características de cada um, permitindo estabelecer grupos afins com base na seletividade, época de aplicação, forma de aplicação e movimentação na planta e no seu mecanismo de ação, descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Diferentes classificações dos herbicidas.

Seletividade	Seletivos		Restringem severamente o crescimento de plantas daninhas numa cultura, sem prejudicar as espécies de interesse.
	Não seletivos		São aqueles com amplo espectro de ação, capazes de matar a maioria das plantas.
Época de aplicação	Pré-plantio		Para controlar a população inicial de plantas daninhas e como dessecantes.
	Pós-plantio		Na pré-emergência a aplicação ocorre após a semeadura, mas antes da emergência da cultura. Na pós-emergência a aplicação é realizada para dessecação antes do plantio direto da cultura.
Forma de aplicação e translocação	Aplicados ao solo		Movem-se das raízes para as folhas por translocação via xilema.
	Aplicados às folhas	Com ação de contato	Causam danos apenas nos pontos de contato e não se movem nos sistemas internos das plantas.
		Com ação sistêmica	Movimentam-se para os pontos de crescimento das plantas, sendo translocados via xilema ou floema.

Fonte: Oliveira Jr., Constantin e Inoue, (2011) e Marchi, Marchi e Guimarães (2008).

Outra classificação dos herbicidas leva em consideração o mecanismo de ação na planta. Esse mecanismo de ação está relacionado ao primeiro passo bioquímico ou biofísico no interior das células a ser inibido pela atividade herbicida. Esse processo pode ser suficiente para matar as espécies sensíveis, entretanto, diversas outras reações químicas ou processos são necessários para se matar uma planta, cujo somatório é denominado modo de ação. Os herbicidas geralmente inibem a atividade de uma enzima e/ou proteína na célula e, como consequência desencadeiam uma série de eventos que matam ou inibem o desenvolvimento do organismo (VIDAL, 1997). O Quadro 3 mostra os locais de aplicação e a movimentação dos herbicidas, bem como seus mecanismos de ação e grupos químicos.

Segundo o AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, uma ferramenta de consulta pública dos produtos agrotóxicos e afins registrados no MAPA, existem hoje

652 herbicidas registrados (BRASIL, 2018b). Dentre estes, o glifosato é um dos mais empregados na atualidade, dominando mais da metade do mercado mundial (JACOBI, GIATTI e FERRAZ DE TOLEDO, 2016). De acordo com alguns agricultores do assentamento Bela Vista do Chibarro, é o herbicida mais utilizado nas plantações, seja em culturas de cana de açúcar, milho ou soja, no entorno de suas propriedades, como em suas próprias plantações.

Quadro 3 - Resumo da classificação dos herbicidas, incluindo forma de aplicação e translocação, mecanismo de ação e grupos químicos.

Aplicação - Movimentação na planta	Mecanismos de ação		Grupo químico
Herbicidas Aplicados ao Solo	Inibidores de pigmentos	Inibidores de diterpeno	Isoxazolidinona
		Inibidores da síntese de hidroxifenilpiruvato dioxigenase	Isoxazole
		Inibidores da síntese da fitoenodesidrogenase	Piridazinona
	Inibidores de crescimento de plântulas	Inibidores de crescimento da parte aérea	Carbamotioatos
		Inibidores do crescimento da parte aérea e das raízes	Acetamidas
		Inibidores da polimerização de tubulina	Dinitroanilina
	Inibidores de fotossistema II	Fotossistema II, sítio A	Triazina Uracila
		Fotossistema II, sítio B	Feniluréia
Herbicidas Aplicados às Folhas – por contato	Inibidores de fotossistema II		Benzotiadiazoles
	Degradadores de membrana celular	Inibidores da protoporfirina oxidase (Protox)	Difenileter Arltriazolina Fenilftalimida
		Inibidores de fotossistema I	Bipiridilos
		Inibidores do metabolismo do nitrogênio	Aminoácido fosforilado
Herbicidas Aplicados às Folhas – sistêmicos	Reguladores de crescimento		Fenóxi Ácido benzóico Ácido carboxílico
	Inibidores da síntese de aminoácidos aromáticos		Derivados de glicina*
	Inibidores da síntese de aminoácidos de cadeia ramificada		Sulfoniluréia Imidazolinona Triazolopirimidina
	Inibidores da síntese de lipídeos		Ariloxifenoxipropionato Ciclohexanodiona

* dentre os herbicidas derivados da glicina, destaca-se o glifosato.

Fonte: Adaptado de Marchi, Marchi e Guimarães (2008).

1.2. Herbicida glifosato e seu metabólito AMPA

O glifosato é um herbicida de largo espectro, não seletivo, sistêmico e pós-emergente. Pertence ao grupo químico das Glicinas, recebendo o nome químico de N-(Fosfonometil)-glicina (ARAÚJO, 2002).

Comercializado desde 1970 como princípio ativo do Roundup®, foi desenvolvido pioneiramente pela Monsanto e seus resultados em campo o tornaram um dos herbicidas mais utilizados no mundo (WHO, 1994). Pode ser aplicado em culturas de banana, cana de açúcar, milho, soja, trigo e pastagens, entre outras, utilizado como maturador para eliminação de soqueira de cana de açúcar, no controle da rebrota em florestas de eucalipto e como dessecante nas culturas de soja (ANVISA, 2017).

No tocante da classificação toxicológica, as informações são discordantes. Segundo monografia dos agrotóxicos, disponibilizada pela ANVISA (2017), o glifosato pertence à Classe IV, sendo considerado pouco tóxico. Já o rótulo do produto, com faixa amarela, informa que este herbicida pertence Classe II, portanto altamente tóxico. Quanto à classificação do potencial de periculosidade ambiental, é considerado produto perigoso ao meio ambiente, pertencendo à classe III.

O principal metabólito do glifosato, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), é decorrente da sua degradação por ação microbiológica. Embora tenha toxicidade baixa, o AMPA é mais persistente que o glifosato no ambiente (SOUZA *et al.*, 2006).

Alguns estudos apontam a variação da meia-vida do glifosato e AMPA em solo. TONI *et al.* (2006) afirmam que o glifosato varia de menos de uma semana até alguns meses, dependendo dos teores de argila e matéria orgânica e do nível de atividade microbiana. Enquanto para SOUZA *et al.* (2006), o AMPA varia entre 119 e 958 dias. Segundo Giesy *et al.* (2000) a variação pode ser de 2 a 197 dias para o glifosato e de 76 a 240 dias para o AMPA. E ainda, VEIGA *et al.* (2001) demonstraram uma dissipação rápida do glifosato no solo, na qual era quase total um mês depois da aplicação.

No ambiente, as concentrações mais altas de glifosato e AMPA são encontradas no solo, e devido a sua rápida adsorção, o glifosato não é facilmente lixiviado, sendo pouco provável a contaminação de águas subterrâneas (AMARANTE JUNIOR *et al.*, 2002a).

Apesar do glifosato não ser persistente no meio ambiente, o conhecimento detalhado sobre sua biodegradação, bem como sobre os grupos de microrganismos capazes de degradar este composto é relativamente pequeno (PRATA, 2002). Além disso, o aparecimento da soja transgênica, resistente a ele, tem aumentado a preocupação ambiental devido, principalmente, à maior dosagem na aplicação do herbicida em campos cultivados, sendo necessários vários estudos sobre o comportamento do glifosato em solos de países tropicais (ARAÚJO, 2002).

Neste contexto, o modelo de agricultura, conhecido atualmente como “convencional”, não supre as necessidades alimentares da população, além de impactar no cenário socioeconômico e ambientalmente sustentável. Como forma de mudança frente estes obstáculos, movimentos de soluções alternativas ganham força (SANTOS *et al.*, 2012; FARIAS, 2015).

1.3. Agricultura orgânica como alternativa

Nas últimas décadas, o interesse dos cientistas pelos sistemas orgânicos de cultivo tem aumentado, especialmente em comparação à agricultura convencional. Esses sistemas fazem parte do conceito abrangente de agricultura alternativa, o qual envolve também outras correntes, tais como: agricultura natural, agricultura biodinâmica, agricultura biológica, agricultura ecológica, permacultura e a agricultura orgânica (CAMPANHOLA e VALARINI, 2001; DE ASSIS e ROMEIRO, 2002; BARBOZA *et al.*, 2012).

O movimento de agricultura alternativo ao convencional tem por princípios a não utilização de insumos potencialmente poluidores, respeito aos ciclos biogeoquímicos e preservação do meio ambiente (água, solo e ar), buscando assim proporcionar nos alimentos uma fonte de vida saudável e sustentável (FARIAS, 2015). Dessa forma, a solução não está em alternativas parciais, mas no rompimento com a monocultura e o redesenho dos sistemas de produção de forma a minimizar a necessidade de insumos externos à propriedade. Intensificando-se então, o reconhecimento de modelos agrícolas que considerassem a importância das diferentes interações ecológicas para a produção agrícola (ASSIS, 2006).

Conforme o Ministério da Agricultura e Abastecimento (LEI N° 10.831, DE 23 DE DEZEMBRO DE 2003), o sistema orgânico de produção agropecuária é:

Todo aquele em que se adotam técnicas específicas, mediante a otimização do uso dos recursos naturais e socioeconômicos disponíveis e o respeito à integridade cultural das comunidades rurais, tendo por objetivo a sustentabilidade econômica e ecológica, a maximização dos benefícios sociais, a minimização da dependência de energia não renovável, empregando, sempre que possível, métodos culturais, biológicos e mecânicos, em contraposição ao uso de materiais sintéticos, a eliminação do uso de organismos geneticamente modificados e radiações ionizantes, em qualquer fase do processo de produção, processamento, armazenamento, distribuição e comercialização, e a proteção do meio ambiente (BRASIL, 2003).

Para Penteado (2000), o planejamento do uso da terra é fundamental na agricultura orgânica, porque o solo não é somente considerado um meio para a sustentação da planta e fornecedora de nutrientes, mas como abrigo de uma rica fauna e flora. O processo produtivo deve ser planejado com o objetivo de causar o menor impacto possível no ecossistema local. A agricultura orgânica melhora a fertilidade dos solos, aumenta a capacidade de retenção de água e nutrientes, e conseqüentemente diminui a erosão e a lixiviação. Isso só é possível devido à manutenção da cobertura do solo, rotação de culturas, incremento de matéria orgânica e favorecimento das atividades biológicas do solo (LYNCH, 2009).

O sistema orgânico também minimiza os riscos de contaminação dos corpos hídricos, visto que se utiliza de fertilizações orgânicas, oferecendo um habitat natural e adequado para aves, insetos e microrganismos presentes no solo. Além disso, o controle biológico de pragas favorece o desenvolvimento de inimigos naturais e mantém a população de insetos polinizadores (ROSSET *et al.*, 2014).

Com isso, esse sistema, torna-se uma alternativa à produção sustentável, que proporciona além da preservação ambiental, uma mudança na relação homem-natureza. A adoção de práticas agroecológicas, com suas práticas e formas de manejo alternativas, permite o desenvolvimento de uma agricultura ambientalmente consciente e, com isso, produtiva, econômica e socialmente viável (KAMIYAMA *et al.*, 2011; BARBOZA *et al.*, 2012).

Visando o monitoramento da qualidade do solo, são realizadas técnicas laboratoriais físico-químicas, e como complemento a essas, a ecotoxicologia se mostra uma ferramenta eficiente (LEONEL, 2012).

1.4. Ecotoxicologia como ferramenta de análise

A toxicologia é uma ciência que estuda os efeitos nocivos causados por substâncias químicas sobre organismos vivos e seus principais objetivos são identificar os riscos associados a uma substância e determinar quais condições de exposição esses riscos são induzidos. Um ramo dessa ciência é a ecotoxicologia, que se preocupa com o destino dos agentes tóxicos no ambiente e nas cadeias alimentares, bem como o efeito desses contaminantes sobre os organismos e as populações (COSTA *et al.*, 2008).

A ecotoxicologia estuda os efeitos ocasionados por agentes químicos e físicos sobre a dinâmica de populações e comunidades integrantes de um ecossistema definido. Ela trata de movimentos de poluentes no ar, água, solos e sedimentos através da cadeia alimentar, com as transformações químicas e biotransformação e vem se tornando uma ferramenta auxiliar nas análises de impactos ambientais causados por tais elementos, estimando sua toxicidade em relação ao organismo-teste utilizado (SILVA, POMPEO e PAIVA, 2015).

Azevedo e Chasin (2003) situam a ecotoxicologia entre as ciências do ambiente, como conhecimento básico e essencial, que pode amparar a formulação de dispositivos legais, normas, programas e diretrizes gerenciais para enfrentar questões de risco ecológico, potencial ou real, determinado pelo uso e pelo lançamento de agentes químicos no ambiente.

Essa ciência foi desenvolvida, primeiramente, para os ecossistemas aquáticos e mais tarde para os terrestres, e durante essa evolução, foram criados métodos padronizados e bioensaios com invertebrados, peixes e algas (ALVES, 2015).

Para o ecossistema terrestre, apesar de serem reconhecidas as funções dos invertebrados no solo e a sua utilidade como bioindicadores dos distúrbios ecológicos, havia somente dois métodos disponíveis para a avaliação do risco de contaminantes sobre biota terrestre, um utilizando minhocas em solo artificial, (OECD, 1984a), e outro utilizando plantas (OECD, 2003), ambos desenvolvidos pela *Organization for Economic Co-operation and Development*.

A maior parte dos ensaios ecotoxicológicos com organismos da fauna do solo é baseada nas respostas de letalidade, reprodução, crescimento e comportamento, após exposição a solos contaminados. Estes ensaios têm por objetivo expor esses organismos

a concentrações crescentes de contaminantes e avaliar os impactos de maneira individual (espécie única), ou em conjunto (multi-espécies) (CARDOSO e ALVES, 2012).

Com isso, os estudos ecotoxicológicos de solos crescem a cada ano e os testes de ecotoxicidade são desenvolvidos por várias instituições de pesquisa e órgãos de monitoramento ambiental em todo o mundo. Zagatto e Bertolotti (2008) e Silva, Pompêo e Paiva (2015) defendem que os testes de toxicidade são extremamente importantes para avaliar o potencial de risco ambiental dos contaminantes, uma vez que somente as análises químicas não possibilitam esse tipo de avaliação. Além disso, as análises de toxicidade já vêm sendo exigidas por leis ambientais no Brasil, como por exemplo, as Resoluções CONAMA 357 (2005) e 430 (2011).

Para Campagna-Fernandes, Marin e Penha (2016), estes testes se tornaram uma ferramenta importante para avaliar o potencial tóxico de substâncias químicas e até mesmo os efeitos deletérios das condições ambientais adversas (pH, temperatura, oxigênio) para diferentes espécies. Eles dão suporte ao estabelecimento de níveis limiares para produtos comerciais e ao diagnóstico de qualidade ambiental e, como consequência, apoiam decisões sobre gerenciamento e recuperação de áreas contaminadas.

Dentro de uma abordagem ecossistêmica, muitas tentativas têm sido feitas no sentido de tornar mais realistas os testes de ecotoxicidade, uma delas é a realização de ensaios multi-espécies.

1.4.1. Sistema multi-espécies de análise de solo

Os problemas de solos contaminados são atualmente uma questão importante que pode afetar comunidades terrestres e aquáticas, devido à drenagem e escoamento superficial de substâncias tóxicas na água de locais contaminados. As análises ecotoxicológicas são recomendadas para estimar o risco dos receptores ecológicos aos contaminantes nos solos em avaliações de risco e identificação de perigos (GIMENO, CABRERO e GONZÁLEZ, 1987; FERNÁNDEZ *et al.*, 2004).

Durante o início da década de 1980, os testes de toxicidade para plantas e minhocas foram desenvolvidos conjuntamente pela União Europeia (UE) e pela *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OCDE), principalmente para atender os requisitos regulamentares para registro de novos produtos químicos. Mais tarde, foi recomendada uma bateria de testes simples para avaliar os solos em locais

contaminados. Hoje em dia, como alternativa a essa bateria de testes de ecotoxicidade independentes, utilizam-se ensaios mais complexos como os microcosmos de solo com sistema multi-espécies (FERNÁNDEZ *et al.*, 2005).

Forbes (1887) foi o primeiro a usar o termo microcosmos, descrevendo um lago como sendo um pequeno mundo em si mesmo, dentro do qual todas as forças elementares estão funcionando, mas em uma escala tão pequena que é facilmente assimilável. Para Leffler (1978), os microcosmos são pequenos modelos vivos de processos ecossistêmicos.

Os microcosmos são unidades experimentais projetadas para conter componentes importantes e demonstrar os processos que ocorrem em um ecossistema, sendo funcionalmente semelhante ao que simulam. Podem ser construídos artificialmente de componentes mantidos em laboratório ou de comunidades bióticas e seus substratos abióticos extraídos de um ecossistema natural. Consistem em sistemas onde uma coleção de espécies é exposta simultaneamente, o que permite considerar as interações entre as espécies, que podem influenciar a toxicidade e, portanto, aumentar o realismo do estudo (GARCÍA-GÓMEZ *et al.*, 2014; GIMENO, CABRERO E GONZÁLEZ, 1987).

No INIA - *Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria* (Madri, Espanha), foi desenvolvido um sistema multi-espécies de análise de solo em microcosmos chamado de MS3 – *Multispecies Soil System*. Descrito pela primeira vez por Fernández *et al.* (2004), já foi aplicado para caracterizar substâncias geoquímicas e solos poluídos por Fernández *et al.* (2005), Carbonell *et al.* (2009) e García Frutos *et al.* (2010).

O ensaio multi-espécies pode substituir os testes padronizados que utilizam uma única espécie, produzindo informações sobre a sensibilidade dos grupos taxonômicos de diferentes níveis tróficos, normalmente empregados nas análises de solo (plantas, minhocas e microorganismos), os quais cobrem papéis ecológicos essenciais para o uso sustentável do solo. Estes organismos são introduzidos em colunas e expostos a produtos químicos, simulando condições ambientais reais (VAN DEN BRINK *et al.*, 2005).

Esse sistema não só combina três testes em um, mas produz informações sobre a dissipação e mobilidade do solo, e ainda a toxicidade do lixiviado, pois durante o período de exposição, o sistema é regado simulando eventos de chuva. Dessa forma, a

mobilidade dos contaminantes e os possíveis riscos para o ambiente aquático (águas subterrâneas e superficiais) podem ser determinados (GARCÍA-GÓMEZ *et al.*, 2014).

Embora existam alguns estudos utilizando o MS-3 na Europa, no Brasil ainda é uma novidade. Em vista disso, há necessidade de adaptar esses protocolos para a realidade de cada região, e dessa forma, empregá-los em ensaios ecotoxicológicos de ecossistemas terrestres, para que contribuam em programas de monitoramento ambiental, bem como em avaliações de risco ambiental. Diante disso, os organismos indicadores são essenciais para avaliar a qualidade do solo.

***Lactuca sativa* L. (Asteraceae)**

A alface (*Lactuca sativa* L.) é uma planta herbácea anual ou bienal, pertencente à família das Asteraceae. Originária do leste do Mediterrâneo é mundialmente cultivada para o consumo e considerada a hortaliça folhosa mais importante na alimentação dos brasileiros. Sua propagação é feita por meio de sementes, as quais apresentam particular sensibilidade às variações na umidade e temperatura do meio onde germinam (Figura 1) (BUFALO *et al.*, 2012).

