

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO
DA NATUREZA

Laís Coura Soranço

FLYING ASHES: ECOSYSTEM THREATS EVALUATED BY
ECOTOXICOLOGICAL TESTS IN TROPICAL WETLANDS

CINZAS VOADORAS: AMEAÇAS AO ECOSISTEMA AVALIADAS POR TESTES
ECOTOXICOLÓGICOS EM ZONAS ÚMIDAS TROPICAIS

Juiz de Fora

2022

Laís Coura Soranço

**FLYING ASHES: ECOSYSTEM THREATS EVALUATED BY
ECOTOXICOLOGICAL TESTS IN TROPICAL WETLANDS**

**CINZAS VOADORAS: AMEAÇAS AO ECOSISTEMA AVALIADAS POR TESTES
ECOTOXICOLÓGICOS EM ZONAS ÚMIDAS TROPICAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biodiversidade e Conservação da Natureza

Orientador: Prof. Nathan Oliveira Barros

Juiz de Fora

2022

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Soranço, Laís Coura.

CINZAS VOADORAS : AMEAÇAS AO ECOSISTEMA
AVALIADAS POR TESTES ECOTOXICOLÓGICOS EM ZONAS
ÚMIDAS TROPICAIS / Laís Coura Soranço. -- 2022.

102 p.

Orientador: Nathan Oliveira Barros

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação da Natureza, 2022.

1. Cinzas. 2. Daphnia. 3. Eisenia. 4. Gases do efeito estufa. 5. Queimadas. I. Barros, Nathan Oliveira, orient. II. Título.

Laís Coura Soranço

Cinzas Voadoras: Ameaças ao ecossistema avaliadas por testes ecotoxicológicos em zonas úmidas tropicais

Dissertação
apresentada ao
Programa de Pós
graduação em
Biodiversidade e
Conservação da
Natureza
da Universidade
Federal de Juiz de
Fora como requisito
parcial à obtenção do
título de Mestre em
Biodiversidade. Área
de
concentração: Comportamento,
Ecologia e
Sistemática

Aprovada em 03 de março de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Nathan Oliveira Barros - Orientador

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Roberto Júnio Pedroso Dias

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Eneida Maria Eskinazi Sant Anna

Universidade Federal de Ouro Preto

Juiz de Fora, 09/02/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Roberto Júnio Pedroso Dias, Professor(a)**, em 03/03/2022, às 10:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nathan Oliveira Barros, Professor(a)**, em 03/03/2022, às 10:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Eneida Maria Eskinazi Sant'Anna, Usuário Externo**, em 03/03/2022, às 18:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0674146** e o código CRC **D9849926**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais que me forneceram os subsídios e o apoio necessários para concluir mais esta etapa.

À minha namorada, Lívia, por todo o companheirismo e paciência.

Aos meus amigos e colegas, que me forneceram apoio e incentivo durante toda esta etapa. Dando ênfase especial a Carol, Lívia, Mylena, pelo suporte até hoje.

Ao colega Edimar, pelo apoio neste trabalho.

À Universidade federal de Juiz de Fora que me permitiu entrar em contato com todos os professores e colegas do curso de biologia que compuseram minha jornada acadêmica.

Agradeço ao meu orientador Nathan, por ter me acompanhado e me guiado durante este processo.

A todos os companheiros do Laboratório de Ecologia Aquática, pelo aprendizado e auxílio.

RESUMO

O aumento de cinzas na região tropical, causado principalmente pelas queimadas, associado à necessidade de melhor compreensão do impacto das cinzas no ecossistema, evidência a importância de realizar análises mais detalhadas da influência deste poluente na região do Pantanal, uma das maiores áreas úmidas do planeta, dispondo de uma abundante biodiversidade. Aqui, nosso objetivo foi elucidar os efeitos ecotoxicológicos da degradação de cinzas em áreas úmidas tropicais. O impacto deste composto no sistema edáfico foi medido através de testes comportamentais e de toxicidade aguda em anelídeos submetidos a solo artificial tropical com diferentes concentrações de solução matriz de cinzas. Também se buscou avaliar o impacto das cinzas na emissão de gases de efeito estufa pelo solo. Já o efeito deste poluente sobre o ambiente aquático foi avaliado por meio de ensaios de toxicidade aguda com dafnídeos. Nossos resultados permitiram a identificação de possíveis efeitos das cinzas em organismos tropicais. O ensaio agudo resultou em reduzidas taxas médias de mortalidade para *Eisenia andrei*, com a maior porcentagem sendo de 25%, embora tenham sido registradas respostas subletais dos indivíduos ao poluente, como alterações comportamentais e morfológicas. O teste de evitação permitiu identificar respostas de rejeição dos anelídeos ao substrato poluído com as quatro maiores concentrações de cinzas testadas, tendo se visualizado porcentagens de rejeição superiores a 50%, com possíveis indícios de danos à função do solo como habitat. Enquanto o teste agudo com *Daphnia similis* permitiu registrar taxas de mortalidade média de 100% dos organismos. Adicionalmente, constatamos um aumento significativo nas emissões de gases de efeito estufa para a atmosfera, com o fluxo do dióxido de carbono apresentado um crescimento conforme houve um aumento na concentração de cinzas, enquanto o metano apresentou uma maior emissão ao longo do período experimental. Também foram registradas modificações nas características do solo devido a presença do poluente e diferenças na composição química das cinzas conforme sua origem, fato que pode ter interferido sobre os testes executados. Nossos achados contribuem para elucidar os efeitos da deposição de cinzas devido às queimadas no Pantanal.

Palavras-chave: Cinzas; *Daphnia*; Ecotoxicologia; *Eisenia*; Gases do efeito estufa; Minhoca; Pantanal; Poluição; Queimadas

ABSTRACT

The increase in ash in the tropical region, mainly caused by fires, associated with the need for a better understanding of the impact of ash on the ecosystem, highlights the importance to carry out more detailed analyzes of the influence of this pollutant in the Pantanal region, one of the largest wetlands on the planet, with an abundant biodiversity. Here, our objective was to elucidate the ecotoxicological effects of ash degradation in tropical wetlands. The impact of this compound on the edaphic system was measured through behavioral and acute toxicity tests in annelids subjected to tropical artificial soil with different concentrations of ash matrix solution. We also sought to assess the impact of ash on the emission of greenhouse gases by the soil. The effect of this pollutant on the water environment was evaluated through acute toxicity tests with *Daphnia*. Our results allowed the identification of possible effects of ash on tropical organisms. The acute trial resulted in reduced mean mortality rates for *Eisenia andrei*, with the highest percentage being 25%, although sublethal responses of individuals to the pollutant, such as behavioral and morphological changes, were recorded. The avoidance test allowed the identification of annelid rejection responses to the polluted substrate with the four highest ash concentrations tested, with rejection percentages higher than 50%, with possible indications of damage to the soil function as a habitat. While the acute test with *Daphnia similis* allowed to record average mortality rates of 100% of the organisms. Additionally, we found a significant increase in greenhouse gas emissions to the atmosphere, with the flow of carbon dioxide increasing as there was an increase in ash concentration, while methane showed a higher emission throughout the experimental period. In addition, changes in soil characteristics were recorded due to the presence of the pollutant and discrepancies in the chemical composition of the ash according to its origin were verified, a fact that may have interfered with the tests performed. Our findings contribute to the understanding of the ecotoxicological impact of ash in tropical areas.

Keywords: Ash; *Daphnia*; Earthworm; Ecotoxicology; *Eisenia*; Fire; Greenhouse effect; Pantanal; Pollution

RESUMO DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA

O aumento de cinzas na região tropical, devido, especialmente, à ocorrência de queimadas, junto à necessidade de melhor compreender o impacto das cinzas no ambiente, mostra a importância de realizar mais estudos avaliando a influência deste poluente na região do Pantanal. Aqui, nosso objetivo foi estudar os efeitos ecotoxicológicos da presença de cinzas em áreas úmidas tropicais. O impacto deste composto no solo foi medido através de testes comportamentais e de toxicidade aguda em minhocas expostas a solo artificial tropical com diferentes concentrações de cinzas. Também se buscou avaliar o impacto das cinzas na emissão de gases de efeito estufa pelo solo. Já o efeito deste poluente sobre a água foi avaliado utilizando testes agudos com dafnídeos. Nossos resultados apontaram possíveis efeitos das cinzas em organismos tropicais. O ensaio agudo apresentou pequenas taxas médias de mortalidade para minhocas, embora tenham sido visualizadas mudanças de comportamento e características corporais incomuns. O teste agudo com pulgas d'água permitiu registrar elevadas taxas de mortalidade. O teste de comportamental com minhocas resultou em respostas de fuga ao solo com cinzas. Adicionalmente, houve um aumento significativo nas emissões de gases de efeito estufa, conforme houve um aumento na concentração de cinzas. Além disso, foram registradas modificações nas características do solo devido a presença do poluente e composições químicas distintas conforme a amostra de cinza testada. O presente trabalho ajuda a entender um pouco mais o impacto ecotoxicológico das cinzas em áreas tropicais.

Palavras-chave: Cinzas; Ecotoxicologia; Gases do efeito estufa; Microcrustáceos; Minhoca; Pantanal; Poluição; Queimadas

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Exemplar de *Eisenia andrei*, advindo da empresa Minhobox®.....27
- Figura 2:** Solo artificial tropical (SAT). **(A)** Materiais utilizados no preparo do solo artificial tropical, sendo possível visualizar o caulim a esquerda, o pó da fibra de casca de coco ao centro e a areia industrial a direita. **(B)** Solo artificial tropical seco, logo após a mistura dos materiais. **(C)** Solo artificial tropical úmido, após a adição de água destilada na proporção de 19,5g de água para cada 100g de solo seco.....28
- Figura 3:** Etapas do processo de determinação da capacidade de retenção de água do solo artificial tropical (SAT).29
- Figura 4:** Ocupação da área do Pantanal referente ao ponto de coleta das cinzas utilizadas para os ensaios ecotoxicológicos com anelídeos.....30
- Figura 5:** Cinzas coletadas no setor meandrônico em Cáceres, Baía Caiçara, próximo ao Rio Paraguai em uma área de floresta inundável poliespecífica. **(A)** Cinzas secas e peneiradas. **(B)** Solução matriz homogênea de cinzas advindas do Pantanal na proporção de 50g/L.30
- Figura 6:** Estrutura do Ensaio de Toxicidade Aguda: **(A)** Desenho esquemático representando o Ensaio de Toxicidade Aguda envolvendo anelídeos da espécie *Eisenia andrei*. **(B)** Imagem contendo o recipiente-teste utilizado ao longo dos ensaios.32
- Figura 7:** Etapas executadas ao longo do Ensaio de Toxicidade Aguda.33
- Figura 8:** Análise das taxas de emissão de CO₂ e de CH₄ através de um analisador de gases de efeito estufa portátil (Los Gatos Inc.).34
- Figura 9:** **(A)** Desenho esquemático representando o Ensaio de Comportamento de Fuga utilizando anelídeos da espécie *Eisenia andrei*. **(B)** Imagem do recipiente-teste utilizado ao longo dos ensaios.....35
- Figura 10:** Esquema representando as etapas do Ensaio de Comportamento de Fuga.36
- Figura 11:** “Dual control test” para o solo artificial tropical: porcentagem de organismos (média + desvio padrão, n = 5) presentes em cada seção do recipiente-teste utilizado como controle no ensaio de fuga. Não houve diferença estatística na distribuição dos anelídeos Segundo o teste exato de Fisher ($p \geq 0.05$).....40
- Figura 12:** Ensaio de comportamento de fuga em anelídeos expostos a cinzas coletadas após queimadas no Pantanal: porcentagem de resposta de fuga (média + desvio padrão, n = 5) de

Eisenia andrei em solo artificial tropical contendo diferentes concentrações de cinzas provenientes de queimadas no Pantanal. Os desvio-padrão são representados pelas barras. (s) = Resposta significativa ($p < 0.05$) e (ns) = resposta não significativa ($p \geq 0.05$), conforme o Teste Exato de Fisher. 42

Figura 13: Mortalidade média ($n = 4$) do Teste de Toxicidade Aguda em minhocas expostas a tratamentos contendo cinzas, em diferentes concentrações, coletadas no Pantanal. Número médio de indivíduos que, no 7° e no 14° dia, não apresentaram resposta ao toque em cada concentração. Conforme o Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo Teste de Nemenyi para comparações múltiplas, não houve, em qualquer tratamento, diferença estatisticamente significativa ($p > 0.05$) em relação ao grupo controle. Barras de erro correspondem ao desvio-padrão. 44

Figura 14: Gráfico Boxplot para o Ensaio de Toxicidade Aguda em anelídeos: Sobrevivência de Eisenia andrei submetidos a solo artificial tropical contaminado com diferentes concentrações de cinzas provenientes de queimadas no Pantanal após 7 dias de ensaio (cinza) e após transcorridos 14 dias (branco). Nenhuma das concentrações testadas apresentou diferença estatisticamente significativa ($p > 0.05$) em relação ao controle, segundo os testes de Kruskal-Wallis e Nemenyi. 45

Figura 15: Média do fluxo de metano liberado no Teste de Toxicidade Aguda, no qual as amostras contendo solo artificial tropical apresentavam minhocas expostas a diferentes concentrações de cinzas coletadas no Pantanal. O fluxo de gases foi aferido ao longo de 14 dias, considerando o intervalo de 1 dia entre as análises. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0.05$) entre os tratamentos, segundo o teste de Kruskal-Wallis. Barras de erro correspondem ao desvio-padrão. 47

Figura 16: Fluxo médio de gás carbônico emitido durante o ensaio de toxicidade aguda em solo artificial tropical contendo anelídeos expostos a distintas concentrações de cinzas coletadas no Pantanal. A coleta de dados foi realizada ao longo de 14 dias, com intervalos de 1 dia entre as análises. Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre os tratamentos, segundo o teste de Kruskal-Wallis. Barras de erro correspondem ao desvio-padrão..... 48

Figura 17: Comparativo entre as amostras controle contendo anelídeos e o controle livre de minhocas, tendo por foco as médias de emissão de gases, relacionados ao efeito estufa, no Teste de Toxicidade Aguda, no qual os organismos foram expostos a diferentes concentrações de

cinzas coletadas no Pantanal. As medições duraram 14 dias, com um intervalo de 1 dia entre as análises, tendo se aferido a liberação de Dióxido de Carbono e Metano.	48
Figura 18: Fluxo de gás carbônico emitido ao longo dos 14 dias de duração do ensaio de toxicidade aguda, se avaliando a liberação de CO ₂ em solo artificial tropical contendo anelídeos submetidos a diferentes concentrações de cinzas coletadas na região do Pantanal. Barras de erro correspondem ao desvio-padrão.	50
Figura 19: Fluxo de metano liberado durante o ensaio de toxicidade aguda com anelídeos, correspondente a emissão de CH ₄ em solo artificial tropical submetido a distintas concentrações de cinzas coletadas em Cáceres. Barras de erro correspondem ao desvio-padrão.	51
Figura 20: Cultivo de <i>Daphnia similis</i> : Recipiente contendo dafinídeos em sistema de cultivo mantido no Laboratório de Ecologia Aquática da Universidade Federal de Juiz de Fora.	81
Figura 21: Cinzas coletadas nas proximidades do Rio Paraguai, na Estação Ecológica de Taiamã, Cáceres, em uma área de macrófitas aquáticas.....	82
Figura 22: Mapa de ocupação do Pantanal, incluindo o ponto de amostragem das cinzas de macrófitas utilizadas para o experimento de toxicidade aguda em dafinídeos.....	82
Figura 23: (A) Desenho esquemático ilustrando o Ensaio de Toxicidade Aguda utilizando microcrustáceos da espécie <i>Daphnia similis</i> . (B) Imagem de alguns recipientes-teste utilizados para a execução das análises.....	83
Figura 24: Esquema representando as etapas executadas durante a realização do Ensaio de Toxicidade Aguda com microcrustáceos.....	84
Figura 25: Ensaio de sensibilidade com dafinídeos (<i>Daphnia similis</i>) submetidos à substância de referência (NaCl).	86
Figura 26: Carta-controle referente a faixa de sensibilidade de <i>Daphnia similis</i> submetidas ao cloreto de sódio como substância de referência.	87

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Resumo do ensaio de toxicidade aguda aplicado para a avaliação ecotoxicológica da influência das cinzas advindas de queimadas no Pantanal sobre o ecossistema edáfico..... 33
- Quadro 2:** Resumo do ensaio de comportamento de fuga aplicado com o intuito de se avaliar a influência das cinzas provenientes de incêndios florestais no Pantanal sobre o ecossistema edáfico 36
- Quadro 3:** Resumo do ensaio de toxicidade aguda utilizado na análise da influência das cinzas advindas de queimadas no Pantanal sobre o ambiente hídrico..... 84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Quantidade de cinzas, advindas de queimadas no Pantanal, presentes em cada solução testada após o processo de diluição da solução matriz (50g/L).	31
Tabela 2: Avaliação da capacidade de retenção de água do solo artificial tropical em dois ensaios distintos.	39
Tabela 3: Volume de água necessário para ajustar a umidade do solo artificial tropical de acordo com a CRA.	39
Tabela 4: Quantidade de organismos-teste presentes no solo controle que apresentaram mobilidade durante os testes de toque executados no 7° e no 14° dia do ensaio de toxicidade aguda. Variável que permite avaliar a letalidade do solo.	40
Tabela 5: Registro da ocorrência de comportamento de cópula ao final do Ensaio de Comportamento de Fuga aplicado em anelídeos expostos a solo artificial tropical contaminado com distintas concentrações de cinzas resultantes de queimadas no Pantanal.	43
Tabela 6: Resultado do Teste de Toxicidade Aguda em indivíduos, da espécie <i>Eisenia andrei</i> , expostos a solo artificial tropical contendo distintas concentrações de cinzas advindas de queimadas no Pantanal: Número de indivíduos responsivos ao teste de toque e taxa média de mortalidade (n = 4).	44
Tabela 7: Análise físico-química do Solo Artificial Tropical ao início do Ensaio de Toxicidade Aguda, no qual o solo recebeu diferentes concentrações de cinzas do Pantanal. CA - Controle contendo anelídeos; CB – Controle livre de anelídeos; T1 - Tratamento com 609.375 mg/Kg de cinzas; T2 - Tratamento com 1218.75 mg/Kg de cinzas; T3 - Tratamento com 2437.5 mg/Kg de cinzas; T4 - Tratamento com 4875 mg/Kg de cinzas; T5 - Tratamento com 9750 mg/Kg de cinzas; 12 - Amostra contendo réplicas 1 e 2 do tratamento; 34 - Amostra contendo réplicas 3 e 4 do tratamento; t – Capacidade de Troca de Cátions Efetiva.	54
Tabela 8: Análise físico-química do Solo Artificial Tropical ao final do Ensaio de Toxicidade Aguda, no qual o solo recebeu diferentes concentrações de cinzas do Pantanal. CA - Controle contendo anelídeos; CB – Controle livre de anelídeos; T1 - Tratamento com 609.375 mg/Kg de cinzas; T2 - Tratamento com 1218.75 mg/Kg de cinzas; T3 - Tratamento com 2437.5 mg/Kg de cinzas; T4 - Tratamento com 4875 mg/Kg de cinzas; T5 - Tratamento com 9750 mg/Kg de cinzas; (1)(2)(3)(4) - Réplicas de cada tratamento; t – Capacidade de Troca de Cátions Efetiva.	55

Tabela 9: Concentração dos elementos nos extratos de cinzas coletadas em área de floresta inundável poliespecífica na região do Pantanal.....	57
Tabela 10: Valores de CE50(48h) e seus respectivos intervalos de confiança referentes aos cinco testes de sensibilidade realizados com <i>Daphnia similis</i> , tendo como substância de referência o cloreto de sódio.....	87
Tabela 11: Quantidade de organismos-teste presentes na amostra controle que apresentaram mobilidade ao final do ensaio de toxicidade aguda.....	88
Tabela 12: Resultado do Teste de Toxicidade Aguda em organismos, da espécie <i>Daphnia similis</i> , expostos a água contendo distintas concentrações de cinzas advindas de queimadas no Pantanal: Número de indivíduos móveis e taxa média de mortalidade (n = 3).....	88
Tabela 13: Avaliação da qualidade da água acrescida de diferentes concentrações de cinzas coletadas em área de macrófita no Pantanal. As análises foram realizadas no momento do estabelecimento do Ensaio de Toxicidade Aguda com <i>Daphnia similis</i> e após transcorridas 48h (n = 3).....	89
Tabela 14: Concentração dos elementos nos extratos de cinzas de macrófitas aquáticas na região do Pantanal.	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Al	Alumínio
APP	Área de Preservação Permanente
Ca	Cálcio
CaCO ₃	Carbonato de cálcio
CE	Ceará
CEO	Menor Concentração de Efeito Observável
CENO	Maior Concentração de Efeito Não Observável
CE50	Concentração Efetiva Mediana
CH ₄	Metano
CL50	Concentração Letal Média
cm	Centímetro
cmol _c	Centimol de carga
CO	Monóxido de carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
CRA	Capacidade de Retenção de Água
dag	Decagrama
dm ³	Decímetro cúbico
g	Gramma
GEE	Gases do Efeito Estufa
h	Hora
H ₂ O	Água
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HNO ₃	Ácido nítrico
L	Litro
ICA	Instituto de Ciências Agrárias
ISO	Organização Internacional de Normalização
K	Potássio
Kg	Quilograma
kPa	Quilopascal
LAS	Laboratório de Análises de Solo

LQI	Laboratório de Química Instrumental
m	Metro
MG	Minas Gerais
Mg	Magnésio
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NaCl	Cloreto de sódio
NBR	Norma Brasileira
N ₂ O	Óxido nitroso
NBR	Norma Técnica Brasileira
P	Fósforo
PAHs	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
S	Sul
SAT	Solo Artificial Tropical
SB	Soma de Bases
t	Capacidade de Troca de Cátions
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
W	Oeste

LISTA DE SÍMBOLOS

<	Menor
>	Maior
≥	Maior ou igual
°	Graus
'	Minutos
”	Segundos
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
K	Kelvin

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	19
2. CAPÍTULO 1	23
2.1. INTRODUÇÃO	23
2.2. MATERIAL E MÉTODOS	26
2.2.1. Organismo-teste e substrato de cultivo	26
2.2.2. Solução matriz e solos-teste	29
2.2.3. Toxicidade aguda	31
2.2.4. Comportamento de fuga	35
2.2.5. Análise estatística	37
2.3. RESULTADOS	38
2.3.1. Avaliação da capacidade de retenção de água do solo	39
2.3.2. Validação dos ensaios	39
2.3.3. Efeito das cinzas sobre o comportamento de fuga	41
2.3.4. Teste de toxicidade aguda	43
2.3.5. Emissão de gases	46
2.3.6. Análises físico-químicas	52
2.4. DISCUSSÃO	57
2.5. CONCLUSÃO	64
2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
3. CAPÍTULO 2	77
3.1. INTRODUÇÃO	77
3.2. MATERIAL E MÉTODOS	80
3.2.1. Organismo-teste e meio de cultivo	80
3.2.2. Solução matriz e soluções-teste.....	81
3.2.3. Toxicidade aguda	83
3.2.5. Teste de sensibilidade.....	85
3.2.6. Análise estatística	86
3.3. RESULTADOS	86
3.3.1. Teste de sensibilidade.....	86
3.3.2. Validação dos ensaios	87
3.3.3. Teste de Toxicidade Aguda.....	88
3.3.4. Análise química das cinzas	89
3.4. DISCUSSÃO	90
3.5. CONCLUSÃO	92

3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

1. INTRODUÇÃO GERAL

Nas últimas décadas a atividade humana tem acarretado uma série de prejuízos ambientais em diferentes âmbitos, incluindo as esferas terrestre, aquática e atmosférica (García-Alix *et al.*, 2013). Nesse sentido, atualmente, uma das problemáticas ambientais que tem sido foco dos pesquisadores se refere a contaminação de solos e corpos hídricos em decorrência da poluição por agentes tóxicos produzidos pela ação antrópica (Nunes, 2010; Chini, 2014; Zhang & Wang, 2020). Tais compostos podem ser provenientes de diferentes circunstâncias, como é o caso dos incêndios florestais, prática que tem representado uma problemática crescente ao longo de todo o globo, estando cada vez mais graves e frequentes, além de gerar uma variedade de problemas ambientais e socioeconômicos (Brito, 2014; Brito *et al.*, 2017; Chini, 2014; Silva *et al.*, 2016; Pinto *et al.*, 2020).

Dentre as regiões que têm sofrido com a crescente ocorrência de incêndios, o Pantanal tem apresentado relativo destaque. Dispondo de uma abundante diversidade faunística e florística, este bioma, cujo nome faz analogia ao fato de que suas várzeas ficam submersas durante as estações chuvosas, se estende por três países, estando a sua maior porção localizada no Brasil, enquanto algumas porções menores são encontradas na Bolívia e no Paraguai (Mioto *et al.*, 2012; Bergier *et al.*, 2018; Filho *et al.*, 2021). Assim como outros biomas, esta região apresenta relativa propensão a ocorrência de incêndios, de modo que suas espécies estão sujeitas a diversos impactos gerados pelo fogo, tendo algumas desenvolvido certas adaptações ou até mesmo uma relação de dependência com o mesmo (Hardesty *et al.*, 2005; Marques *et al.*, 2020; Filho *et al.*, 2021). Contudo, modificações nesse sistema, como o aumento na intensidade e frequência dos incêndios, podem acarretar diferentes impactos ecológicos na região, principalmente, ao se considerar que o Pantanal apresenta uma parcela de seu território sem adaptações para a ocorrência de incêndios, sendo sensível ao fogo (Hardesty *et al.*, 2005; Filho *et al.*, 2021).