Figura 1 - *Lactuca sativa* L. (alface)



Fonte: USDA (2018)

É amplamente utilizada em bioensaios, pois apresenta germinação rápida e homogênea, possui crescimento linear insensível às diferenças de pH em ampla faixa de variação e insensibilidade aos potenciais osmóticos das soluções (GONÇALVES, COELHO e CAMILI, 2016). Além disso, os bioensaios têm sido recomendados e

aplicados por diferentes agências de proteção ambiental como *U.S. Environmental Protection Agency* (USEPA), *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) e a *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD) para a avaliação ecotoxicológica de amostras ambientais e compostos puros, além da avaliação do efeito fitotóxico de agrotóxicos sobre as espécies não alvo para o registo destes compostos (OECD, 1984b; USEPA, 1989; WANG *et al.*, 2011).

A maioria dos estudos examina apenas a germinação para avaliar a toxicidade sem considerar o comprimento da raiz e do hipocótilo (PESSOTTO e PASTORTINI, 2007; LIMA e MORAES, 2008; GONÇALVES, COELHO E CAMILI, 2016). Assim, o teste de avaliação dos efeitos sobre o alongamento da radícula e do hipocótilo das plântulas permite ponderar o efeito ecotóxico de compostos solúveis presentes em níveis tão baixos de concentração que não são suficientes para inibir a germinação, mas, podem retardar ou inibir completamente os processos de alongamento da radícula ou hipocótilo (SOBRERO e RONCO, 2004).

De acordo com Campagna-Fernandes, Marin e Penha (2016), a inclusão dessas variáveis é muito importante, particularmente o crescimento radicular, uma vez que as raízes estão em contato direto com o solo, absorvendo água e distribuindo-a para o resto da planta. A este respeito, seu uso é justificável, especialmente considerando que as sementes desta espécie germinam rapidamente e as raízes crescem linearmente, facilitando a obtenção e análise dos resultados.

***Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta).**

Os enquitreídeos são pequenos representantes da mesofauna terrestre e apresentam ampla distribuição, desde solos não explorados até solos cultivados e antropizados, sendo comumente encontrados no mundo inteiro (NIVA *et al.*, 2010).

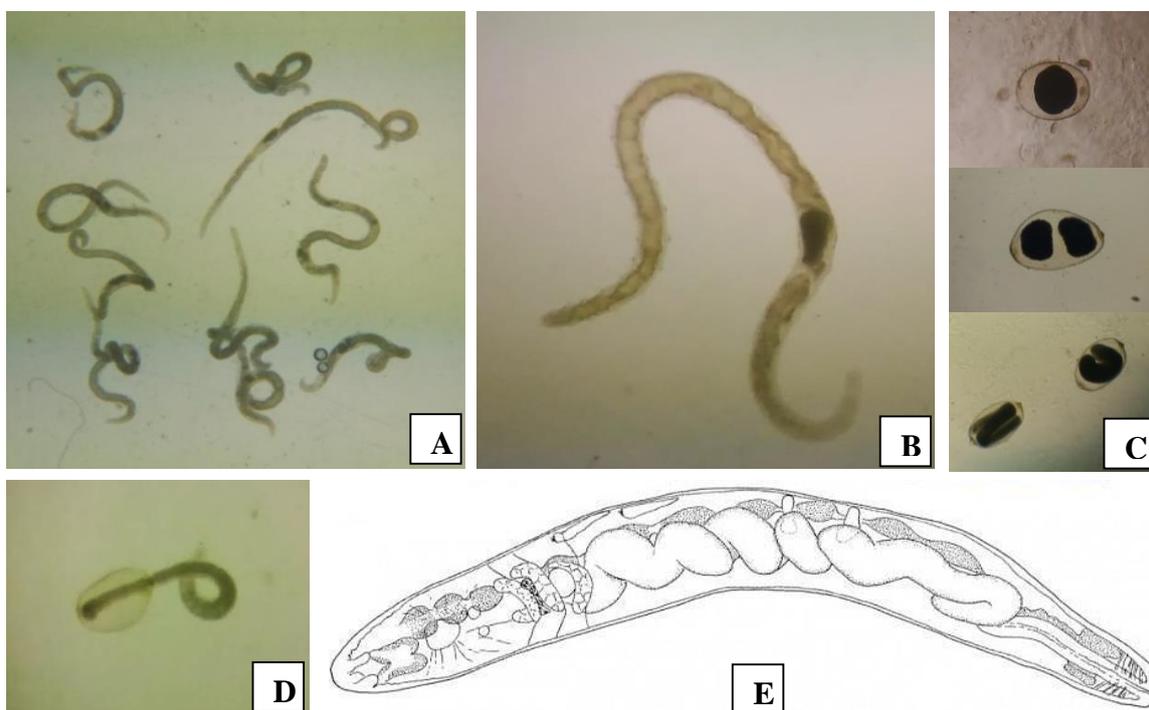
Desempenham um papel importante na decomposição da matéria orgânica e reformulação do solo, uma vez que se alimentam de resíduos vegetais mais ou menos decompostos e microrganismos. Eles são comuns em muitos tipos de solo e suportam até os ácidos, arenosos e pobres em nutrientes, tolerados por poucas espécies de minhocas terrestres. Vivem em estreito contato com a fração de água intersticial do solo e suas vias de exposição são dérmica, intestinal e respiratória (RÖMBKE, 2003).

Os enquitreídeos têm uma capacidade limitada de movimento dentro do solo. Ocupam as camadas mais superficiais do solo (0-10 cm) onde o material orgânico e a atividade biológica estão concentrados. Esses organismos são encontrados de regiões árticas a regiões tropicais, e são mais abundantes em solos florestais (ou solos ricos em material orgânico) e menos abundantes em pastagens e campos agrícolas (ALVES e CARDOSO, 2016). Sua principal fonte de alimento é o micélio fúngico. No entanto, eles também se alimentam de matéria orgânica que foi previamente digerida por fungos e outros microrganismos (NIVA *et al.*, 2010).

Apresentam o corpo segmentado, são alongados e cilíndricos, possuem poucas cerdas sobre o corpo, dificilmente ultrapassam 4 cm de comprimento (maioria 1-2 cm). *In vivo*, possuem uma coloração esbranquiçada translúcida, deixando seus órgãos internos visíveis, principalmente o tubo intestinal, quando preenchido por material escuro e os oócitos em desenvolvimento, que se revelam como esferas brancas opacas na região do clitelo de indivíduos sexualmente maduros (Figura 2). Esses organismos são hermafroditas e reproduzem-se produzindo casulos por anfimixia, partenogênese ou autofertilização, mas algumas espécies podem se reproduzir por fragmentação (arquitomia). Atualmente, estima-se que existam cerca de 950 espécies conhecidas no mundo, das quais aproximadamente 50 espécies ocorrem no Brasil, em sua maioria na região Sudeste (DIDDEN, 1993; ASSIS, 2016).

Os adultos de *E. crypticus* variam seu comprimento entre 3 e 12 mm, e possuem 34 segmentos, enquanto os juvenis possuem em média 21 segmentos. Com relação ao ciclo de vida, o desenvolvimento embrionário ocorre entre 9 e 11 dias, o crescimento dos juvenis até a maturidade (quando se torna visível o clitelo) é de 11 a 14 dias e o tempo de vida total é de aproximadamente 85 dias. Quanto à produção de casulos, produzem uma média de 0,6 casulos por dia, com um número médio de 4,6 oócitos produzidos por dia (BICHO *et al.*, 2015; WESTHEIDE e GRAEFE, 1992).

Figura 2 - *Enchytraeus crypticus*. A - Indivíduos adultos; B - Clitelo evidente; C - Casulos em diversas fases do desenvolvimento embrionário; D - Eclosão de um juvenil e E - Desenho esquemático.



Fonte: A, B, C, D – Próprio autor (2017); E – Assis (2016).

Enchytraeus (Henle, 1837) é o único gênero de enquitreídeos com espécies selecionadas para testes ecotoxicológicos padronizados pelas diretrizes ISO 16387 (ISO, 2004) e OECD 220 (OECD, 2016), pois é considerado representativo dentre os organismos indicadores de estresse ambiental. São considerados "espécies-chave", especialmente em solos ácidos, onde sua abundância os torna bons indicadores de qualidade ou contaminação do solo. Há muitos anos são utilizados na Europa (DIDDEN e RÖMBKE, 2001; RÖMBKE e MOSER, 2002) e mais recentemente, tem sido utilizados também como indicadores dos efeitos do aquecimento global devido à sua sensibilidade à temperatura e dessecação (BRIONES, INESON e HEINEMEYER, 2007).

Ademais, a espécie *Enchytraeus crypticus* (WESTHEIDE e GRAEFE, 1992) vem ganhando atenção nos estudos ecotoxicológicos do solo devido as suas vantagens práticas, como ser facilmente cultivada em laboratório em meio ágar, possuir uma maior taxa de reprodução com um ciclo de vida significativamente mais curto do que outros vermes, os testes podem ser realizados em períodos mais curtos (3 semanas), além de

possuir uma faixa de tolerância mais ampla das propriedades distintas do solo (pH, textura e teor de matéria orgânica) (CASTRO-FERREIRA *et al.*, 2012).

1.4.2. *Daphnia magna* (Cladocera, Crustacea).

Daphnia magna (Straus, 1820), também conhecida como pulga d'água, é um microcrustáceo planctônico de água doce. Ocupam papel de consumidor primário na cadeia alimentar, alimentando-se por filtração de material orgânico particulado, principalmente de algas unicelulares, sendo fonte de alimento para predadores invertebrados e vertebrados (HENRIQUE e BRENTANO, 2013).

O gênero *Daphnia* inclui mais de 100 espécies encontradas em todo o mundo. Habitam a maioria dos ambientes de água doce, exceto em habitats extremos, como as fontes termais. Os indivíduos de todas as faixas etárias são bons nadadores e são, na sua maioria pelágicos, ou seja, encontrados em águas abertas (EBERT, 2005).

Em geral os cladóceros da família Daphnidae são basicamente diferenciados pelo seu tamanho, com adultos variando de menos de 1 a 5 mm de tamanho, essa característica tem influência sobre a toxicidade das substâncias (Figura 3) (COSTA *et al.*, 2008).

Figura 3 - Diferentes estágios de vida de *Daphnia magna* (embrião, neonato, macho, fêmea, efípio).



Fonte: VAN DAMME (2018).

Em geral, o ciclo de vida aumenta com o decréscimo da temperatura, em função da diminuição da atividade metabólica. A 20°C a média do ciclo de vida (nascimento e

morte) é de 56 dias. Reproduzem-se por partenogênese e os ovos diploides são liberados por gerações, e uma fêmea pode produzir uma sucessão de incubações. Contudo, em algum ponto, determinados fatores (alteração na temperatura da água, redução do suprimento alimentar em função de um aumento populacional) induzem o aparecimento de machos e são produzidos ovos fertilizados (RAND, 1995).

Segundo pesquisas de Mansano, Oliveira e Rocha (2012), Laitano e Matias (2006), Soares de Mendonça (2005) e Buratini, Bertolotti e Zagatto (2004), o uso de *D. magna* como indicador biológico em estudos de controle da qualidade da água e em testes de ecotoxicidade na avaliação de efluentes, é fundamentado nos critérios que seguem:

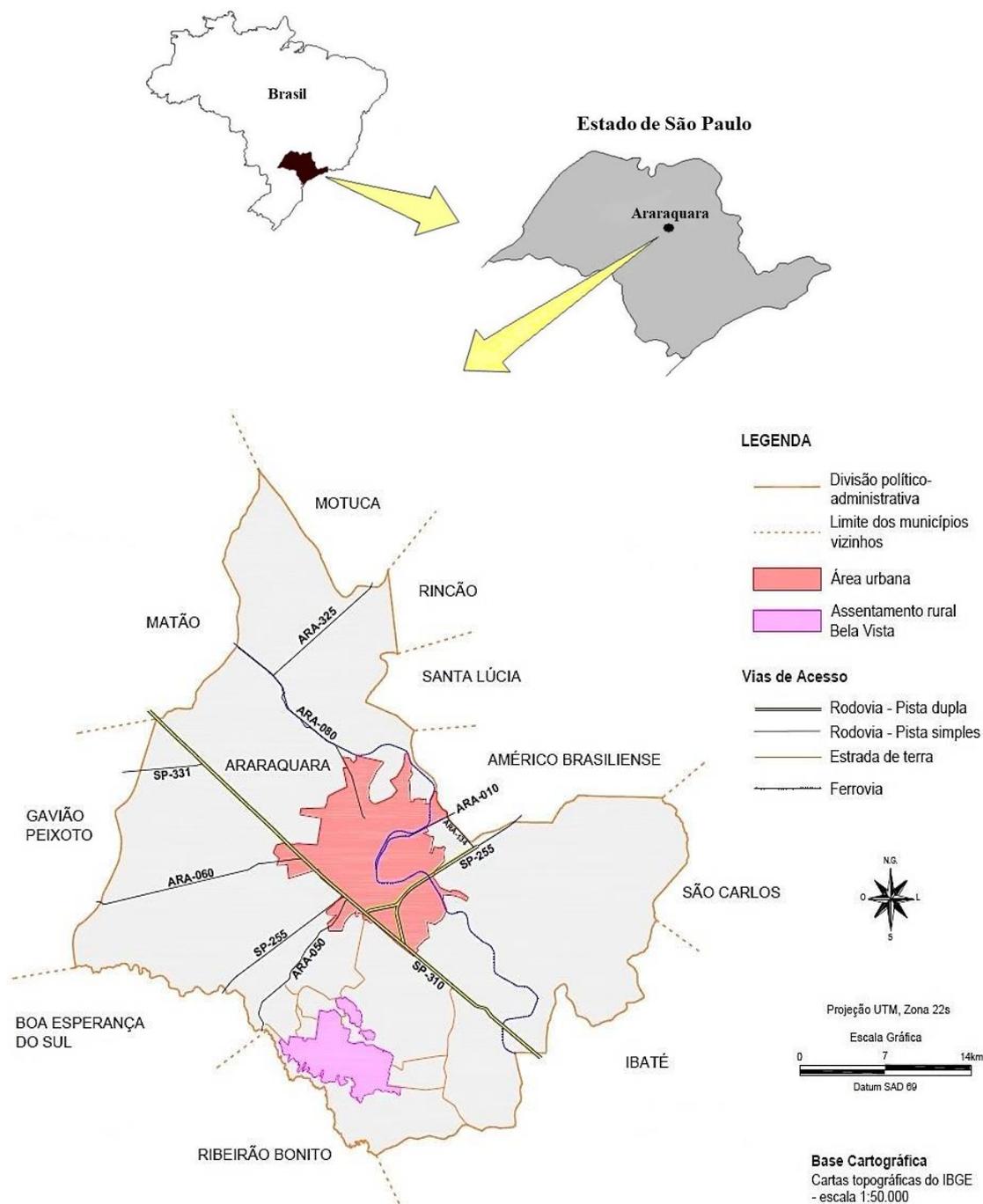
- Os descendentes são geneticamente idênticos, assegurando desta forma, certa uniformidade de resposta nos ensaios;
- Entre os Daphnideos é um dos organismos de mais fácil manuseio (tamanho relativamente grande para espécie, quando comparado com outros microcrustáceos);
- A cultura do laboratório possui baixo custo, quando comparada com peixes, moluscos e macrocrustáceos;
- A espécie possui grande sensibilidade a substâncias químicas ou a mistura delas;
- É adequada para testes estáticos, semi-estáticos ou de fluxo contínuo;
- Apresentam ciclo de vida e reprodução relativamente curtos, permitindo a realização de testes crônicos;
- A *D. magna* é internacionalmente reconhecida como organismo-teste, sendo usada há décadas.

Diante do exposto, ressalta-se a importância de analisar o impacto na qualidade ambiental numa área heterogênea de culturas e manejos, sendo esta um Assentamento de Reforma Agrária.

1.5. O Assentamento Bela Vista do Chibarro

O Assentamento Rural Bela Vista do Chibarro está localizado na região sul do município de Araraquara, interior do estado de São Paulo (Figura 4). Tem como principal via de acesso à estrada vicinal Abílio Augusto Correa (ARA-050) que interliga Araraquara a Guarapiranga (distrito do município de Ribeirão Bonito) e, por volta do quilômetro 11 da estrada ARA-050, é possível acessar uma estrada de terra chegando até a agrovila do assentamento, de acordo com as coordenadas geográficas 21°54'49.92"S e 48°11'39.96"O (LOPES *et al.*, 2015b).

Figura 4 - Localização do Assentamento Bela Vista do Chibarro, no município de Araraquara/SP.



Fonte: Silva (2011).

O assentamento está constituído nas estruturas remanescentes de uma antiga fazenda do café, chamada Bela Vista do Chibarro, estabelecida em fins do século XIX, mais especificamente na segunda metade da década de 1870. A fazenda foi um dos grandes polos de produção de café, que contavam com grande quantidade de mão de obra escrava e imigrante. Com o declínio das exportações de café e o fim da mão de obra

escrava, a antiga fazenda vendeu suas terras para a família Morganti, que converteu a produção de café para a monocultura de cana, e teve como marco a Usina Tamoio (ARARAQUARA, 2016).

Adquirida por Pedro Morganti, imigrante italiano, em 1917, quando ainda era um pequeno engenho com área em torno de 2.000 alqueires denominado Engenho Fortaleza, a Usina Tamoio era constituída pela sede industrial e por seções agrícolas, numa extensão territorial de 5.046.795 alqueires. Dentre todas as seções, a Bela Vista constituía uma das maiores e melhor organizadas. Entre o final dos anos 1940 e anos 1950, a Usina Tamoio atingiu sua fase áurea, destacando-se indústria sucroalcooleira da região, do estado de São Paulo e do Brasil. Porém, em meados dos anos 1960, em meio às ampliações, a crise já se anunciava, com mudanças na agricultura da cana, modernização tecnológica e contratação de técnicos especializados. Em abril de 1969, após um período de turbulências e de decadência, passando por dificuldades econômicas e administrativas, a usina foi transferida, e dos 13,5 mil hectares de terras que lhe pertenciam inicialmente, só restaram 7,2 mil hectares (LOPES *et al.*, 2014; CAIRES, 2011; FLORES, FERRANTE e BEZERRA, 2011).

Em 1977 uma nova fase foi inaugurada quando a Usina entrou em processo de falência. Em 1980, devido ao desemprego e às péssimas condições de vida dos trabalhadores empregados na cana, o Sindicato dos Trabalhadores Rurais de Araraquara começou a empreender e lutar pela terra e, deste processo, a seção Bela Vista foi ocupada por um conjunto de famílias de Araraquara, além das que migraram de diferentes regiões do país e em 1988, um ano após a ocupação do Bela Vista, as terras foram declaradas de interesse social para reforma agrária (ARARAQUARA, 2016; PUGLIESE, 2016; CAIRES, 2011).

Em 1989 o INCRA – Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária, oficializou a desapropriação das terras. A fazenda foi dividida inicialmente em 176 lotes, sendo duas áreas ambientais, que foram distribuídas para 171 famílias através da Portaria INCRA/P 661/90 de 1990 (LOPES *et al.*, 2015b).

Assim, restou ao assentamento parte da estrutura da antiga Usina, que pode ser representada na disposição de 100 casas em uma agrovila central, que eram cedidas aos antigos trabalhadores da usina. Estas casas foram/são utilizadas por parte das famílias assentadas e a disposição dos lotes de produção se faz no entorno das mesmas, formando um núcleo central (AMARAL e FERRANTE, 2007).

Atualmente residem no local, 202 famílias provenientes de várias cidades do estado de São Paulo e de outros estados. Segundo o INCRA (2016), o assentamento possui uma área total de 3.482 hectares, totalizando 210 lotes, divididos em módulos de 15 a 16 hectares e módulos de 7,5 a 8 hectares, criados a partir da divisão dos lotes originais (SILVA, 2011).