Há algum tempo o Pantanal vem enfrentando uma diversidade de problemas ambientais em decorrência da ação humana na região, sendo possível elencar alguns como: o desmatamento, a contaminação de recursos hídricos, a intensificação do processo de erosão e degradação do solo (Schulz *et al.*, 2019; Filho *et al.*, 2021). Entretanto, atualmente, a influência antrópica na área tem se mostrado ainda mais severa, tendo em vista o aumento considerável da ocorrência de incêndios no presente bioma, que, desde a intensa seca de 2020, teve em torno de 26% de seu território consumido pelo fogo, além de terem sido registrados mais do que o dobro de focos de incêndio em comparação aos dados de 2019 (Chiaravalloti *et al.*, 2017;

Marques *et al.*, 2020; Pinto *et al.*, 2020; Filho *et al.*, 2021; Marengo *et al.*, 2021; Mataveli *et al.*, 2021). Dessa forma, os incêndios ocorridos no Pantanal, embora em alguns casos sejam oriundos de fatores climáticos naturais, têm sido influenciados também pela atividade humana na região, que agravam o quadro de queimadas no bioma, afetando, conseqüentemente, o equilíbrio ecológico do sistema (Filho *et al.*, 2021).

Os impactos gerados pelos incêndios florestais podem ser categorizados em três níveis distintos: local, ligado a prejuízos da biodiversidade, redução da taxa de infiltração de água no solo e modificação da ciclagem de nutrientes; regional, levando a poluição da atmosfera, fato que pode vir a gerar prejuízos ecossistêmicos e danos a saúde; e global, nível em que a atmosfera e a biosfera se mostram sujeitas a possíveis modificações (Brito, 2014; Brito *et al.*, 2017). Ainda, durante a ocorrência dos incêndios ocorre a combustão da biomassa local, resultando na produção de dióxido de carbono (CO₂) e na liberação de água (H₂O), além da geração de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (PAHs), partículas de aerossol, óxido nitroso (N₂O), monóxido de carbono (CO) e elementos inorgânicos, como metalóides, metais e elementos não metálicos (Spencer *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2004; Brito, 2014, Silva *et al.*, 2016; Brito *et al.*, 2017).

Ao longo do processo de queima, alguns elementos podem ser mineralizados, de modo a produzir as cinzas, que são o resultado da mistura de minerais inorgânicos e materiais orgânicos que não foram completamente queimados, podendo apresentar em sua composição distintos elementos, que poderão, ainda, estar presentes em diferentes proporções (Chang *et al.*, 1977; Spencer *et al.*, 2003; Brito, 2014; Brito *et al.*, 2017). Assim, os impactos gerados pela disposição das cinzas no ambiente podem se mostrar bastante variados, podendo contaminar o solo, o ar e a água, além de exercer distintos níveis de influência sobre o ecossistema, que ainda hoje seguem pouco elucidados (Chang *et al.*, 1977; Earl & Blinn, 2003; Spencer *et al.*, 2003; Maleknia *et al.*, 2009; Brito, 2014; Nayak *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2016; Brito *et al.*, 2017).

Nesse sentido, visando analisar os impactos gerados por diferentes agentes tóxicos sobre os organismos e o ambiente no qual se encontram surge o termo Ecotoxicologia, cunhado por Truhaut em 1969, a qual compreende uma sequência de etapas denominadas em conjunto de cadeia da causalidade (Truhaut, 1977; Costa *et al.*, 2008; Magalhães & Ferrão Filho, 2008; Brito, 2014; Chini, 2014; Brito *et al.*, 2017). Sendo de caráter multidisciplinar, a ecotoxicologia permite o estudo qualitativo e quantitativo do efeito adverso de compostos químicos e físicos sobre o ecossistema, podendo se utilizar de diferentes métodos de análise da toxicidade, tendo por princípio fundamental a resposta dos organismos-teste ao poluente, que irão variar

conforme seu nível de exposição (Silveira, 2007; Costa *et al.*, 2008; Costa, 2010; Brito, 2014; Chini, 2014; Brito *et al.*, 2017). Além do fato de ser possível obter respostas de diferentes âmbitos, como modificações na fisiologia, na morfologia ou, ainda, alterações dos parâmetros comportamentais dos indivíduos (Magalhães & Ferrão Filho, 2008; Ferreira, 2010; Borges, 2013).

Os organismos utilizados nos ensaios ecotoxicológicos, sejam eles vegetais ou animais, devem apresentar uma alta relevância ecológica, possuir elevada disponibilidade e ampla distribuição, ser de fácil obtenção e cultivo em laboratório, ser um representante de seu nível trófico, ter suas características fisiológicas, comportamentais e genéticas bem conhecidas, além de expressar certa sensibilidade a poluentes de diversos tipos, tendo um baixo limite de tolerância ecológica (EPA, 2002; Costa *et al.*, 2008; Magalhães & Ferrão Filho, 2008; Brito, 2014; Chini, 2014; Brito *et al.*, 2017). Estes indivíduos deverão ser expostos a diferentes concentrações da substância poluente durante um determinado período, de maneira aguda ou crônica (Magalhães & Ferrão Filho, 2008; Amaral, 2012). Além disso, a execução dos testes de toxicidade está fundamentada em uma série de normas e padrões pré-estabelecidos que devem ser seguidos para que haja a validação das respostas obtidas (Magalhães & Ferrão Filho, 2008).

Os testes ecotoxicológicos permitem: avaliar a periculosidade dos compostos tóxicos e seus derivados sobre a biodiversidade local; estimar a taxa máxima do poluente que o ambiente pode tolerar; analisar o nível e o destino dos compostos; determinar os impactos do componente no ecossistema, assim como o efeito das possíveis medidas a serem aplicadas; verificar os riscos ecológicos; além de controlar as taxas de emissão de efluentes (Costa *et al.*, 2008). Dessa forma, a ecotoxicologia é de suma importância para uma melhor compreensão do processo de intoxicação do ecossistema, se apresentando como um mecanismo de monitoramento ambiental, visando a elaboração e execução de estratégias adequadas que tem por objetivo prevenir, estagnar ou remediar esse processo (Costa *et al.*, 2008; Azevedo & Chasin, 2003 *apud* Chini, 2014; Brito, 2014; Brito *et al.*, 2017).

Em contrapartida, a maioria das avaliações ecotoxicológicas, relacionadas ao ambiente aquático e, em especial, os testes voltados para o ambiente terrestre, foram desenvolvidas em regiões de clima temperado, de modo que a obtenção de dados, a partir de testes padronizados, sobre a influência de poluentes em condições tropicais ainda é escassa, não sendo possível extrapolar dados obtidos em ecossistemas temperados para zonas tropicais (Nunes, 2010; Garcia, 2004 *apud* Lima, 2010; Brito, 2014; Brito *et al.*, 2017). Tal fator associado ao aumento na incidência de incêndios florestais, em especial no Pantanal, e a escassez de dados referentes

ao impacto das cinzas sobre o ecossistema evidenciam a necessidade da realização de análises mais detalhadas da influência desse poluente na região tropical. Assim, o presente trabalho tem como objetivo geral elucidar os efeitos ecotoxicológicos da degradação de cinzas em áreas úmidas tropicais. Tendo por hipótese central a ideia de que a presença de cinzas no ambiente pode acarretar efeitos letais e subletais sobre os organismos, além de proporcionar a ocorrência de modificações sobre os diferentes parâmetros ambientais.

2. CAPÍTULO 1

EFEITO DAS CINZAS PROVENIENTES DE INCÊNDIOS FLORESTAIS EM ZONAS ÚMIDAS TROPICAIS SOBRE A FAUNA EDÁFICA

2.1. INTRODUÇÃO

De modo geral, ao longo dos últimos anos o solo, uma entidade natural viva e quadridimensional que contém sólidos, água e ar, tem estado exposto a uma diversidade de malefícios em decorrência de possíveis ações antrópicas (Candello, 2014; Hartemink, 2016). Fato que, associado com as limitadas taxas de depuração e reconstituição do substrato, acabam por gerar uma preocupação acerca de uma possível alteração da qualidade do ambiente (Candello, 2014). Este quadro se intensifica ao considerar a importância do ecossistema edáfico, sendo o mesmo: fonte de recursos para os organismos da região, sejam eles animais ou vegetais; uma estrutura intermediária entre as águas subterrâneas e a atmosfera, agindo como uma agente tamponador de mudanças do fluxo e da temperatura da água; utilizado como abrigo por indivíduos decompositores; e um possível estoque de nutrientes (Andréa, 2010).

Nesse contexto, sendo considerado como um resíduo sólido problemático, as cinzas podem afetar o ecossistema edáfico em diferentes níveis (Nayak *et al.*, 2015). Esse poluente é o resultado da queima da biomassa local, durante a qual parte do material resfria e se solidifica, resultando na formação de partículas mineralizadas, que podem apresentar diferentes composições (Chang *et al.*, 1977; Spencer *et al.*, 2003; Demirbas, 2005; Brito, 2014; Brito *et al.*, 2017). Dessa forma, a liberação desse poluente no ambiente pode gerar consequências variadas, levando a possíveis alterações no pH do solo, acúmulo de metais, contaminação de nutrientes, entre outros impactos (Grumiaux *et al.*, 2007; Brito, 2014; Brito *et al.*, 2017; Candello, 2014; Nayak *et al.*, 2015). Assim, tendo em consideração o aumento das taxas de liberação de cinzas na atmosfera devido a ocorrência de queimadas, em especial na região do Pantanal, é imprescindível a realização de mais estudos visando elucidar seu efeito sobre o solo, uma vez que este é de suma importância para a manutenção do ecossistema (Brito, 2014; Brito *et al.*, 2017; Candello, 2014; Silva *et al.*, 2016; Filho *et al.*, 2021).

Os danos causados ao ambiente podem ser avaliados de diferentes maneiras no campo da toxicologia ambiental, incluindo a caracterização do poluente por metodologias físico-químicas e testes *in vivo*. Assim, considerando que a aplicação de estudos químicos e físicos convencionais na área contaminada não evidenciam completamente o grau de impacto dos poluentes sobre o ecossistema, torna-se necessário a utilização de testes complementares que

permitam elucidar o nível de efeito do poluente no ambiente. Assim, buscando melhor compreender as consequências da ação humana sobre o ecossistema edáfico, os pesquisadores têm recorrido a ecotoxicologia, fazendo uso de análises ligadas aos efeitos de componentes químicos sobre os animais, sendo assim capazes de mensurar a toxicidade do poluente no ambiente terrestre (Magalhães & Ferrão Filho, 2008; ABNT, 2011; Candello, 2014). Podendo então, avaliar a função do solo contaminado enquanto habitat para vegetais, microorganismos, entre outros organismos encontrados nesse ecossistema (ABNT, 2011; Candello, 2014).

Para a realização de avaliações ecotoxicológicas é necessário selecionar organismos-teste que apresentem uma alta relevância ecológica no ambiente a ser analisado, sendo comum que os testes envolvendo o solo utilizem vegetais ou organismos invertebrados (Ferreira, 2010; Brito, 2014; Brito *et al.*, 2017). Nesse sentido, ao considerar o solo de ecossistemas tropicais, torna-se possível apontar as minhocas como indivíduos de fundamental importância ecossistêmica, uma vez que as mesmas podem representar até 90% da biomassa de macrofauna e por apresentarem a capacidade de integrar os diferentes processos biológicos, físicos e químicos do ambiente edáfico (Fragoso *et al.*, 1999; Shuster *et al.*, 2002; Andréa, 2010).

Além disso, esses organismos são fundamentais para a formação do solo, auxiliam na decomposição de resíduos orgânicos, realizam a produção de húmus, atuam na degradação de poluentes, participam da ciclagem de nutrientes, executam o controle de patógenos e aumentam a fertilidade do solo (Shipitalo & Bayon, 2004; Oliveira *et al.*, 2008; Andréa, 2010; Brown & Domínguez, 2010; Ferreira, 2010; Chini, 2014). De maneira complementar, a locomoção e a escavação destes indivíduos também promove uma melhora nas condições do solo, alterando positivamente as taxas de drenagem, infiltração e retenção de água ou ar e, permitindo também, o deslocamento de nutrientes e microorganismos (Oliveira *et al.*, 2008; Ingham, 2006 *apud* Andréa, 2010). Por fim, estes organismos representam um componente chave na teia alimentar terrestre, uma vez que podem ser consumidos por uma variedade de espécies animais, como insetos, anfíbios, répteis, aves e mamíferos (Hinton, 2002; Andréa, 2010; Chini, 2014).

Assim, devido a influência das minhocas sobre a estrutura e a qualidade do ecossistema edáfico, tais indivíduos têm sido utilizados como organismos-teste durante a realização de testes ecotoxicológicos terrestres (ABNT, 2007; Ferreira, 2010; Chini, 2014). Esses animais podem entrar em contato, direto ou indireto, com possíveis poluentes presentes no solo durante sua locomoção ou ao ingerir o substrato contaminado (Vijver *et al.*, 2003; Spadotto *et al.*, 2004; Castellanos & Hernandez, 2007; Andréa, 2010). Desse modo, há a possibilidade de que as minhocas apresentem quadros de intoxicação, que podem levar a um aumento da taxa de

mortalidade desses organismos ou gerar o acúmulo de poluentes em seus tecidos, levando a uma possível bioacumulação trófica, quadro que se agrava ao considerar o nível basal no qual as minhocas se encontram na teia alimentar (Curry, 2004; Andréa, 2010).

Dentre as espécies de minhoca comumente utilizadas para avaliações em laboratório, duas foram selecionadas pelos órgãos regulamentadores de diferentes países, incluindo o Brasil, para a execução de testes toxicológicos: a *Eisenia andrei* Bouché, 1972 e a *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) (Papini & Andrea, 2004; Andréa, 2010; Ferreira, 2010; Lima, 2010). Essas duas espécies de anelídeos oligoquetas são utilizadas na compostagem e apresentam grande importância para a minhocultura, sendo popularmente conhecidas como minhocas vermelhas-da-califórnia (ABNT, 2014; Candello, 2014). Embora ambas apresentem certa similaridade morfológica e ecológica, a *E. andrei*, diferente da *E. fetida*, dispõe de um corpo uniformemente avermelhado, apresentando, entre seus segmentos corporais, listras claras pouco evidentes, além desta espécie ser mais competitiva e prolífica (Domínguez *et al.*, 2005; ABNT, 2014; Candello, 2014).

A recomendação destes organismos para a realização de testes de toxicidade se deve a sua importância para o solo, sua ampla distribuição e a facilidade de cultivo em ambientes artificiais de laboratório (Borali, 2000; Andréa, 2010; Ferreira, 2010; Lima, 2010). Embora a escolha destas espécies possa ser criticada devido a questões ligadas ao seu modo de vida e habitat natural, a utilização destes organismos dispõe de diversas vantagens, como: facilidade de criação e manutenção; padronização das análises, permitindo comparações com dados internacionais; as condições estipuladas para a execução dos testes são aceitas internacionalmente; permitem a obtenção de estimativas acerca da toxicidade do poluente para espécies endêmicas; e compõem avaliações iniciais do poluente, fornecendo informações acerca do intervalo de doses a ser estabelecido, sobre a concentração letal e a concentração sem efeito observável (Loureiro *et al.*, 2005; Andréa, 2010).

O efeito do poluente estudado sobre as minhocas pode ser avaliado através de diferentes tipos de abordagem, havendo a possibilidade de se verificar pontos como: alterações nos padrões de crescimento, taxas de reprodução, presença de condições patológicas e padrões comportamentais expressos (Kapanen & Itavaara, 2001; Andréa, 2010; Ferreira, 2010; Chini, 2014). Assim, diferentes testes podem ser empregados durante as análises ecotoxicológicas envolvendo estes organismos, é o caso do Ensaio de Toxicidade Aguda, no qual será observada a letalidade do poluente para os organismos-teste, e do Ensaio de Comportamento de Fuga, aplicado de modo a se avaliar a resposta comportamental e o nível de estresse dos indivíduos

quando expostos ao poluente (Kapanen & Itavaara, 2001; Ferreira, 2010; ABNT, 2011; ABNT, 2014; Niva & Brown, 2019).

Além dos testes ecotoxicológicos, outras análises podem ser empregadas para melhor compreender a dinâmica dos solos quando expostos a diferentes poluentes. Um exemplo é a avaliação da relação entre o substrato e os gases do efeito estufa (GEE), uma vez que os solos podem se apresentar como fonte ou sumidouro de GEEs, incluindo a dióxido de carbono (CO₂) e o metano (CH₄), conforme modificações na estrutura do substrato (Rastogi *et al.*, 2002; Jungkunst & Fiedler, 2007; Lubbers *et al.*, 2013; Oertel *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2018). A emissão desses gases pelo solo são o resultado de uma série de processo bióticos, que sofrem alterações conforme a disponibilidade dos componentes do substrato, como nitrogênio e carbono, e fatores químico-físicos do solo, como umidade e temperatura (Mer & Roger, 2001; Rastogi *et al.*, 2002; Lubbers *et al.*, 2013). Tais características, portanto, podem ser afetadas pela presença de um potencial poluente, como as cinzas, no ambiente, podendo acarretar em mudanças na emissão de GEEs. Ainda, a presença de anelídeos pode influenciar significativamente as características do solo ligadas aos processos biológicos, consequentemente, afetando a emissão de gases (Lubbers *et al.*, 2013).

Dessa forma, visando avaliar os efeitos ecotoxicológicos terrestres resultantes da presença de cinzas em áreas úmidas tropicais, o presente trabalho abarca entre seus objetivos específicos a avaliação da letalidade e da resposta comportamental de minhocas da espécie *Eisenia andrei* à presença de cinzas provenientes de queimadas no Pantanal. Além de buscar compreender a influência deste poluente sobre o fluxo de gases ligados ao efeito estufa. Tendo por hipótese o pressuposto de que a presença de cinzas no solo pode ocasionar a ocorrência de alterações nos atributos do ambiente edáfico, podendo resultar em modificações no fluxo de gases ligados ao efeito estufa e proporcionar a ocorrência de diferentes efeitos, letais e subletais, sobre os anelídeos.

2.2. MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1. Organismo-teste e substrato de cultivo

Os testes voltados para a avaliação do efeito toxicológico das cinzas no solo utilizaram como organismos-teste exemplares adultos de minhoca da espécie *Eisenia andrei*, com presença de clitelo e apresentando um peso individual entre 300 mg e 600 mg (**Figura 1**). Os indivíduos foram obtidos de um lote matriz de minhocas da empresa Minhobox®, situada em Juiz de Fora – MG, e foram dispostos em solo artificial tropical (SAT) previamente preparado

em conformidade com as recomendações das Normas NBR/ISO 17512-1 (ABNT, 2011) e NBR 15537 (ABNT, 2014).



Figura 1: Exemplar de *Eisenia andrei*, advindo da empresa Minhobox®.

Assim, o solo em questão apresentava em sua composição: 10% de pó da fibra de casca de coco, peneirada em uma malha de 4,8 mm e livre de restos vegetais; 20% de caulim, contendo mais de 30% de caulinita; e 70% de areia industrial peneirada, apresentando granulometria entre 0,075mm e 0,15mm (**Figura 2A**). O pH do solo SAT foi aferido, utilizando um pHmetro de bolso AK90 da marca AKSO, antes do início dos ensaios, tendo se realizado seu ajuste, quando necessário, através da adição de carbonato de cálcio (CaCO_3), de modo a se obter um valor entre 5,5 e 6,5.



Figura 2: Solo artificial tropical (SAT). **(A)** Materiais utilizados no preparo do solo artificial tropical, sendo possível visualizar o caulim a esquerda, o pó da fibra de casca de coco ao centro e a areia industrial a direita. **(B)** Solo artificial tropical seco, logo após a mistura dos materiais. **(C)** Solo artificial tropical úmido, após a adição de água destilada na proporção de 19,5g de água para cada 100g de solo seco.

O solo seco foi então distribuído entre os recipientes do experimento, sendo, posteriormente, adicionada a solução de cinzas e/ou água processada, conforme o tratamento em questão (**Figura 2B e 2C**). O volume de água a ser incorporado ao solo foi definido de maneira a se estabelecer uma Capacidade de Retenção de Água (CRA) em torno de 50%, para isso se utilizou o protocolo fornecido pela NBR 15537 (ABNT, 2014; Candello, 2014; Niva & Brown, 2019) (**Figura 3**).

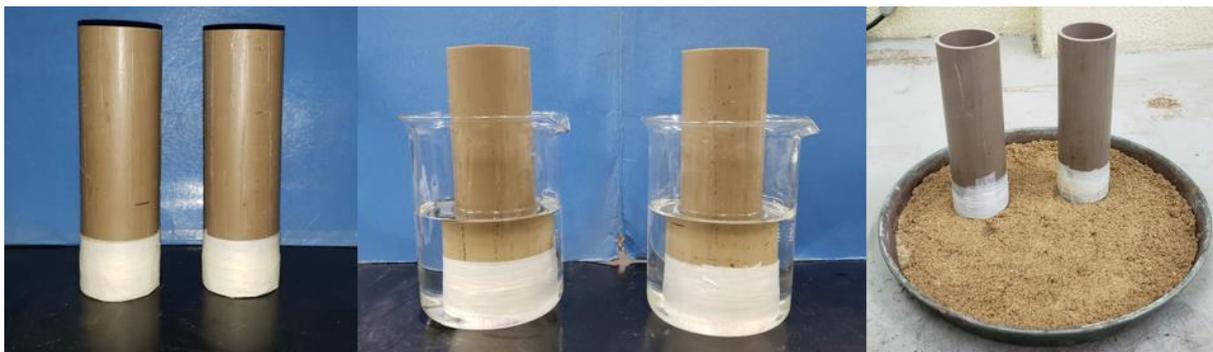


Figura 3: Etapas do processo de determinação da capacidade de retenção de água do solo artificial tropical (SAT).

2.2.2. Solução matriz e solos-teste

As cinzas utilizadas ao longo dos testes eram provenientes de uma área de floresta inundável poliespecífica ($16^{\circ}9'0''S$, $57^{\circ}45'32.4''W$), localizada nas proximidades do Rio Paraguai, no setor meandrônico em Cáceres, Baía Caiçara (**Figura 4**). O material foi coletado, com o auxílio de uma colher previamente descontaminada, entre agosto e outubro de 2020, cerca de 1 a 2 meses após o incêndio, sendo, posteriormente, acondicionado em recipientes de papel. Antes do estabelecimento das condições experimentais a serem analisadas, as cinzas foram peneiradas em uma malha de 2 mm e diluídas em água processada na proporção de 50g/L, de modo a se estabelecer uma solução matriz homogênea (Praharaj, 2002; Izquierdo & Querol, 2012; Brito, 2014; Brito et al., 2017; Silva *et al.*, 2016; Castelões, 2019; Harper *et al.*, 2019; Verma & Verma, 2019) (**Figura 5**).

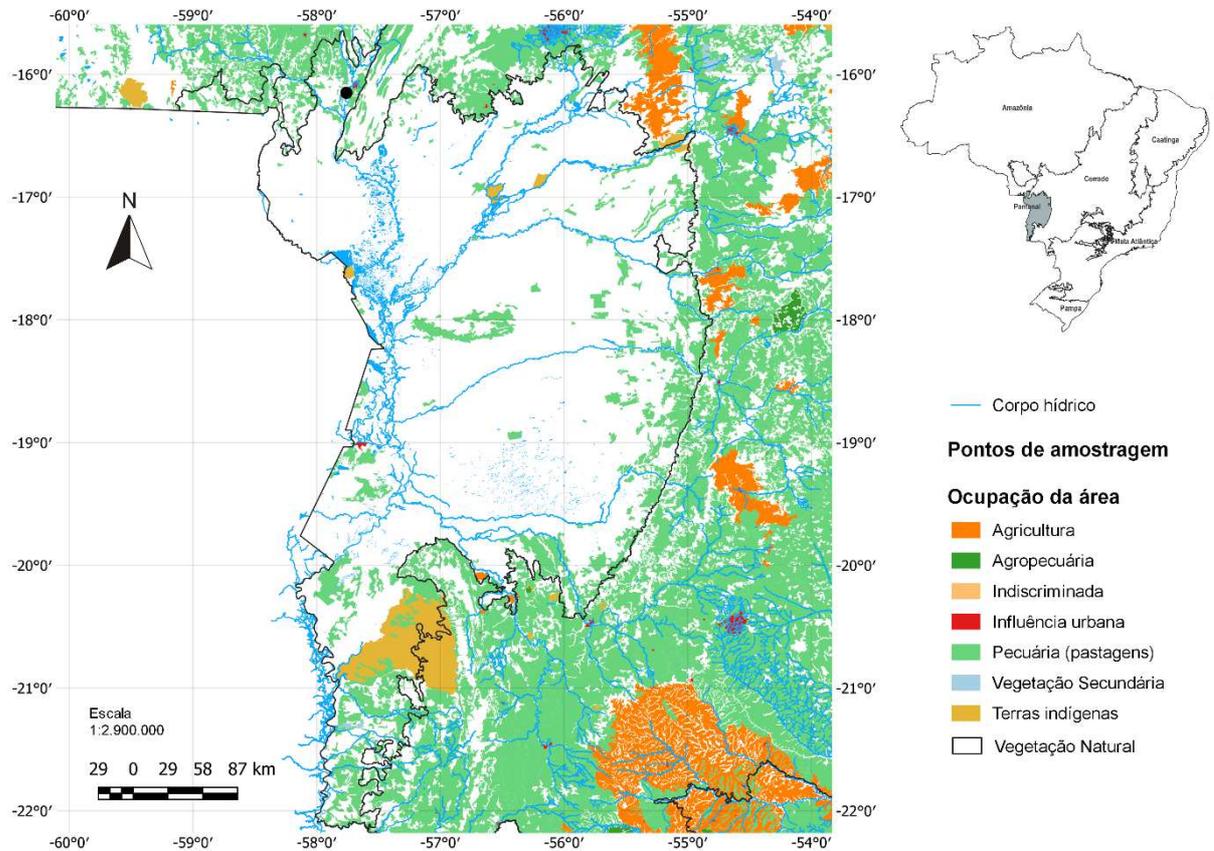


Figura 4: Ocupação da área do Pantanal referente ao ponto de coleta das cinzas utilizadas para os ensaios ecotoxicológicos com anelídeos. Fonte: Elaborado pelo autor.

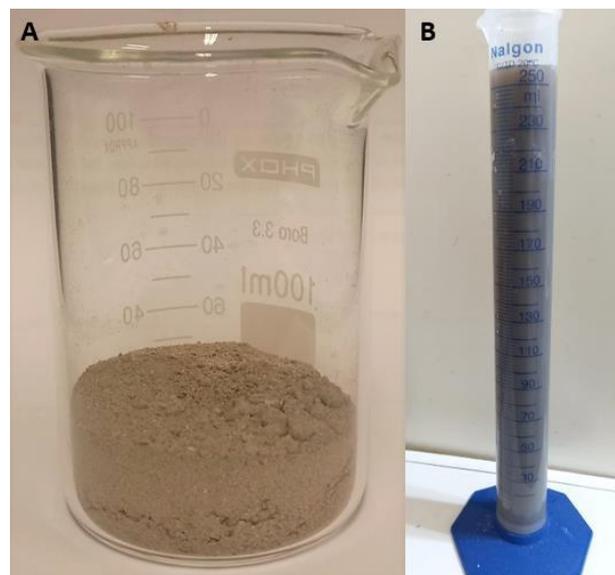


Figura 5: Cinzas coletadas no setor meandrítico em Cáceres, Baía Caiçara, próximo ao Rio Paraguai em uma área de floresta inundável poliespecífica. (A) Cinzas secas e peneiradas. (B) Solução matriz homogênea de cinzas advindas do Pantanal na proporção de 50g/L.

Previamente ao início dos experimentos, as minhocas foram aclimatadas em solo-controle, sendo, posteriormente, distribuídas entre os diferentes solos-teste. Para a análise do efeito das cinzas no solo foram realizados dois ensaios complementares, ensaio de toxicidade aguda e de comportamento de fuga, nos quais os organismos-teste foram expostos à solos-teste tratados com cinco concentrações diferentes da solução matriz de cinzas (100%, 50%, 25%, 12.5% e 6.25%), além do grupo controle, contendo apenas água processada (**Tabela 1**) (Harper *et al.*, 2019; Niva & Brown, 2019). Todos os tratamentos foram dispostos de maneira aleatória no ambiente.

Tabela 1: Quantidade de cinzas, advindas de queimadas no Pantanal, presentes em cada solução testada após o processo de diluição da solução matriz (50g/L).

Tratamento	Volume adicionado (mL)		Solo seco (Kg)	Concentração (mg de cinzas/kg de solo)
	Solução de Cinzas	Água destilada		
Controle	0	97.5	0.5	0
Solução 6.25%	6.094	91.406	0.5	609.375
Solução 12.5%	12.188	85.312	0.5	1218.75
Solução 25%	24.375	73.125	0.5	2437.50
Solução 50%	48.750	48.750	0.5	4875.00
Solução 100%	97.500	0	0.5	9750.00

Ao longo de toda a fase experimental, de ambos os ensaios, os indivíduos foram mantidos sob um fotoperíodo de 12h/12h e expostos a uma temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, de modo a se simular as condições tropicais (Nunes & Espíndola, 2012; ABNT, 2014; Candello, 2014). Por fim, os anelídeos não receberam alimentação durante a execução dos experimentos e os recipientes-teste no qual os animais foram alocados dispunham de tampas perfuradas, de maneira a evitar o ressecamento do solo e possibilitar a ocorrência de trocas gasosas.

2.2.3. Toxicidade aguda

O Ensaio de Toxicidade Aguda foi realizado segundo a Norma NBR 15537 (ABNT, 2014). O experimento teve a duração de 14 dias e foi realizado de forma estática. Cada solo-teste era composto por 500g de massa de solo seca, produzindo uma camada de 5 a 6 cm no

recipiente. Todos os tratamentos aplicados contaram com quatro repetições de 10 organismos em cada sessão ($n = 40$ indivíduos/tratamento), de modo que o experimento utilizou de um total de 240 organismos-teste (**Figura 6**).

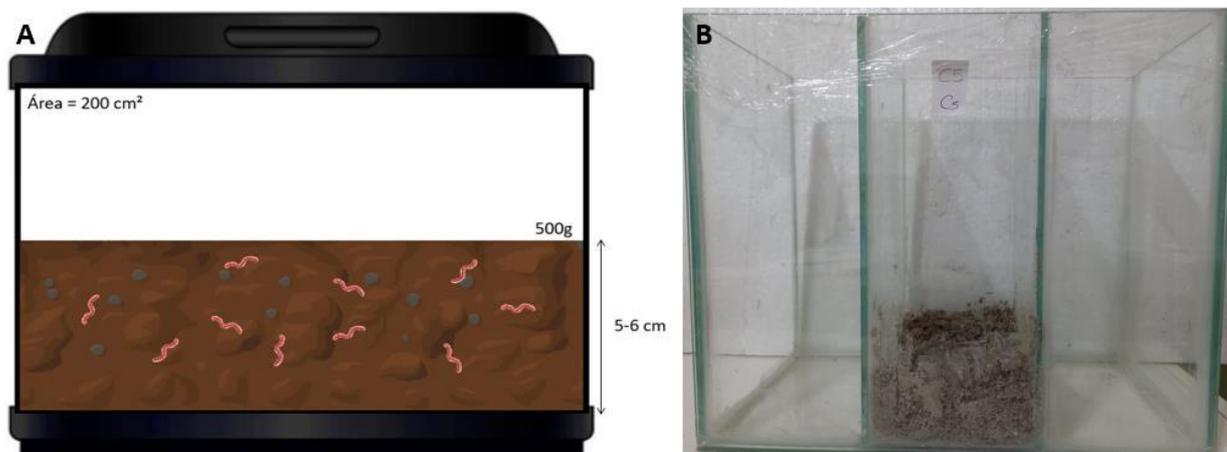


Figura 6: Estrutura do Ensaio de Toxicidade Aguda: **(A)** Desenho esquemático representando o Ensaio de Toxicidade Aguda envolvendo anelídeos da espécie *Eisenia andrei*. **(B)** Imagem contendo o recipiente-teste utilizado ao longo dos ensaios. Fonte: Elaborado pelo autor.

Os recipientes-teste utilizados eram de vidro, com a base retangular e capacidade para, aproximadamente, 3 litros. Após a adição dos anelídeos, os recipientes foram tampados e mantidos sem alterações por 7 dias. No sétimo dia e ao final (14º dia) dos testes, a letalidade de cada tratamento foi avaliada (**Figura 7**) (**Quadro 1**). Para isso, o solo-teste foi transferido para uma bandeja e os organismos-teste submetidos a um estímulo mecânico, que consistia em uma avaliação por toque com uma pinça na parte anterior do corpo dos indivíduos. Aqueles anelídeos que não apresentaram qualquer tipo de reação ao estímulo foram considerados mortos, assim como aqueles indivíduos não encontrados no recipiente-teste. Dessa forma, a variável resposta avaliada foi a letalidade provocada pela presença de cinzas no solo em diferentes concentrações. Sendo que, para validar o ensaio, a letalidade do solo-controle deve ser igual ou inferior a 10%.



Figura 7: Etapas executadas ao longo do Ensaio de Toxicidade Aguda. Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro 1: Resumo do ensaio de toxicidade aguda aplicado para a avaliação ecotoxicológica da influência das cinzas advindas de queimadas no Pantanal sobre o ecossistema edáfico.

Requisitos do teste	Toxicidade aguda
Normas	NBR 15537 (2014)
Tipo de ensaio	Estático
Tempo de duração	14 dias
Organismo-teste	<i>Eisenia andrei</i>
Número de indivíduos por réplica	10
Peso dos organismos	300-600 mg
Tipo de solo	Solo artificial tropical
Quantidade de solo-teste por réplica	500 g de solo seco
Número de concentrações	Cinco e o controle
Número de réplicas	Quatro
Temperatura	25 ± 2°C
Luminosidade (fotoperíodo)	12h de luz e 12h de escuro
Umidade	50% da capacidade máxima de retenção de água
Alimentação	Nenhuma
Efeito observado	Letalidade

Fonte: Adaptado de Lima, 2010; ABNT, 2014.

De maneira complementar, visando avaliar o efeito das cinzas e das minhocas sobre a emissão de gases ligados ao efeito estufa, foram avaliadas as taxas de liberação de gás carbônico (CO₂) e de metano (CH₄), de cada recipiente-teste, utilizado um analisador de gases de efeito estufa portátil (Los Gatos Research Inc.) (**Figura 8**). Esta análise incluiu a adição de um recipiente preenchido apenas com solo-teste, ao qual não houve a adição de anelídeos, tendo

este sido mantido nas mesmas condições que as demais amostras. Assim, as taxas de liberação de gases foram aferidas, ao longo de todo o experimento, com um intervalo de um dia entre as análises. Adicionalmente, as taxas de CO₂ e de CH₄ também foram registradas ao início e ao final do período experimental. Durante as análises, cada amostra foi checada três vezes, sendo estabelecido um intervalo de um minuto entre as coletas.



Figura 8: Análise das taxas de emissão de CO₂ e de CH₄ através de um analisador de gases de efeito estufa portátil (Los Gatos Inc.).

Ademais, buscando verificar possíveis alterações na estrutura física e na composição química do solo devido a presença de cinzas no substrato, amostras do material de cada réplica, coletadas no primeiro e no último dia de experimento, foram avaliadas quanto a sua: textura, pelo método da pipeta; presença de matéria orgânica, por meio do método Walkley & Black; carbono orgânico, pelo método Walkley & Black; fósforo, por colorimetria, por método do P em solução de equilíbrio e pelo método Mehlich I; potássio, pela fotometria de chama e também pelo método Mehlich I; alumínio, pelo método KCl 1mol/L e titulação com NaOH; cálcio e magnésio, por titulação com EDTA e também por método KCl 1mol/L. Para isso, o material destinado à análise foi encaminhado para o Laboratório de Análises de Solo (LAS) vinculado ao Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A interpretação de análise dos solos teve por base os parâmetros pontuados por Ribeiro *et al.* (1999). Por fim, também se buscou avaliar a composição das cinzas utilizadas para o

estabelecimento dos tratamentos. De modo que, o material foi destinado ao Laboratório de Química Instrumental (LQI) ligado ao Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), que quantificou os metais presentes na amostra de cinzas por meio de um Espectrofotômetro de Absorção Atômica da Varian (AAS 240 FS). As amostras de extrato de cinzas (0,5g) foram digeridas em chapa de aquecimento com 10mL de HNO₃ e 2mL de H₂O₂. Quando necessário, os extratos foram submetidos a um processo de diluição.

2.2.4. Comportamento de fuga

O ensaio de comportamento de fuga foi baseado nas recomendações da Norma NBR/ISO 17512-1 (ABNT, 2011). O teste em questão teve a duração de 48h e todos os tratamentos aplicados contaram com cinco repetições de 10 organismos em cada sessão (n = 50 indivíduos/tratamento), de modo que o experimento utilizou um total de 300 organismos-teste. Em cada um dos tratamentos, os anelídeos foram adicionados ao centro de uma câmara, com área de cerca de 400 cm², contendo duas seções (Schaefer, 2003). Uma das partições do recipiente-teste foi preenchido com o solo-teste, enquanto a outra seção recebeu o solo-controle, ambas contendo o mesmo peso de solo (500g), de maneira a gerar uma camada de 5 a 6 cm de substrato (**Figura 9**).

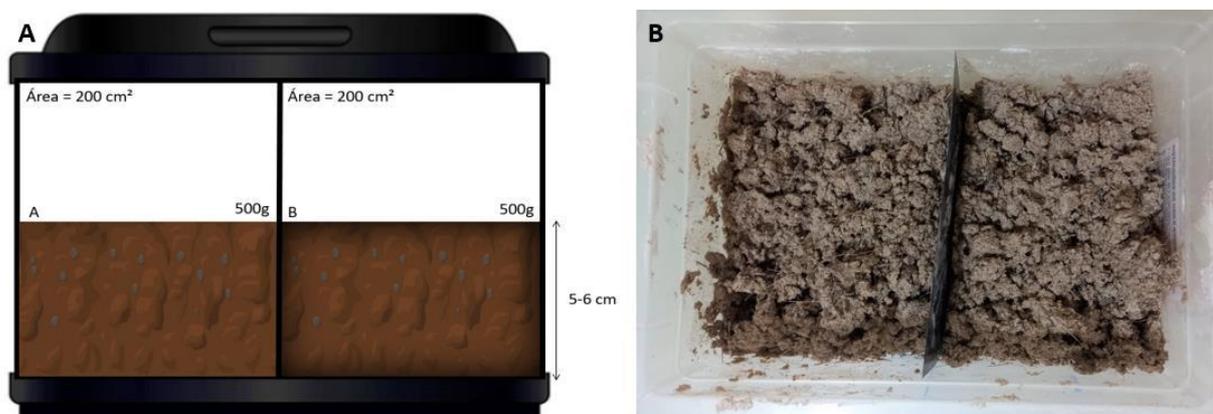


Figura 9: (A) Desenho esquemático representando o Ensaio de Comportamento de Fuga utilizando anelídeos da espécie *Eisenia andrei*. (B) Imagem do recipiente-teste utilizado ao longo dos ensaios. Fonte: Elaborado pelo autor.

Os recipientes-teste utilizados eram de polipropileno, com a base retangular e capacidade para 2.4 litros. Após a adição dos anelídeos, os recipientes foram então cobertos e mantidos sem alterações por 48h. Ao final deste período, ocorreu a adição de uma divisória entre as duas seções para que fossem realizadas as contagens do número de organismos-teste

presentes em cada seção (**Figura 10**) (**Quadro 2**). Os indivíduos não encontrados foram considerados na taxa de mortalidade e os anelídeos seccionados durante a inserção da divisória foram pontuados com o valor de 0.5 (ABNT, 2011; Niva & Brown, 2019).

Para cada um dos tratamentos ou réplicas executados, caso a mortalidade tenha atingido um valor superior a 10%, o teste em questão será pontuado como inválido. Além disso, a distribuição dos organismos no recipiente-teste contendo, em ambas as seções, o solo-controle também foi avaliada, buscando se analisar a existência de outros fatores que poderiam interferir nos ensaios. Dessa forma, caso a distribuição dos anelídeos no “dual control test” não tenha sido homogênea, o teste será pontuado como inválido (Yeardley *et al.*, 1996; Rinke & Wiechering, 2001; Lima, 2010; Machado, 2016; Santo *et al.*, 2020).

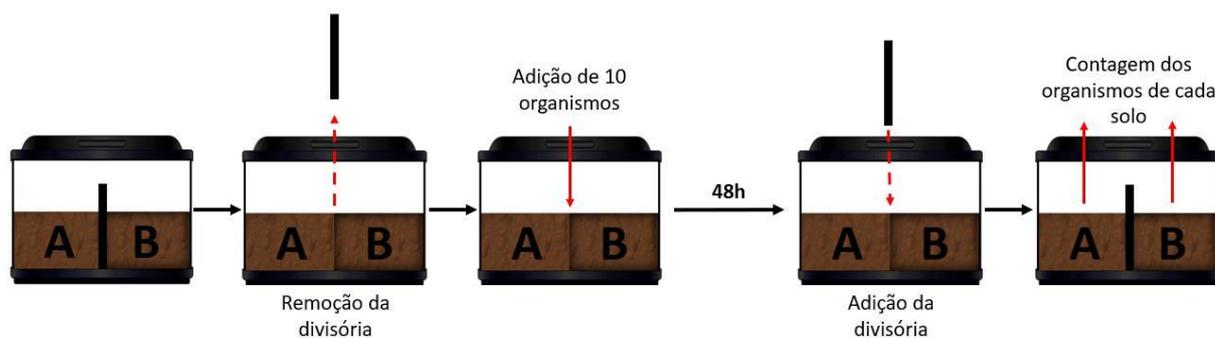


Figura 10: Esquema representando as etapas do Ensaio de Comportamento de Fuga. Fonte: Adaptado de Loureiro et al., 2005.

Quadro 2: Resumo do ensaio de comportamento de fuga aplicado com o intuito de se avaliar a influência das cinzas provenientes de incêndios florestais no Pantanal sobre o ecossistema edáfico.

Requisitos do teste	Ensaio de fuga
Normas	NBR/ISSO 17512-1 (2011)
Tipo de ensaio	Comportamental
Tempo de duração	48 horas
Organismo-teste	<i>Eisenia andrei</i>
Número de indivíduos por réplica	10
Peso dos organismos	300-600 mg
Tipo de solo	Solo artificial tropical
Quantidade de solo-teste por réplica	500 g de solo seco de cada lado
Número de concentrações	Cinco e o controle
Número de réplicas	Cinco

Temperatura	25 ± 2°C
Luminosidade (fotoperíodo)	12h de luz e 12h de escuro
Umidade	50% da capacidade máxima de retenção de água
Alimentação	Nenhuma
Efeito observado	Comportamento de fuga

Fonte: Adaptado de Lima, 2010; ABNT, 2011; Niva & Brown, 2019.

2.2.5. Análise estatística

A resposta dos experimentos de comportamento de fuga do solo-teste foi calculada, em porcentagem, através da equação (ABNT, 2011):

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

Considerando:

% = Taxa de fuga expressa em porcentagem

nC = Número de anelídeos encontrados no solo-controle (por recipiente-teste ou no solo controle de todas as replicatas)

nT = Número de anelídeos encontrados no solo-teste (por recipiente-teste ou no solo-teste de todas as replicatas)

N = Número total de anelídeos (por recipiente-teste ou no solo controle de todas as replicatas)

Nos casos em que a quantidade de anelídeos no solo-teste se mostrou inferior a 20%, o mesmo foi classificado como tendo função de habitat limitada. Em contrapartida, a ocorrência de taxas de rejeição negativas aponta para uma possível preferência dos anelídeos pelo solo-teste. Nesses casos, respostas negativas foram consideradas com 0% de fuga.

A significância da resposta de fuga foi calculada através do Teste Exato de Fisher. Para o ensaio com os solos contaminados, tendo em vista que o teste avalia uma resposta de evitação, foi utilizando o teste unicaudal, considerando como hipótese nula que, na ausência de efeito adverso, haverá a presença de 50% dos organismos no solo contaminado. Enquanto para o teste de controle duplo foi aplicado o teste bicaudal, tendo por hipótese nula a distribuição homogênea dos anelídeos em ambos os lados do recipiente. Quando $p < 0.05$, a hipótese nula foi rejeitada, tendo sido registrada a ocorrência de diferença significativa entre a seção contendo solo controle e a seção contendo solo contaminado (Natal-da-Luz *et al.*, 2004; Natal-da-Luz *et al.*, 2008; Lima, 2010; Nunes, 2010; Candello, 2014).

Ademais, a Concentração Mediana Efetiva (CE50) do teste de fuga e a Concentração Letal Média (CL50) do teste de toxicidade aguda foram calculadas, quando possível, através de um modelo de regressão não linear (ABNT, 2011; ABNT, 2014; Niva & Brown, 2019). Inicialmente, os dados foram avaliados quanto à sua normalidade através do teste de Shapiro-Wilks e, posteriormente, submetidos à análise de variância one-way (ANOVA). Nos testes de toxicidade aguda, tendo em vista que os dados não apresentavam uma distribuição normal, foi aplicado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis e, em seguida, o teste de comparações múltiplas de Nemenyi, de modo a analisar possíveis diferenças das médias dos tratamentos em relação ao controle. Em contrapartida, os dados normais, obtidos nos testes de comportamento de fuga, foram submetidos ao teste de Tukey (Nunes, 2010; Lima, 2010). Sempre se considerando o valor de $p < 0.05$ como significativo.

Por fim, a emissão de gases ligados ao efeito estufa foi avaliada a partir da inclinação resultante da relação entre o tempo e a concentração de gás, de modo que o cálculo do fluxo de gás esteve pautado na seguinte fórmula (Almeida *et al.*, 2016):

$$F = (V/A) \times \text{slope} \times (P \times F_1 \times F_2 / R \times T)$$

Onde:

F = Fluxo de gás ($\text{mg}/\text{m}^2/\text{dia}$)

V = Volume da câmara (m^3)

A = Área de superfície da câmara (m^2)

Slope = Inclinação resultante da relação o gás (CH_4 ou CO_2) e o tempo ($\text{ppm}/\text{segundo}$)

P = Pressão atmosférica (kPa)

F_1 = Peso molecular do gás, para CH_4 (16 g/mol) ou CO_2 (44 g/mol)

F_2 = Fator de conversão de segundos para dias

R = Constante de gás, equivalente a $8.3144 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$

T = Temperatura (K)

Os valores obtidos para o fluxo de gás foram então compilados e testados qual a sua normalidade por meio do teste de Shapiro-Wilks. Em seguida, devida a ausência de distribuição normal nos dados, houve a aplicação do teste não paramétrico Kruskal-Wallis, de modo a comparar os distintos tratamentos executados.

As análises estatísticas e os gráficos foram desenvolvidos utilizando “R version 4.1.1.”.

2.3. RESULTADOS

Adiante estão dispostos os resultados advindos dos testes complementares, de toxicidade aguda e de comportamento de fuga, através dos quais foi avaliada a influência de cinzas provenientes do Pantanal sobre indivíduos da espécie *Eisenia andrei*.

2.3.1. Avaliação da capacidade de retenção de água do solo

Conforme os procedimentos previstos no protocolo estabelecido pela NBR 15537, o solo artificial tropical foi submetido a dois ensaios distintos para a determinação da capacidade de retenção de água (CRA), cujos resultados estão dispostos na **Tabela 2**. Assim, considerando tais valores, foi possível ajustar a umidade do solo-teste de modo a se obter 50% da CRA, através da adição de 97.5mL de água destilada a cada 500g de solo seco (**Tabela 3**).

Tabela 2: Avaliação da capacidade de retenção de água do solo artificial tropical em dois ensaios distintos.

	Ensaio I	Ensaio II	Média dos ensaios
Capacidade de Retenção de Água (%)	38.29	39.48	38.89

Tabela 3: Volume de água necessário para ajustar a umidade do solo artificial tropical de acordo com a CRA.

	CRA	50% da CRA	Água necessária para ajustar 100g de solo para 50% da CRA	Água necessária para ajustar 500g de solo para 50% da CRA
Solo	38.89 % da massa seca do solo	19.5% da massa seca do solo	19.5g	97.5g

2.3.2. Validação dos ensaios

Os critérios estabelecidos para a validação do teste de toxicidade aguda foram atendidos, uma vez que, ao final do período de ensaio, a taxa de letalidade dos organismos-teste no solo controle foi menor ou igual a 10%, conforme expresso na **Tabela 4**.

Tabela 4: Quantidade de organismos-teste presentes no solo controle que apresentaram mobilidade durante os testes de toque executados no 7° e no 14° dia do ensaio de toxicidade aguda. Variável que permite avaliar a letalidade do solo.

	Controle 1	Controle 2	Controle 3	Controle 4
Número de indivíduos responsivos ao toque (7° dia)	10	10	9	10
Número de indivíduos responsivos ao toque (14° dia)	10	10	9	10
Letalidade (%)	0	0	10	0

Ambos os critérios para a validação do ensaio de fuga também foram atendidos, tendo em vista que não houve registro de mortalidade ou perda de indivíduos ao longo do experimento. Além disso, durante o “dual control test”, os anelídeos apresentaram uma distribuição equitativa entre as seções dos recipientes-teste contendo solo controle em ambos os lados, tendo havido a presença de 42% dos organismos-teste na seção A e 58% na seção B (**Figura 11**). Dessa forma, os recipientes controle apresentaram um padrão homogêneo na distribuição dos indivíduos, estando de acordo com o padrão de distribuição 40-60% estipulado para a validação do ensaio.

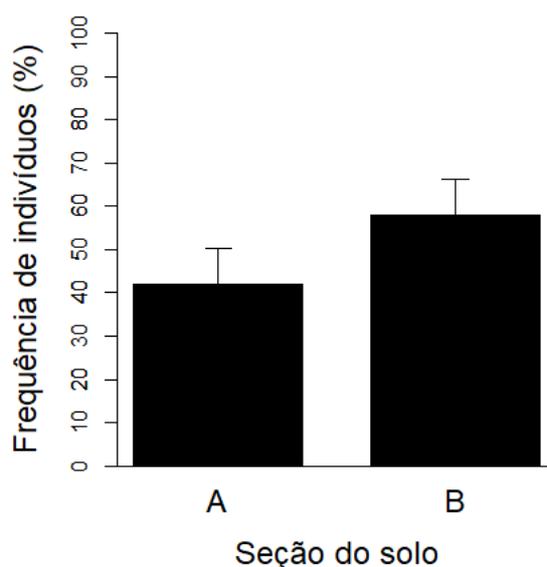


Figura 11: “Dual control test” para o solo artificial tropical: porcentagem de organismos (média + desvio padrão, n = 5) presentes em cada seção do recipiente-teste utilizado como controle no ensaio de fuga. Não houve diferença estatística na distribuição dos anelídeos, segundo o teste exato de Fisher ($p \geq 0.05$).

2.3.3. Efeito das cinzas sobre o comportamento de fuga

A realização de uma série de ensaios para avaliar a ocorrência de comportamento de fuga em anelídeos quando em contato com substrato contaminado com cinzas provenientes de queimadas no Pantanal permitiram analisar as respostas de rejeição desses organismos quando submetidos a diferentes concentrações da substância estudada. Tendo sido obtida uma resposta significativa ($p < 0.05$) em três dos tratamentos aplicados.

Considerando a porcentagem média de fuga de cada concentração, embora não tenha sido observada uma resposta ligada a curva dose-resposta tradicional, é possível verificar que as minhocas apresentaram uma resposta de rejeição a solos contaminados com cinzas em duas concentrações, sendo que a resposta mais expressiva esteve ligada ao solo contendo 2437.50mg/Kg de cinzas, o qual apresentou uma porcentagem de fuga de 52%. Já a segundo solo a gerar uma resposta aversiva entre os organismos-teste foi aquele que recebeu 9750mg/Kg de cinzas, tendo apresentado uma taxa de fuga de 32% (**Figura 12**). Em contrapartida, nas demais concentrações, os anelídeos não apresentaram resposta de fuga média. Ainda que, ao analisar as réplicas em separado, tenha sido possível visualizar respostas de rejeição acima de 60% a partir da concentração de 1218.75 mg/Kg de cinzas.