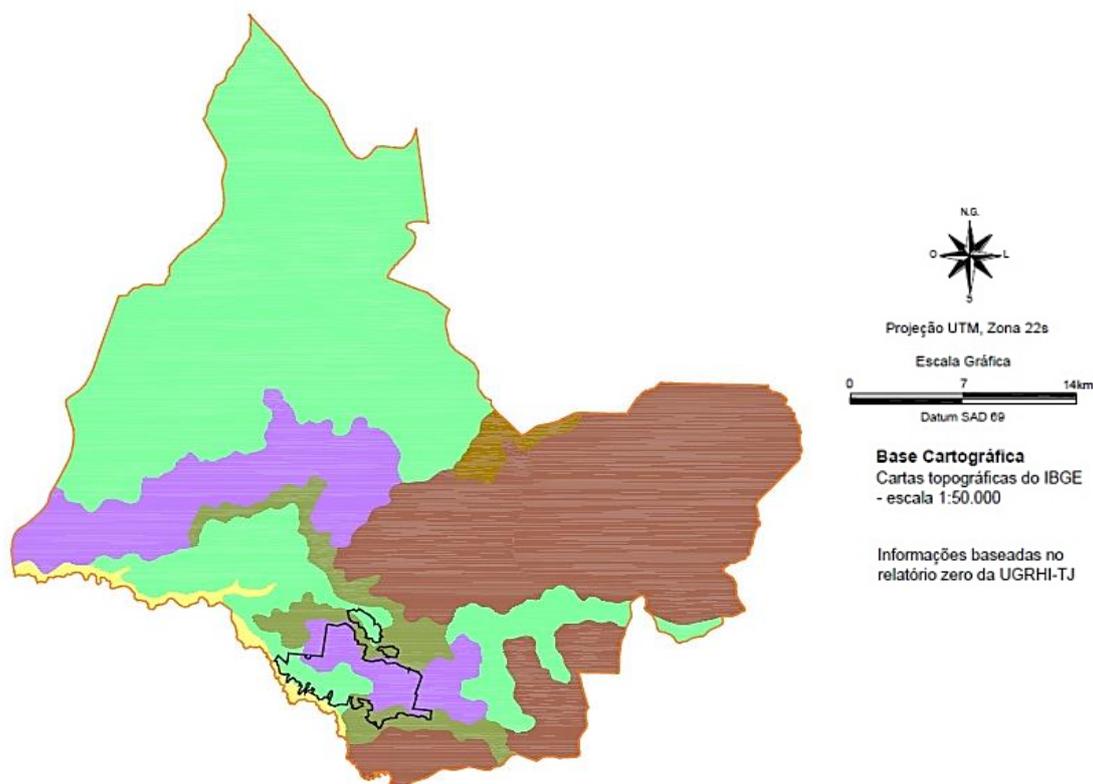
É importante ressaltar que o assentamento está cercado por usinas de cana de açúcar, sendo as mais próximas a Usina Zanin e a Corona. Esta característica regional favoreceu a entrada da cana de açúcar no assentamento, já que essa cultura é um produto de fácil comercialização (LOPES, *et al.*, 2015a). De acordo com Ferrante, Barone e Duval (2012), a mobilização que levou à instalação deste Projeto de Assentamento acabou sendo emblemática da luta dos trabalhadores rurais nas terras dos canaviais.

1.5.1. Caracterização ambiental

Segundo o Plano Municipal de Desenvolvimento Rural Sustentável de Araraquara (2016), uma parcela do município é ocupada por rochas sedimentares, destacando-se os arenitos e argilitos. Há predominância de rochas efusivas basálticas, caracterizadas pelo baixo teor de sílica e teores elevados de ferro e magnésio, responsáveis pela formação de solos com altos teores de óxido de ferro, titânio e manganês, textura argilosa, densidade real e elevada, além da cor avermelhada escura.

O assentamento ocupa predominantemente uma região com formação Serra Geral (Basalto) e trechos com formação Botucatu (Arenitos finos a médios), região onde há predominância de Latossolo Vermelho-Escuro de textura argilosa e muito argilosa, associado a Latossolo Vermelho-Amarelo de textura média a argilosa e alguns trechos com Neossolos Litólicos associados a solos Podzólicos Vermelho-amarelo e Terra Roxa (Argissolos), demonstrados na Figura 5 (SILVA, 2011).

Figura 5 - Mapa do solo do município de Araraquara/SP.



LEGENDA

-  Divisão político-administrativa
-  Limite do Assentamento Rural Bela Vista

-  Associação de Latossolo Vermelho-Escuro álico, A moderado e proeminente, textura média, argilosa e muito argilosa e Latossolo Roxo eutrófico e distrófico, A moderado e proeminente, textura argilosa e muito argilosa.
-  Associação de Latossolo Vermelho-Escuro álico, A moderado, textura média, Latossolo Vermelho-Amarelo álico, A moderado, textura média a argilosa.
-  Associação de Solos Litólicos eutróficos e distróficos, A chernozêmico e moderado, textura média e argilosa (fase pedregosa e não pedregosa), Podzólico Vermelho-Amarelo eutrófico e distrófico, abrupto e não abrupto, A moderado, textura arenosa/média e média/argilosa e Terra Roxa Estruturada eutrófica, A moderado, textura muito argilosa.
-  Associação de Planossolo álico A moderado e proeminente, textura arenosa/média e arenosa/argilosa, Solos Orgânicos álicos textura indiscriminada e Gleis Húmicos álicos e distrófico A proeminente, textura argilosa.
-  Associação de Latossolo Vermelho-Amarelo álico, distrófico, A moderado e proeminente, textura média e argilosa e Latossolo Vermelho-Escuro álico, distrófico, A moderado, textura média e argilosa e Latossolo Vermelho-Escuro álico, distrófico, A moderado, textura média e argilosa.

Fonte: Silva (2011).

Os Latossolos Vermelho-Escuro de textura argilosa e muito argilosa apresentam elevada porosidade e friabilidade, facilitando seu manejo agrícola. Sua principal limitação é a baixa disponibilidade de nutrientes, porém possuem boa drenagem interna com capacidade produtiva estável, enquanto que os Latossolos de textura média, possuem elevada permeabilidade, baixa retenção de água e baixa coesão, o que os torna sensíveis à degradação sob manejo agrícola. Os Neossolos Litólicos são solos com sérios impedimentos para a produção agrícola e florestal, com pequena profundidade e pedregosidade que dificultam a penetração e a exploração de água e nutrientes pelas raízes das plantas. Os Argissolos Vermelho-Amarelos de textura média/arenosa possuem menor permeabilidade e apresentam elevada erosão, exigindo práticas intensivas de controle no manejo agrícola. Já os Argissolos de textura média/argilosa possuem elevada capacidade de água disponível e por serem mais argilosos e com maior reserva de minerais, possuem características mais favoráveis à exploração agrícola (IAC, 2017; EMBRAPA, 2006).

Referente à declividade, o assentamento Bela Vista possui predominantemente regiões com pouca declividade (na faixa de 1 a 8%), algumas áreas com declividade mediana (de 8 a 20%) e locais específicos com declividades mais elevadas (maiores que 20%). Esse tipo de caracterização é de grande utilidade para fins de planejamento agrícola e ambiental (Lopes *et. al*, 2015b).

No que diz respeito aos recursos hídricos, o assentamento rural Bela Vista do Chibarro pertence Bacia Hidrográfica do Tietê-Jacaré (BH-TJ), representada pela Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos 13 (UGRHI 13) e possui sua ocupação em duas sub-bacias, sendo elas a sub-bacia do rio Chibarro e a sub-bacia do rio Jacaré-Guaçu (SILVA, 2011).

II. JUSTIFICATIVA

Dentre as grandes preocupações atuais em termos de agricultura, se enquadram a qualidade do solo e a necessidade de produção, cada vez maior, de alimentos. É inegável a importância da agricultura brasileira, sendo esta uma das potências mundiais. Entretanto, torna-se imprescindível a conscientização do impacto causado ao ambiente pelo uso intensivo de agrotóxicos, buscando na ciência estratégias que minimizem suas consequências nos ecossistemas.

Este estudo é produto de inquietude a respeito dos diferentes manejos agrícolas, convencional e orgânico, presentes no assentamento Bela Vista do Chibarro, tendo em vista que o consumo de alimentos orgânicos é tendência mundial. Dado isso, é essencial a averiguação do manejo orgânico quanto a sua efetividade do ponto de vista ecológico, utilizando como base, parâmetros ecotoxicológicos.

Assim, os estudos ecotoxicológicos oferecem esclarecimentos quanto ao monitoramento ambiental, avaliando riscos potenciais e prevendo impactos futuros para os diferentes compartimentos (ar, água, solo e sedimento). Portanto, pesquisas são indispensáveis para vigilância e acompanhamento das condições dos ecossistemas, detectando possíveis alterações ambientais.

III. HIPÓTESE

Com base nos parâmetros ecotoxicológicos, há diferença significativa entre o manejo agrícola orgânico e o manejo agrícola convencional (agricultura intensiva).

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a ecotoxicidade do extrato da fração solúvel do solo de diferentes manejos agrícolas: (i) manejo convencional, e (ii) manejo orgânico, localizados no Assentamento Bela Vista do Chibarro (Araraquara-SP).

4.2 Objetivos Específicos

- Determinar a presença do herbicida Glifosato e seu metabólito AMPA no extrato da fração solúvel do solo;
- Estabelecer uma metodologia de análise ecotoxicológica utilizando sistema multi-espécies de análise do solo em microcosmos (MS-2) com *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta) e *Lactuca sativa* L. (Asteraceae).
- Averiguar o efeito da fração solúvel do solo dos diferentes manejos sobre as funções biológicas de *Enchytraeus crypticus* e *Lactuca sativa* L. na metodologia MS-2;
- Avaliar o efeito da fração solúvel do solo na sobrevivência de *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera).

V. METODOLOGIA

5.1. Pontos de Amostragem

O estudo foi realizado no assentamento Bela Vista do Chibarro, com os 4 pontos de amostragem de solo distribuídos em dois lotes distintos, com aproximadamente 2,0 km de distância entre eles (Figuras 6 e 7). As coordenadas geográficas de cada ponto estão citadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Coordenadas geográficas dos pontos de coleta no Assentamento Bela Vista do Chibarro – Araraquara/SP.

Pontos		Coordenadas
Manejo orgânico	P1	21°55'6.10"S; 48°10'23.54"O
	P2	21°55'7.73"S; 48°10'28.40"O
Manejo convencional	P3	21°55'12.53"S; 48°11'39.90"O
	P4	21°55'14.99"S; 48°11'42.55"O

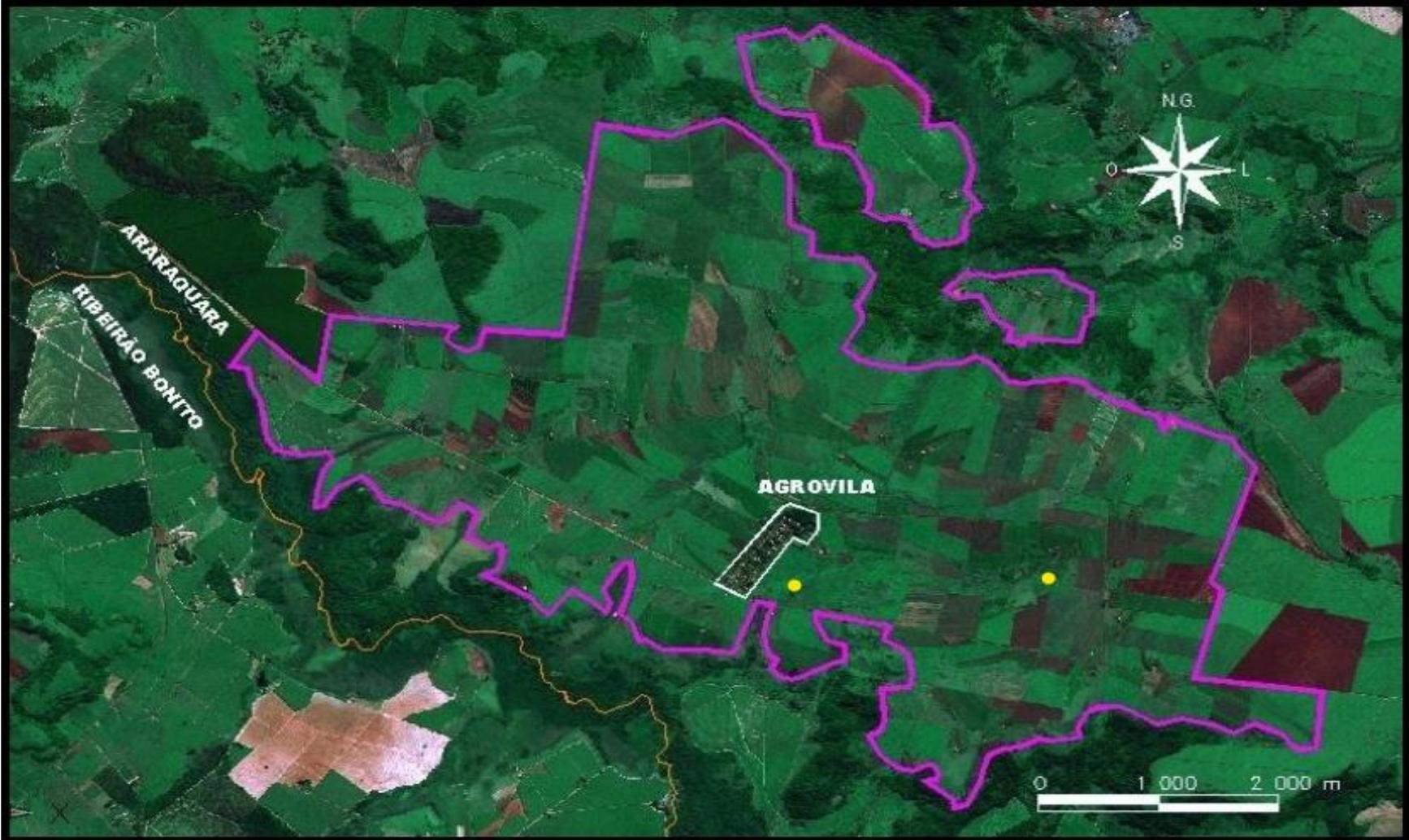
Fonte: Próprio autor (2017).

Os pontos 1 e 2 se encontram localizados no lote nº 161 do assentamento (Figura 8A), o qual compreende um total de 16 hectares, sendo apenas uma pequena parcela utilizada na produção de olericultura com manejo orgânico. Sua produção inclui berinjela, jiló, mandioca, e hortaliças como couve-flor, brócolis, repolho e variedades de alface. Estas hortas com manejo orgânico estão em terreno com declive, e no seu entorno existem plantações de milho, banana e, como dito anteriormente, plantações de cana-de-açúcar. O ponto 1 fica no início da plantação, na porção mais baixa do terreno (Figura 8B), enquanto o ponto 2 está localizado próximo ao limite com outras propriedades, ao lado há um pasto para criação de gado, separado da horta apenas por uma cerca de arame farpado e acima, uma plantação de milho (Figura 8C).

Os pontos 3 e 4 se encontram localizados no lote nº 15, mais próximo a agrovila central (Figura 9A). Este lote possui 16 hectares nos quais apenas uma parcela é utilizada para agricultura com manejo convencional, e segundo o agricultor, há a utilização de agrotóxicos, adubos e fertilizantes sintéticos. A plantação olerícola irrigada inclui alface de diferentes tipos, couve, salsa, cebolinha, rúcula, entre outros. O ponto 3 é o único localizado próximo ao corpo d'água, uma vez que foi realizado um desvio no mesmo,

com a intenção de captar água por meio de uma bomba para a irrigação de toda a plantação (Figura 9B), enquanto o ponto 4 está localizado mais próximo a plantação (Figura 9C).

Figura 6 - Assentamento Bela Vista do Chibarro e propriedades amostradas.



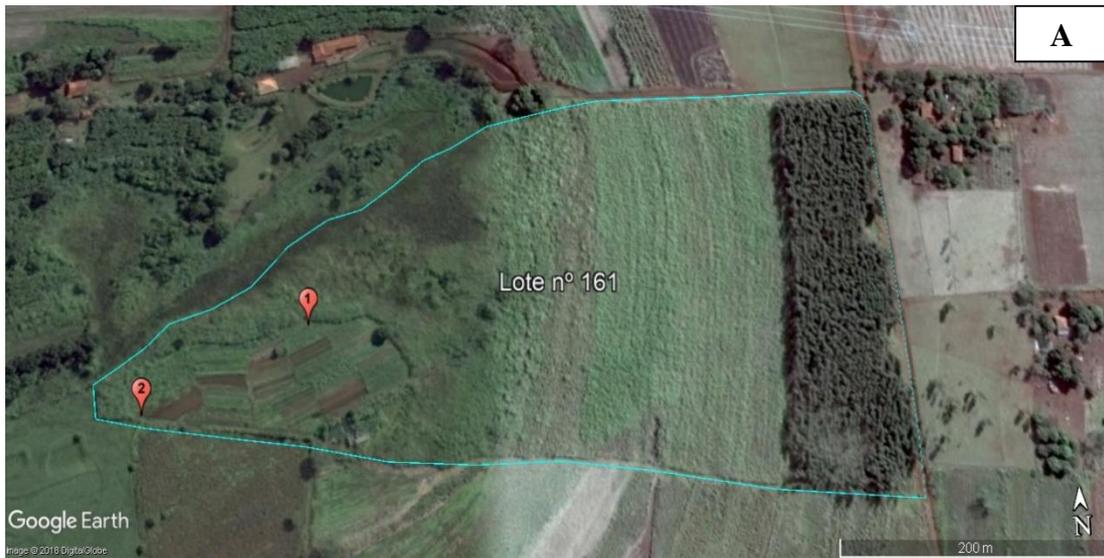
Fonte: SILVA (2011).

Figura 7 - Pontos de coleta localizados em duas propriedades do Assentamento Bela Vista do Chibarro - Araraquara/SP.



Fonte: Google Earth (2018).

Figura 8 - A – Lote nº 161 do Assentamento Bela Vista; B – Ponto 1 e C – Ponto 2.



Fonte: A – Google Earth (2018); B e C – Próprio autor (2017).

Figura 9 - A – Lote nº 15 do Assentamento Bela Vista; B – Ponto 3 e C – Ponto 4

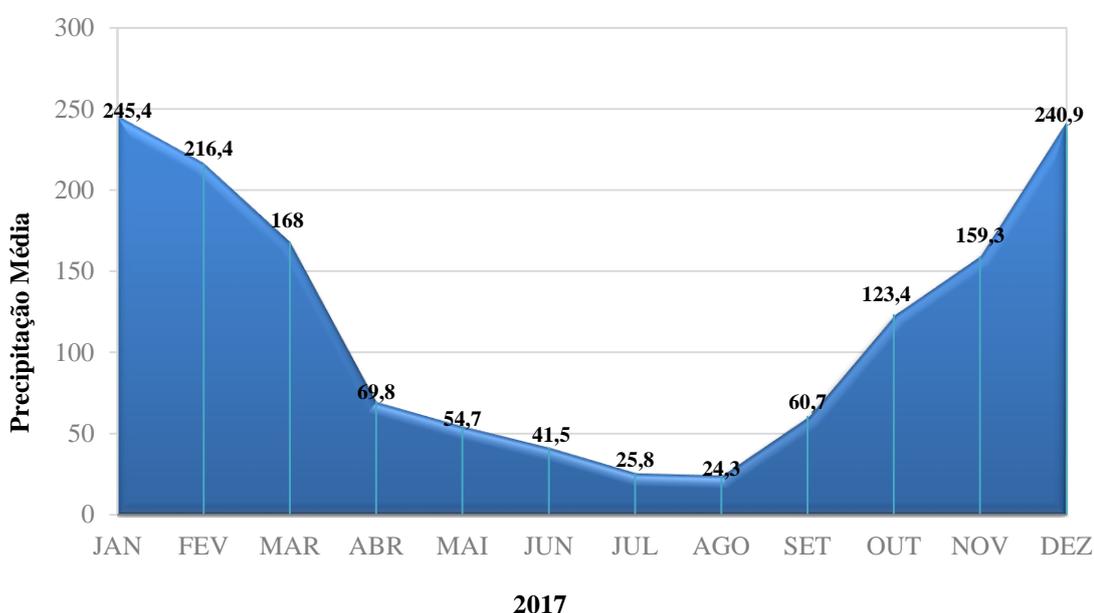


Fonte: A – Google Earth (2018); B e C – Próprio autor (2017).

5.2. Coleta das Amostras de Solo

Foram realizadas duas coletas de solo. A primeira coleta ocorreu no mês de Março de 2017, representando o final do período chuvoso, e a segunda foi realizada no mês de Agosto do mesmo ano, representando o período de estiagem, porém a sazonalidade não foi considerada na interpretação dos resultados. A Figura 10 demonstra a precipitação média mensal do ano de 2017 no município de Araraquara-SP (CEPAGRI, 2018).

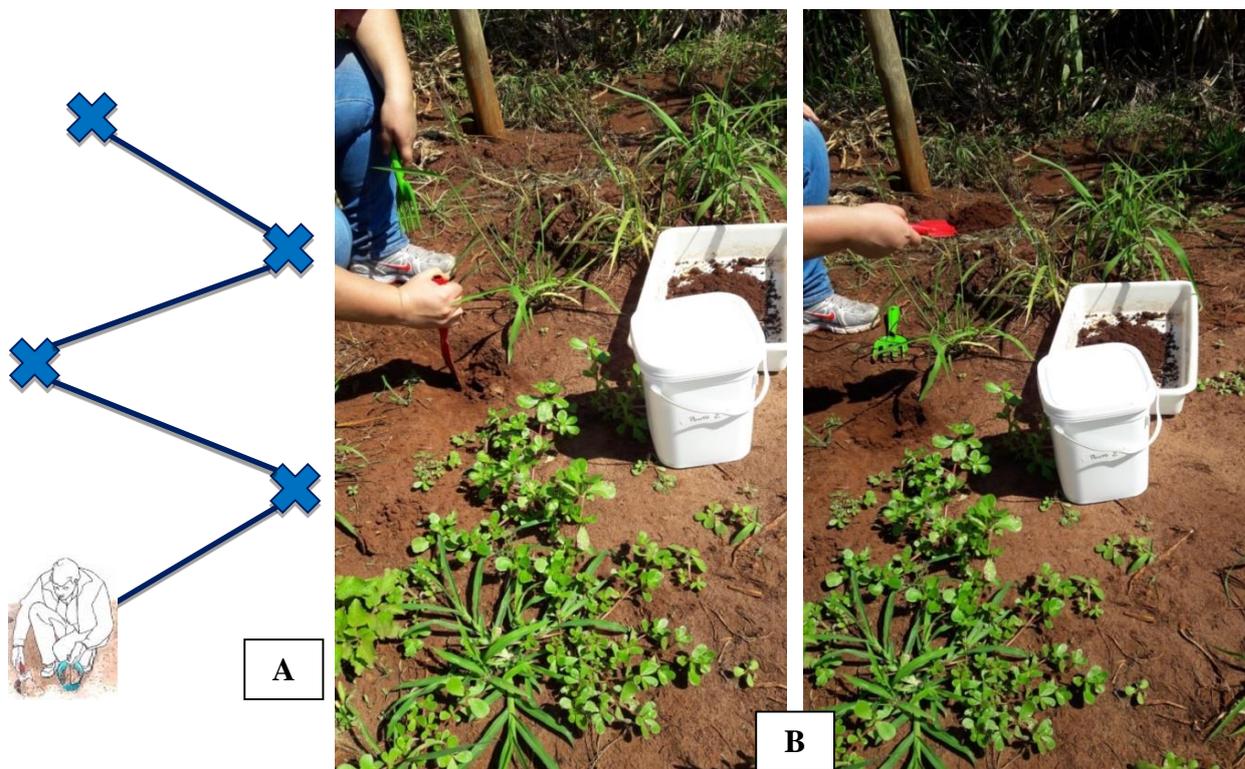
Figura 10 - Precipitação média mensal do ano de 2017 no município de Araraquara-SP.



Fonte: CEPAGRI (2018).

O procedimento de coleta foi adaptado do protocolo de amostragem de solos da Embrapa (1997), onde em cada ponto de coleta, foram retiradas cinco amostras simples de solo formando uma amostra composta, pelo método de zigzag, contando-se cinco passos de distância entre os locais de retirada das amostras simples (Figura 11A). Para retirar o solo, foram utilizadas como ferramentas, pá e garfo de jardinagem, higienizadas com água deionizada a cada ponto. Com o garfo toda a camada superficial de folhagem e solo foi retirada, e com a pá coletou-se o mesmo na profundidade de 0-10 cm. Todas as amostras coletadas em cada ponto foram dispostas em uma bandeja para homogeneização e quarteamento. Desta forma o solo foi armazenado em baldes plásticos para transporte até o laboratório (Figura 11B).

Figura 11 - Coleta das amostras de solo. A – Método ziguezague de amostragem de solos; B – amostras de solo coletadas de 0-10 cm de profundidade.



Fonte: Próprio autor (2017).

5.3. Processamento das amostras de solo

Antes de proceder com o processamento do solo, foram retirados 200 g de cada amostra e armazenados a 4°C para posterior análise cromatográfica. O solo restante foi disposto em bandejas forradas com papel filtro qualitativo e acondicionado em câmara de germinação (BOD) com fotoperíodo a 30°C por 2 dias (Figura 12). Após esse tempo, o solo foi triturado e peneirado (malha de 2 mm), e armazenado em recipientes de vidro para o desenvolvimento dos ensaios laboratoriais.

Figura 12 - Processamento da amostra do solo em câmara de germinação (BOD).



Fonte: Próprio autor (2017).

5.4. Extração da Fração Solúvel do Solo

Os métodos de extração sequencial do solo fornecem informações a respeito das frações químicas e da proporção de metal e outros compostos presentes neste solo (GOMES *et al.*, 1997). Esses compostos são extraídos sequencialmente, sendo a fração solúvel, representada pelos metais presentes na solução do solo e que estão mais disponíveis para a absorção pelas plantas ou dispersão ambiental (LOURENCETTI, 2001).

Desta forma, foi utilizado o protocolo de extração sequencial, adaptado da proposta de Gaivizzo (2001), apenas para extrair a fração solúvel do solo. Este procedimento foi realizado com a colaboração da Prof.^a Dr.^a Carolina Lourencetti do Instituto Federal de São Paulo, IFSP – Campus Matão.

Para tanto, foram adicionados em frascos de vidro Erlenmeyer, 40 g de solo peneirado e triturado de cada ponto de coleta e 200 ml de água deionizada. Essas soluções permaneceram em agitação a 30 rpm em câmara incubadora com agitação orbital (*shaker*), por 10 horas à 25°C. Após esse período, os extratos da fração solúvel do solo foram filtrados em papel filtro qualitativo e armazenados em frascos de vidro sob refrigeração (4°C), até determinação cromatográfica e ensaios ecotoxicológicos (Figura 13).

Figura 13 - Extração da fração solúvel do solo (A – Solução em incubadora shaker; B – Filtragem da solução e C – extratos da fração solúvel do solo).



Fonte: Colaboração da Prof.^a Dr.^a Carolina Lourencetti (2017).

5.5. Determinação dos Agrotóxicos

De acordo com Rodríguez, Guerrero e Castro (2002), há uma necessidade de se avaliar quantitativamente os resíduos de glifosato e seu principal metabolito AMPA em matrizes biológicas, como solo e água em diferentes ecossistemas, por meio de métodos analíticos que utilizam técnicas cromatográficas seletivas e sensíveis. Dentre os métodos de determinação e quantificação destes compostos, a análise por cromatografia líquida é a mais empregada, sendo os detectores mais utilizados para esse tipo de análise os ultravioletas, fluorescência, colorimétricos e por espectrometria de massas (SILVA, 2009).

A determinação do resíduo do herbicida glifosato e seu metabolito AMPA foi realizada em pelo laboratório de análises de água Keller Ambiental, o qual possui acreditação vigente da ISO/IEC 17025:2005 junto ao INMETRO no registro CRL 0400, e é realizado de acordo com o método de ensaio interno ME 91 revisão 04.

O método consistiu na filtração de 1 ml do extrato da fração solúvel do solo em filtro de membrana 0,22 μm de porosidade em vial de 2 ml com septo de PTFE. Após a filtração da

amostra foi realizado o processo de derivatização com cloroformiato de 9-fluorenilmetila (Cloreto de FMOC/FMOC-Cl). A análise foi realizada em cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE – DF), nos comprimentos de onda $\lambda_{exc} = 270$ nm e $\lambda_{em} = 315$ nm, para quantificação dos resíduos de glifosato e AMPA.

Os dados da validação do método, curva analítica, condições cromatográficas e requisitos do equipamento são de caráter privado do laboratório Keller Ambiental. Os valores referentes ao limite de quantificação (LQ) podem ser consultados junto ao escopo vigente do laboratório, disponível no site do Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO), que são de $50 \mu\text{g L}^{-1}$ para Glifosato e de $200 \mu\text{g L}^{-1}$ para AMPA, referente ao limite de detecção (LD) do método, o valor informado pelo laboratório foi de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ para ambos os compostos.

5.6. Desenvolvimento das culturas de *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae, Oligochaeta)

As culturas de enquitreídeos foram desenvolvidas a partir de uma matriz cedida pelo Prof. Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola, por meio da pós-doutoranda Vanessa Bezerra de Menezes Oliveira, do Centro de Recursos Hídricos e Ecologia Aplicada, vinculado ao Departamento de Hidráulica e Saneamento na Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo.

A partir dessa matriz, foi desenvolvida uma coleção de culturas de *E. crypticus*, mantidas no laboratório de Ecotoxicologia Ambiental da Universidade de Araraquara (UNIARA). Para tanto, os organismos foram transferidos para placas de Petri (90 mm) contendo aproximadamente 20 ml de meio de cultura à base de ágar bacteriológico, diluído em água destilada e enriquecido com sais (Tabela 4). O ágar foi esterilizado por meio de tratamento térmico (Autoclavagem). Esse meio de cultura serviu como substrato para todos os processos que envolvem a utilização de *E. crypticus*, desde a manutenção da coleção de culturas, até o desenvolvimento dos bioensaios de ecotoxicologia. A Figura 14 demonstra a coleção de culturas estabelecida.

Semanalmente os organismos foram alimentados com 5 mg de farinha de aveia e as culturas hidratadas com 2 ml de água deionizada. Essas culturas foram mantidas em ambiente climatizado, com temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e iluminação de lâmpadas fluorescentes (18W) com fotoperíodo de 12h:12h (luz:escuro). À medida que o substrato se tornou liquefeito ou

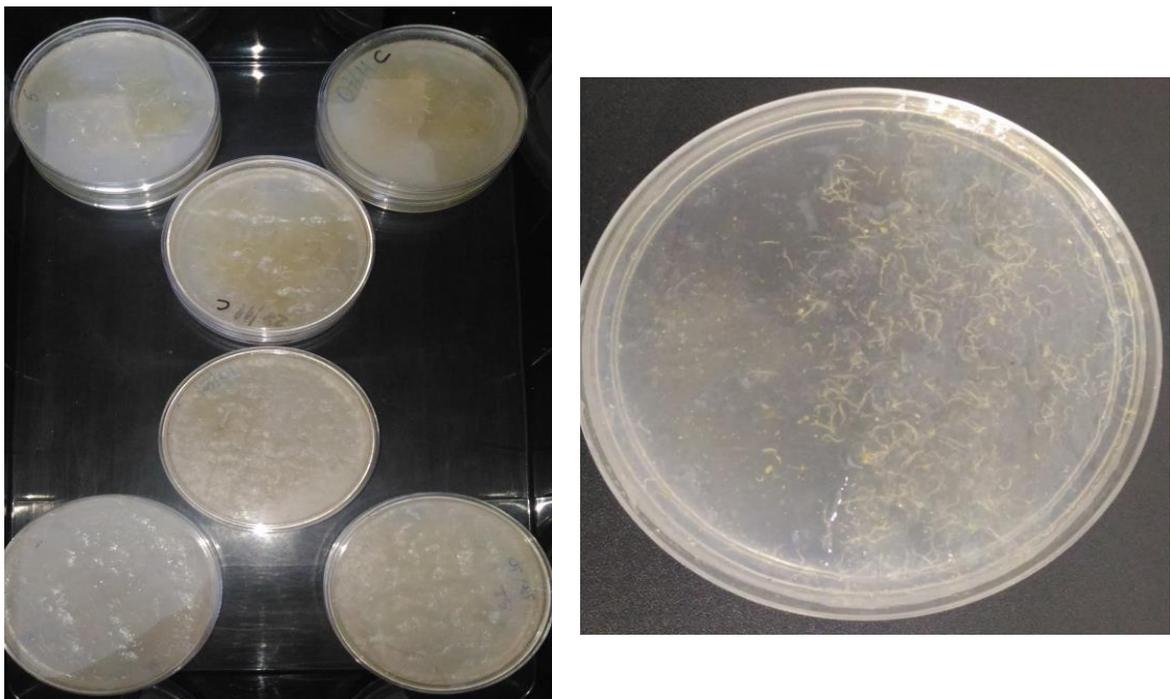
contaminado com ácaros, as culturas foram replicadas em novas placas contendo ágar, em intervalos de aproximadamente 30 - 40 dias.

Tabela 4 - Sais e concentração das soluções adicionadas ao ágar bacteriológico para manutenção das culturas.

Sal	Fórmula	Concentração
Cloreto de Cálcio	$\text{CaCl}_2 * 2 \text{H}_2\text{O}$	Concentrado
Sulfato de Magnésio	MgSO_4	Concentrado
Cloreto de Potássio	KCl	0,01M
Bicarbonato de Sódio	NaHCO_3	0,1M

Fonte: Próprio autor (2018).

Figura 14 - Coleção de culturas de *Enchytraeus crypticus* em ágar bacteriológico.



Fonte: Próprio autor (2018).

5.7. Bioensaios ecotoxicológicos do solo

Esta pesquisa teve como propósito o desenvolvimento de uma nova metodologia de bioensaios ecotoxicológicos de solo, inédita no Brasil, utilizando o sistema multi-espécies de análise de solo em microcosmos (MS-2). A metodologia foi fundamentada no modelo europeu,

o MS-3 (*Multispecies Soil System*), desenvolvido pelo INIA - *Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria* (Madri, Espanha). Para facilitar, a proposta consiste em reduzir a escala dos ensaios ecotoxicológicos, bem como adaptar estes estudos a realidade brasileira, utilizando espécies nativas de bioindicadores, mas que da mesma forma que o MS-3, produzir informações sobre a sensibilidade destes organismos às substâncias e misturas adicionadas ao solo.

O MS-3 trata-se de um sistema multi-espécies de análise de solo em microcosmos, que consiste em colunas de PVC (policloreto de vinil) ou acrílico (polimetil-metacrilato) com 15 cm de altura x 15 cm de diâmetro interno. A essas colunas são adicionados aproximadamente 2 kg de solo seco peneirado, onde são incorporados macro-organismos de solo (três espécies de plantas e uma espécie de invertebrado). Utiliza-se dez sementes de cada planta, podendo ser o trigo, (*Triticum aestivum* L.), a colza, também chamada de canola (*Brassica napus* L.), a ervilhaca (*Vicia sativa* L.) e/ou o trevo vermelho (*Trifolium pratense*); e dez adultos de *Eisenia fetida* (Oligochaeta: Lumbricidae). Essas colunas são irrigadas cinco dias por semana com 50 ml água desclorada, simulando precipitação de 1000 mm/ano (FERNÁNDEZ *et al.*, 2004). Uma luz solar artificial com fotoperíodo é fornecida para o crescimento das plantas e o gradiente de temperatura durante o ensaio, se aproxima das condições naturais. Todo o lixiviado é recolhido e testado quanto à toxicidade utilizando testes padronizados. O perfil de caracterização dos perigos obtidos com o MS-3 pode ser suficiente para a triagem da avaliação de risco (FERNÁNDEZ *et al.*, 2005; VAN DEN BRINK *et al.*, 2005).

Na produção da metodologia MS-2, foram utilizados dois organismos indicadores ecologicamente distintos. Sendo eles os oligoquetos, pertencentes à infauna terrestre e os vegetais, que ocupam a posição de produtores na cadeia alimentar. Para tal, três protocolos foram adaptados: o protocolo do sistema multi-espécies (MS-3), descrito por Fernández *et al.* (2004); o protocolo descrito por Pelegrini *et al.* (2014), que utiliza a germinação de sementes em meio ágar para avaliação ecotoxicológica; e o protocolo descrito por Sobrero e Ronco (2004), que avalia toxicidade de substâncias sobre a germinação de sementes de alface.

5.8. Sistema multi-espécies de análise de solo em microcosmos (MS-2)

No desenvolvimento da metodologia MS-2, foram utilizados como organismos-teste indivíduos adultos de *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta: Enchytraeidae) provenientes da coleção de culturas do Laboratório de Ecotoxicologia Ambiental da Universidade de

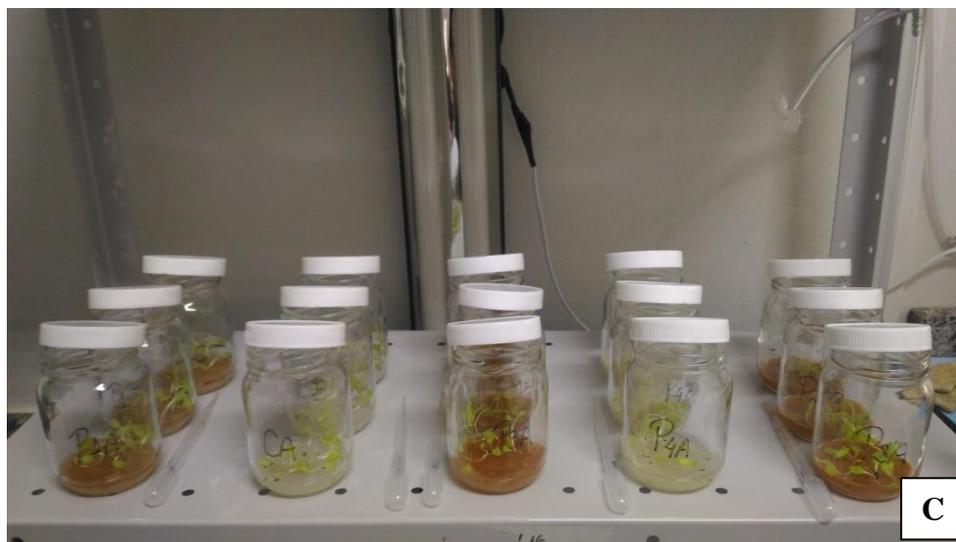
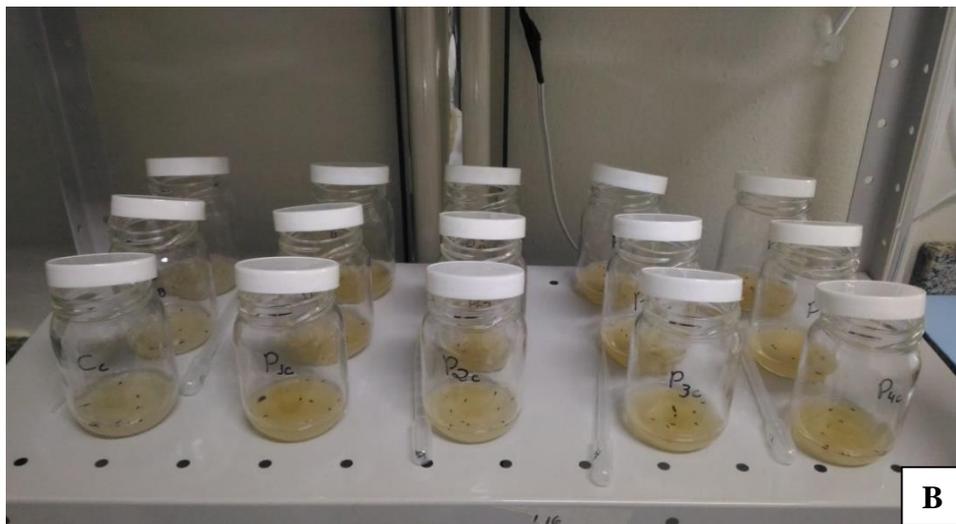
Araraquara - UNIARA, e uma espécie de vegetal, representada pelas sementes de alface (*Lactuca sativa* L.), pertencentes ao lote 444097, safra 2015/2015, com validade 02/2018, a qual não possui qualquer tratamento químico. Ambas são indicadas para testes de ecotoxicidade de substâncias químicas pela OCDE - *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD, 2016; OECD, 2003).