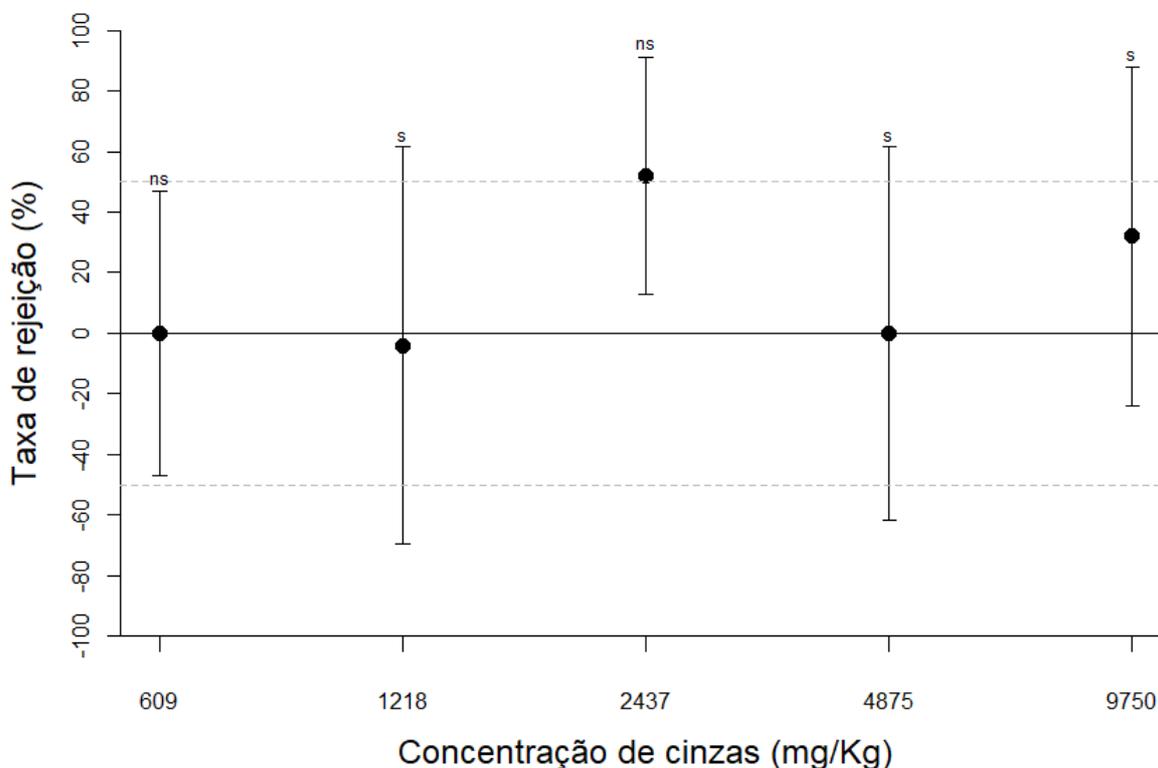


Figura 12: Ensaio de comportamento de fuga em anelídeos expostos a cinzas coletadas após queimadas no Pantanal: porcentagem de resposta de fuga (média + desvio padrão, n = 5) de *Eisenia andrei* em solo artificial tropical contendo diferentes concentrações de cinzas provenientes de queimadas no Pantanal. Os desvio-padrão são representados pelas barras. (s) = Resposta significativa ($p < 0.05$) e (ns) = resposta não significativa ($p \geq 0.05$), conforme o Teste Exato de Fisher.

Embora o cálculo da porcentagem de fuga tenha indicado duas concentrações nas quais os anelídeos apresentam comportamento de rejeição, não foi possível estimar o valor, da Concentração Efetiva mediana (CE50-48h), responsável pela ocorrência de comportamento de fuga em 50% dos indivíduos expostos a solução de cinzas advindas do Pantanal, em solo artificial tropical, após transcorridas 48h.

Por fim, após 48h de experimento, não foram registradas características evidentes indicativas de um efeito subletal nos anelídeos. Em contrapartida, a ocorrência de comportamento de cópula foi registrada seis vezes ao longo de amostras contendo diferentes concentrações de cinzas (**Tabela 5**).

Tabela 5: Registro da ocorrência de comportamento de cópula ao final do Ensaio de Comportamento de Fuga aplicado em anelídeos expostos a solo artificial tropical contaminado com distintas concentrações de cinzas resultantes de queimadas no Pantanal.

Comportamento de cópula	Registro de cópula	Local de ocorrência	
		Solo-teste	Solo controle
Concentração testada			
Controle	0	0	0
609.375 mg/Kg	0	0	0
1218.75 mg/Kg	2	0	2
2437.5 mg/Kg	1	0	1
4875 mg/Kg	1	1	0
9750 mg/Kg	2	1	1

2.3.4. Teste de toxicidade aguda

A presente análise contou com uma mortalidade média reduzida na maioria dos tratamentos estabelecidos, conforme apresentado na **Figura 13**, estando a maior porcentagem de mortalidade (25%) concentrada na amostra contendo 609.375 mg/Kg de cinzas (**Tabela 6**), embora não tenha sido registrado uma diferença estatística significativa ($p \geq 0.05$) em relação ao controle.

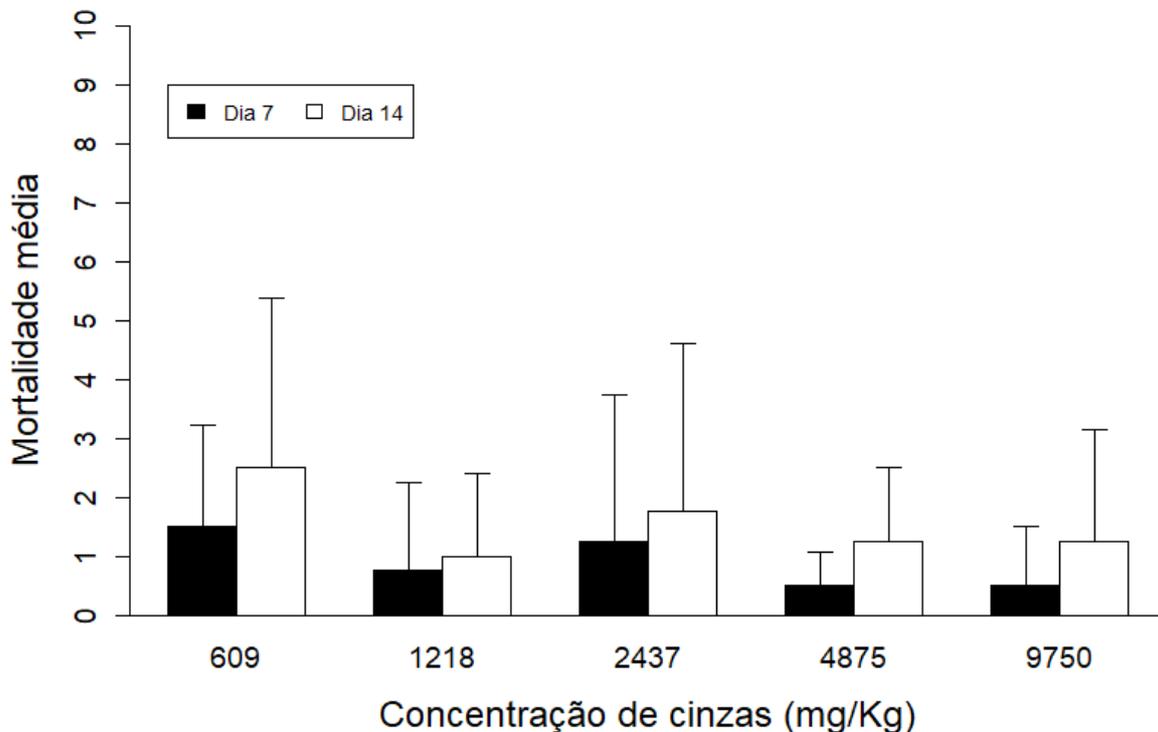


Figura 13: Mortalidade média ($n = 4$) do Teste de Toxicidade Aguda em minhocas expostas a tratamentos contendo cinzas, em diferentes concentrações, coletadas no Pantanal. Número médio de indivíduos que, no 7° e no 14° dia, não apresentaram resposta ao toque em cada concentração. Conforme o Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo Teste de Nemenyi para comparações múltiplas, não houve, em qualquer tratamento, diferença estatisticamente significativa ($p > 0.05$) em relação ao grupo controle. Barras de erro correspondem ao desvio-padrão.

Tabela 6: Resultado do Teste de Toxicidade Aguda em indivíduos, da espécie *Eisenia andrei*, expostos a solo artificial tropical contendo distintas concentrações de cinzas advindas de queimadas no Pantanal: Número de indivíduos responsivos ao teste de toque e taxa média de mortalidade ($n = 4$).

Concentração testada	N° de indivíduos móveis		Taxa de mortalidade (%)	
	7° Dia	14° Dia	7° Dia	14° Dia
609.375 mg/Kg	34	30	15	25
1218.75 mg/Kg	37	36	7,5	10
2437.5 mg/Kg	35	33	12,5	17,5
4875 mg/Kg	38	35	5	12,5
9750 mg/Kg	38	35	5	12,5

Ainda assim, foi possível visualizar uma certa variação na taxa de sobrevivência entre as réplicas de cada tratamento (**Figura 14**). Indicando a presença de um número reduzido de sobreviventes também em réplicas contendo concentrações de cinzas mais elevadas. Contudo, o valor estimado da Concentração Letal Mediana após 14 dias (CL50-14dias), responsável pela mortalidade de 50% dos indivíduos expostos a solução de cinzas coletadas na região de Cáceres, não pode ser aferido, tendo em vista a baixa mortalidade média entre as amostras.

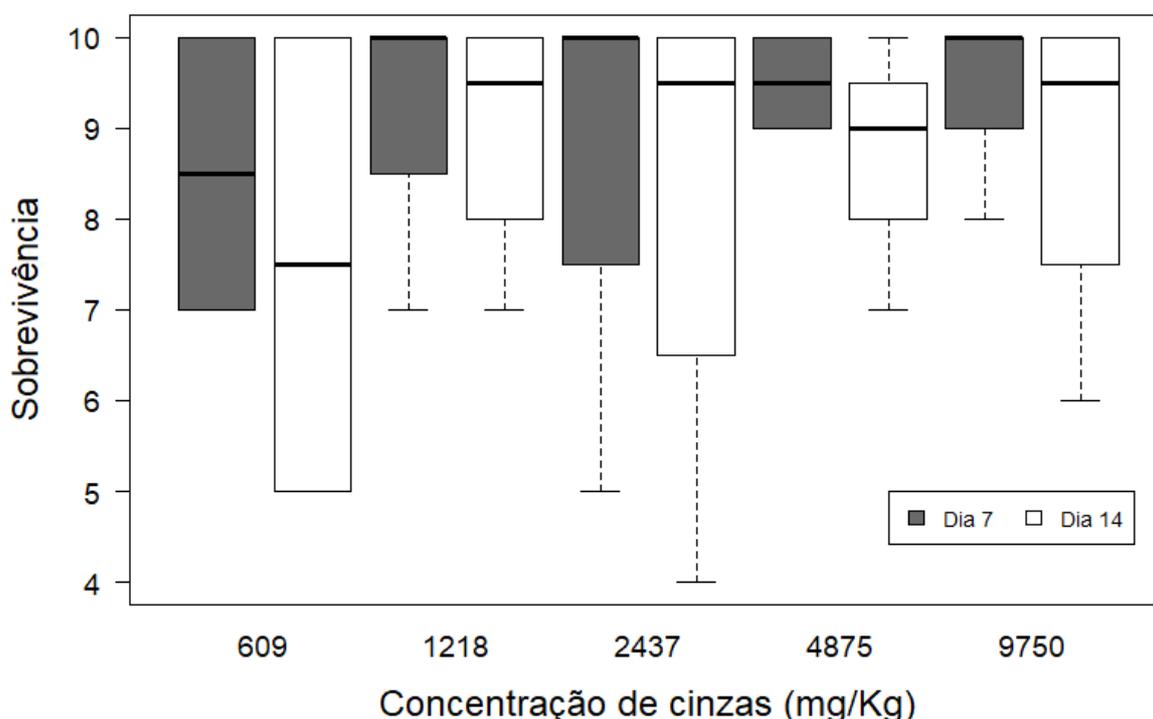


Figura 14: Gráfico Boxplot para o Ensaio de Toxicidade Aguda em anelídeos: Sobrevivência de *Eisenia andrei* submetidos a solo artificial tropical contaminado com diferentes concentrações de cinzas provenientes de queimadas no Pantanal após 7 dias de ensaio (cinza) e após transcorridos 14 dias (branco). Nenhuma das concentrações testadas apresentou diferença estatisticamente significativa ($p > 0.05$) em relação ao controle, segundo os testes de Kruskal-Wallis e Nemenyi.

De maneira complementar, no 14º dia de ensaio, durante a execução do teste de toque, também foram identificados alguns parâmetros subletais, como: alteração na coloração de alguns indivíduos, redução ou ausência de clitelo, presença de extremidades corporais mais finas, evidências de autotomia caudal e respostas comportamentais mais lentas após o estímulo mecânico. Tais características foram registradas em ao menos uma réplica de cada concentração contendo solução de cinzas, embora a frequência de ocorrência dessas alterações não tenha

seguido um padrão. Ainda, com exceção das amostras controle, todas as réplicas apresentavam vestígios indicativos de movimentação dos indivíduos, durante o fotoperíodo escuro, na região superior do recipiente. A ocorrência desse comportamento se mostrou mais frequente nas concentrações mais elevadas de cinzas. Por fim, no 7º dia do ensaio, foi possível realizar o registro da ocorrência de comportamento de cópula nas concentrações de 12.5%, 25% e 50% da solução matriz, enquanto, ao final do ensaio, uma análise do solo contendo 100% da solução matriz de cinzas permitiu a identificação de dois casulos, presentes em diferentes réplicas.

2.3.5. Emissão de gases

A análise da emissão de gases relacionados ao efeito estufa contou com a presença de resultados distintos entre os gases avaliados. Ao considerar a emissão de metano (CH₄) foi possível visualizar certa constância entre os valores de fluxo, de modo que o solo se apresenta como um consumidor desse gás independente do tratamento ao qual foi submetido (**Figura 15**). Em contrapartida, a verificação do fluxo de gás carbônico (CO₂) permitiu o registro de diferença significativa ($p < 0.05$) entre os tratamentos, conforme o Teste de Kruskal-Wallis. Assim, embora o solo tenha a capacidade de absorver CO₂, a presença de cinzas no substrato levou a um aumento gradativo na emissão desse gás, tendo sido apontada uma relação direta entre a quantidade de cinzas presente no solo e o fluxo de CO₂ (**Figura 16**). Além disso, ao comparar a emissão de gases entre as amostras controle contendo anelídeos e a amostra livre de minhocas, foi possível notar uma maior emissão de CO₂ na presença de *Eisenia andrei*, enquanto a liberação de CH₄ não apresentou grandes discrepâncias (**Figura 17**).

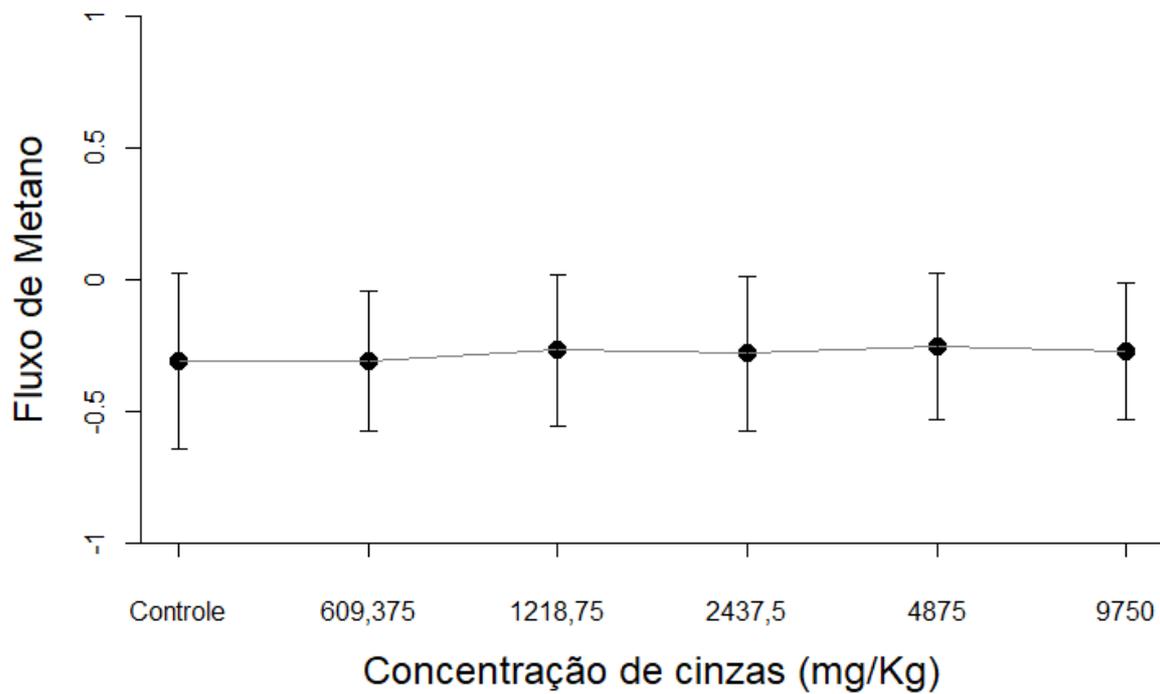


Figura 15: Média do fluxo de metano liberado no Teste de Toxicidade Aguda, no qual as amostras contendo solo artificial tropical apresentavam minhocas expostas a diferentes concentrações de cinzas coletadas no Pantanal. O fluxo de gases foi aferido ao longo de 14 dias, considerando o intervalo de 1 dia entre as análises. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0.05$) entre os tratamentos, segundo o teste de Kruskal-Wallis. Barras de erro correspondem ao desvio-padrão.

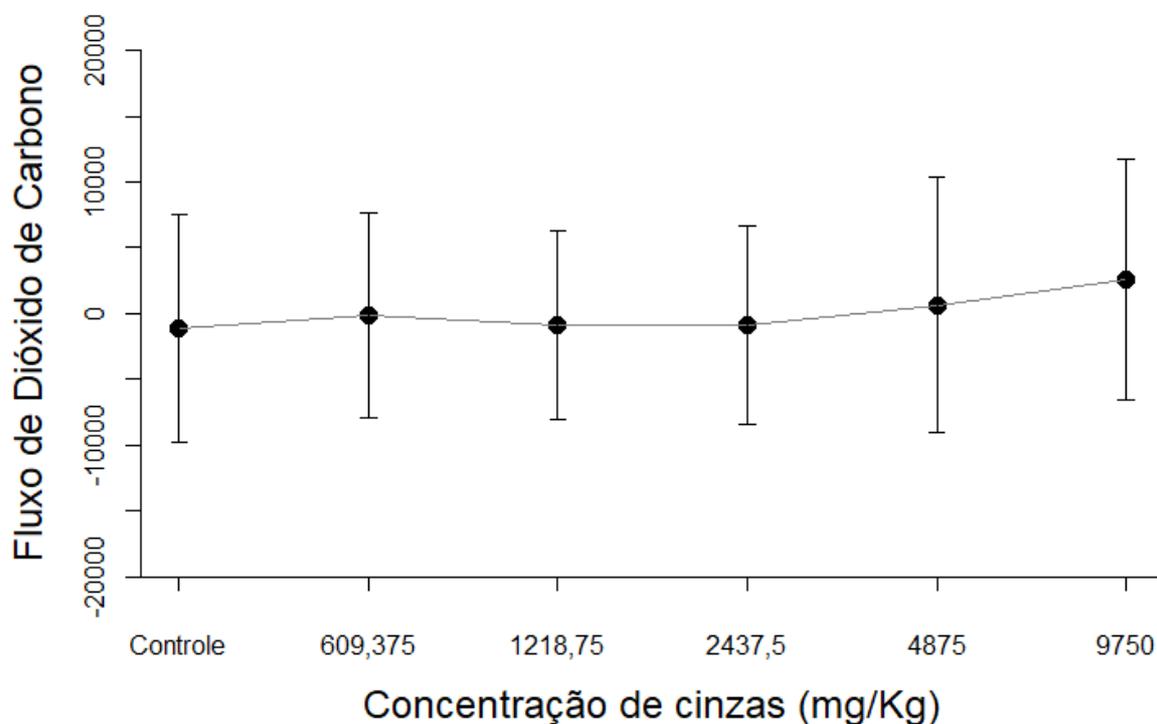


Figura 16: Fluxo médio de gás carbônico emitido durante o ensaio de toxicidade aguda em solo artificial tropical contendo anelídeos expostos a distintas concentrações de cinzas coletadas no Pantanal. A coleta de dados foi realizada ao longo de 14 dias, com intervalos de 1 dia entre as análises. Houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre os tratamentos, segundo o teste de Kruskal-Wallis. Barras de erro correspondem ao desvio-padrão.

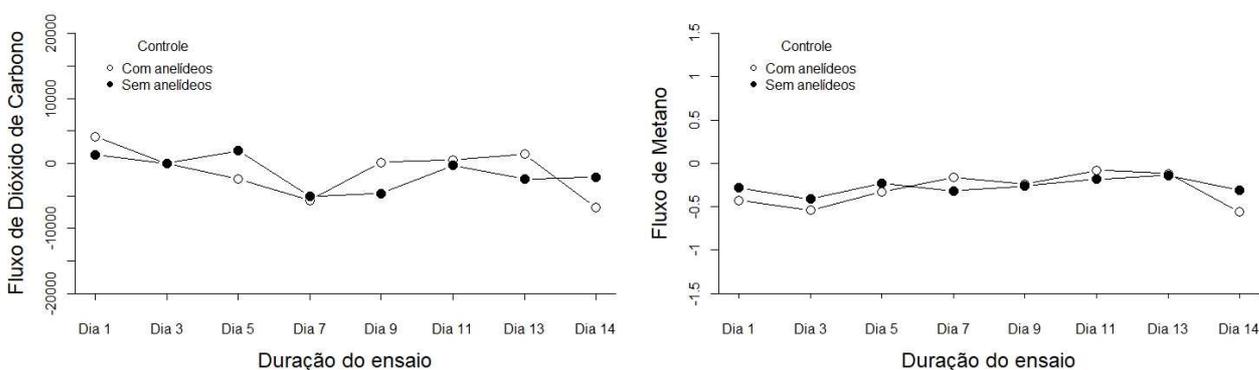


Figura 17: Comparativo entre as amostras controle contendo anelídeos e o controle livre de minhocas, tendo por foco as médias de emissão de gases, relacionados ao efeito estufa, no Teste de Toxicidade Aguda, no qual os organismos foram expostos a diferentes concentrações de cinzas coletadas no Pantanal. As medições duraram 14 dias, com um intervalo de 1 dia entre as análises, tendo se aferido a liberação de Dióxido de Carbono e Metano.

Ainda que tenha ocorrido um maior fluxo de gás carbônico nas maiores concentrações de cinza, ao avaliar a relação entre a emissão de gases e o tempo de duração da coleta de dados, foi possível notar que com o decorrer dos dias houve uma redução na emissão de CO₂ (**Figura 18**). Padrão que não se repetiu ao avaliar o fluxo de metano, tendo em vista que este gás apresentou um aumento nas taxas de emissão a partir do terceiro dia de experimento, se mantendo praticamente constante até o décimo primeiro dia de experimento, momento no qual se inicia uma queda na liberação de CH₄ no ambiente, de modo que ao décimo quarto dia os valores desse gás se assemelham ao fluxo apresentado logo após o início do período experimental (**Figura 19**).

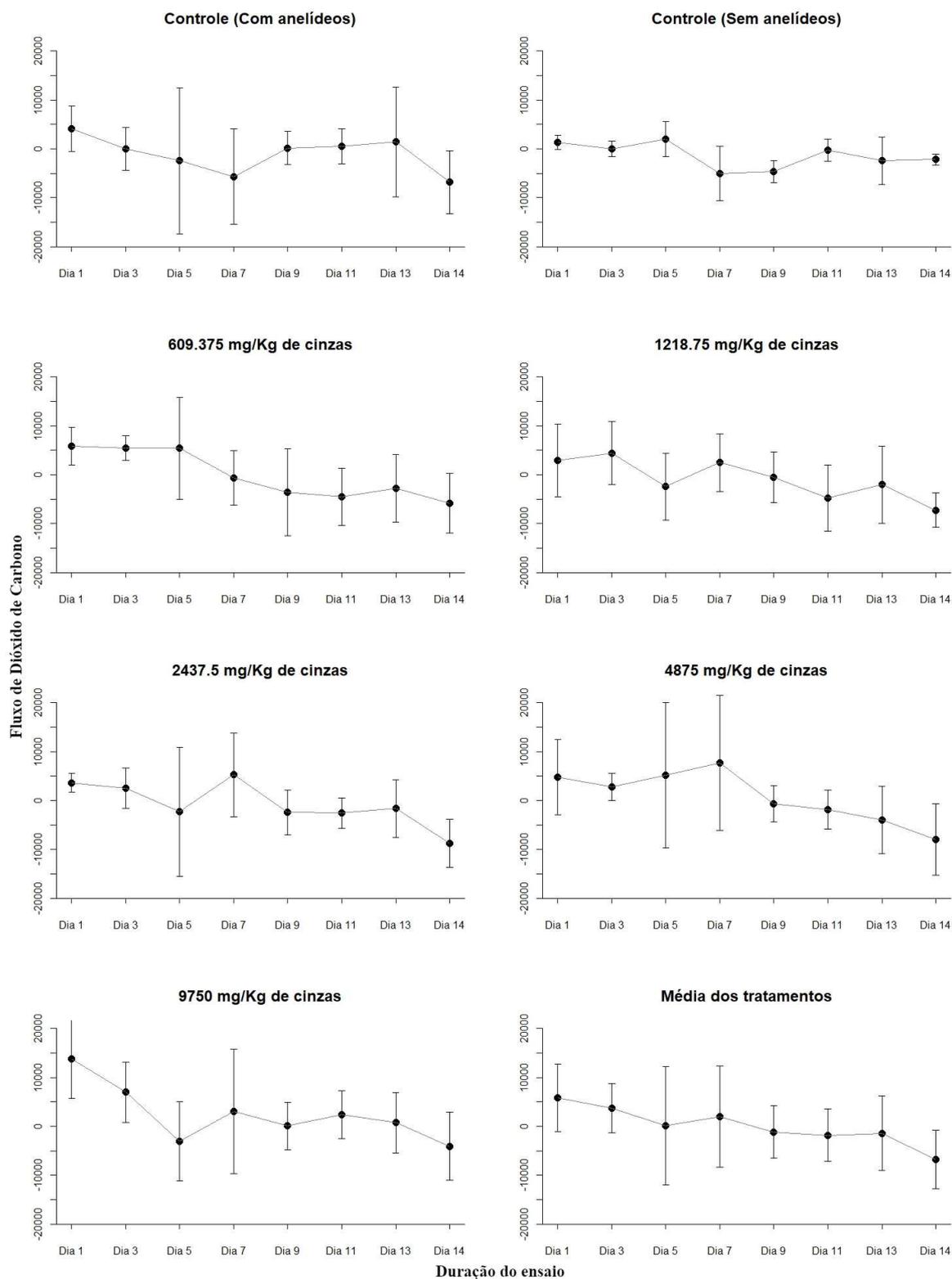


Figura 18: Fluxo de gás carbônico emitido ao longo dos 14 dias de duração do ensaio de toxicidade aguda, se avaliando a liberação de CO₂ em solo artificial tropical contendo anelídeos submetidos a diferentes concentrações de cinzas coletadas na região do Pantanal. Barras de erro correspondem ao desvio-padrão.