Os microcosmos foram produzidos utilizando-se frascos de vidro transparente com tampa de rosca e capacidade para 250 ml, previamente lavados, enxaguados com água deionizada e secos ao ar, 24 horas antes de serem manipulados. O meio de cultura foi confeccionado seguindo o protocolo de manutenção das culturas de *E. crypticus*. Um volume de 20 ml do meio de cultura foi adicionado aos frascos de vidro e resfriado até se tornar um gel firme. A esse meio de cultivo foram adicionados 10 organismos adultos e clitelados de *E. crypticus* e 10 sementes de *Lactuca sativa* L. Foram realizadas 3 repetições para cada ponto de amostragem.

A irrigação dos microcosmos ocorreu duas vezes na semana, sendo adicionados 3 ml de água deionizada nas repetições do grupo controle e nas repetições dos pontos de amostragem, adicionou-se 3 ml dos extrato da fração solúvel do solo.

Durante 21 dias, os frascos permaneceram em ambiente climatizado sob as mesmas condições da coleção de culturas e a alimentação destes organismos seguiu protocolo de manutenção das culturas, vide item 5.7 (Figura 15).

Figura 15 - Metodologia MS-2. A – Preparação dos frascos com meio de cultura; B – Primeiro dia do bioensaio; C – Após 21 dias.



Fonte: Próprio autor (2017).

Ao final do ensaio, os enquitreídeos foram retirados do ágar e colocados em água deionizada, e por meio de um Microscópio Estereoscópico da Marca Taimin, com capacidade máxima de aumento de 30x, foram fotografados. Visando contabilizar a população, foi registrado o número de indivíduos juvenis e adultos, calculando-se a densidade populacional de cada tratamento. Ainda, para cada tratamento, foi calculada a média de casulos presentes por indivíduo. As sementes de alface que germinaram normalmente, considerando como critério o aparecimento efetivo da raiz, foram registradas para calcular a porcentagem de germinação. As plântulas foram dispostas em papel milimetrado e foi medido o comprimento total das raízes (mm) determinando assim o crescimento de *L. sativa*. As métricas ecotoxicológicas propostas neste estudo (Tabela 5) foram obtidas por meio do *software* Image J versão 1.51j8 (NIH, 2017), calculando a média das duas coletas para cada ponto.

Tabela 5 - Métricas ecotoxicológicas.

Organismos	Metodologia	Métricas
<i>Enchytraeus crypticus</i>	Foram retirados do ágar e para contabilizar a população, registrou-se os indivíduos juvenis, adultos e o número de casulos produzidos	Densidade populacional (Indivíduos/cm ²)
		Média de casulos por indivíduo
<i>Lactuca sativa</i> L.	Foram registradas as sementes que germinaram	Porcentagem de germinação
	As plântulas foram dispostas em papel milimetrado, medindo-se o comprimento total das raízes	Crescimento de <i>L. sativa</i> (Média do comprimento total das raízes – mm)

Fonte: Próprio autor (2018).

5.9. Ensaio de ecotoxicidade aguda com *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera).

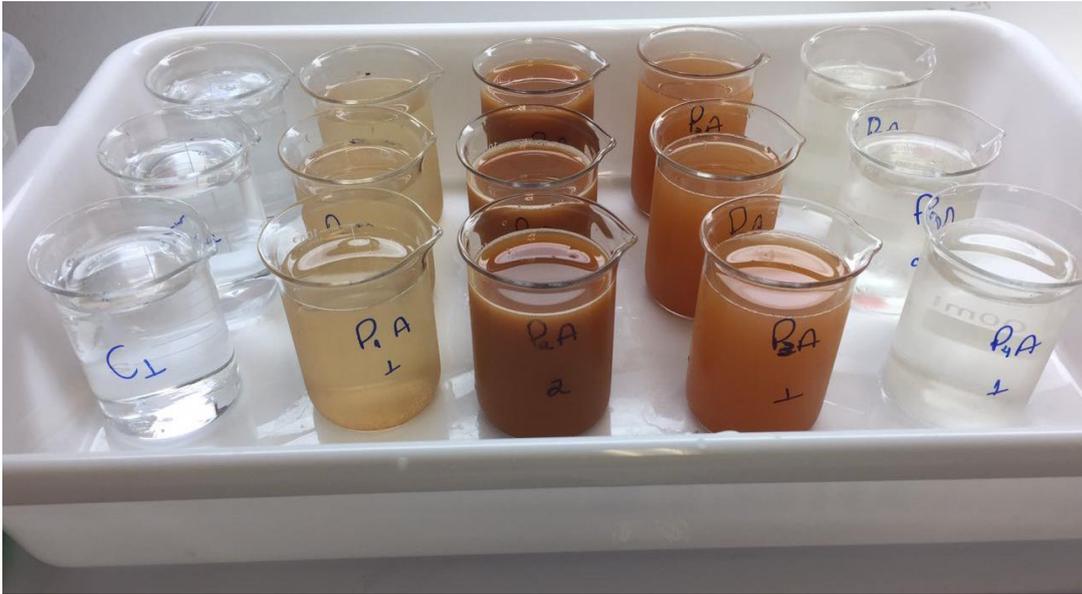
O ensaio de ecotoxicidade aguda com *D. magna* foi realizado em colaboração da Engenheira Ambiental Mayara Caroline Felipe do Laboratório de Ecologia de Ambientes Aquáticos (LEAA) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC - USP).

Todos os procedimentos adotados seguiram normativas descritas nos protocolos da OECD 202 (2004) e NBR 12713 (ABNT, 2016). Os testes são estáticos, ou seja, não há renovação do meio, e como organismos-teste foram utilizadas neonatas de *D. magna* de 3ª geração nascidas em até 24 horas.

O ensaio foi realizado em béqueres de vidro contendo 100 ml do extrato da fração solúvel do solo dos pontos de amostragem, sendo realizadas 3 repetições para cada ponto. Para os controles, foi utilizada água reconstituída com dureza total entre 175 a 225 mg CaCO₃/L e pH entre 7,6 a 8,0. Em cada repetição foram adicionados 10 organismos (Figura 16).

Para evitar a evaporação, os béqueres de vidro foram vedados com filme de plástico transparente. O ensaio é realizado em câmara incubadora (BOD) a uma temperatura de 20 ± 2°C, com fotoperíodo de 16h:8h (luz:escuro), durante 48 horas. Ao final do ensaio, foi verificada a porcentagem de sobrevivência destes organismos.

Figura 16 - Ensaio de ecotoxicidade aguda com *D. magna*.



Fonte: Colaboração da Engenheira Ambiental Mayara Caroline Felipe (LEAA – EESC/USP, 2017).

Este bioensaio tem por princípio determinar o número de organismos imóveis, ou seja, a porcentagem de sobrevivência das dáfias. A porcentagem de sobrevivência em cada ponto, levou em consideração ambas as coletas. Para qualificar os resultados obtidos, utilizou-se uma escala de toxicidade relativa proposta por Brandolt e Lobo (2010) (Quadro 4).

Quadro 4 - Escala de toxicidade relativa para porcentagem de sobrevivência de *Daphnia magna*.

Sobrevivência (%)	Toxicidade relativa
0 – 25]	Extremamente tóxica
]25 – 50]	Altamente tóxica
]50 – 75]	Medianamente tóxica
]75 – 100]	Pouco tóxica

Fonte: Adaptado de Brandolt e Lobo (2010).

5.10. Análise dos dados

Os dados obtidos foram analisados utilizando o software Paleontological Statistics – PAST, versão 3.16 (HAMMER, HARPER e RYAN, 2001).

Visando comparar os tratamentos, para a determinação de Glifosato e AMPA e nos ensaios com *Daphnia magna*, foi empregado o teste de Kruskal Wallis ($\alpha = 0,05$), seguido do teste de Dunn (corr. Bonferroni) à *posteriori*.

Para a metodologia MS-2, foi empregada análise de variância One-way ANOVA ($\alpha = 0,05$) para cada uma das variáveis, seguida de teste de Tukey à *posteriori*.

Para correlacionar os dados da determinação dos agrotóxicos com os ensaios ecotoxicológicos foi realizado um *clustering* com valores de matriz de correlação.

VI. RESULTADOS

6.1. Determinação de Glifosato e seu metabolito AMPA

A determinação de Glifosato e AMPA foi realizada pelo Laboratório de Análise de Água Keller Ambiental. Na Tabela 6 encontram-se relacionados os resultados da determinação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE-DF).

Tabela 6 - Análise de Glifosato e AMPA por CLAE-DF.

		Manejo orgânico		Manejo Convencional	
		P1	P2	P3	P4
Coleta 1	Glifosato	ND	< LQ	ND	ND
	AMPA	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Coleta 2	Glifosato	< LQ	< LQ	ND	50,15
	AMPA	< LQ	< LQ	ND	< LQ

Legenda: ND = < Limite de Detecção (Glifosato e AMPA = 5 $\mu\text{g L}^{-1}$); LQ = < Limite de Quantificação (Glifosato = 50 $\mu\text{g L}^{-1}$ e AMPA = 200 $\mu\text{g L}^{-1}$);

Fonte: Próprio autor (2017)

A presença de glifosato no extrato da fração solúvel do solo foi detectada no ponto 2 da primeira coleta e nos pontos 1 e 2 da segunda coleta, porém com valores inferiores ao limite de quantificação do método. Somente o ponto 4 da segunda coleta pode ser quantificado (50,15 $\mu\text{g L}^{-1}$). Em relação ao AMPA, todos os valores detectados foram inferiores ao LQ do método.

Como a maioria dos valores se apresentaram abaixo do limite de detecção ou do limite de quantificação, optou-se por transformar as variáveis em variáveis categóricas ordinais, onde para resultados abaixo do limite de detecção (ND) foi atribuído o valor 1, para os resultados menores que limite de detecção (<LQ) foi atribuído valor 2 e para o ponto onde foi detectado o composto foi atribuído valor 3 (Tabela 7).

Tabela 7 - Transformação da análise de Glifosato e AMPA para variável categórica ordinal.

		Manejo orgânico		Manejo Convencional	
		P1	P2	P3	P4
Coleta 1	Glifosato	1	2	1	1
	AMPA	2	2	2	2
Coleta 2	Glifosato	2	2	1	3
	AMPA	2	2	1	2

Legenda: ND = 1; <LQ = 2 e Detecção = 3.

Fonte: Próprio autor (2017)

A análise estatística a partir das variáveis categóricas ordinais, demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,1948$) entre os pontos amostrados.

Os cromatogramas podem ser visualizados no Apêndice A.

6.2. Bioensaios ecotoxicológicos do solo

6.2.1. Sistema multi-espécies de análise de solo em microcosmos (MS-2)

Os ensaios de toxicidade utilizando a metodologia MS-2, se mostraram eficientes, mantendo a integridade das plântulas, principalmente das radículas e na contabilização da população, facilitando o registro dos indivíduos juvenis e adultos, e o número de casulos. Os valores correspondentes aos parâmetros propostos na metodologia MS-2 estão resumidos na Tabela 8 .

Tabela 8 - Média e erro padrão dos parâmetros da metodologia MS-2.

	Manejo orgânico			Manejo Convencional	
	Controle	P1	P2	P3	P4
<i>Densidade Populacional de E. crypticus</i> ¹	5,08 ± 1,66	11,18 ± 3,93	16,18 ± 5,11	17,08 ± 5,41	10,83 ± 3,54
Média de Casulos/Indivíduo	0,23 ± 0,07	0,17 ± 0,05	0,10 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,15 ± 0,04
Crescimento de <i>L. sativa</i> ²	67,83 ± 6,35	58,43 ± 1,62	61,47 ± 5,56	39,93 ± 10,02	58,05 ± 4,68
Germinação (%)	95 ± 3,42	93,33 ± 3,33	93,33 ± 6,67	65 ± 17,08	93,33 ± 6,67

Legenda: 1 = Média de indivíduos/cm²; 2 = Média do comprimento total das raízes em milímetros.

Fonte: Próprio autor (2018).

Os dados de ecotoxicidade dos extratos da fração solúvel do solo em *E. crypticus* demonstram que apesar dos pontos P2 e P3 apresentarem uma densidade populacional maior (P2 = 16,18 Indivíduos/m²; P3 = 17,08 Indivíduos/m²) quando comparada aos outros pontos e principalmente ao grupo controle, a análise estatística mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa na densidade populacional dos indivíduos entre os tratamentos ($p = 0,2784$).

Esses pontos estão estabelecidos em propriedades distintas, sendo o P2 localizado no lote de manejo orgânico. É o ponto localizado na parte mais alta da propriedade, próximo às suas divisas, possuindo em seus arredores um pasto e plantações de milho e banana. O P3 está localizado no lote com manejo convencional. É o único ponto próximo ao corpo d'água, e pela declividade do terreno, é o local que recebe os lixiviados dos contaminantes aplicados na plantação.

Para a média do número de casulos por indivíduo, os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p = 0,2989$).

Quanto as métricas ecotoxicológicas com *L. sativa*, os resultados mostraram que o crescimento das raízes foi marginalmente significante ($p = 0,5045$), e a análise *à posteriori* indicou que o P3 apresentou um menor crescimento quando comparado ao controle. No que diz respeito a porcentagem de germinação, o P3 também apresentou um valor menor (65%), quando

comparados aos outros tratamentos, entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,1171$).

6.2.2. Ensaio de toxicidade aguda com *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera).

Os dados apresentados na Tabela 9 referem-se à sobrevivência dos neonatos, no ensaio de toxicidade aguda com *D. magna*.

Tabela 9 - Média e erro padrão da porcentagem de sobrevivência de *D. magna*.

Controle	Manejo orgânico		Manejo Convencional	
	P1	P2	P3	P4
100 ± 0	70 ± 15,06	92 ± 1,67	50 ± 13,66	92 ± 4,77

Fonte: próprio autor (2018).

Neste ensaio, os resultados obtidos demonstraram que houve diferença estatisticamente significativa entre os pontos amostrados ($p = 0,001$) e, a análise *à posteriori* indicou menor porcentagem de sobrevivência dos organismos em apenas um ponto (P3), quando comparado ao controle. Utilizando a escala de toxicidade relativa proposta por Brandolt e Lobo (2010), o ponto P3 é considerado altamente tóxico aos neonatos de *D. magna*, o P1 apresenta toxicidade mediana, enquanto os pontos P2 e P4 apresentaram sobrevivência média de 92%, sendo considerados pouco tóxicos (Quadro 5).

Quadro 5 - Toxicidade relativa (%) em *D. magna*.

	Sobrevivência média (%)	Toxicidade relativa
P1	70	Medianamente tóxico
P2	92	Pouco tóxico
P3	50	Altamente tóxico
P4	92	Pouco tóxico

Fonte: Adaptado de Brandolt e Lobo (2010).

VII. DISCUSSÃO

Na agricultura convencional, o glifosato é amplamente utilizado em sucessivas aplicações. Este herbicida e seu metabolito (AMPA) geralmente são detectados em amostras de solo (APARICIO *et al.* 2013; DIDDEN e RÖMBKE, 2001).

No solo, o glifosato é fortemente adsorvido aos coloides de argila e húmus, fazendo com que haja dificuldade da extração do mesmo (JONGE *et al.*, 2001). Amarante Jr. *et al* (2002b) afirmam que a qualidade da extração de glifosato e do AMPA está diretamente ligada ao tipo de solo analisado, uma vez que em solos argilosos, o esmo estudado neste trabalho, a extração fica comprometida em virtude da elevada competitividade pelos sítios iônicos. Neste estudo, as concentrações de glifosato e AMPA não foram possíveis de serem quantificadas. Resultados vistos anteriormente por Castro (2005).

De acordo com Mattos *et al.* (2002), o glifosato possui persistência média, e sua permanência depende do teor de matéria orgânica e da atividade microbiana, uma vez que o aparecimento do metabólito está diretamente relacionado com a degradação do glifosato pela atividade microbiana. Veiga *et al.* (2001) avaliaram a dinâmica do glifosato e AMPA, e observaram que a concentração do herbicida decrescia enquanto a do seu metabólito aumentava, após algumas semanas a concentração do AMPA também decrescia devido a sua degradação.

Para Castro (2005) o AMPA mostra-se mais persistente, sendo encontrado em maior concentração do que a de glifosato. O conjunto de trabalhos estudados sobre a presença de glifosato e AMPA em amostras de solo reforçam nossos resultados, visto que o metabólito AMPA foi detectado na maioria dos pontos, porém em valores abaixo do limite de quantificação do método.

Ademais, a determinação destes compostos, quando adicionados ao solo, é importante para avaliar o grau de contaminação e monitorar ao longo do tempo, a lixiviação para o lençol freático, escoamento superficial ou erosão (GAIVIZZO, 2001). Visto isso, são necessárias técnicas de extração ou fracionamento destes compostos, uma vez que as extrações sequenciais utilizam extratores geralmente com agressividade crescente. No presente estudo, utilizamos a água como extrator para obtenção do extrato da fração solúvel do solo, para diminuir o impacto nos organismos presentes nos ensaios e originar uma amostra mais real.

Assim, há limitações no extrato da fração solúvel do solo, visto que no solo os contaminantes não ocorrem isolados, mas sim como misturas complexas que interagem dinamicamente por processos químicos, físicos e biológicos (LOGAN, 1998). A disponibilidade dos contaminantes na fração solúvel, apesar de presente, não foi suficiente para apresentar danos aos organismos, uma vez que para uma extração eficiente são necessários processos químicos e reagentes específicos.

Convém reforçar que o local de estudo, está disposto em uma área heterogênea e em seu entorno, existe uma complexidade de manejos empregados, onde se encontram áreas de agricultura orgânica, convencional e áreas de pecuária, aumentando assim a possibilidade de contaminação difusa.

Assim sendo, apesar de não haver pesquisas sobre o sistema multi-espécies confrontando os manejos convencional e orgânico na agricultura, literatura especializada relatam de forma satisfatória a utilização de espécies de enquitreídeos e *Lactuca sativa* em bioensaios de toxicidade com substâncias químicas presentes no solo (RODRIGUES *et al.*, 2017; CAMPAGNA-FERNANDES, MARIN E PENHA, 2016; LEITÃO *et al.*, 2014; CASTRO-FERREIRA *et al.*, 2012; CHELINHO *et al.*, 2012; GREVE *et al.*, 2012; MOLINA *et al.*, 2012; AMORIM *et al.*, 2008; AMORIM *et al.*, 2005 e RÖMBKE, 2003). Essa coletânea de autores ressalta que estes organismos possuem elevada sensibilidade, indicando qualitativamente a presença de substâncias tóxicas, como os herbicidas utilizados na agricultura convencional.

Com base nas análises ecotoxicológicas do extrato da fração do solúvel do solo, presume-se que o uso do glifosato não interfere de maneira significativa na dinâmica populacional de *E. crypticus*. De maneira contraditória, Assis (2016), afirma que as sucessivas aplicações deste herbicida, influenciam na diminuição das taxas reprodutivas do organismo. Cabe ressaltar que na presente pesquisa, para obtenção do extrato, foi utilizada água como solvente, não se mostrando eficaz na remoção dos contaminantes presentes no solo.

No que tange a elaboração da metodologia MS-2, a *Lactuca sativa* foi a espécie de vegetal selecionada, posto que, segundo Pelegrini *et al.* (2006), os testes de toxicidade utilizando essa espécie constituem um recurso prático, de baixo custo e de sensibilidade razoável na indicação qualitativa da presença de substâncias tóxicas ou inibidores biológicos, como os pesticidas e herbicidas.

Os bioensaios envolvendo *Lactuca sativa* (porcentagem de germinação e crescimento de *L. sativa*) não demonstraram diferença significativa entre os tratamentos. Campagna-Fernandes, Marin e Penha (2016), em pesquisa voltada a avaliação da sensibilidade do crescimento radicular em *L. sativa*, demonstraram em seus resultados que o crescimento da raiz foi um *endpoint* mais sensível quando comparado a porcentagem de germinação, uma vez que os efeitos no comprimento total das raízes foram detectados em concentrações menores, justificando a utilização de dois *endpoints* na avaliação de toxicidade em *L. sativa* apresentados neste estudo.

De maneira similar, pesquisas de Greve *et al.* (2012) e Molina *et al.* (2012), utilizaram meio de cultura a base de ágar contendo glifosato para investigar a toxicidade em diferentes espécies de hortaliças, dentre elas a *L. sativa*. A técnica utilizada possibilitou observar a germinação das sementes e o desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, sendo que as plântulas se apresentaram altamente sensíveis a concentrações baixas de glifosato, demonstrando assim sensibilidade significativa em sua germinação.

Rodrigues *et al.* (2017), avaliaram duas formulações a base de glifosato, Roundup® original (Monsanto) e o Herbicida AKB 480 (Kelldrin) em germinação de *L. sativa* e outras duas espécies de vegetais, das quais a alface apresentou maior sensibilidade ao Roundup®, enquanto ambas as formulações inibiram significativamente o crescimento radicular de todas as espécies testadas. Entretanto, Araújo *et al.* (2015), em pesquisa de avaliação da fitotoxicidade do glifosato em *L. sativa*, concluíram que este herbicida não apresentou toxicidade, o que contradiz a maioria dos estudos conduzidos na área, incluindo os resultados da presente pesquisa.

Ademais, é possível observar a latente carência de estudos utilizando ensaios ecotoxicológicos na agricultura orgânica. Exceção à regra, são as pesquisas conduzidas por Dalla Rosa *et al.* (2017) e Silva e Mattiolo (2010). A primeira avaliou a toxicidade de substâncias com uso autorizado no manejo orgânico: Calda Bordalesa (fungicida e bactericida) e o óleo de Neem comercial Nim-I-Go® (inseticida), e seus resultados demonstraram que essas substâncias potencializaram a mortalidade e afetaram negativamente o potencial reprodutivo de *E. crypticus*, mesmo em concentrações inferiores ao recomendado. O segundo estudo avaliou o efeito em germinação de *L. sativa*, do fitotóxico Rotenat®, um inseticida natural indicado para uso em culturas orgânicas, concluindo que esse composto promove significativa inibição

na germinação e crescimento das plântulas, mesmo na concentração recomendada pelo fabricante.

No presente estudo, ensaios ecotoxicológicos revelaram que em 3 pontos de amostragem a toxicidade relativa do extrato apresenta-se como pouco e medianamente tóxica. Resultados similares foram obtidos por Castro (2013), que objetivou avaliar percolados de solo com resíduo de usina termelétrica em espécie do gênero *Daphnia* e *Lactuca sativa*, demonstrando que o solo provavelmente retém as substâncias tóxicas do lixiviado, uma vez que não foi expresso potencial tóxico nos organismos.

Nakagome, Noldin e Resgalla Jr. (2006), utilizando-se análise toxicológica com *D. magna*, indicam que os herbicidas são classificados com toxicidade mínima, já os inseticidas apresentam maior periculosidade de impacto ecológico. Ainda, Laitano e Matias (2016), confirmam que os bioensaios com *D. magna* apresentam-se como ferramentas práticas e vantajosas na avaliação da toxicidade, gerando respostas seguras para o controle e monitoramento da qualidade ambiental.

7.1. Reflexões sobre os manejos convencional e orgânico

A agricultura intensiva (manejo convencional) com elevado uso de fertilizantes e agrotóxicos, associados às práticas de seleção de espécies (monocultura), promove importantes alterações na estrutura do solo, afetando a riqueza e a biomassa da microbiota do solo (LIMA *et al.*, 2010; MARCHÃO *et al.*, 2009). De forma complementar, Anderson (2009) pontua que a agricultura convencional sobrepõe-se aos processos biológicos do solo na definição da produtividade agrícola.

A lógica nesse modelo está na exploração ao máximo da natureza, sem observar o limites de sua utilização (DIAS, 2006). Segundo Possenti *et al.* (2007) existe no sistema de agricultura convencional, uma maior preocupação com a produção do que com a preservação do ambiente e a própria qualidade dos alimentos produzidos. Esse sistema prejudica o ambiente devido às perdas de matéria orgânica do solo através da mineralização e erosão. Esta condição é causada principalmente pela degradação das propriedades físicas e a baixa fertilidade química inerente desses solos (BALBINO *et al.*, 2004).

De acordo com Silva *et al.* (2006) e Beecher *et al.* (2002), para a manutenção da qualidade do solo e da sustentabilidade de seu uso é fundamental que a biodiversidade seja

promovida. A biodiversidade dessas áreas agrícolas é constituída por populações de espécies vegetais e animais que vivem nos agroecossistemas.

Para tanto, buscam-se modelos de agricultura mais sustentáveis como os sistemas agroecológicos, que visam diminuir a utilização massiva de insumos ou a sua substituição (ROSSET *et al.*, 2014). Roel (2002) afirma que substituição de insumos sintéticos por produtos naturais tende a diminuir os custos de produção e gerar mais empregos, além de contribuir para fixar o homem no campo. Entretanto, Altieri (2002) defende que a simples substituição de insumos que agredem o ambiente por outros menos agressivos, gera um aumento nos os custos de produção e não reduz a vulnerabilidade das monoculturas, consequentemente não atende aos princípios fundamentais da produção orgânica.

Roel (op. Cit.) ainda assegura que a agricultura ecológica é um sistema economicamente viável que resgata práticas seculares e conhecimentos empíricos de populações rurais e desta forma melhora a qualidade de vida do produtor e de sua família e resguarda o ambiente de degradações.

A transição da agricultura convencional para a agricultura orgânica deve ocorrer de maneira gradativa nas propriedades rurais, não apenas com mudanças na base tecnológica do sistema de produção, mas também da própria maneira de encarar a relação da produção com a natureza. As mudanças devem iniciar em novas políticas agrárias com incentivos governamentais, incentivos a pesquisas, além do desenvolvimento e transferência de tecnologias eficientes, acessíveis e, acima de tudo, economicamente viáveis (ROSSET *et al.*, 2014; FEIDEN, 2001).

VIII. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os valores da determinação do glifosato e seu metabolito AMPA por CLAE-DF, apesar do método sensível, foram abaixo do limite de quantificação, com exceção de um ponto, tornando-se, no presente estudo, uma avaliação qualitativa quanto à presença do herbicida no extrato da fração solúvel do solo.

- A metodologia MS-2, mostrou-se eficiente como técnica de análise ecotoxicológica, porém, devido a características inerentes ao processo de extração da fração solúvel do solo, são necessários estudos futuros, a fim de refinar esta metodologia de análise ecotoxicológica/de risco ambiental.

- Os ensaios ecotoxicológicos com *D. magna* apresentaram resultados relevantes em relação à toxicidade do extrato da fração solúvel do solo, uma vez que estes organismos bioindicadores são mais sensíveis aos contaminantes.

- Com base nos dados da determinação dos compostos químicos, na metodologia MS-2 e nos bioensaios com *D. magna*, os manejos agrícolas (orgânico e convencional) não diferem quanto às variáveis estudadas, o que sugere a influência de variáveis como declividade do terreno ou localização dos pontos em relação a outras culturas, ou seja, a hipótese proposta na pesquisa não foi confirmada.

- A área onde se localiza o assentamento é particularmente heterogênea e, em consequência complexa, contemplando diversos manejos dentre eles os orgânicos, convencionais e pastagens, o que aumenta a possibilidade de contaminação difusa, influenciando principalmente os lotes orgânicos.

- Convém ressaltar que nesta pesquisa foi utilizado o extrato aquoso da fração solúvel do solo nos ensaios ecotoxicológicos, evidenciando a necessidade de novos estudos que utilizem como matriz o solo puro.

- Ainda, sugere-se pesquisas ambientais mais aprofundadas no assentamento Bela Vista do Chibarro, com o intuito de monitorar as possíveis contaminações do solo por agrotóxicos, e que acompanhem a evolução da agricultura orgânica, incentivando a transição e otimizando os sistemas produtivos agroecológicos.

REFERÊNCIAS

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Crustacea, Cladocera)**. Rio de Janeiro, 2016.

ALTIERI, Miguel. **Agroecologia: bases científicas para uma agricultura sustentável**. Guaíba: Agropecuária, 2002.

ALVES, P.R.L. **Avaliação ecotoxicológica da vinhaça de cana-de-açúcar no solo**. 138f. Tese (Doutorado em Ciências: Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

ALVES, P.R.L.; CARDOSO, E.J.B.N. Overview of the standard methods for soil ecotoxicology testing. **Invertebrates-Experimental Models in Toxicity Screening**. InTech. 2016.

AMARAL, D.T.; FERRANTE, V.L.S.B. Assentamentos rurais e desenvolvimento local: produção comercial de cana em parcerias com a agroindústria. **Raízes**, Campina Grande, vol. 26, n°s 1 e 2, p. 101–112, jan./dez. 2007.

AMARANTE JUNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M.; RIBEIRO, M.L. Glifosato: Propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Quim. Nova**, Vol. 25, No. 4, 589-593, 2002 (a).

AMARANTE JUNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO, N.M.; RIBEIRO, M.L. Métodos de extração e determinação do herbicida glifosato: Breve revisão. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 420-428, 2002 (b).

AMORIM, M.J.B.; NOVAIS, S.; RÖMBKE, J.; SOARES, A.M.V.M. *Enchytraeus albidus* (Enchytraeidae): a test organism in a standardised avoidance test? Effects of different chemical substances. **Environ. Int.** 34, 363–371, 2008.

AMORIM, M.J.B.; RÖMBKE, J.; SCHEFFCZYK, A.; SOARES, A.M.V. M. Effect of different soil types on the enchytraeids *Enchytraeus albidus* and *Enchytraeus luxuriosus* using the herbicide phenmedipham. **Chemosphere** 61, 1102–1114, 2005.

ANDERSON, J.M. Why should we care about soil fauna? **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.835-842, 2009.

ANDRÉA, M.M. O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos. **Acta Zoológica Mexicana** (n.s.), Número Especial 2, 2010. Disponível em: [http://www1.inecol.edu.mx/azm/AZM26-esp\(2010\)/AZM-Esp-7-Andrea.pdf](http://www1.inecol.edu.mx/azm/AZM26-esp(2010)/AZM-Esp-7-Andrea.pdf). Acesso: 14 Set 2016.

ANDREOLI, C.V.; HOPPEN, C.; FERREIRA, A.C. Avaliação dos níveis de agrotóxicos encontrados na água de abastecimento nas regiões de Curitiba e Londrina. **Revista Técnica da Sanepar: SANARE**, 2000

ANVISA, 1992 – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 3, de 16 de Janeiro de 1992**. Ratifica os termos das “diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de agrotóxicos e afins. Diário Oficial da União, Brasil: 4 fev. 1992. Disponível em: <http://www.aenda.org.br/painel/images/files-legislacoes/136/u/portaria-anvisa-03-1992---avaliacao-toxicologica.pdf>. Acesso em: 10 Fev 2018

ANVISA, 2016 – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA): Relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015**. Brasília: 2016. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+PARA+2013-2015_VERS%C3%83O-FINAL.pdf/494cd7c5-5408-4e6a-b0e5-5098cbf759f8. Acesso em: 10 Mai 2017.

ANVISA, 2017 – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regularização de Produtos: Monografias Autorizadas de Agrotóxicos. G01 – Glifosato**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/registros-e-autorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas>. Acesso em: 10 Mai 2017.

APARICIO, V.C.; GERÓNIMO E.D.; MARINO D.; PRIMOST J.; CARRIQUIRIBORDE P.; COSTA, J.L. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. **Chemosphere**, 93, 1866–1873, 2013.

ARARAQUARA, Prefeitura do Município. **Plano Municipal de Desenvolvimento Rural Sustentável**. Período de vigência: 2014 a 2017. Disponível em: <http://www.araraquara.sp.gov.br/ImageBank/FCKEditor/file/administrador/Plano%20Municipal%20de%20Desenvolvimento%20Rural%20Sustent%20C3%A1vel%202014-2017.pdf>.

Acesso em: 11 Set 2016.

ARAÚJO, A.R.S.; RODRIGUES, L.B.; BRITO, L.B.; VALADARES, M.C.; OLIVEIRA, G.A.R. Avaliação da ecotoxicidade do glifosato, o ingrediente ativo de alguns herbicidas. **Revista de Biotecnologia & Ciência**. Vol. 4, N°. 1, 2015.

ARAÚJO, A.S.F. **Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solos**. 2002. 63 f. **Dissertação** (Mestrado em Agronomia – Microbiologia agrícola) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ARMAS, E.D.; MONTEIRO, R.T.R. Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na bacia do Rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica. **Química Nova**, vol. 28, n. 6, p.975-982, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v28n6/26824.pdf>. Acesso em: 14 Set 2016.

ASSIS, O. **Enchytraeídeos (Enchytraeidae, Oligochaeta) como indicadores do manejo do solo e em ensaios ecotoxicológicos**. 2016. 75f. **Dissertação** (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2016.

ASSIS, R.L. Desenvolvimento rural sustentável no Brasil: perspectivas a partir da integração de ações públicas e privadas com base na agroecologia. **Econ. Aplic.**, 10(1): 75-89, jan-mar 2006.

AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. **As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, 2003; São Paulo: InterTox, 2003.

BALBINO, L.C.; BRUAND, A.; COUSIN, I.; BROSSARD, M.; QUÉTIN, P.; GRIMALDI, M. Change in the hydraulic properties of a Brazilian clay Ferralsol on clearing for pasture. **Geoderma**, v.120, p.297-307, 2004.

BARBOZA, L.G.A.; THOMÉ, H.V.; RATZ, R.J.; MORAES, A.J. Para além do discurso ambientalista: percepções, práticas e perspectivas da agricultura agroecológica. **Ambiência**, Guarapuava, v.8, n.2, p.389-401, 2012.

BEECHER, N.A.; JOHNSON, R.J.; BRANDLE, J.R.; CASE, R.M.; YOUNG, L.J. Agroecology of birds in organic and nonorganic farmland. **Conservation Biology**, Boston, v.15, n.6, p.1620-1631, 2002.

BICHO, R.C.; SANTOS, F.C.F.; GONÇALVES, M.F.M.; SOARES, A.M.V.M.; AMORIM, M.J.B. Enchytraeid Reproduction Test^{PLUS}: hatching, growth and full life cycle test—an optional multi-endpoint test with *Enchytraeus crypticus*. **Ecotoxicology** 24: 1053–1063.2015.

BRANDOLT, T. D.; LOBO, E. A. Avaliação ecotoxicológica utilizando bioensaios com *Daphnia magna* em água de lavoura de arroz no município de Mostardas, RS, Brasil. **Tecnológica**, 14(2), 47-51. 2010.

BRASIL, 1989. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Lei nº 7.802, de 11 de Julho de 1989**. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L7802.htm. Acessado em: 03 de Fev. 2016.

BRASIL, 2002. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Decreto n.º 4.074 de 04 de janeiro de 2002**. Regulamenta a Lei nº 7.802/89 (Lei Federal dos Agrotóxicos). Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm. Acesso em: 20 Mai 2017.

BRASIL, 2003. Ministério da Agricultura e Abastecimento. **Lei no 10.831, de 23 de dezembro de 2003**. Dispõe sobre a agricultura orgânica. Disponível em: <www.agricultura.gov.br>. Acesso em: 18 de Nov. de 2017.

BRASIL, 2016. Ministério do Meio Ambiente. **Agrotóxicos**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/agrotoxicos>. Acesso em 10 Set 2016.

BRASIL, 2018 (a). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Resumo de Registro Concedido de Agrotóxicos e Afins 2005-2017**. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/informacoes-tecnicas>. Acesso em: 20 Jan 2018.

BRASIL, 2018 (b). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT – Sistemas de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 25 Fev 2018.

BRASIL, **Resolução CONAMA nº 357**, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Publicada no DOU nº 053, de 18/03/2005, págs. 58-63.

BRASIL, **Resolução CONAMA nº 430**, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Publicada no DOU nº 92, de 16/05/2011, pág. 89.

BRIONES, M.J.; INESON, P.; HEINEMEYER, A. Predicting potential impacts of climate change on the geographical distribution of enchytraeids: a meta-analysis approach. **Global Change Biology**, v.13, p.2252-2269, 2007.

BUFALO, J.; ESTEVES AMARO, A.C.; SAMPAIO DE ARAÚJO, H.; MALAGUTTI CORSATO, J.; ORIKA ONO, E.; FERREIRA, G.; DOMINGOS RODRIGUES, J. Períodos de

estratificação na germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) sob diferentes condições de luz e temperatura. **Semina: Ciências Agrárias**, 33(3), 2012.

BURATINI, S.V., BERTOLETTI, E., ZAGATTO, P.A. Evaluation of *Daphnia similis* as a test species in ecotoxicological assays. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, 73(5), 878-882, 2004.

CAIRES, A.C.R. O Assentamento Bela Vista do Chibarro em tempos anteriores: Vida e trabalho na Usina Tamoio. **Retratos de Assentamentos**, v.14, n.2, p.95-130, 2011.

CAMPAGNA-FERNANDES, A.F.; MARIN, E.B.; PENHA, T.H.F.L. Application of root growth endpoint in toxicity tests with lettuce (*Lactuca sativa*). **Ecotoxicol. Environ. Contam.**, v. 11, n. 1, 27-32, 2016.

CAMPANHOLA, C.; VALARINI, P.J. A agricultura orgânica e seu potencial para o pequeno agricultor. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 18, n. 3, p. 69-101, 2001.

CARBONELL, G.; BRAVO, J.C.; LÓPEZ-MANCISIDOR, P.; PRO, J.; FERNÁNDEZ TORIJA C.; TARAZONA, J.V. Distribution, fractionation and mobility assessment of heavy metals in a spiked soil using a multi-species soil system. **Spanish Journal of Agricultural Research**. 7(3), 629-637, 2009.