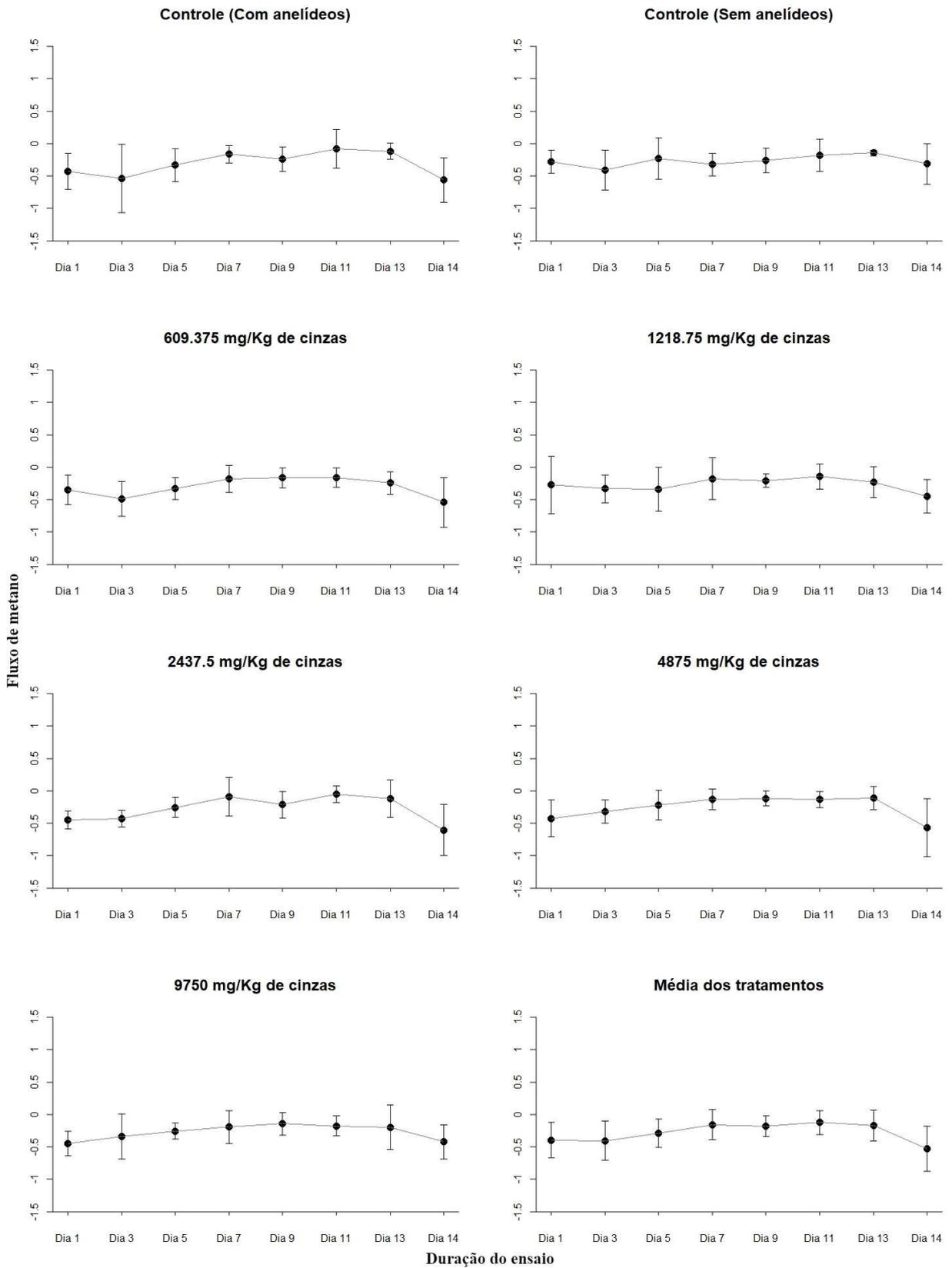


Figura 19: Fluxo de metano liberado durante o ensaio de toxicidade aguda com anelídeos, correspondente a emissão de CH₄ em solo artificial tropical submetido a distintas concentrações de cinzas coletadas em Cáceres. Barras de erro correspondem ao desvio-padrão.

2.3.6. Análises físico-químicas

A análise física das amostras de solo permitiu notar que, embora inicialmente os substratos tenham mostrado um nível médio de argila, após transcorridos 14 dias o material passa a apresentar uma textura mais arenosa. Além disso, os solos com as duas maiores concentrações de cinzas também apresentaram uma condição mais arenosa, tanto ao início quanto ao final do experimento, em comparado com as concentrações mais baixas do poluente.

Ao verificar a composição dos substratos testados foi possível perceber que entre as amostras iniciais houve um aumento na concentração de fósforo (P), magnésio (Mg), cálcio (Ca) e potássio (K) conforme se acrescia cinzas ao solo. Relação também reportada para os atributos de Soma de Bases (SB) e Capacidade de Troca de Cátions (t). Em contrapartida, o alumínio (Al) não apresentou uma relação tão definida com a concentração de cinzas testadas. Ao se comparar com as amostras finais, torna-se aparente um relativo aumento na presença de P, Ca e Mg em quase todas as amostras, além de uma crescente nos atributos SB e t. Já no caso da concentração de K, esse elemento registrou um aumento apenas nos controles e nas duas menores concentrações de cinzas testadas, tendo se verificado um decréscimo deste atributo nos demais tratamentos. Para o Al, no geral, as concentrações finais exibiram um decréscimo ou se mantiveram estáveis em comparação as amostras iniciais. A matéria orgânica disponível e o carbono orgânico sofreram uma redução ao comparar o solo coletado de cada amostras no primeiro dia e o substrato do último dia. Contudo, não foi possível se estabelecer um paralelo entre estes dois atributos e a proporção de cinzas no solo.

Em todas as amostras avaliadas (iniciais e finais), o P e o K apresentaram valores bastante elevados. Enquanto o Ca dispôs de concentrações moderadas nas amostras controle (finais) e nas três menores concentrações de cinzas (iniciais e finais), com os dois maiores tratamentos (iniciais e finais) apresentando valores altos de Ca. Para as amostras controle do primeiro dia os valores de Ca e Mg se mostram baixos. Embora, este último, tenha apresentado, sobretudo, valores moderados entre as amostras (iniciais e finais), além de registros de concentrações altas nos três maiores tratamentos (finais). No que se refere ao Al, todas as amostras expuseram valores muito baixos desse metal. A matéria orgânica disponível e o carbono orgânico apresentaram concentrações, em maioria, moderadas ao início do experimento, com alguns tratamentos dispondo de valores mais baixos ao final dos ensaios. Por fim, os atributos SB e t apresentaram um padrão similar entre si, para as amostras iniciais e finais, com os controles e os três primeiros tratamentos dispondo de valores moderados, enquanto as duas maiores proporções de cinzas testadas exibiram valores altos.

As análises físico-químicas das amostras de solo contaminado ao primeiro dia do Ensaio de Toxicidade Aguda estão dispostas na **Tabela 7**, enquanto os valores avaliados nas amostras finais se encontram representados na **Tabela 8**.

Tabela 7: Análise físico-química do Solo Artificial Tropical ao início do Ensaio de Toxicidade Aguda, no qual o solo recebeu diferentes concentrações de cinzas do Pantanal. CA - Controle contendo anelídeos; CB – Controle livre de anelídeos; T1 - Tratamento com 609.375 mg/Kg de cinzas; T2 - Tratamento com 1218.75 mg/Kg de cinzas; T3 - Tratamento com 2437.5 mg/Kg de cinzas; T4 - Tratamento com 4875 mg/Kg de cinzas; T5 - Tratamento com 9750 mg/Kg de cinzas; 12 - Amostra contendo réplicas 1 e 2 do tratamento; 34 - Amostra contendo réplicas 3 e 4 do tratamento; t – Capacidade de Troca de Cátions Efetiva.

ATRIBUTOS DO SOLO	AMOSTRAS												
	CA-12	CA-34	CB	T1-12	T1-34	T2-12	T2-34	T3-12	T3-34	T4-12	T4-34	T5-12	T5-34
Fósforo (mg/dm³)	10.6	10.5	12.1	12.4	10.8	10.1	10.2	11.1	13.8	12.4	13.4	17.5	19.4
Potássio (mg/dm³)	313.6	302.4	291.2	336.0	313.6	313.6	313.6	336.0	324.8	313.6	336.0	358.4	369.6
Cálcio (cmol_c/dm³)	1.13	1.32	0.90	1.38	1.58	1.55	1.39	1.44	1.50	1.91	2.42	2.41	3.15
Magnésio (cmol_c/dm³)	0.67	0.46	0.33	0.47	0.57	0.52	0.99	0.81	0.44	0.49	1.00	0.72	0.67
Alumínio (cmol_c/dm³)	0.00	0.07	0.08	0.11	0.09	0.09	0.08	0.03	0.07	0.04	0.00	0.00	0.00
Soma de Bases (cmol_c/dm³)	2.60	2.56	1.98	2.71	2.95	2.87	3.18	3.11	2.77	3.20	4.28	4.05	4.77
t (cmol_c/dm³)	2.60	2.63	2.06	2.82	3.04	2.96	3.26	3.14	2.84	3.24	4.28	4.05	4.77
Saturação por alumínio (%)	0.0	2.7	3.9	3.9	3.0	3.0	2.5	1.0	2.5	1.2	0.0	0.0	0.0
Matéria Orgânica (dag/kg)	2.57	3.83	3.72	1.76	2.91	2.68	2.22	1.88	2.11	1.99	3.03	2.11	2.45
Carbono Orgânico (dag/kg)	1.49	2.22	2.16	1.02	1.69	1.56	1.29	1.09	1.22	1.16	1.76	1.22	1.42
Areia grossa (dag/kg)	46.00	43.00	42.50	45.40	43.30	47.10	43.50	44.60	44.20	46.30	43.50	49.10	47.10
Areia fina (dag/kg)	32.00	31.00	33.50	36.60	38.70	34.90	32.50	35.40	37.80	37.70	40.50	30.90	30.90
Silte (dag/kg)	6.00	12.00	10.00	2.00	2.00	2.00	10.00	6.00	2.00	2.00	2.00	6.00	8.00
Argila (dag/kg)	16.00	14.00	14.00	16.00	16.00	16.00	14.00	14.00	16.00	14.00	14.00	14.00	14.00

Tabela 8: Análise físico-química do Solo Artificial Tropical ao final do Ensaio de Toxicidade Aguda, no qual o solo recebeu diferentes concentrações de cinzas do Pantanal. CA - Controle contendo anelídeos; CB – Controle livre de anelídeos; T1 - Tratamento com 609.375 mg/Kg de cinzas; T2 - Tratamento com 1218.75 mg/Kg de cinzas; T3 - Tratamento com 2437.5 mg/Kg de cinzas; T4 - Tratamento com 4875 mg/Kg de cinzas; T5 - Tratamento com 9750 mg/Kg de cinzas; (1)(2)(3)(4) - Réplicas de cada tratamento; t – Capacidade de Troca de Cátions Efetiva.

ATRIBUTOS DO SOLO	AMOSTRAS												
	CA(1)	CA(2)	CA(3)	CA(4)	CB	T1(1)	T1(2)	T1(3)	T1(4)	T2(1)	T2(2)	T2(3)	T2(4)
Fósforo (mg/dm³)	15.1	13.2	12.4	13.2	11.9	13.4	14.5	11.1	19.6	15.0	13.9	11.1	13.4
Potássio (mg/dm³)	358.4	369.6	336.0	347.2	414.4	347.2	358.4	358.4	403.2	347.2	336.0	302.4	291.2
Cálcio (cmol_c/dm³)	1.75	1.57	1.51	1.61	1.75	1.71	1.44	1.83	1.83	1.57	1.76	1.53	1.77
Magnésio (cmol_c/dm³)	0.94	0.65	0.67	0.66	0.49	0.65	0.84	0.79	0.48	0.58	0.55	0.87	0.21
Alumínio (cmol_c/dm³)	0.00	0.09	0.00	0.07	0.08	0.10	0.06	0.06	0.08	0.00	0.08	0.07	0.07
Soma de Bases (cmol_c/dm³)	3.61	3.17	3.04	3.16	3.30	3.25	3.20	3.54	3.34	3.04	3.17	3.18	2.73
t (cmol_c/dm³)	3.61	3.26	3.04	3.23	3.38	3.35	3.26	3.60	3.42	3.04	3.25	3.25	2.80
Saturação por alumínio (%)	0.0	2.8	0.0	2.2	2.4	3.0	1.8	1.7	2.3	0.0	2.5	2.2	2.5
Matéria Orgânica (dag/kg)	2.57	1.76	1.88	1.76	2.45	2.11	1.65	1.99	1.42	2.45	2.34	2.11	2.22
Carbono Orgânico (dag/kg)	1.49	1.02	1.09	1.02	1.42	1.22	0.96	1.16	0.82	1.42	1.36	1.22	1.29
Areia grossa (dag/kg)	43.20	45.30	47.40	43.40	49.80	46.10	54.70	42.90	52.00	51.00	45.00	52.70	46.90
Areia fina (dag/kg)	34.80	28.70	26.60	30.60	22.20	25.90	15.30	31.10	18.00	21.00	29.00	21.30	25.10
Silte (dag/kg)	6.00	14.00	12.00	12.00	14.00	14.00	16.00	12.00	16.00	12.00	12.00	12.00	14.00
Argila (dag/kg)	16.00	12.00	14.00	14.00	14.00	14.00	14.00	14.00	14.00	16.00	14.00	14.00	14.00

Tabela 8: Continuação.

ATRIBUTOS DO SOLO	AMOSTRAS											
	T3(1)	T3(2)	T3(3)	T3(4)	T4(1)	T4(2)	T4(3)	T4(4)	T5(1)	T5(2)	T5(3)	T5(4)
Fósforo (mg/dm³)	12.1	14.3	13.0	13.4	13.8	14.5	14.3	22.7	16.7	20.6	18.3	25.1
Potássio (mg/dm³)	302.4	302.4	302.4	302.4	313.6	280.0	291.2	302.4	280.0	313.6	302.4	324.8
Cálcio (cmol_c/dm³)	1.65	1.30	1.65	1.79	2.52	2.14	1.59	2.89	2.19	3.12	2.58	3.20
Magnésio (cmol_c/dm³)	0.71	0.92	1.08	0.81	0.64	0.82	1.05	1.11	0.86	0.68	0.78	0.92
Alumínio (cmol_c/dm³)	0.08	0.09	0.00	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Soma de Bases (cmol_c/dm³)	3.14	3.00	3.51	3.38	3.96	3.68	3.39	4.78	3.77	4.60	4.14	4.95
t (cmol_c/dm³)	3.22	3.09	3.51	3.38	3.96	3.75	3.39	4.78	3.77	4.60	4.14	4.95
Saturação por alumínio (%)	2.5	2.9	0.0	0.0	0.0	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Matéria Orgânica (dag/kg)	1.53	1.76	2.91	1.88	2.57	2.34	1.88	2.34	1.99	2.45	1.88	2.22
Carbono Orgânico (dag/kg)	0.89	1.02	1.69	1.09	1.49	1.36	1.09	1.36	1.16	1.42	1.09	1.29
Areia grossa (dag/kg)	53.50	50.80	54.30	54.00	49.40	48.30	43.20	57.40	45.20	47.60	46.20	49.10
Areia fina (dag/kg)	16.50	23.20	21.70	22.00	22.60	31.70	36.80	20.60	40.80	24.40	25.80	24.90
Silte (dag/kg)	16.00	12.00	10.00	8.00	14.00	8.00	8.00	10.00	2.00	14.00	16.00	14.00
Argila (dag/kg)	14.00	14.00	14.00	16.00	14.00	12.00	12.00	12.00	12.00	14.00	12.00	12.00

A análise dos elementos presentes no extrato de cinzas advindas de uma área de floresta inundável poliespecífica em Cáceres permitiu identificar que os níveis mais elevados de metal foram, respectivamente, os do Cálcio ($61,3 \pm 18 \text{ g Kg}^{-1}$), Alumínio ($14,1 \pm 2 \text{ g Kg}^{-1}$), Ferro ($11,8 \pm 0,9 \text{ g Kg}^{-1}$), Magnésio ($9,48 \pm 3 \text{ g Kg}^{-1}$) e Potássio ($6,66 \pm 1,0 \text{ g Kg}^{-1}$) (**Tabela 9**).

Tabela 9: Concentração dos elementos nos extratos de cinzas coletadas em área de floresta inundável poliespecífica na região do Pantanal.

Elementos (g Kg^{-1})	Cinza
Sódio (Na)	$0,420 \pm 0,09$
Magnésio (Mg)	$9,48 \pm 3$
Alumínio (Al)	$14,1 \pm 2$
Potássio (K)	$6,66 \pm 1,0$
Cálcio (Ca)	$61,3 \pm 18$
Manganês (Mn)	$0,727 \pm 0,05$
Ferro (Fe)	$11,8 \pm 0,9$
Níquel (Ni)	$0,0119 \pm 0,001$
Zinco (Zn)	$0,549 \pm 0,03$
Chumbo (Pb)	$0,0413 \pm 0,006$
Cobre (Cu)	$0,0211 \pm 0,002$

2.4. DISCUSSÃO

A ocorrência recorrente de incêndios florestais, responsáveis pela liberação de cinzas no ambiente, aliada a escassez de dados sobre os impactos desse composto nos trópicos, tornam imprescindível elucidar as implicações da presença das cinzas nos ecossistemas tropicais (Nunes, 2010; Garcia, 2004 *apud* Lima, 2010; Brito, 2014; Silva *et al.*, 2016; Pinto *et al.*, 2020). Assim, análises ecotoxicológicas se apresentam como uma importante ferramenta neste cenário, auxiliando na compreensão do efeito das cinzas sobre os organismos, incluindo aqueles pertencentes a fauna edáfica, tendo em vista o acúmulo deste potencial poluente sobre o solo e suas variadas consequências (Magalhães & Ferrão Filho, 2008; Candello, 2014; Nayak *et al.*, 2015). Para tais avaliações, o uso de minhocas tem sido comumente empregado, uma vez que estes organismos detectam uma grande variedade de poluentes dispersos no ambiente (Silva & Van Gestel, 2009; Nunes, 2010). Nesse sentido, no presente estudo, foi verificado o comportamento de evitamento e a ocorrência de efeitos subletais sobre indivíduos da espécie *Eisenia andrei*, além de alterações no fluxo de gases ligados ao efeito estufa, evidenciando um

efeito prejudicial das cinzas sobre a fauna edáfica, embora os testes de toxicidade aguda indiquem que não houve interferência sobre a sobrevivência desses organismos.

Estes resultados indicam que as cinzas coletadas na região do Pantanal apresentaram um baixo potencial de toxicidade sobre os anelídeos, situação representada pelas baixas taxas de mortalidade verificadas durante os testes agudos. Cenário que não corresponde a alguns valores apresentados em trabalhos prévios envolvendo a toxicidade desse poluente. A contaminação do solo com cinzas de combustão, por exemplo, resultou em elevadas taxas de mortalidade em adultos e juvenis de *Eisenia andrei*, situação que os autores apontaram estar correlacionada com a alteração gradativa no pH do solo, devido a presença das cinzas (Kaplan *et al.*, 1980; Grumiaux *et al.*, 2007). Contudo, de modo similar ao visualizado no presente trabalho, os autores também apontaram a ocorrência de um cenário no qual houve uma baixa interferência do poluente sobre a sobrevivência dos anelídeos, nesse caso os indivíduos foram expostos ao solo contaminado com cinzas após o pH estar estabilizado (Grumiaux *et al.*, 2007). Resultados e justificativas semelhantes, também foram expostos no estudo de Blackowicz (2015) para *E. fetida* submetida a cinza de gaseificação de biomassa industrial. Nesse sentido, a mesma explicação poderia ser aplicada aos resultados obtidos com as cinzas do Pantanal. Assim, a baixa mortalidade poderia, portanto, estar ligada ao fato de que o pH sofreu pouca flutuação ao longo dos experimentos, reduzindo o efeito tóxico do poluente.

Ainda, a reduzida mortalidade de *Eisenia andrei* pode estar vinculada a sua alta tolerância ao poluente, além da capacidade das minhocas de acumular elementos tóxicos em formas inertes e eliminar o poluente através da autotomia caudal, comportamento registrado durante o ensaio agudo aqui executado e que já havia sido apontado, anteriormente, para *E. andrei* e *E. fetida* (Rodriguez *et al.*, 2013; Kocinski *et al.*, 2016). Esse processo é hipotetizado como sendo um mecanismo de desintoxicação, através do qual o poluente é acumulado nos segmentos caudais do indivíduo, sendo, posteriormente, expelido no ambiente por meio da autotomia caudal (Vidal & Horne, 2003; Rodriguez *et al.*, 2013). Situação pode justificar o uso de organismos do gênero *Eisenia* como agentes de desintoxicação e reciclagem do ambiente, inclusive para o tratamento de solo contaminado com cinzas (Vidal & Horne, 2003; Sturzenbaum *et al.*, 2012; Suleiman *et al.*, 2017; Mondal *et al.*, 2020). Portanto, esse fato reforça a necessidade de realização de mais estudos para compreender os mecanismos envolvidos nesse processo, além da relação do mesmo com outras demandas ecológicas, como a magnificação trófica.

Ademais, as taxas reduzidas de mortalidade obtidas no teste de toxicidade aguda e as baixas porcentagens de rejeição para algumas concentrações avaliadas no teste de comportamento de fuga, fatores responsáveis pela impossibilidade de se calcular a CL50 e a CE50, podem estar relacionadas com o tempo de armazenamento, a origem e a composição das cinzas utilizadas nos ensaios. Tendo em vista que, esses critérios podem influenciar o nível de toxicidade do composto, além de estarem ligados a possíveis modificações na qualidade do ambiente (Grumiaux *et al.*, 2007; Rombke *et al.*, 2009; Izquierdo & Querol, 2012; Brito, 2014; Silva *et al.*, 2015; Brito *et al.*, 2017; Zajac *et al.*, 2018; Harper *et al.*, 2019).

Dessa forma, considerando que as cinzas frescas, normalmente, são mais tóxicas do que o material já envelhecido e que o material utilizado no presente trabalho já estava armazenado em laboratório há algum tempo, é possível supor que o estágio envelhecido das cinzas coletadas na Baía Caiçara tenha atenuado o efeito tóxico do composto (Rombke *et al.*, 2009). Acrescido a este cenário está o fato de que as cinzas utilizadas para o desenvolvimento dos testes com anelídeos foram coletadas em uma Área de Preservação Permanente (APP), mitigando uma possível exposição à influência antrópica, situação que pode indicar a ausência ou taxas reduzidas de componentes potencialmente tóxicos para os organismos edáficos (Borges *et al.*, 2011; Zajac *et al.*, 2018; Harper *et al.*, 2019). Circunstância corroborada pela análise química das cinzas coletadas em uma área de floresta inundável poliespecífica em Cáceres, que permitiu identificar e quantificar uma série de componentes presentes na amostra testada.

Tendo sido possível verificar que elementos como o cálcio, o potássio e o magnésio foram pontuados como alguns dos componentes mais abundantes, enquanto o manganês, o sódio e o zinco apresentaram proporções menores. Tal situação já era esperada, uma vez que estes elementos, normalmente, são encontrados conforme este padrão em cinzas de incêndios florestais (Bodí *et al.*, 2014; Brito, 2014; Silva *et al.*, 2015; Brito *et al.*, 2017; Harper *et al.*, 2019). Contudo, a amostra analisada contou com concentrações de alumínio e ferro mais elevadas do que o habitual (Bodí *et al.*, 2014). Além disso, embora o magnésio, o cálcio e o potássio não sejam considerados perigosos, elevadas proporções destes componentes, em especial o cálcio, podem exercer significativa influência sobre a toxicidade das cinzas (Brito, 2014; Brito *et al.*, 2017; Harper *et al.*, 2019).