CARDOSO, E.J.B.N.; ALVES, P.R.L. Soil Ecotoxicology. In: Dr. Ghousia Begum (Ed.). **Ecotoxicology**. Rijeka: InTech, 2012. cap. 2, p. 27- 50.

CARNEIRO, F.F.; AUGUSTO, L.G.S.; RIGOTTO, R.M.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A.C. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015. 624p

CASSAL, V.B.; AZEVEDO, L.F.; FERREIRA, R.P.; SILVA, D.G.; SIMÃO, R.S. Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública. **REGET/UFSM**. Santa Maria, v.18, n.1, p.437-445, Abr. 2014. Disponível em: <http://periodicos.ufsm.br/reget/article/viewFile/12498/pdf>. Acesso em: 13 Set 2016.

CASTRO, A.S. Avaliação pontual da degradação e transporte do herbicida glifosato no solo da Bacia do Arroio Donato – Pejuçara (RS). 102fls. Dissertação (Mestrado em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, 2005.

CASTRO, F. J. **Avaliação ecotoxicológica dos percolados das colunas de cinzas de carvão e de solos com cinzas de carvão utilizando *Lactuca sativa* e *Daphnia similis* como organismos teste.** 106f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear - Materiais). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Universidade de São Paulo- USP, São Paulo, 2013.

CASTRO-FERREIRA, M.P.; ROELOFS, D.; VAN GESTEL, C.A.M.; VERWEIJ, R.A.; SOARES, A.M.V.M.; AMORIM, M.J.B. *Enchytraeus crypticus* como espécie modelo em ecotoxicologia de solo. **Chemosphere** **87**, p.1222–1227, 2012.

CEPAGRI - Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas à Agricultura. **Clima dos Municípios Paulistas – Araraquara.** Disponível em: http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima_muni_037.html. Acesso em 11 Jan 2018.

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Poluição de solo.** 2016. Disponível em: <http://solo.cetesb.sp.gov.br/solo/informacoes-basicas/informacoes-basicas-solo/poluicao/>. Acesso em: 13 Set 2016.

CHELINHO, S.; DOMENE, X.; CAMPANA, P.; ANDRÉS, P.; RÖMBKE, J.; SOUSA, J. Toxicity of phenmedipham and carbendazim to *Enchytraeus crypticus* and *Eisenia andrei* (Oligochaeta) in Mediterranean soils. **J. Soils Sediments** **14**, 584–599, 2014.

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

DALLA ROSA, V. M.; SCORIZA, R. N.; CORREIA, M. E. F.; BARETTA, D. Ecotoxicological potential of bordeaux mixture and Neem oil on non-target soil organisms. **Rev. Bras. Cienc. Agrar.**, Recife, v.12, n.4, p.470-474, 2017.

DE ASSIS, R.L.; ROMEIRO, A.R. Agroecologia e agricultura orgânica: controvérsias e tendências. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, Curitiba, n.6, p.67-80, 2002.

DIAS, T.F. Agricultura Convencional e Agricultura Ecológica: um debate sobre a sustentabilidade de um novo sistema agrícola. **SEGeT – Simpósio de Excelência em Gestão e Tecnologia**. AEDB, Resende, RJ, 2006. Disponível em: https://www.aedb.br/seget/arquivos/artigos06/787_sustentabilidade%20de%20um%20novo%20sistema%20agricola%20SEGET.pdf. Acesso em: 15 Nov 2017.

DIAZ, R.J.; ROSENBERG, R. Spreading dead zones and consequences for marine ecosystems. *Science*, Nova York, v.321, p.926-929, 2008.

DIDDEN, W.A.M. Ecology of terrestrial Enchytraeidae. **Pedobiologia**. 37:2–29, 1993.

DIDDEN, W.A.M.; RÖMBKE, J. Enchytraeids as indicator organisms for chemical stress in terrestrial ecosystems. **Ecotoxicology Environmental Safety**, 50: 25-43, 2001.

EBERT, D. **Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia**. Bethesda (MD), USA: National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. 2005.

EHLERS, E. **Agricultura sustentável. Origens e perspectivas de um novo paradigma**. São Paulo: Livros da Terra, 178 p. 1996.

EMBRAPA – **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Amostragem de solos para análise química**. Circular Técnica, Número 33. Dezembro, 1997.

EMBRAPA – **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Centro Nacional de Pesquisa de Solos, 2 ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006.

FARIAS, A. B. E. O papel da agricultura familiar para a diversificação e valorização da produção de alimentos pós revolução verde no Brasil. **Revista de Direito Agrário e Agroambiental**. Minas Gerais, v. 1, n. 2, p 75-90, jan/dez. 2015;

FEIDEN, A. A conversão de sistemas de produção convencionais para sistemas de produção orgânicas. **Embrapa Agrobiologia – Documento nº 139**. Seropédica, RJ, 2001.

FERNÁNDEZ, C.; ALONSO, C.; BABIN, M.M.; PRO, J.; CARBONELL, G.; TARAZONA, J.V. Ecotoxicological assessment of doxycycline in aged pig manure using multispecies soil systems. **Science of the Total Environment**, 323(1), 63-69, 2004.

FERNÁNDEZ, M.D.; CAGIGAL, E.; VEJA, M.M.; URZELAI, A.; BABIN, M.; PRO, J.; TARAZONA, J.V. Ecological risk assessment of contaminated soils through direct toxicity assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.62, p.174–184, 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651304002416>. Acesso em: 01 Set 2016.

FERRANTE, V.L.S.B.; BARONE, L.A.; DUVAL, H.C. O Final de Um Ciclo? Reflexões Sobre Assentamentos Rurais no Estado de São Paulo. **REDD – Revista Espaço de Diálogo e Desconexão**, Araraquara, v.5, n.1, jul/dez. 2012. Disponível em: <http://seer.fclar.unesp.br/redd/article/view/5317>. Acesso em: 09 Set 2016.

FLORES, A.F.; FERRANTE, V.L.B. e BEZERRA, M.C.S. Educação em dois tempos nas terras do Bela Vista: Usina de cana-de-açúcar e assentamento em Araraquara/SP. **Retratos de Assentamentos**, v.14, n.2, P.131-150, 2011.

FORBES, S. A., 1887: The lake as a microcosm. – Bull. Peoria (Illinois) Sci. Assoc. 1887, Reprinted in **Bull. Ill. Nat. Hist. Surv.** 15: 537–550, 1925.

GAIVIZZO L.H.B. **Fracionamento e mobilidade de metais pesados em solo com descarte de lodo industrial**. 2001. 123f. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

GARCÍA FRUTOS, F.J.; ESCOLANO, O.; GARCIA, S.; BABIN, M.; FERNÁNDEZ, M.D. Bioventing remediation and ecotoxicity evaluation of phenanthrene-contaminated soil. **J Hazard Mater**;183:806–13. 2010.

GARCÍA-GÓMEZ, C.; SÁNCHEZ-PARDO, B.; ESTEBANB, E.; PEÑALOSA, J.M.; FERNÁNDEZ, M.D. Risk assessment of an abandoned pyrite mine in Spain based on direct toxicity assays. **Science of the Total Environment**, v.470–471, p.390–399, 2014.

GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. Ecotoxicological risk assessment for roundup herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, New York, v.167, n.1, p.35-120, 2000.

GIMENO, B.S.; CABRERO, B.S.; GONZALEZ; J.V. Microcosmos terrestre: una tecnica para la evaluacion de los efectos producidos por los contaminantes. **Publ./Centro de investigaciones energeticas, medioambientales y tecnologicas**. 1987.

GOMES, P.C.; FONTES, M.P.F.; COSTA, L.M.; MENDONÇA, E. Extração fracionada de metais pesados em latossolo vermelho-amarelo. **Bras. Ci. Solo**, Viçosa, 21:543-551, 1997.

GONÇALVES, V. D.; COELHO, M. D. F. B.; CAMILI, E. C. Bioensaios em sementes de *Lactuca sativa* L. com extrato de folhas de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. **Revista Internacional de Ciências**, v. 06, n. 02, p. 160 - 170, jul-dez, 2016.

GOOGLE EARTH. **Google**. Version 7.1.8.3036, 2018. Araraquara-SP. Acesso em: 25 Jan 2018.

GORDON, L.J.; STEFFEN, W.; JONSSON, B.F.; FOLKE, C.; FALKENMARK, M.; JOHANNESSEN, A. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Nova York, v.102, n.21, p.7612-7617, 2005.

GREVE, L.F.; MENDES, F.; MEDINA, A.; PELEGRINI, R.T. Desenvolvimento de ensaios ecotoxicológicos empregando as espécies de hortaliças *Brassica oleracea* var. *acephala*; *Eruca Sativa*; *Achicoria Amarilla*; *Brassica juncea*; *Lactuca Sativa* var. *Vanda*; *Brassica oleracea* var. *Capitata*; *Capsicum Annuum*; *Cucumis Anguria* L.; *Lycopersicum* sp. Mill.; *Beta vulgaris*. In **Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia** (Vol. 12). 2012.

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. **PAST: Paleontological Statistics – versão 3.16**. 2001. Disponível em: <https://folk.uio.no/ohammer/past/>.

HENRIQUE, F.L.; BRENTANO, D.M. Avaliação da toxicidade aguda da água do rio Papaquara, município de Florianópolis/SC, utilizando o organismo-teste *Daphnia magna*. **Revista Técnico Científica do IFSC**, v. 1, n. 2, p. 72, 2013.

HIROMI HOSHINO, A.C.; PACHECO-FERREIRA, H.; KAZUO TAGUCHI, C.; TOMITA, S.; MIRANDA, M. D. F. Estudo da ototoxicidade em trabalhadores expostos a organofosforados. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 74, n. 6, 2008.

IAC – Instituto Agrônomo. **Solos do Estado de São Paulo**. 2017. Disponível em: <http://www.iac.sp.gov.br/solosp/>. Acesso em: 10 mai 2017.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Avaliação do Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA) de Agrotóxicos e Afins**. Disponível em: <http://ibama.gov.br/agrotoxicos/avaliacao-ambiental-para-registro-de-agrotoxicos-seus-componentes-e-afins-de-uso-agricola/ppa#sistemadeclassificacao>. Acesso em: 10 Fev 2018.

INCRA – Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária. **Superintendência Regional São Paulo - SR 08: Assentamentos - Informações Gerais**. 2016. Disponível em: http://painel.incra.gov.br/sistemas/Painel/ImprimirPainelAssentamentos.php?cod_sr=8&Parameters%5BPlanilha%5D=Nao&Parameters%5BBox%5D=GERAL&Parameters%5BLinha%5D=1. Acesso em: 21 Jan 2017.

ISO – International Organization for Standardization. **Nº 16387: Soil Quality – Effects of Pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus sp.*) – Determination of Effects on Reproduction and Survival**. Geneve, Switzerland, 2004.

JACOBI, P.; GIATTI, L.; FERRAZ DE TOLEDO, R. A reflexividade em oposição à massificação da produção agrícola. **Ambiente & Sociedade**, XIX (3), 2016.

JONGE, H.; JONGE, L.W.; JACOBSEN, O.H.; YAMAGUSHI, T.; MOLDRUP, P. Glyphosate sorption in soils of different pH and phosphorus content. **Soil Science**, v.166, p.230-238, 2001.

KAMIYAMA, A.; MARIA, I.C.; SOUZA, D.C.C.; SILVEIRA, A.P.D. Percepção ambiental dos produtores e qualidade do solo em propriedades orgânicas e convencionais. **Bragantia**, Campinas, v.70, n.1, p.176-184, 2011.

LAITANO, K.S.; MATIAS, W.G. Testes de Toxicidade com *Daphnia magna*: Uma Ferramenta para Avaliação de um Reator Experimental UASB. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol.**, v. 1, n. 1, 43-47, 2006.

LEFFLER, J.W. Microcosmology: thoretical application of biological models. In: GIESEY, J.P.JR (Ed). **Microcosms in ecological research**.U.S. Department of Energy, 1978.

LEITÃO, S., JOSÉ CEREJEIRA, M., VAN DEN BRINK, P.J., SOUSA, J.P. Effects of azoxystrobin, chlorothalonil, and ethoprophos on the reproduction of three terrestrial invertebrates using a natural Mediterranean soil. **Appl. Soil Ecol.** 76, 124–131, 2014.

LEONEL, L. F. **Utilização de bioensaios ecotoxicológicos com *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae) e análises limnológicas para a avaliação dos ecossistemas aquáticos na bacia hidrográfica dos rios Itaqueri/Lobo (Itirapina/Brotas, SP)**. Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental). Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012;

LIMA S.S.; AQUINO A. M.; LEITE L.F.C.; VELÁSQUEZ E., LAVELLE P. Relação entre macrofauna edáfica e atributos químicos do solo em diferentes agroecossistemas. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.45, n.3, p.322-331, mar. 2010.

LIMA, J.D.; MORAES, W.S. Potencial alelopático de *Ipomoea fistulosa* sobre a germinação de alface e tomate. **Sci. Agron. Maringá**, v. 30, n. 3, p. 409-413, 2008.

LOGAN, T.L. Impact of soil chemical reactions of food chain conatmination and environmental quality. In: HUANG, P.M. (Org.). **Future prospects for soil chemistry**. Madison : SSSA, p.191-204, 1998.

LOPES, A.W.P.; CARMO, M.S.; BERGAMASCO, S.M.P.P.; FERRANTE, V.L.S.B. Práticas e estratégias em diferentes modalidades de assentamento rural. **Retratos de Assentamentos**, v.17, n.2, p.171-196, 2014.

LOPES, A.W.P.; CARMO, M.S.; BERGAMASCO, S.M.P.P.; FERRANTE, V.L.S.B. Assentamentos rurais e práticas ecológicas: uma análise em duas modalidades diferenciadas de assentamento. **Cadernos CERU** v.26, n.2, Dez. 2015(a).

LOPES, M.M.; SILVA, A.M.R.C.; TEIXEIRA, D.; RIBEIRO, M.L. Dilemas da dimensão ambiental nos assentamentos rurais - Percepção e Práticas ambientais. **RevBEA**, São Paulo, V.10, N. 2, p.301-317, 2015(b).

LOURENCETTI, C. **Estudo da disponibilização de metais em solo tratado com composto de resíduos sólidos urbanos utilizando a extração fracionada**. 2001. 52f. Monografia (Bacharelado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

LYNCH, D. Environmental impacts of organic agriculture: A Canadian perspective. **Canadian Journal of Plant Science**, Ottawa, v.89, p.621-628, 2009.

MANSANO, A.; OLIVEIRA, L.; ROCHA, O. Avaliação da toxicidade aguda do antibiótico ciprofloxacina aos cladóceros *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia silvestrii*. **Fórum Ambiental: Saúde, Saneamento e Meio Ambiente**, v. 8, n. 12, 2012.

MARCHÃO, R.L.; LAVELLE, P.; CELINI, L.; BALBINO, L.C.; VILELA, L.; BECQUER, T. Soil macrofauna under integrated crop-livestock systems in a Brazilian Cerrado Ferralsol. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, p.1011-1020, 2009

MARCHI, G.; MARCHI, E.C.S.; GUIMARÃES, T.G. **Herbicidas: mecanismos de ação e uso**. Documentos 227. Embrapa Cerrados, 2008.

MARIANI, C.M.; HENKES, J.A. Agricultura orgânica x Agricultura convencional: Soluções para minimizar o uso de insumos industrializados. **R. gest. sust. ambient.**, Florianópolis, v. 3, n. 2, p. 315 - 338, out. 2014/mar.2015.

MARION, L.F. **Avaliação da qualidade do solo em propriedades agrícolas familiares em sistema de cultivo convencional e de bases ecológicas, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil**. 85f.

Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental) – Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2011.

MATTOS, M.L.T.; PERALBA, M.D.C.R.; DIAS, S.L.P., PRATA, F., CAMARGO, L. Monitoramento ambiental do glifosato e seu metabólito (ácido aminometilfosfônico) na água de lavoura de arroz irrigado. **Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 12, p. 145-154, jan./dez. 2002 .

MOLINA, J.; SALMAZO, L.G.; AVELAR, M.; MILANI, P.A.; ANDRADE, P.G.; TOGNOLI, R.B. Desenvolvimento de metodologia para avaliação de Toxicidade Crônica usando as espécies *Crambe abyssinica*; *Lactuca sativa*; *Salvia hispanica*, meio de cultura com nutrientes em AGAR. In **Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia** (Vol. 12). 2012.

MOREIRA, J.C.; JACOB, S.C.; PERES, F.; LIMA, J.S.; *et al.* Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.7, n.2, p.299-311, 2002.

MORI, H.F.; FAVARETTO, N.; PAULETTI, V.; DIECKOW, J.; SANTOS, W.L. Perda de água, solo e fósforo com aplicação de dejetos líquidos bovinos em latossolo sob plantio direto e com chuva simulada. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v.33, n.1, p.189-198, 2009.

MORI, H.F.; FAVARETTO, N.; PAULETTI, V.; DIECKOW, J.; SANTOS, W.L. Perda de água, solo e fósforo com aplicação de dejetos líquidos bovinos em latossolo sob plantio direto e com chuva simulada. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, Viçosa, v.33, n.1, p.189-198, 2009.

NAKAGOME, F.K.; NOLDIN, J.A.; RESGALLA JR., C.; Toxicidade aguda e análise de risco de herbicidas e inseticidas utilizados na lavoura de arroz irrigado sobre o cladóceros *Daphnia magna*. **Pesticidas: r.ecotoxicol. e meio ambiente**, Curitiba, v.16, p.93-100, jan./dez. 2006.

NIH - NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **Image J**. Image Processing and Analysis in Java. Disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>. Acesso em: 15 Nov. 2017.

NIVA, C. C.; RÖMBKE, J.; SCHMELZ, R. e BROWN, G.G. Enquitrédeos (Enchytraeidae, Oligochaeta, Annelida). In Moreira, F. M. S., E. J. Huising e D. E. Bignell (eds), **Manual de**

biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade. UFPA, Lavras, Brazil: 351-365, 2010.

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.** 175f. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

OECD 202 (2004). Organization for Economic Co-operation and Development. ***Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test.** Guideline for the Testing of Chemicals N° 202. Paris, France. 2004

OECD 207 (1984a). Organization for Economic Co-operation and Development. **Earthworm, acute toxicity tests.** Guideline for the Testing of Chemicals N° 207. Paris, France. 1984.

OECD 208 (1984b). Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). **Terrestrial Plants: Growth Test.** Guideline for Testing of Chemicals N ° 208.OECD Publications Service, Paris, 1984.

OECD 208 (2003). Organization for Economic Co-operation and Development. **Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test.** Guideline for the Testing of Chemicals N° 208. Paris, France. 2003.

OECD 220 (2016). Organization for Economic Co-operation and Development. **Enchytraeid Reproduction Test.** Guidelines for testing of chemicals N° 220. Paris, France. 2016.

OLIVEIRA JR., R.S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M.H. **Biologia e manejo de Plantas Daninhas.** Curitiba: Editora Omnipax, 2011.

OPAS/OMS - ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE / ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos.** Brasília, 1996. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/livro2.pdf>. Acesso em: 28 Mai. 2017.

PELEGRINI, N.N.B.; PATERNIANI, J.E.S.; CARNIATO, J.G.; SILVA, N.B.; PELEGRINI, R.T. Estudo da sensibilidade de sementes de *Eruca sativa* (rúcula) utilizando substâncias tóxicas para agricultura. **XXXV Congresso Brasileiro de Engenharia Agrícola (CONBEA)** – João Pessoa - PB, 2006.

PELEGRINI, R.T.; MEDINA, A.F.; MENDES, F.; MOLENA, J.C.; GREVE, L.F.; SALMAZO, L.G.S.; MILAN, P.A.; ANDRADE, P.G.; TOGNOLI, R.B. Metodología de evaluación ecotoxicológica empleando germinación de semillas en gel nutriente como medio de cultura. **Rev. Ambient. Água** vol. 9 n. 2 Taubaté - Apr/Jun, 2014.

PENTEADO, S.R. **Introdução à Agricultura Orgânica: Normas e técnicas de cultivo**. Campinas: Via Orgânica, 2000.

PESSOTTO, G.P.; PASTORINI, L.H. Análise da germinação de alface (*Lactuca sativa* L.) e tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) sob a influência alelopática do funcho (*Foeniculum vulgare* Mill.) **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 2, p. 990-992, 2007.

PIGNATI, W. **Não existe uso seguro de agrotóxicos**. Entrevista, 2011. Disponível em: <http://www.ihu.unisinos.br/entrevistas/44972-nao-existe-uso-seguro-de-agrotoxicos-entrevista-especial-com-wanderlei-pignati>. Acesso em: 19 de Nov. de 2017.

POSSENTI, J.C.; TOZETTO, F.C.; BETTIATO, G.; SZEPAHUK, V.A. Agricultura convencional e suas implicações para o meio ambiente. Seminário: Sistemas de Produção Agropecuária - **Ciências Agrárias, Animais e Florestais**, p.126-128, 2007.

PRATA, F. **Comportamento do glifosato no solo e deslocamento miscível de Atrazina**. 2002. 149f. Tese (Doutorado em Agronomia: Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

PUGLIESE, L. **Segurança alimentar dos agricultores assentados no território de Araraquara / SP: Uma análise a partir do índice UFSCAR e das efetividades do programa de aquisição de alimentos (PAA)**. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Territorial e Meio Ambiente). Universidade de Araraquara, Araraquara, 2016;

RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment**. 2nd edition. North Palm Beach, Florida: Taylor e Francis. 1995. 1125p.

RODRIGUES, L.B.; OLIVEIRA, R.; ABE, F.R.; BRITO, L.R.; MOURA, D.S.; VALADARES, M.C.; GRISOLIA, C.K.; OLIVEIRA, D.P.; OLIVEIRA, G.A.R. Ecotoxicological assessment of glyphosate-based herbicides: Effects on different organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 36, No. 7, pp. 1755–1763, 2017.

RODRÍGUEZ, H.A.; GUERRERO, J.; CASTRO, R. Determinación de residuos de glifosato y de su metabolito ácido aminometilfosfónico em aguas mediante cromatografía líquida de alta eficiencia com derivación poscolumna y detección por fluorescência. **Revista Colombiana de Química**, v. 31, nº 1 de 2002.

ROEL, A.R. A agricultura orgânica ou ecológica e a sustentabilidade da agricultura. **INTERAÇÕES - Revista Internacional de Desenvolvimento Local**. Vol. 3, N. 4, p. 57-62, Mar. 2002.

RÖMBKE, J. Ecotoxicological laboratory tests with enchytraeids: a review. **Pedobiologia** 47, 607–616, 2003.

RÖMBKE, J.; MOSER, T. Validating the enchytraeid reproduction test: Organisation and results of an international ringtest. **Chemosphere**, Vol. 46, Feb., p.1117–1140, 2002.

ROSSET, J.S.; COELHO, G.F.; GRECO, M.; STREY, L.; GONÇALVES-JUNIOR, A.C. Agricultura convencional versus sistemas agroecológicos: modelos, impactos, avaliação da qualidade e perspectivas. **Scientia Agraria Paranaensis**, 13(2), p.80-94, 2014.

SANTOS, J. O. *et al.* A evolução da agricultura. **Revista Brasileira de Gestão Ambiental GVAA Grupo Verde de Agroecologia e Abelhas**. Pombal, v. 6, n. 1, p 35-41, jan/dez. 2012;

SILVA, A.M.R.C. **Análise ambiental do assentamento Bela Vista do Chibarro (Araraquara-SP): Legislação incidente, uso e ocupação do solo e percepção ambiental**. 2011. 126f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Territorial e Meio Ambiente) – Universidade de Araraquara, Araraquara, 2011.

SILVA, B.M. **Desenvolvimento de metodologia simples, rápida e sem etapa de clean-up para determinação de glifosato em amostras ambientais de água e solo por HPLC/UV-VIS.** 2009. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

SILVA, D.C.V.R.; POMPÊO, M.; PAIVA, T.C.B. A Ecotoxicologia no Contexto Atual no Brasil. In: POMPÊO, M.; MOSCHINI-CARLOS, V.; NISHIMURA, P.Y.; SILVA, S.C.; DOVAL, J.C.L. (Org.). **Ecologia de Reservatórios e Interfaces.** Cap. 22, p. 340-353. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2015.

SILVA, J.N.; MATTIOLO, S.R. Estudo da germinação e crescimento de sementes de alface (*Lactuca sativa*) na presença do Rotenat®. **XVI Seminário Anual PIBIC e VII Seminário Anual PROBIC** - Centro Tecnológico da Marinha em São Paulo - CTMSP, 2010.

SILVA, R.F. da; AQUINO, A.M. de; MERCANTE, F.M.; GUIMARÃES, M. de F. Macrofauna invertebrada do solo sob diferentes sistemas de produção em Latossolo da Região do Cerrado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.41, p.697-704, 2006.

SOARES DE MENDONÇA, V. **Aplicabilidade de testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri*, no monitoramento da qualidade das águas de bacias hidrográficas: o caso do rio Ipojuca em Pernambuco.** 84f. Dissertação (Dissertação em Gestão e Políticas Ambientais) – Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2005.

SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. IDRC/IMTA.** Canadá, Capítulo, 4, 71-79, 2004.

SOUZA, T.A.; MATTA, M.H.R; MONTAGNER, E.; ABREU, A.B.G. **Estudo da recuperação de glifosato e AMPA derivados em solo utilizando-se resinas nacionais.** *Química Nova*, v. 29, n. 6, p. 1372-1376, 2006.

TONI, L. R. M.; SANTANA, H.; ZAIA, D. A. M. Adsorção de glyphosate sobre solos e minerais. *Química Nova*, São Paulo, v.29, n.4, p.829-833, 2006.

USDA - United States Department of Agriculture. Natural Resources Conservation Service, **Lactuca sativa L.**, 2018. Disponível em: <https://plants.usda.gov/core/profile?symbol=LASA3#>. Acesso em: 23 Abr. 2018.

USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Protocols for short term toxicity screening of hazardous waste sites**. US EPA 600/3-88/029, Corvallis, 1989.

VAN DAMME, K. Scientists to help out with Mission Discovery's Daphnia experiment! ISSET - International Space School Educational Trust, 2014. Disponível em: <https://issetdirectorblog.wordpress.com/>. Acesso em: 02 Abr. 2018.

VAN DEN BRINK, P.J.; TARAZONA, J.V.; SOLOMON, K.R.; KNACKER, T.; VAN DEN BRINK, N.W.; BROCK, T.C.M.; HOOGLAND, J.P. (Hans). The use of terrestrial and aquatic microcosms and mesocosms for the ecological risk assessment of veterinary medicinal products. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Vol. 24, No. 4, pp. 820–829, 2005.

VEIGA, F.; ZAPATA, J.M.; MARCOS, M.L.F.; ALVAREZ, E. Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 271, p. 135-144, 2001.

VIDAL, R. A. **Herbicidas: mecanismos de ação e resistência de plantas**. Porto Alegre, 1997. 165 p.

WANG, Z.; XIAO, B.; SONG, L.; WU, X.; ZHANG, J.; WANG, C. Effects of microcystin-LR, linear alkylbenzene sulfonate and their mixture on lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds and seedlings. **Ecotoxicology** 20:803–814, 2011.

WESTHEIDE, W., GRAEFE, U., Two new terrestrial *Enchytraeus* species (Oligochaeta, Annelida). **J. Nat. Hist.** 26, 479–488, 1992.

WHO – World Health Organization International programme on chemical safety. **Environmental Health Criteria 159 – Glyphosate**. Geneva, Switzerland, 1994.

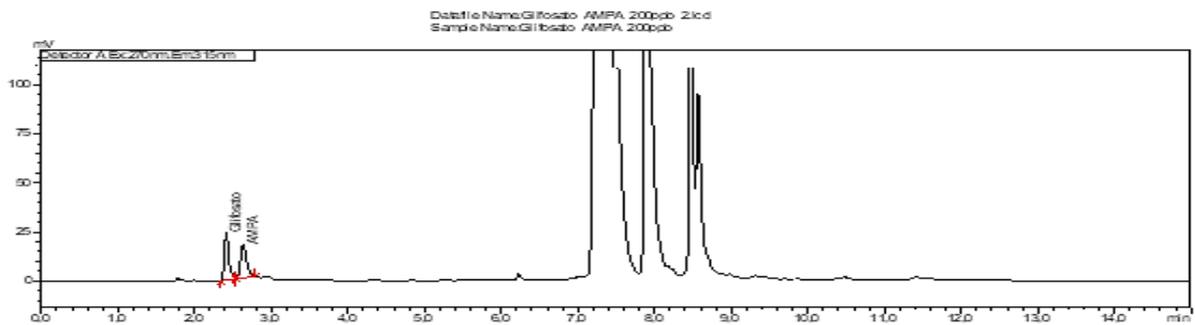
ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos: RiMa, 2008.

APÊNDICE A

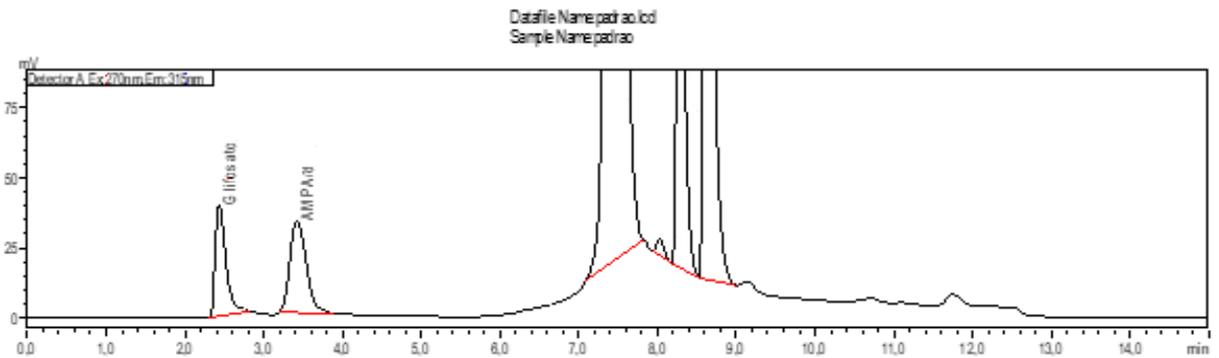
Cromatogramas da determinação de Glifosato e AMPA, por CLAE-DF, em extratos das frações solúveis do solo.

➤ Padrão Glifosato/AMPA – 200ppb

Coleta 1

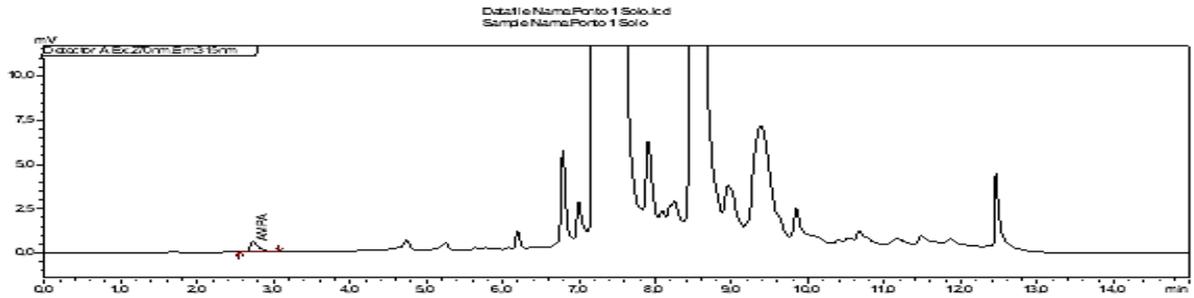


Coleta 2

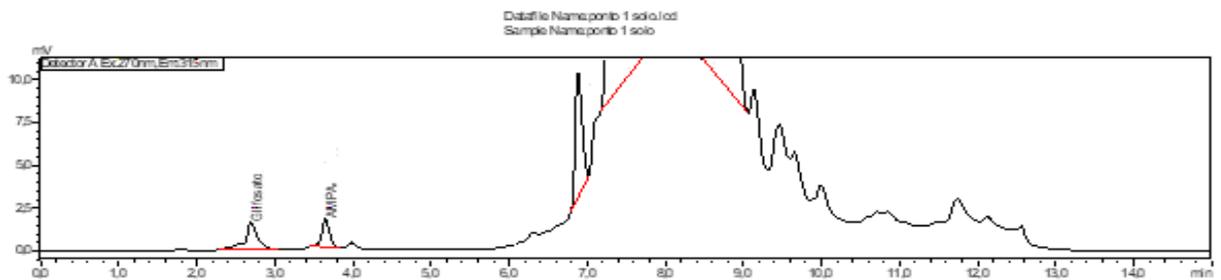


➤ **Ponto 1 – Lote nº 161, manejo orgânico.**

Coleta 1

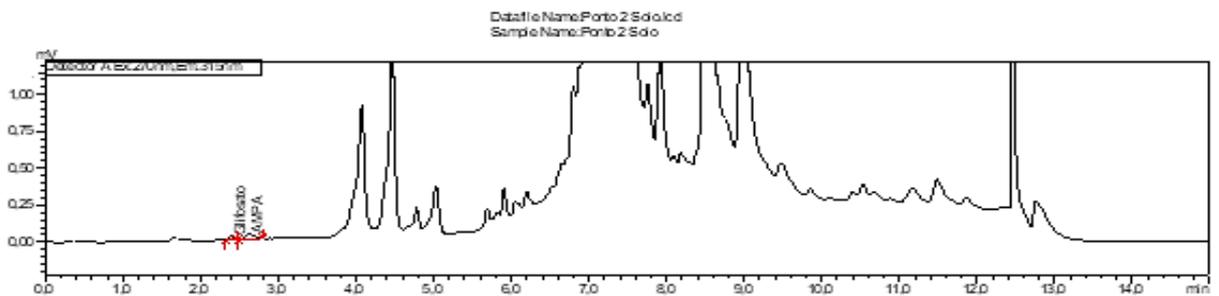


Coleta 2

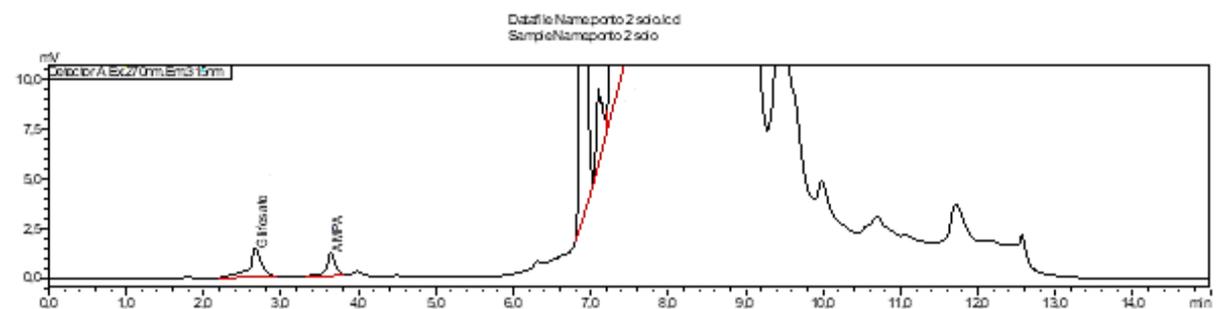


➤ **Ponto 2 – Lote nº 161, manejo orgânico.**

Coleta 1

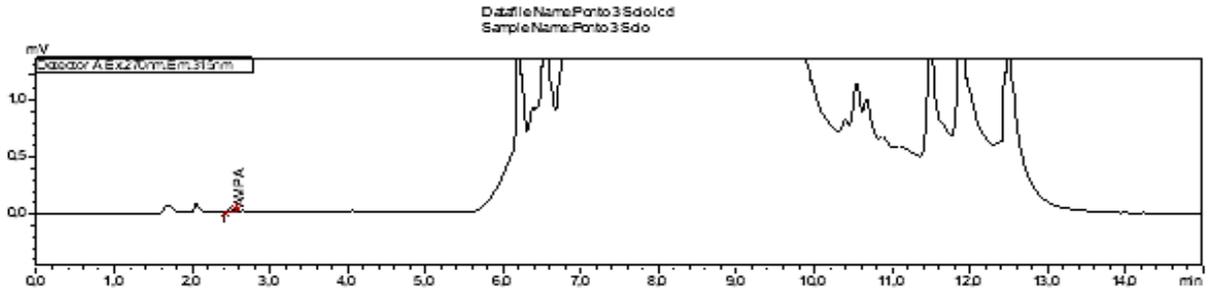


Coleta 2

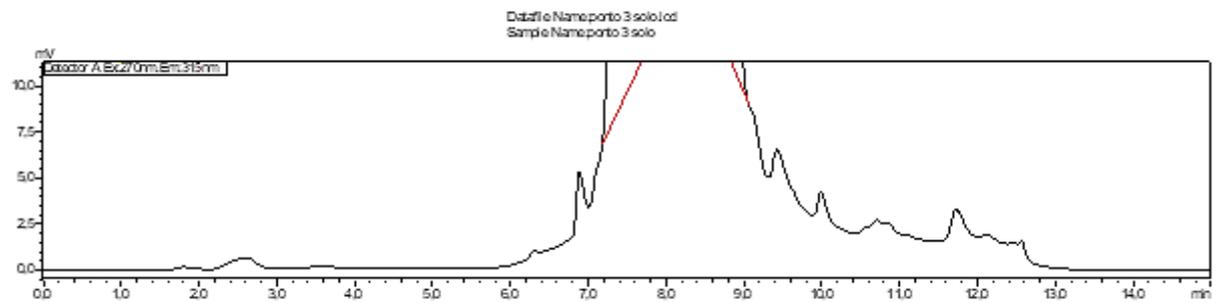


➤ **Ponto 3 – Lote 15, manejo convencional.**

Coleta 1

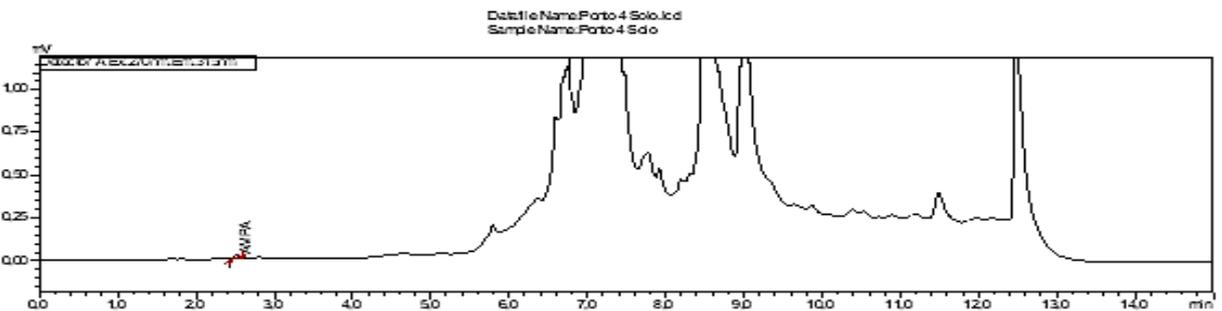


Coleta 2



➤ **Ponto 4 – Lote 15, manejo convencional.**

Coleta 1



Coleta 2