Assim, a composição das cinzas analisadas corrobora o baixo efeito deste componente sobre a mortalidade de anelídeos durante o ensaio agudo. Ainda que elevadas proporções de alguns elementos, como o cálcio, também permitam estabelecer uma correlação entre tais concentrações e as respostas de fuga observadas. Este cenário pode também ser acrescido pela

capacidade das minhocas de acumularem alguns dos metais presentes na amostra, como cobre, chumbo e zinco (Grumiaux *et al.*, 2010). Circunstância que pode justificar a elevada tolerância dos anelídeos às cinzas da Baía Caiçara, resultando em reduzidos efeitos letais, além de elucidar alguns dos efeitos subletais verificados, como a ocorrência de autotomia caudal.

Ainda assim, não é possível descartar completamente a toxicidade das cinzas provenientes de queimadas na região do Pantanal. Corroborando um possível efeito prejudicial do poluente, os ensaios envolvendo o comportamento de fuga indicaram a rejeição dos anelídeos a duas concentrações de cinza testadas, conforme o cálculo da porcentagem de fuga. Sendo possível enfatizar o solo contendo 2437.5 mg/Kg de cinzas, o qual apresentou a maior porcentagem média de rejeição e a presença de anelídeos no solo se aproximou do valor limiar de 20%, estipulado pela ABNT NBR ISO 17512-1:2011, abaixo do qual o solo seria classificado como tendo sua função de habitat limitada, fato que indica certo comprometimento do solo em questão. Situação acrescida ao se considerar a porcentagem de indivíduos presente no solo-teste em cada réplica, evidenciando a existência de solos com função de habitat limitada nas amostras contendo as quatro maiores concentrações de cinza. Tal cenário fica evidente ao se considerar as respostas significativas, através do Teste Exato de Fisher. Dessa forma, é interessante ressaltar a importância de se utilizar ambas as análises, de forma complementar, para avaliar a ocorrência de rejeição. Tendo em vista que a aplicação de ambos os cálculos, no presente trabalho, permitiu evidenciar a ocorrência de comportamento de fuga nas quatro maiores concentrações de cinzas. Ainda, mesmo para os tratamentos em que foi registrada certa preferência pelo solo-teste não é possível desconsiderar a presença de substâncias químicas (ABNT, 2011).

O comportamento de rejeição dos anelídeos a solos contaminados com cinzas, assim como visualizado no presente trabalho, já foi reportado anteriormente. A literatura prévia aponta a adição de cinzas volantes no solo como responsável pelo aumento do comportamento de evasão em minhocas da espécie *Eisenia fetida*, fato que esteve ligado a alterações na textura e composição química dos solos em decorrência da aplicação de cinzas (Jansch *et al.*, 2005; Natal da Luz *et al.*, 2008; Lopareva-Pohu *et al.*, 2011; Demuynck *et al.*, 2014). Tais indícios se assemelham as modificações registradas para o solo contaminado com cinzas de Cáceres, podendo justificar o comportamento de fuga apresentado pelos organismos testados, uma vez que tais alterações podem resultar em reduções na função do solo como habitat e na apetência do substrato para os anelídeos (Lopareva-Pohu *et al.*, 2011; Demuynck *et al.*, 2014). Dessa forma, embora o solo do presente estudo não tenha sofrido alterações aparentes, avaliações

detalhadas sobre a composição química e a estrutura do solo se mostram de grande valia para auxiliar na compreensão do efeito desse composto sobre o ambiente edáfico.

Outrossim, alterações nos atributos do solo devido à presença de cinzas, como redução dos teores de argila, com conseqüente aumento da concentração de silte, e decaimento na presença de matéria orgânica, também foram correlacionadas a possíveis impactos sobre os indivíduos, incluindo a observação de diferentes padrões comportamentais e alterações morfológicas similares ao reportado no presente trabalho, evidenciando que os organismos edáficos apresentaram sensibilidade específica ao poluente avaliado (Lopareva-Pohu *et al.*, 2011; Demuyneck *et al.*, 2014). Efeitos subletais similares já haviam sido reportados para organismos do gênero *Eisenia* expostos a agrotóxicos (Chini, 2014; Nunes, 2010). Tais observações, aliadas ao fato de que análises ligadas a variáveis comportamentais, como o teste de fuga, apresentam maior sensibilidade do que os testes que envolvem a sobrevivência dos indivíduos, evidenciam a importância da aplicação de avaliações envolvendo respostas comportamentais e morfológicas para análises de risco (Silva & Van Gestel, 2009; Nunes, 2010).

O fato de que o ensaio de comportamento de fuga apresenta maior sensibilidade do que os testes envolvendo a sobrevivência dos indivíduos se apresenta como um fundamento para a discrepância entre os testes aqui realizados (Schaefer, 2003; Silva & Van Gestel, 2009; Nunes, 2010). Uma vez que, embora tenha sido possível o estabelecimento de similaridades entre os dois testes aplicados no presente estudo, como a identificação de aglomerados de anelídeos, os ensaios apresentaram um distinto padrão de resposta acerca da avaliação do efeito das cinzas nos indivíduos. Essa divergência também foi reportada em trabalhos prévios envolvendo diferentes compostos, nos quais, mesmo não tendo ocorrido efeitos letais sobre os anelídeos durante as avaliações de toxicidade aguda, os testes de comportamento de fuga registraram elevadas taxas de rejeição (Reinecke *et al.*, 2002; Owojori & Reinecke, 2009; Nunes, 2010; Chini, 2014). Dessa forma, embora os testes de sobrevivência sejam usados em maior frequência, eles se mostram mais indicados para a avaliação de solos contaminados com concentrações mais altas, enquanto proporções reduzidas do poluente podem ser avaliadas através de métodos mais sensíveis (Yasmin & D'Souza, 2010). Situação que salienta a problemática do uso exclusivo de avaliações de toxicidade para a análise de risco dos poluentes, além de apontar os testes de rejeição como uma ferramenta de triagem inicial, visando analisar os potenciais impactos de poluentes nos trópicos (Schaefer, 2003; Garcia *et al.*, 2008; Marques *et al.*, 2009; Owojori & Reinecke, 2009; Silva & Van Gestel, 2009; Nunes, 2010).

Estas análises podem, ainda, ser acrescidas por testes de reprodução, considerando que eles são ainda mais sensíveis do que os ensaios de evitamento, sendo apontados como detentores de uma maior relevância ecológica (Garcia *et al.*, 2008; Marques *et al.*, 2009; Owojori & Reinecke, 2009; Silva & Van Gestel, 2009; Nunes, 2010). Tal circunstância, aliada aos registros de comportamento de cópula e presença de casulos nos solos contaminados durante ambos os testes executados, evidencia a necessidade de análises mais detalhadas acerca dos efeitos fisiológicos das cinzas sobre os organismos edáficos. Adicionalmente, de maneira a corroborar esta demanda, alguns autores apontaram a presença de cinzas como um fator prejudicial para a reprodução de *Eisenia andrei*, tendo sido reportada uma menor produção de casulos, ausência de eclosão dos mesmos e redução no número de filhotes (Grumiaux *et al.*, 2007; Grumiaux *et al.*, 2010). Assim, é notória a importância de se analisar os efeitos subletais durante as avaliações ecotoxicológicas.

Adicionalmente, a ausência de uma resposta ligada a curva dose-resposta tradicional no ensaio de comportamento de fuga, embora desvie da relação sigmoideal normalmente apresentada, já havia sido reportada em outros trabalhos envolvendo *Eisenia andrei* (Clotfelter *et al.*, 2004; Candello, 2014). Situação que deixa de ser atípica ao se considerar a ocorrência de uma subnotificação das respostas envolvendo curvas não lineares, uma vez que estes resultados contradizem a relação padrão estabelecida pelo dogma toxicológico (Calabrese & Baldwin, 2003; Candello, 2014). Dessa forma, as avaliações ecotoxicológicas, como a aqui apresentada, devem também levar em consideração a possibilidade de ocorrência dos efeitos horméticos, sendo possível visualizar uma curva dose-resposta com comportamento bifásico (Calabrese & Baldwin, 2003; Calabrese *et al.*, 2007).

No caso presente, em que foi registrada a ocorrência de uma curva não linear como resposta de rejeição para a contaminação do solo com cinzas de Cáceres, uma possível justificativa está associada ao movimento coletivo dos anelídeos. Explicação pautada em postulados prévios, nos quais os autores apresentam a existência, em indivíduos do gênero *Eisenia*, de estruturas sociais auto-organizadas (Zirbes *et al.*, 2012; Demuyneck *et al.*, 2014). Comportamento que poderia influir sobre a resposta dos anelídeos quando expostos a um agente estressor, uma vez que o efeito do poluente sobre o indivíduo pode ser influenciado pela presença de coespecíficos (Zirbes *et al.*, 2010; Demuyneck *et al.*, 2014). Assim, uma possível alternativa é o estabelecimento de testes individuais, seguindo os mesmos parâmetros estabelecidos para os testes em grupo, tendo em vista a maior sensibilidade das respostas individuais do que as de grupo (Demuyneck *et al.*, 2014). Além disso, há de se considerar a

formação de aglomerados, comportamento recorrente durante os ensaios de fuga e de toxicidade aguda aqui executados, como um dos fatores responsáveis pela curva dose-resposta não tradicional. Tal reação outorga uma maior proteção as minhocas e proporciona um aumento na taxa de sobrevivência, sendo este, portanto, um possível indicativo de um efeito prejudicial das cinzas sobre esses organismos (Natal da Luz *et al.*, 2008; Zirbes *et al.*, 2010).

Por fim, além dos efeitos letais e subletais resultantes da presença de cinzas do Pantanal no solo, a análise do fluxo de gases permitiu compreender um pouco mais o impacto desse composto no ecossistema. Tendo sido possível perceber que o solo se manteve sempre como um consumidor de metano, independente do tratamento ou do tempo de exposição às cinzas, situação que pode estar ligada a uma baixa atividade microbiana e a estabilidade do pH do solo (Klemedtsson *et al.*, 2010). Além disso, a presença de anelídeos não ter interferido no fluxo desse gás, resultado este que concorda com o exposto em trabalhos anteriores, segundo os quais o efeito das minhocas na emissão do metano ainda requer um maior detalhamento, embora estes organismos não gerem alterações significativas no fluxo do gás (Bradley *et al.*, 2012; Lubbers *et al.*, 2013). No que se refere ao ligeiro aumento na emissão de CH₄ entre o terceiro e o decimo terceiro dia de experimento, é possível que tal circunstância esteja relacionada a pequenas flutuações de temperatura do ambiente (Klemedtsson *et al.*, 2010).

No que se refere ao fluxo de gás carbônico, a presença de indivíduos do gênero *Eisenia* resultou em um aumento de sua emissão, situação acrescida pela adição de cinzas ao substrato avaliado, sendo possível notar que o composto testado levou o solo da condição de consumidor de CO₂ para a de emissor, conforme o aumento da concentração de cinzas. Tais resultados concordam com análises prévias acerca da interferência dos anelídeos na emissão de gases relacionados ao efeito estufa, tendo sido apontado um aumento na emissão de dióxido de carbono na presença de minhocas (Lubbers *et al.*, 2013). Em contrapartida, o presente trabalho permitiu o registro de um decréscimo na liberação de dióxido de carbono ao longo do experimento. Resultado similar ao apresentado anteriormente, corroborando o fato de que a presença de cinzas no solo, a longo prazo, propicia uma redução na emissão de CO₂, tendo em vista que fatores, como o tempo, tem forte influência sobre o fluxo desse gás (Klemedtsson *et al.*, 2010; Lubbers *et al.*, 2013). Fato que, assim como o metano, pode ser justificado pela redução da atividade microbiana no solo devido a presença de cinzas, especialmente ao se considerar a presença de metais na composição do material. Nesse mesmo sentido, a baixa disponibilidade de carbono no solo, após os 14 dias de exposição as cinzas, também pode indicar uma baixa taxa de atividade microbiana, novamente, justificando as modificações

visualizadas nas emissões de gases relacionados ao efeito estufa (Klemedtsson *et al.*, 2010). Dessa forma, estudos envolvendo a comunidade microbiana se fazem necessários para melhor compreender a dinâmica do solo contaminado com cinzas.

2.5. CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados permitiram a identificação de possíveis efeitos importantes das cinzas provenientes de queimadas sobre o ecossistema e os organismos edáficos encontrados nos trópicos, sendo possível destacar às respostas subletais dos indivíduos ao poluente, como modificações comportamentais e morfológicas, e o impacto do composto sobre o fluxo de gases ligados ao efeito estufa, proporcionando um aumento na emissão de dióxido de carbono na atmosfera. A toxicidade, avaliada em um dos testes do presente estudo, foi menor do que a averiguada na literatura prévia, fato que, provavelmente, está ligado a questões vinculadas às cinzas, como sua origem, composição, tempo de armazenamento e interferências nas características químicas do solo, e aos anelídeos, os quais apresentam uma alta tolerância a alguns compostos em baixas doses e podem armazená-los em formas inertes nos seus tecidos corporais. Tal característica do gênero *Eisenia* evidencia o potencial desses organismos para a desintoxicação e reciclagem do ambiente, incluindo a revitalização do solo contaminado com cinzas. Ainda, a observação da ocorrência de modificações no padrão comportamental e alterações morfológicas dos anelídeos demonstram a importância de se utilizar organismos tolerantes, que permitem melhor compreender o efeito de um potencial poluente sobre o ambiente e seus organismos.

Os efeitos subletais observados após 14 dias de exposição ao poluente se mostram de grande valia para uma melhor compreensão do efeito das cinzas sobre os organismos. Nesse sentido, seria fortuito incluir, futuramente, avaliações de reprodução em anelídeos expostos a cinzas de queimadas, permitindo um melhor entendimento dos impactos desse poluente na fisiologia dos indivíduos. Além disso, a realização de análises de toxicidade crônica, permitindo a avaliação de impactos a longo prazo, e a exposição dos organismos a concentrações mais elevadas de cinzas também poderiam ajudar a elucidar, de maneira mais ampla, os efeitos desse poluente no ambiente edáfico.

O ensaio de comportamento de fuga permitiu a observação de efeitos subletais sobre o comportamento de *Eisenia andrei* quando expostas a cinzas de queimadas. A resposta dos organismos a presença do poluente, provavelmente, esteve vinculada a alterações na textura e composição química do solo. Contudo, os resultados do presente trabalho não dispuseram de

uma curva dose-resposta tradicional, fato que pode estar ligado a presença de coespecíficos, interferindo na resposta de um indivíduo ao agente estressor. Assim, considerando a importância dos testes subletais para uma compreensão inicial dos efeitos de um potencial poluente, a realização de testes de evitação com indivíduos isolados pode auxiliar na compreensão do impacto das cinzas sobre o comportamento dos organismos edáficos, uma vez que estas avaliações dispõem de maior sensibilidade.

A observação do fluxo de gases relacionados ao efeito estufa possibilitou identificar a influência de anelídeos e das cinzas de queimadas sobre a emissão de gases do solo contaminado. A verificação do fluxo de metano apresentou pouca alteração, independente da presença de minhocas ou da adição de cinzas. Em contrapartida, a emissão de dióxido de carbono foi acentuada pela presença de organismos do gênero *Eisenia* e apresentou um crescimento ainda maior conforme houve a adição de cinzas. Embora o fluxo deste gás tenha sofrido um declínio com o passar dos dias. Assim, fica evidente que a problemática gerada pelas cinzas não se restringe ao ambiente edáfico, gerando impactos diretos e indiretos sobre os demais ecossistemas. Dessa forma, análises do impacto desse poluente sobre outros ambientes se mostram necessárias. Além disso, estudos envolvendo a relação do solo contaminado por cinzas com o fluxo de outros gases e ao longo de um tempo mais extenso podem auxiliar na compreensão dos demais efeitos desse poluente no ecossistema edáfico.

2.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15537-1/2007: Ecotoxicologia terrestre – Ecotoxicologia aguda – Método de ensaio com minhocas. Brasil, 2007.

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

ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15537/2014: Ecotoxicologia terrestre: Toxicidade aguda: Método de ensaio com minhocas (Lumbricidae). Rio de Janeiro, 2014.

ALMEIDA, R. M., NOBREGA, G. N., JUNGER, P. C., FIGUEIREDO, A. V., ANDRADE, A. S., MOURA, C. G. B., TONETTA, D., OLIVEIRA Jr., E. S., ARAUJO, F., RUST., F.,

PINEIRO-GUERRA, J. M., MENDONÇA Jr., J. R., MEDEIROS, L. R., PINHEIRO, L., MIRANDA, M., COSTA, M. R. A., MELO, M. L., NOBRE, R. L. G., BENEVIDES, T., ROLAND, F., KLEIN, J., BARROS, N. O., MENDONÇA, R., BECKER, V., HUSZAR, V. L. M., KOSTEN, S. High Primary Production Contrasts with Intense Carbon Emission in a Eutrophic Tropical Reservoir. *Frontiers in Microbiology*, v.7, n.717, 2016. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00717

ANDRÉA, M. M. O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos. *Acta Zoológica Mexicana*, n.2, p.95-107, 2010.

BLACKOWICZ, M. J. The Effects of Industrial Biomass Gasification Ash as a Soil Amendment on the Earthworm *Eisenia fetida*. Masters Theses – Eastern Illinois University, 2015.

BODÍ, M. B., MARTIN, D. A., BALFOUR, V. N., SANTÍN, C., DOERR, S. H., PEREIRA, P., CERDA, A., MATAIX-SOLERA, J. Wildland fire ash: production, composition and eco-hydro-geomorphic effects. *Earth-Science Reviews*, v.130, p.103–127, 2014. DOI: 10.1016/J.EARSCIREV.2014.07.005

BORALI, M. P. Eficiência da vermicompostagem para um composto de lixo orgânico urbano consorciado com resíduo do processamento de derivados de carne de bovinos e suínos, enriquecidos com fertilizantes minerais. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

BORGES, L. A. C., REZENDE, J. L. P., PEREIRA, J. A. A., JÚNIOR, L. M. C., BARROS, D. A. Areas of permanente preservation in Brazilian environmental legislation. *Ciência Rural*, v.41, n.7, 2011. DOI: 10.1590/S0103-84782011000700016

BRADLEY, R. L., CHRONAKOVA, A., ELHOTTOVA, D., SIMEK, M. Interactions between land-use history and earthworms control gross rates of soil methane production in an overwintering pasture. *Soil Biology and Biochemistry*, v.53, p.64-71, 2012. DOI: 10.1016/j.soilbio.2012.04.025

BRITO, D. Q. D. Avaliação ecotoxicológica das cinzas de queimadas do Cerrado em ambientes aquáticos. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Rural), Universidade de Brasília. Planaltina-DF, p.120, 2014.

BRITO, D. Q., PASSOS, C. J. S., MUNIZ, D. H. F., OLIVEIRA-FILHO, E. C. Aquatic ecotoxicity of ashes from Brazilian savana wildfires. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017. DOI: 10.1007/s11356-017-9578-0

BROWN, G.G., DOMÍNGUEZ, J. Uso das minhocas como bioindicadoras ambientais: princípios e práticas – o 3º Encontro Latino Americano de Ecologia e Taxonomia de Oligoquetas (ELAETAO3). *Acta Zoológica Mexicana*, v.26, n.2, p.1-18, 2010.

CALABRESE, E. J., BALDWIN, L. A. Toxicology rethinks its central belief. *Nature*, v.421, p.691-692, 2003. DOI: 10.1038/421691a

CALABRESE, E. J., BACHMANN, K. A., BAILER, A. J., BOLGER, P. M., BORAK, J., CAI, L., CEDERGREEN, N., CHERIAN, M. G., CHIUEH, C. C., CLARKSON, T. W., COOK, R. R., DIAMOND, D. M., DOOLITTLE, D. J., DORATO, M. A., DUKE, S. O., FEINENDEGEN, L., GARDNER, D. E., HART, R. W., HASTINGS, K. L., HAYES, A. W., HOFFMANN, G. R., IVES, J. A., JAWOROWSKI, Z., JOHNSON, T. E., JONAS, W. B., KAMINSKI, N. E., KELLER, J. G., KLAUNIG, J. E., KNUDSEN, T. B., KOZUMBO, W. J., LETTIERI, T., LIU, S. Z., MAISSEU, A., MAYNARD, K. I., MASORO, E. J., MCCLELLAN, R. O., MEHENDALE, H. M., MOTHERSILL, C., NEWLIN, D. B., NIGG, H. N., OEHME, F. W., PHALEN, R. F., PHILBERT, M. A., RATTAN, S. I. S., RIVIERE, J. E., RODRICKS, J., SAPOLSKY, R. M., SCOTT, B. R., SEYMOUR, C., SINCLAIR, D. A., SMITHSONNEBORN, J., SNOW, E. T., SPEAR, L., STEVENSON, D. E., THOMAS, Y., TUBIANA, M., WILLIAMS, G. M., MATTSON, M. P. Biological stress response terminology: Integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose–response framework. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.222, n.1, p.122–128, 2007. DOI: 10.1016/j.taap.2007.02.015

CANDELLO, F. P. Comportamento de fuga de minhocas na presença do antimicrobiano sulfadiazina em solo. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, p.78, 2014.

CASTELLANOS, L. R., HERNANDEZ, J. C. A. Earthworm biomarkers of pesticide contamination: Current status and perspectives. *Journal of Pesticide Science*, v.32, p.360-371, 2007. DOI: 10.1584/jpestics.R07-14

CASTELÕES, L. Pesquisas comprovam efeitos danosos das cinzas de queimadas no solo e na água. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Cerrados, Planaltina – DF, 29 jan. 2019. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/40809567/pesquisas-comprovam-efeitos-danosos-das-cinzas-de-queimadas-no-solo-e-na-agua> >. Acesso em 02 de fev. de 2022.

CHANG, A. C., LUND, L. J., PAGE, A. L., WARNEKE, J. E. Physiscal Properties of Fly Ash-Amended Soils. *Journal of Environment Quality*, v.6, n.3, p.267-270, 1977. DOI: 10.2134/jeq1977.00472425000600030007

CHINI, P. Uso de minhocas da espécie *Eisenia fetida*, como bioindicadoras em solos contaminados com agrotóxicos. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária), Universidade do Sul de Santa Catarina. Palhoça, p.75, 2014.

CLOTFELTER, E. D., BELL, A. M., LEVERING, K. R. The role of animal behaviour in the study of endocrine-disrupting chemicals. *Animal Behaviour*, v.68, n.4, p.665-676, 2004. DOI: 10.1016/j.anbehav.2004.05.004

CURRY, J. P. Factors affecting the abundance of earthworms in soils. In: C. A. Edwards (Ed.). *Earthworm ecology*. 2nd Ed. CRC Press, Boca Raton, p. 91-113, 2004. DOI: 10.1201/9781420039719.pt3

DEMIRBAS, A. Heavy Metal Contents of Fly Ashes from Selected Biomass Samples. *Energy Sources*, v.27, p.1269-1276, 2005. DOI: 10.1080/009083190519384

DEMUYNCK, S., SUCCIU, I. R., GRUMIAUX, F., DOUAY, F., LEPRETRE, A. Effects of field metal-contaminated soils submitted to phytostabilisation and fly ash-aided phytostabilisation on the avoidance behaviour of the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.107, p.170-177, 2014. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.05.011

FERREIRA, D. G. Biorremediação de Solo Argiloso Contaminado com Gasolina Aditivada com Diferentes Teores de Etanol. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

FILHO, W. L., AZEITEIRO, U. M., SALVIA, A. L., FRITZEN, B., LIBONATI, R. Fire in Paradise: Why the Pantanal is burning. *Environmental Science & Policy*, v.123, p.31-34, 2021. DOI: 10.1016/j.envsci.2021.05.005

FRAGOSO, C., LAVELLE, P., BLANCHART, E., SENAPATI, B. K., JIMÉNEZ, J. J., MARTÍNEZ, M. A., DECAENS, T., TONDOH. J. Earthworm communities of tropical agroecosystems: origin, structure and influence of management practices. In: LAVELLE, P., BRUSSAARD L., HENDRIX, P. F. (Eds). *Earthworm management in tropical agroecosystems*. CABI, Wallingford, p. 27-55, 1999.

GARCIA, M., ROMBKE, J., BRITO, M. T., SCHEFFCZYK, A. Effects of three pesticides on the avoidance behavior of earthworms in laboratory tests performed under temperate and tropical conditions. *Environmental Pollution*, v.153, n.2, p.450-456, 2008.

GRUMIAUX, F., DEMUYNCK, S., SCHIKORSKI, D., LEMIERE, S., LEPRETRE, A. Assessing the effects of FBC ash treatments of metal-contaminated soils using life history traits and metal bioaccumulation analysis of the earthworm *Eisenia andrei*. *Chemosphere*, v.79, n.2, p.156-161, 2010. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2010.01.018

GRUMIAUX, F., DEMUYNCK, S., SCHIKORSKI, D., LEMIERE, S., VANDENBULCKE, F., LEPRETRE, A. Effect of fluidized bed combustion ashes used in metal polluted soil remediation on life history traits of the oligochaeta *Eisenia andrei*. *European Journal of Soil Biology*, v.43, p.256-260, 2007. DOI: 10.1016/j.ejsobi.2007.08.038

HARPER, A. R., SANTIN, C., DOERR, S. H., FROYD, C. A., ALBINI, D., OTERO, X. L., VINAS, L., PEREZ-FERNANDEZ, B. Chemical composition of wildfire ash produced in contrasting ecosystems and its toxicity to *Daphnia magna*. *International Journal of Wildland Fire*, v.28, p.726-737, 2019. DOI: 10.1071/WF18200

HARTEMINK, A. E. The Definition of Soil Since the Early 1800s. *Advances in Agronomy*, v.137, p.73-126, 2016. DOI: 10.1016/bs.agron.2015.12.001

HINTON, J. Earthworms as a bioindicator of mercury pollution in an artisanal gold mining community, Cachoeira do Piriá, Brazil. Dissertação (Mestrado em Ciência Aplicada) – Institute of Mining Engineering, University of British Columbia, p.136, 2002.

IZQUIERDO, M., QUEROL, X. Leaching behaviour of elements from coal combustion fly ash: An overview. *International Journal of Coal Geology*, v.94, p.54-66, 2012. DOI: 10.1016/j.coal.2011.10.006

JANSCH, S., AMORIM, M. J., ROMBKE, J. Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. *Environmental Reviews*, v.13, n.2, 2005. DOI: 10.1139/a05-007

JUNGKUNST, H. F., FIEDLER, S. Latitudinal differentiated water table control of carbon dioxide, methane and nitrous oxide fluxes from hydromorphic soils: feedbacks to climate change. *Global Change Biology*, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2486.2007.01459.x

KAPANEN, A., ITAVAARA, M. Ecotoxicity tests for compost applications. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 49, p.1-16. 2001. DOI: 10.1006/eesa.2000.1927

KAPLAN, D. L., HARTENSTEIN, R., NEUHAUSER, E. F., MALECKI, M. R. Physicochemical requirements in the environment of the earthworm *Eisenia foetida*. *Soil Biology and Biochemistry*, v.12, n.4, p.347-352, 1980. DOI: 10.1016/0038-0717(80)90008-5

KLEMEDTSSON, L., ERNFORS, M., BJORK, R. G., WESLIEN, P., RUTTING, T., CRILL, P., SIKSTROM, U. Reduction of greenhouse gas emissions by wood ash application to a *Picea abies* (L.) Karst. Forest on a drained organic soil. *European Journal of Soil Science*, v.61, n.5, 2010.

KOCINSKI, M., TAKACS, V., MOLNAR, L., MORGAN, A. J., BIGAJ, J., PLYTYCZ, B. Experimental induction of autotomy in two potential model lumbricid earthworms *Eisenia andrei* and *Aporrectodea caliginosa*. *Invertebrate Survival Journal*, v.13, p.11-17, 2016. DOI: 10.25431/1824-307X/isj.v13i1.11-17

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

LOPAREVA-POHU, A., POURRUT, B., WATERLOT, C., GARÇON, G., BIDAR, G., PRUVOT, C., SHIRALI, P., DOUAY, F. Assessment of fly ash-aided phytostabilisation of highly contaminated soils after an 8-year field trial: Part 1. Influence on soil parameters and

metal extractability. *Science of The Total Environment*, v.409, n.3, p.647-654, 2011. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2010.10.040

LOUREIRO, S., SOARES, A. M. V. M., NOGUEIRA, A. J. A. Terrestrial avoidance behaviour tests as screening tool to assess soil contamination. *Environmental Pollution*, v.138, p.121-131, 2005. DOI: 10.1016/j.envpol.2005.02.013

LUBBERS, I. M., GROENIGEN, K. J. V., FONTE, S. J., SIX, J., BRUSSAARD, L., GROENIGEN, J. W. V. Greenhouse-gas emissions from soils increased by earthworms. *Nature Climate Change*, v.3, p.187-194, 2013. DOI: 10.1038/nclimate1692

MACHADO, B. R. Avaliação da toxicidade ambiental do agrotóxico Glifosato em solo utilizando como bioindicador minhocas da espécie *Eisenia andrei*. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenheiro Ambiental e Sanitarista) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

MAGALHÃES, D. P. & FERRÃO-FILHO, A. S. Ecotoxicology as a tool to monitoring aquatic systems. *Oecologia Brasiliensis*, v.12, n.3, p.355-381, 2008.

MARQUES, C., PEREIRA, R., GONÇALVES, F. Using earthworm avoidance behaviour to assess the toxicity of formulated herbicides and their active ingredients on natural soils. *Journal of Soils and Sediments*, v.9, p.137-147, 2009. DOI: 10.1007/s11368-009-0058-0

MER, J. L., ROGER, P. Production, oxidation, emission and consumption of methane by soils: A review. *European Journal of Soil Biology*, v.37, n.1, p.25-50, 2001. DOI: 10.1016/S1164-5563(01)01067-6

MONDAL, A., GOSWAMI, L., HUSSAIN, N., BARMAN, S., KALITA, E., BHATTACHARYYA, P., BHATTACHARYYA, S. S. Detoxification and eco-friendly recycling of brick kiln coal ash using *Eisenia fetida*: A clean approach through vermitechnology. *Chemosphere*, v.244, 2020. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.125470

NATAL-DA-LUZ, T., RIBEIRO, R., SOUSA, J. P. Avoidance tests with collembola and earthworms as early screening tools for site-specific assessment of polluted soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.23, p.2188-2193, 2004. DOI: 10.1897/03-445

NATAL-DA-LUZ, T., ROMBKE, J., SOUSA, J. P. Avoidance tests in site-specific risk assessment: influence of soil properties on the avoidance response of collembola and earthworms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.27, p.1112-1117, 2008. DOI: 10.1897/07-386.1

NAYAK, A. K., RAJA, R., RAO, K. S., SHUKLA, A. K., MOHANTY, S., SHAHID, M., TRIPATHI, R., PANDA, B. B., BHATTACHARYYA, P., KUMAR, A., LAL, B., SETHI, S. K., PURI, C., NAYAK, D., SWAIN, C. K. Effect of fly ash application on soil microbial response and heavy metal accumulation in soil and rice plant. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.114, p.257-262, 2015. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.03.033

NIVA, C. C., BROWN, G. G. *Ecotoxicologia terrestre: métodos e aplicações dos ensaios com oligoquetas*. 1ed. Brasília, DF: Embrapa, 258p., 2019.

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

NUNES, M. E. T., ESPÍNDOLA, E. L. G. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. *Ecotoxicology*, v.21, p.1063-1071, 2012. DOI: 10.1007/s10646-012-0859-6

OERTEL, C., MATSCHULLAT, J., ZURBA, K., ZIMMERMANN, F., ERASMI, S. Greenhouse gas emissions from soils – A review. *Geochemistry*, v.76, n.3, p.327-352, 2016. DOI: 10.1016/j.chemer.2016.04.002

OLIVEIRA, E. M., COSTA, F. X., COSTA, C. C. Reprodução de minhoca (*Eisenia foetida*) em diferentes substratos. *Caatinga (Mossoró, Brasil)*, v.21, n.5, p.146-150, 2008.

OWOJORI, O. J., REINECKE, A. J. Avoidance behaviour of two eco-physiologically different earthworms (*Eisenia fetida* and *Aporrectodea caliginosa*) in natural and artificial saline soils. *Chemosphere*, v.75, n.3, p.279-283, 2009. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.12.051

PAPINI, S., ANDREA, M. M. Ação de minhocas *Eisenia foetida* sobre a dissipação dos herbicidas simazina e paraquat aplicados no solo. Revista Brasileira de Ciência do Solo, n.28, p.67-73, 2004. DOI: 10.1590/S0100-06832004000100007

PINTO, M. M., LIBONATI, R., TRIGO, R. M., TRIGO, I. F., DACAMARA, C. C. A deep learning approach for mapping and dating burned areas using temporal sequences of satellite images. ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing, v.160, p.206-274, 2020. DOI: 10.1016/j.isprsjprs.2019.12.014

PRAHARAJ, T., POWELL, M. A., HART, B. R., TRIPATHY, S. Leachability of elements from sub-bituminous coal fly ash from India. Environment International, v.27, p.609-615, 2002. DOI: 10.1016/S0160-4120(01)00118-0

RASTOGI, M., SINGH, S., PATHAK, H. Emission of carbon dioxide from soil. Current Science, v.82, n.5, p.510-517, 2002.

REINECKE, A. J., MABOETA, M. S., VERMEULEN, L. A., REINECKE, S. A. Assessment of Lead Nitrate and Mancozeb Toxicity in Earthworms Using the Avoidance Response. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v.68, p.779-786, 2002. DOI: 10.1007/s00128-002-0023-8

RIBEIRO, A. C., GUIMARÃES, P. T., VENEGAZ, V. H. A 5ª Aproximação-Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais. Editora UFV, Viçosa, Minas Gerais, 1999.

RINKE, K. H., WIECHERING, H. Earthworms avoidance test for soils assessments: an alternative for acute and reproduction tests. Journal of Soils and Sediments, v.1, n.1, p.15-20, 2001. DOI: 10.1007/BF02986464

RODRIGUEZ, M. G., RIVERA, B. H., VENTURA-JUÁREZ, J., MUÑOZ-ORTEGA, M. H. Cadmium toxicity evaluation in the earthworm *Eisenia foetida*: behavior and histopathological effects. Trends in Comparative Biochem & Physiol, v.17, 2013.

ROMBKE, J., MOSER, Th., MOSER, H. Ecotoxicological characterisation of 12 incineration ashes using 6 laboratory tests. Waste Management, v.29, n.9, p.2475-2482, 2009. DOI: 10.1016/j.wasman.2009.03.032

SANTO, F. B., RAMOS, G. A., FILHO, A. M. R., MARCHIORO, C. A., NIEMEYER, J. C. Ecotoxicity of the isoxaflutole herbicide to soil invertebrates. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v.19, n.2, 2020. DOI: 10.5965/223811711922020217

SCHAEFER, M. Behavioural endpoints in earthworm ecotoxicology: Evaluation of different test systems in soil toxicity assessment. *Journal of Soils and Sediments*, v.3, p.79-84, 2003. DOI: 10.1007/BF02991072

SHIPITALO, M. J., BAYON, R. C. Quantifying the effects of earthworms on soil aggregation and porosity. In: EDWARDS C.A. (Ed.). *Earthworm ecology*. 2nd Ed. CRC Press, Boca Raton, p.183-200, 2004. DOI: 10.1201/9781420039719.pt5

SHUSTER, W. D., SUBLER, S., MCCOY, E. L. The influence of earthworm community structure on the distribution and movement of solutes in a chisel-tilled soil. *Applied Soil Ecology*, v.21, p.159-167, 2002. DOI: 10.1016/S0929-1393(02)00063-X

SMITH, K. A., BALL, T., CONEN, F., DOBBIE, K. E., MASSHEDER, J., REY, A. Exchange of greenhouse gases between soil and atmosphere: interactions of soil physical factors and biological processes. *European Journal of Soil Science*, v.69, n.1, 2018. DOI: 10.1111/ejss.12539

SILVA, P. M. C. S., VAN GESTEL, C. A. M. Comparative sensitivity of *Eisenia andrei* and *Perionyx excavatus* in earthworm avoidance tests using two soil types in the tropics. *Chemosphere*, v.77, n.11, p.1609-1613, 2009. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.09.034

SILVA, V., ABRANTES, N., COSTA, R., KEIZER, J. J., GONÇALVES, F., PEREIRA, J. L. Effects of ash-loaded post-fire runoff on the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Ecological Engineering*, v.90, p.180-189, 2016. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2016.01.043

SILVA, V., PEREIRA, J. L., CAMPOS, I., KEIZER, J. J., GONÇALVES, F., ABRANTES, N. Toxicity assessment of aqueous extracts of ash from forest fires. *CATENA*, v.135, p.401-408, 2015. DOI: 10.1016/j.catena.2014.06.021

SPADOTTO, C. A., GOMES, M. A. F., LUCHINI, L. C., ANDRÉA, M. M. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. Embrapa Meio Ambiente, Documentos No. 42. Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, 2004.

SPENCER C.N., GABEL K.O., HAUER, F.R. Wildfire effects on stream food webs and nutrient dynamics in Glacier National Park, USA. *Forest Ecology and Management*, p.141–153, 2003. DOI: 10.1016/S0378-1127(03)00058-6

STURZENBAUM, S. R., HOCKNER, M., PANNEERSELVAM, A., LEVITT, J., BOUILLARD, J. S., TANIGUCHI, S., DAILEY, L. A., KHANBEIGI, R. A., ROSCA, E. V., THANOU, M., SUHLING, K., ZAYATS, A. V., GREEN, M. Biosynthesis of luminescent quantum dots in an earthworm. *Nature Nanotechnology*, v.8, p.57-60, 2012. DOI: 10.1038/nnano.2012.232

SULEIMAN, H., RORAT, A., GROBELAK, A., GROSSER, A., MILCZAREK, M., PLYTYCZ, B., KACPRZAK, M., VANDENBULCKE, F. Determination of the performance of vermicomposting process applied to sewage sludge by monitoring of the compost quality and immune responses in three earthworm species: *Eisenia fetida*, *Eisenia andrei* and *Dendrobaena veneta*. *Bioresource Technology*, v.241, p.103-112, 2017. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.05.104

VIDAL, D. E., HORNE, A. J. Mercury Toxicity in the Aquatic Oligochaete *Sparganophilus pearsei*. II: Autotomy as a Novel Form of Protection, v.45, p.462-467, 2003. DOI: 10.1007/s00244-003-2119-5

VIJVER, M. G., VINK, J. P. M., MIERMANS, C. J. H., VAN GESTEL, C. A. M. Oral sealing using glue: a new method to distinguish between intestinal and dermal uptake of metals in earthworms. *Soil Biology and Biochemistry*, v.35, p.125-132, 2003. DOI: 10.1016/S0038-0717(02)00245-6

VERMA, C., VERMA, R. Leaching Behaviour of Fly Ash: A Review. *Nature Environment and Pollution Technology*, v.18, n.2, p.403-412, 2019.

YASMIN, S., D'SOUZA, D. Effects of Pesticides on the Growth and Reproduction of Earthworm: A Review. *Applied and Environmental Soil Science*, 2010. DOI: 10.1155/2010/678360

YEARLEY, R. B., LAZORCHAK, J. M., GAST, L. C. The potential of an earthworms avoidance test for evaluation of hazardous waste sites. *Environmental Toxicology and chemistry*, v.15, n.9, p.1532-1537, 1996. DOI: 10.1002/etc.5620150915

ZAJAC, G., SZYSZLAK-BARGLOWICZ, J., GOLEBIEWSKI, W., SZCZEPANIK, M. Chemical Characteristics of Biomass Ashes. *Energies*, v.11, n.11, 2018. DOI: 10.3390/en11112885

ZHANG, Q., WANG, C. Natural and Human Factors Affect the Distribution of Soil Heavy Metal Pollution: a Review. *Water Air Soil Pollut*, v.231, 2020. DOI: 10.1007/s11270-020-04728-2

ZIRBES, L., DENEUBOURG, J., BROSTAU, Y., HAUBRUGE, E. A new case of consensual decision: Collective movement in earthworms. *Ethology*, v.116, n.6, p.546-553, 2010. DOI: 10.1111/j.1439-0310.2010.01768.x

ZIRBES, L., BROSTAU, Y., MESCHER, M., JASON, M., HAUBRUGE, E., DENEUBOURG, J. Self-assemblage and quorum in the earthworm *Eisenia fetida* (oligochaete, lumbricidae). *PLoS ONE*, v.7, n.3, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0032564

3. CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE CINZAS PROVENIENTES DE INCÊNDIOS FLORESTAIS EM ZONAS ÚMIDAS TROPICAIS SOBRE OS CORPOS HÍDRICOS

3.1. INTRODUÇÃO

A contaminação dos recursos hídricos em decorrência de atividades antrópicas é uma situação que está presente a gerações, embora só tenha atraído atenção após os ecossistemas aquáticos atingirem um limite, se tornando perceptível os impactos gerados sobre o ambiente e os seus organismos (Freire *et al.*, 2008). Contudo, mesmo que estes impactos tenham se tornado uma pauta de interesse global, a ação humana sobre o ambiente aquático, junto a consequente contaminação dos recursos hídricos, tem se mostrado uma problemática crescente nos últimos anos (Shahidul Islam & Tanaka, 2004; Freire *et al.*, 2008).

Esta questão se intensifica ao considerar que o ambiente aquático é extremamente complexo e diverso, compreendendo uma diversidade de tipos de ecossistemas e sendo o resultado das interações entre os componentes bióticos e abióticos presentes. Assim, a presença de poluentes nos ecossistemas aquáticos pode promover distintos graus de impacto, variando conforme as características do poluente e as propriedades do ambiente (Rand *et al.*, 1995 *apud* Costa *et al.*, 2008). Dessa forma, a emissão de poluentes pode acarretar questões como: alterações na qualidade da água; impacto na biodiversidade; e ocorrência de biomagnificação entre os níveis tróficos. Promovendo, portanto, impactos não só em nível local, mas podendo também atingir áreas mais distantes (Sarkar *et al.*, 2006; Freire *et al.*, 2008).

Dentre os poluentes passíveis de serem encontrados no ambiente, é possível elencar as cinzas como uma problemática atual, tendo em vista que a presença desse poluente em diferentes ecossistemas tem sido reportada com cada vez mais frequência. Fato que, provavelmente, está relacionado ao aumento de casos de queimadas ao longo do globo, sendo possível ainda destacar o bioma do Pantanal como um dos locais que mais tem sido atingido por esta prática atualmente (Brito, 2014; Silva *et al.*, 2016; Brito *et al.*, 2017; Pinto *et al.*, 2020; Filho *et al.*, 2021).

Durante os incêndios florestais ocorre a queima de biomassa, processo no qual há a formação de partículas mineralizadas, denominadas cinzas, as quais são o resultado da mistura de materiais orgânicos, que não foram completamente consumidos pelas chamas, e minerais inorgânicos, que estavam presentes no local em que houve o incêndio. Dessa forma, as cinzas podem apresentar em sua composição diferentes elementos, que podem ainda variar em

proporção (Chang *et al.*, 1977; Spencer *et al.*, 2003; Demirbas, 2005; Brito, 2014; Brito *et al.*, 2017). Assim, essas partículas, atualmente consideradas um resíduo sólido problemático, podem gerar uma diversidade de consequências quando dispersas no ambiente (Brito, 2014; Nayak *et al.*, 2015; Brito *et al.*, 2017).

Atualmente, embora já se saiba que as cinzas podem atingir os corpos hídricos e exercer distintos níveis de influência sobre este recurso, inclusive prejudicando as comunidades aquáticas e a qualidade da água, os estudos voltados para a análise dos efeitos das cinzas sobre os recursos hídricos ainda são escassos (Minshall *et al.*, 2001; Scrimgeour *et al.*, 2001; Brito, 2014; Silva *et al.*, 2016; Brito *et al.*, 2017). Por conseguinte, ainda há muito a se descobrir sobre os impactos das queimadas sobre o ecossistema hídrico, tanto no que se refere às regiões da Europa, quanto nas áreas tropicais do globo (Brito, 2014). Portanto, as presentes lacunas nos estudos do efeito das cinzas sobre o ecossistema aquático, somadas a importância dos recursos hídricos e o aumento nas porcentagens de liberação de cinzas na atmosfera em decorrência de incêndios, evidenciam a necessidade de se promover novas avaliações acerca do impacto de partículas mineralizadas sobre a água (Brito, 2014; Silva *et al.*, 2016; Brito *et al.*, 2017).

Tendo em vista que a realização exclusiva de análises físico-químicas não demonstram completamente os efeitos do poluente sobre o ecossistema, de modo que não representam os possíveis impactos ambientais gerados pelo poluente, é necessário que sejam estabelecidos testes complementares que permitam elucidar estes cenários (Magalhães & Ferrão Filho, 2008; Vasconcelos, 2012; Brito, 2014; Brito *et al.*, 2017). Nesse sentido, ao considerar as vantagens de se utilizar sistemas biológicos para a detecção de potenciais impactos por poluentes, atualmente têm sido realizados ensaios ecotoxicológicos visando avaliar a ação de poluentes sobre os diferentes ecossistemas aquáticos (Costa *et al.*, 2008; Magalhães & Ferrão Filho, 2008; Brito, 2014; Brito *et al.*, 2017).

Os testes ecotoxicológicos utilizam em suas análises organismos indicadores que, em decorrência de seu pequeno limite de tolerância ecológica, poderão vir a apresentar diferentes tipos de reação quando em contato com um potencial poluente (Magalhães & Ferrão Filho, 2008; Brito, 2014; Brito *et al.*, 2017). No caso de ensaios relacionados aos recursos hídricos são selecionados diferentes organismos-teste conforme o ecossistema em questão, podendo utilizar indivíduos representativos de ambientes dulcícolas, estuarinos ou marinhos (Vasconcelos, 2012). Assim, ao considerar os diversos critérios a serem pontuados ao selecionar uma espécie foco pra os ensaios e a dificuldade de se cumprir todos os parâmetros,

hoje em dia há uma variedade de espécies padronizadas que podem ser empregadas nos diferentes estudos (Magalhães & Ferrão Filho, 2008).

Em conformidade com este padrão, atualmente, os principais métodos de avaliação ambiental que envolvem testes de toxicidade aguda utilizam peixes e dafnídeos em seus ensaios (Sandbacka *et al.*, 2000; Magalhães & Ferrão Filho, 2008; ABNT, 2016). Estes microcrustáceos dulcícolas do gênero *Daphnia*, conhecidos no popular como pulgas d'água, são consumidores primários e representantes das espécies componentes do zooplâncton (Costa *et al.*, 2008; ABNT, 2016). A utilização recorrente dos dafnídeos como organismos-teste em avaliações ecotoxicológicas se deve a questões como: sua ampla distribuição no ambiente de água doce; seu papel chave nas teias alimentares, sendo uma importante fonte de nutrientes; seu fácil cultivo em sistemas artificiais de laboratório; seu ciclo de vida relativamente curto; sua sensibilidade a uma diversidade de poluentes; o fato desses organismos apresentarem reprodução assexuada por partenogênese, permitindo a manutenção de uma sensibilidade constante dos organismos-teste, uma vez que haverá a produção de indivíduos idênticos geneticamente; e seu tamanho reduzido, de maneira a requerer menores volumes de água de diluição e amostras-teste (Beatrici, 2001; Tatarazako *et al.*, 2003; Buratini *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2008; Vasconcelos, 2012; Brito, 2014; Brito *et al.*, 2017).

Em vista disso, diversas espécies de dafnídeos vem sendo utilizadas em testes ecotoxicológicos aquáticos, embora a *Daphnia magna* ainda seja a mais comumente empregada (Buratini *et al.*, 2004; Silveira, 2007; Costa *et al.*, 2008; Brito, 2014; Brito *et al.*, 2017). A diferença básica entre as espécies desse microcrustáceo é o seu tamanho corporal, característica que apresenta relativa influência sobre a resposta do indivíduo a toxicidade do poluente (Vesela & Vijverberg, 2007; Costa *et al.*, 2008; Vasconcelos, 2012). O Brasil, há alguns anos, padronizou testes ecotoxicológicos envolvendo um microcrustáceo com comprimento máximo de 3,5 mm: a espécie exótica *Daphnia similis* Claus, 1876. Organismo que, embora não seja nativo do país, é facilmente mantido em condições de laboratório e atende os padrões estabelecidos para os testes ecotoxicológicos (Beatrici, 2001; Buratini *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2008; Magalhães & Ferrão Filho, 2008; Vasconcelos, 2012; ABNT, 2016).

Visando a obtenção de uma ampla coleta de dados, diferentes abordagens ecotoxicológicas podem ser aplicadas para se avaliar o efeito de um poluente sobre os dafnídeos. Sendo possível a aplicação de testes agudos e/ou crônicos, que diferem em tempo máximo de duração e resposta a ser avaliada (Costa *et al.*, 2008; Magalhães & Ferrão Filho, 2008; Boufleuer *et al.*, 2016). No caso do teste de toxicidade aguda, o efeito deletério resultante

da presença do poluente estudado no ambiente é determinado através da avaliação da quantidade de microcrustáceos imóveis após um período de 48 horas (Costa *et al.*, 2008; Magalhães & Ferrão Filho, 2008; Vasconcelos, 2012; ABNT, 2016).

Assim, buscando avaliar os efeitos ecotoxicológicos aquáticos em decorrência da presença de cinzas em áreas úmidas tropicais, o trabalho em questão inclui entre seus objetivos específicos a avaliação, através de um teste agudo, da letalidade de cinzas advindas de queimadas no Pantanal sobre microcrustáceos da espécie *Daphnia similis*. Tendo por hipótese central a ideia de que a presença de cinzas no ambiente aquático proporcionaria a ocorrência de alterações nos parâmetros hídricos, acarretando em efeitos letais e subletais sobre os dafnídeos.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1. Organismo-teste e meio de cultivo

Os ensaios aplicados com o intuito de avaliar o efeito toxicológico das cinzas no ecossistema hídrico utilizaram como organismos-teste exemplares neonatos de *Daphnia similis*, com idade entre 6h e 24h. Estes indivíduos foram obtidos, por partenogênese, de fêmeas com idade entre 7 e 28 dias, a partir da segunda postura. A água aplicada para o cultivo dos microcrustáceos, assim como para todas as fases experimentais subsequentes, foi preparada com água mineral Minalba (Minalba Brasil, Fortaleza, CE, Brasil), em conformidade com as recomendações da Norma NBR 12712:2016 (ABNT, 2016). Os indivíduos foram mantidos em recipientes de vidro contendo 300mL de água de cultivo, se estabelecendo uma média de 50 organismos por lote (**Figura 20**). A repicagem ocorreu semanalmente e a alimentação dos microcrustáceos foi baseada em algas da espécie *Raphidocelis subcapitata* na concentração, aproximada, de 1×10^5 células.mL⁻¹.



Figura 20: Cultivo de *Daphnia similis*: Recipiente contendo dafinídeos em sistema de cultivo mantido no Laboratório de Ecologia Aquática da Universidade Federal de Juiz de Fora.

3.2.2. Solução matriz e soluções-teste

Os testes desenvolvidos com microcrustáceos tiveram por base a aplicação de cinzas provenientes de macrófitas aquáticas (**Figura 21**), coletadas, com o auxílio de uma colher previamente descontaminada, nas proximidades do Rio Paraguai, na Estação Ecológica de Taiamã, Cáceres (16°49'29.8"S, 57°31'01.9"W), cerca de 1 a 2 meses após o incêndio (**Figura 22**). Visando remover macropartículas que poderiam vir a causar injúrias aos organismos, interferindo nas análises, as cinzas foram peneiradas em uma malha de 2 mm e, previamente ao estabelecimento dos tratamentos a serem aplicados, adicionadas em água de diluição na proporção de 50g/L, de maneira a se obter uma solução matriz homogênea (Praharaj, 2002; Brito, 2014; Silva *et al.*, 2016; Brito *et al.*, 2017; Castelões, 2019; Harper *et al.*, 2019; Verma & Verma, 2019). Essa solução matriz foi então filtrada, para realizar a remoção de partículas maiores que possam vir a causar injúrias aos organismos (Brito, 2014; Brito *et al.*, 2017). Adicionalmente, também foi preparada uma solução estoque na proporção de 100g/L (Brito, 2014; Brito *et al.*, 2017; Harper *et al.*, 2019).

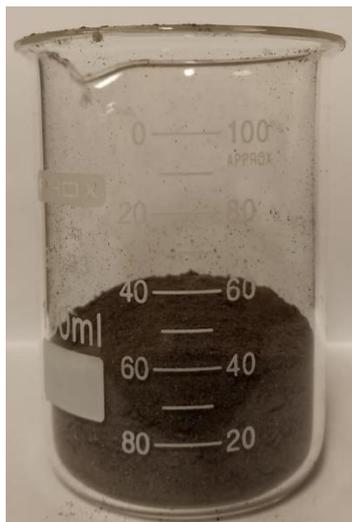


Figura 21: Cinzas coletadas nas proximidades do Rio Paraguai, na Estação Ecológica de Taiamã, Cáceres, em uma área de macrófitas aquáticas.

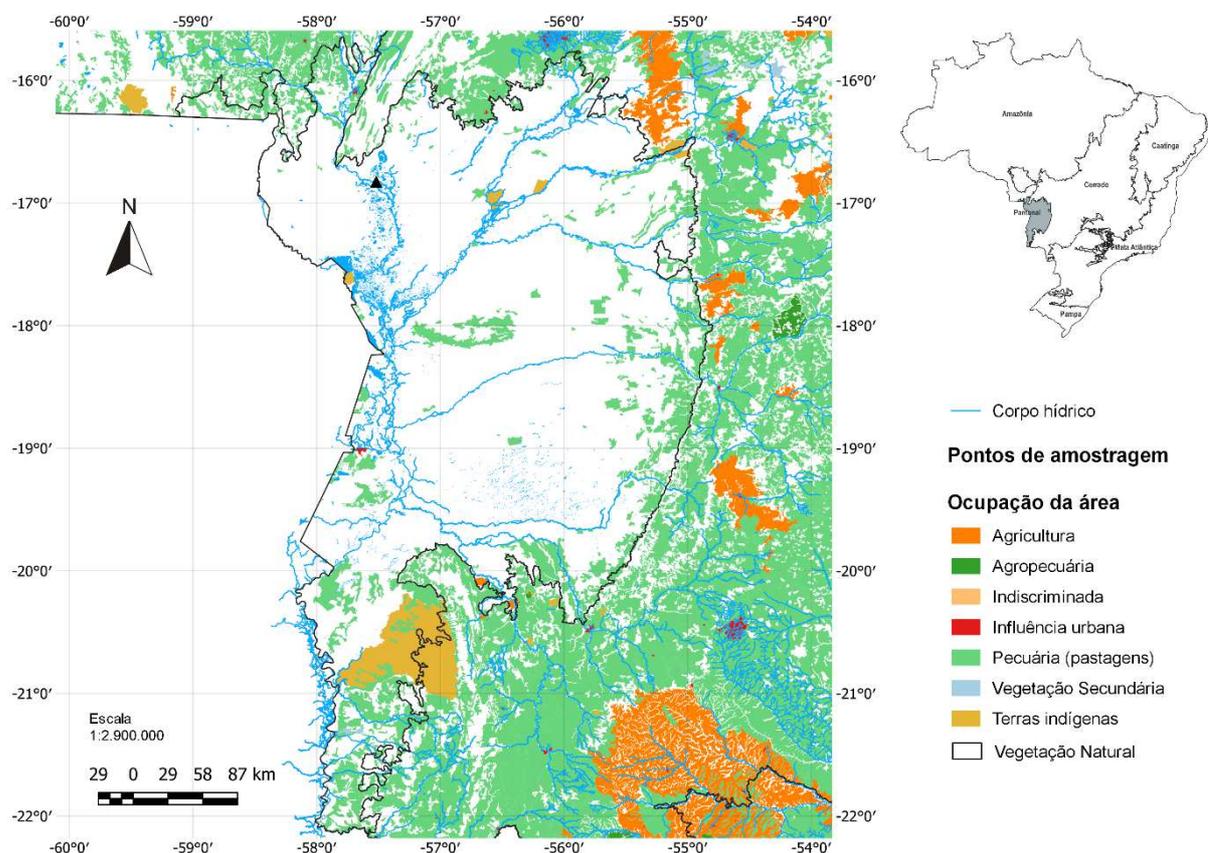


Figura 22: Mapa de ocupação do Pantanal, incluindo o ponto de amostragem das cinzas de macrófitas utilizadas para o experimento de toxicidade aguda em dafnídeos. Fonte: Elaborado pelo autor.

Inicialmente, os microcrustáceos foram aclimatados em solução-controle e, ao início das análises, foram então distribuídos, aleatoriamente, entre as diferentes soluções-teste. A

avaliação do efeito das cinzas sobre a água consistiu na realização de um ensaio de toxicidade aguda, através da aplicação de cinco tratamentos (100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%) aliqüotados da solução matriz de cinzas de 50g/L e um tratamento contendo a solução estoque de 100g/L, além do grupo controle, no qual os indivíduos foram dispostos em água livre de cinzas (ABNT, 2016; Castelões, 2019; Harper *et al*, 2019).

Todos os tratamentos foram posicionados de maneira aleatória no ambiente e os microcrustáceos não receberam alimentação ao longo do experimento, tendo sido mantidos em recipientes-teste de vidro com capacidade de 25 mL. Por fim, durante toda a fase experimental, os indivíduos foram mantidos sob um fotoperíodo de 12h/12h de luz difusa e expostos a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, de maneira a se aproximar das condições tropicais (Nunes & Espíndola, 2012; Candello, 2014; Miguel, 2016; Segundo, 2018).

3.2.3. Toxicidade aguda

O ensaio de toxicidade aguda foi baseado na Norma NBR 12713 (ABNT, 2016). O experimento, realizado de forma estática, consistiu na exposição dos microcrustáceos às soluções de diluição preparadas com cinzas advindas de queimadas no Pantanal durante um período de 48h. Cada solução-teste era composta por um total de 20 mL, de maneira a se estabelecer uma proporção de 2 mL por organismo-teste, uma vez que os recipientes-teste dispunham, cada um, de 10 indivíduos. Além disso, cada concentração testada e o controle foram realizados em triplicata ($n = 30$ indivíduos/tratamento), assim o ensaio utilizou um total de 210 organismos-teste (**Figura 23**).

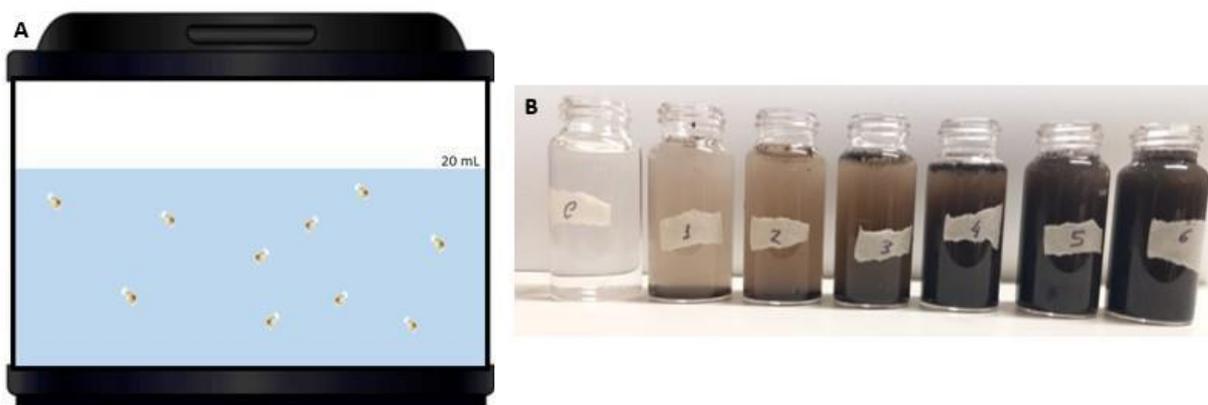


Figura 23: (A) Desenho esquemático ilustrando o Ensaio de Toxicidade Aguda utilizando microcrustáceos da espécie *Daphnia similis*. (B) Imagem de alguns recipientes-teste utilizados para a execução das análises. Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a adição dos microcrustáceos, os recipientes-teste foram mantidos sem modificações durante um período de 48h. Ao final do qual foi realizada uma contagem do número de organismos-teste móveis e imóveis em cada réplica (**Figura 24**) (**Quadro 3**). Adicionalmente, o pH e o oxigênio dissolvido de cada solução-teste foram aferidos ao início e ao final do ensaio. Por fim, a validação dos testes realizados apenas seria possível caso, após o período de exposição, a porcentagem de organismos imóveis na solução-controle fosse igual ou inferior a 10%.



Figura 24: Esquema representando as etapas executadas durante a realização do Ensaio de Toxicidade Aguda com microcrustáceos. Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro 3: Resumo do ensaio de toxicidade aguda utilizado na análise da influência das cinzas advindas de queimadas no Pantanal sobre o ambiente hídrico.

Requisitos do teste	Toxicidade aguda
Normas	NBR 12713 (2016)
Tipo de ensaio	Estático
Tempo de duração	48 horas
Organismo-teste	Neonatos de <i>Daphnia similis</i>
Número de indivíduos por réplica	20
Idade dos neonatos	Entre 6 e 24 horas
Água de diluição	Água reconstituída
Volume mínimo de solução-teste por réplica	10 mL
Número de concentrações	Cinco e o controle
Número de réplicas	Duas
Temperatura	25 ± 2°C
Luminosidade (fotoperíodo)	12h de luz e 12h de escuro
Alimentação	Nenhuma
Efeito observado	Imobilidade

Fonte: Adaptado de ABNT, 2016.

Adicionalmente, visando avaliar a possível ocorrência da ingestão de cinzas por *D. similis*, ao término do período experimental os organismos que dispunham de mobilidade foram verificados em um microscópio Olympus SZ equipado com câmera (Canniff & Hoang, 2018; Renzi *et al.*, 2019). Por fim, também se analisou a composição das cinzas utilizadas para o estabelecimento das diferentes concentrações testadas. De modo que, o material foi enviado ao Laboratório de Química Instrumental (LQI) ligado ao Instituto de Ciências Agrárias (ICA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), que realizou a quantificação dos metais presentes na amostra de cinzas por meio de um Espectrofotômetro de Absorção Atômica da Varian (AAS 240 FS). Para o preparo do extrato de cinzas a ser analisado, amostras de 0,5g foram digeridas em chapa de aquecimento com 10mL de HNO₃ e 2mL de H₂O₂. Quando necessário, os extratos foram submetidos a um processo de diluição.

3.2.5. Teste de sensibilidade

Visando avaliar a sensibilidade e a qualidade do cultivo de *D. similis*, foram realizados 5 testes de sensibilidade, utilizando o cloreto de sódio (NaCl), da marca Synth, como substância de referência, conforme as recomendações da Norma NBR 12712:2016 (ABNT, 2016). As concentrações a serem testadas foram preparadas através de diluições seriadas de uma solução-estoque de 6.4 g/L de NaCl, de maneira a se obter as seguintes soluções-teste: 0.4; 0.8; 1.6; 3.2; 6.4 g/L de NaCl (**Figura 25**). Adicionalmente, também foi incluído um controle contendo apenas água reconstituída. Durante o desenvolvimento dos ensaios, cada frasco contou com a adição de 20 mL da solução-teste e a presença de 10 indivíduos com idade entre 6 e 24 horas (Segundo, 2018). Os testes ocorreram em um período de 48h, ao final do qual foi realizada a contagem do número de organismos móveis. Os indivíduos não receberam alimentação. Os experimentos foram mantidos a uma temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12h/12h de luz difusa. Ao início dos ensaios foram realizadas aferições acerca do pH, oxigênio dissolvido e dureza da água. Com os dois primeiros parâmetros sendo verificados novamente ao final do período experimental. Ao final dos ensaios foi possível o estabelecimento de uma carta-control (média ± 2 desvios-padrão).

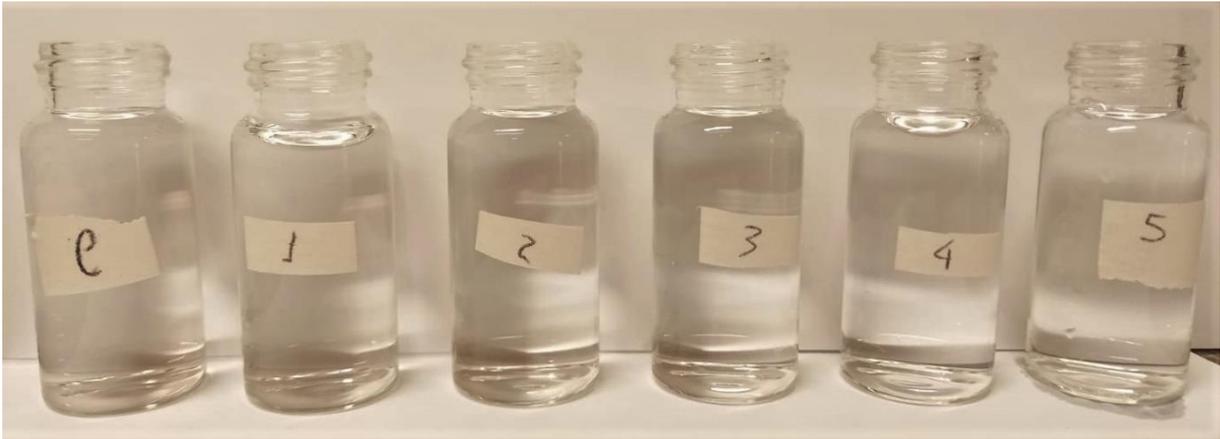


Figura 25: Ensaio de sensibilidade com dafnídeos (*Daphnia similis*) submetidos à substância de referência (NaCl).

3.2.6. Análise estatística

O cálculo de imobilidade dos microcrustáceos por concentração no ensaio de toxicidade aguda, expresso através da Concentração Efetiva Mediana (CE50), foi realizado, quando possível, por meio de um modelo de regressão não linear, de maneira a se aferir a concentração de cinzas que causa efeito agudo em 50% dos dafnídeos testados, após transcorridas 48h de exposição ao poluente (Costa *et al.*, 2008; Magalhães & Ferrão Filho, 2008; Vasconcelos, 2012; ABNT, 2016). A princípio, a normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilks, se realizando, posteriormente, uma análise de variância one-way (ANOVA). Para os dados que não apresentavam uma distribuição normal, foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis, seguindo pelo teste de comparações múltiplas de Nemenyi, avaliando possíveis diferenças das médias dos tratamentos em relação ao controle. Em contrapartida, os dados normais foram submetidos ao teste de Tukey. Sempre se considerando o valor de $p < 0.05$ como significativo. As análises estatísticas e os gráficos foram desenvolvidos utilizando "R version 4.1.1.". Para a elaboração da carta-controle foram realizados cálculos da média, do desvio padrão e do coeficiente de variação da CE50 (48h) através do programa Excel (ABNT, 2016).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Teste de sensibilidade

A faixa de sensibilidade de *Daphnia similis* ao cloreto de sódio (NaCl) compreendeu os valores entre os limites de 0.911 e 1.701 g/L, tendo valor médio de CE50(48h) igual a 1.31 g/L (**Figura 26**). Os testes apresentaram coeficiente de variação de 15% e desvio padrão de 0.198 g/L. Os valores de CE50(48h) obtidos qualificam os lotes de organismos cultivados para o

desenvolvimento do teste de toxicidade aguda. Os valores de CE50(48h) e os intervalos de confiança (95%) dos cinco testes de sensibilidade realizados podem ser visualizados na **Tabela 10**. Durante os ensaios de sensibilidade, o pH não sofreu modificações significativas, enquanto o oxigênio dissolvido apresentou um aumento médio de 0.45 mg/L (ppm).

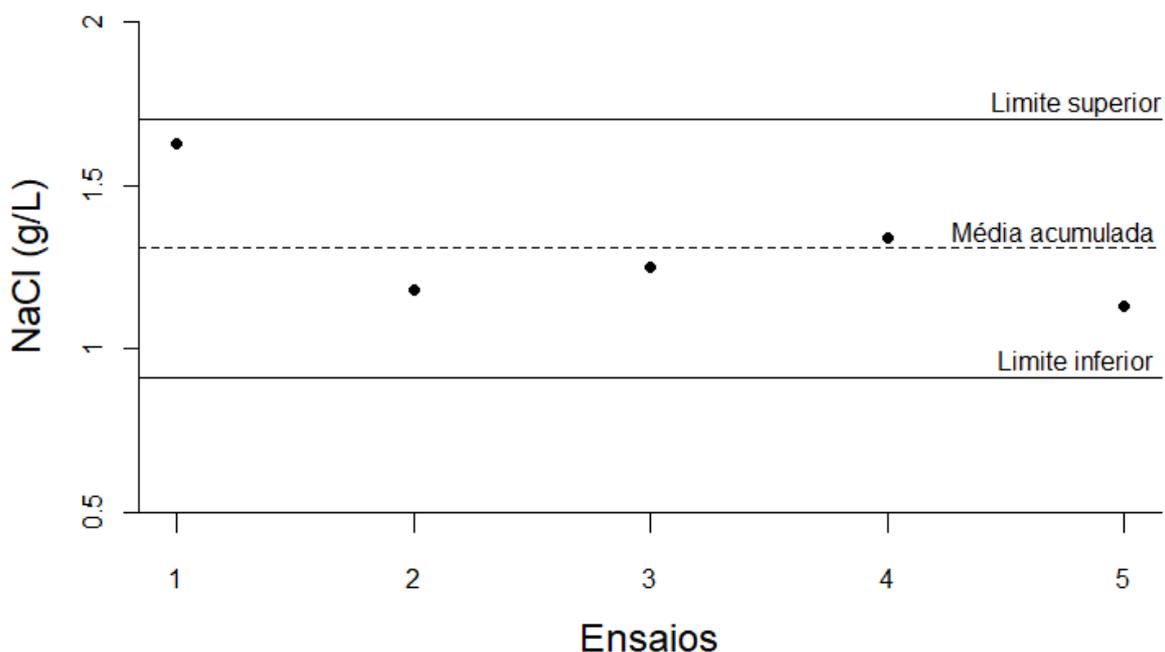


Figura 26: Carta-control referente a faixa de sensibilidade de *Daphnia similis* submetidas ao cloreto de sódio como substância de referência.

Tabela 10: Valores de CE50(48h) e seus respectivos intervalos de confiança referentes aos cinco testes de sensibilidade realizados com *Daphnia similis*, tendo como substância de referência o cloreto de sódio.

Ensaio	CE50(48h) (g/L)	Intervalo de confiança (95%)
1	1.63	1.42 – 1.87
2	1.18	0.944 – 1.55
3	1.25	1.04 – 1.56
4	1.34	1.06 – 1.57
5	1.13	0.946 – 1.34

3.3.2. Validação dos ensaios

O critério para a validação do teste de toxicidade aguda com dafnídeos foi atendido, tendo em vista que, após 48h, a taxa de letalidade dos organismos-teste na amostra controle foi menor ou igual a 10%, conforme expresso na **Tabela 11**.

Tabela 11: Quantidade de organismos-teste presentes na amostra controle que apresentaram mobilidade ao final do ensaio de toxicidade aguda.

	Controle 1	Controle 2	Controle 3
Número de indivíduos móveis	10	9	9
Letalidade (%)	0	10	10

3.3.3. Teste de Toxicidade Aguda

A presente análise contou com uma mortalidade média de 100% dos indivíduos para todas as concentrações aplicadas, conforme apresentado na **Tabela 12**. Desse modo, não foi possível o estabelecimento de um valor referente a CE50(48h). Ainda, considerando que, ao final do experimento, todos os organismos-teste estavam imóveis, não foi possível avaliar a ingestão de cinzas pelos dafnídeos.

Tabela 12: Resultado do Teste de Toxicidade Aguda em organismos, da espécie *Daphnia similis*, expostos a água contendo distintas concentrações de cinzas advindas de queimadas no Pantanal: Número de indivíduos móveis e taxa média de mortalidade (n = 3).

Resultados (Após 48h)	Nº de indivíduos móveis		Taxa de mortalidade (%)
Concentração testada	0h	48h	Ao final
3.125 g/L	30	0	100
6.25 g/L	30	0	100
12.5 g/L	30	0	100
25 g/L	30	0	100
50 g/L	30	0	100
100 g/L	30	0	100

Ao verificar o potencial hidrogeniônico (pH) e o nível de oxigênio dissolvido nos frascos contendo diferentes concentrações de cinzas, foi possível identificar alterações nesses padrões após as 48h do experimento. Tendo sido reportado um aumento significativo no pH para todas as amostras e uma queda expressiva no oxigênio dissolvido ao final dos ensaios, esta

última variável se mostrou intimamente correlacionada com o acréscimo de cinzas ao tratamento (**Tabela 13**).

Tabela 13: Aspectos da qualidade da água acrescida de diferentes concentrações de cinzas coletadas em área de macrófita no Pantanal. As análises foram realizadas no momento do estabelecimento do Ensaio de Toxicidade Aguda com *Daphnia similis* e após transcorridas 48h (n = 3).

Qualidade da água Concentração testada	pH		Oxigênio dissolvido (mg/L ppm)	
	0h	48h	0h	48h
0	7.6	8.2	8.34	7.60
3.125 g/L	7.3	9.2	8.52	5.95
6.25 g/L	7.2	10.2	8.45	4.75
12.5 g/L	7.4	10.2	8.51	3.03
25 g/L	7.1	10.8	8.52	1.27
50 g/L	7.6	10.2	8.58	0.28
100 g/L	7.5	10	8.64	0.13

3.3.4. Análise química das cinzas

Ao verificar os elementos presentes no extrato de cinzas de macrófitas aquáticas, coletadas em Cáceres, foi possível perceber que os níveis mais elevados de metal foram, respectivamente, os do Potássio ($69,8 \pm 3 \text{ g Kg}^{-1}$), Ferro ($45,9 \pm 2 \text{ g Kg}^{-1}$), Cálcio ($39,1 \pm 6 \text{ g Kg}^{-1}$), Magnésio ($15,4 \pm 3 \text{ g Kg}^{-1}$), Alumínio ($13,7 \pm 0,8 \text{ g Kg}^{-1}$) e Manganês ($3,52 \pm 0,07 \text{ g Kg}^{-1}$) (**Tabela 14**).

Tabela 14: Concentração dos elementos nos extratos de cinzas de macrófitas aquáticas na região do Pantanal.

Elementos (g Kg ⁻¹)	Cinza
Sódio (Na)	$0,882 \pm 0,03$
Magnésio (Mg)	$15,4 \pm 3$
Alumínio (Al)	$13,7 \pm 0,8$
Potássio (K)	$69,8 \pm 3$
Cálcio (Ca)	$39,1 \pm 6$
Manganês (Mn)	$3,52 \pm 0,07$
Ferro (Fe)	$45,9 \pm 2$
Níquel (Ni)	$0,0254 \pm 0,0008$
Zinco (Zn)	$0,594 \pm 0,03$

Chumbo (Pb)	0,0766 ± 0,002
Cobre (Cu)	0,0493 ± 0,001

3.4. DISCUSSÃO

Atualmente, existem poucas informações acerca dos impactos gerados pela presença de cinzas em corpos hídricos nos ambientes tropicais. Problemática que se intensifica, atualmente, ao considerar o aumento da liberação desse poluente nos trópicos, em decorrência dos recorrentes casos de incêndios florestais. Tais fatores evidenciam a necessidade crescente de melhor compreender as implicações da presença desse composto nos ecossistemas tropicais (Minshall *et al.*, 2001; Scrimgeour *et al.*, 2001; Nunes, 2010; Brito, 2014; Silva *et al.*, 2016; Brito *et al.*, 2017; Pinto *et al.*, 2020). Neste cenário, os testes ecotoxicológicos aquáticos vem apresentando relativo destaque, ajudando a elucidar o efeito das cinzas sobre os organismos, tendo em vista o potencial impacto deste poluente sobre as comunidades aquáticas e a qualidade da água (Minshall *et al.*, 2001; Scrimgeour *et al.*, 2001; Magalhães & Ferrão Filho, 2008; Nayak *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2016; Brito *et al.*, 2017). O desenvolvimento de tais testes tem, comumente, empregado dafnínideos, tendo em vista que estes organismos são sensíveis a uma variedade de poluentes (Beatrici, 2001; Tatarazako *et al.*, 2003; Buratini *et al.*, 2004; Costa *et al.*, 2008; Vasconcelos, 2012; Brito, 2014; Brito *et al.*, 2017). Nesse sentido, o presente estudo, permitiu a identificação de efeitos letais sobre indivíduos da espécie *Daphnia similis* expostas a cinzas coletadas no Pantanal, evidenciando seu efeito prejudicial sobre a fauna aquática.

Os resultados obtidos nos ensaios de sensibilidade estavam dentro da faixa de sensibilidade. Além disso, os valores encontrados se mostraram similares as CE50(48h) apresentadas por outros autores previamente, que se utilizaram de condições semelhantes às do presente trabalho (Coelho, 2006; Lameira, 2008; Nobre, 2015; Maziero *et al.*, 2016; Segundo, 2018). Dessa forma, os organismos-teste foram classificados como aptos para serem aplicados nos testes de toxicidade aguda, permitindo a obtenção de resultados confiáveis.

A mortalidade extremamente elevada para todos os testes de toxicidade aguda, circunstância que inviabilizou o cálculo da CE50(48h), pode estar vinculada a duas questões: a composição química das cinzas utilizadas para o estabelecimento das concentrações e a ocorrência de modificações na qualidade da água após a exposição ao material poluente por 48h. Sendo que, está última pode sofrer influência dos diversos componentes presentes nas cinzas utilizadas.

O primeiro ponto está relacionado ao fato de que é de extrema importância se considerar o tipo e a composição das cinzas aplicadas, além da consequente origem do material, uma vez que tais fatores se encontram diretamente ligados ao nível de toxicidade do poluente sobre as diferentes espécies de cladóceros (Brito, 2014; Silva *et al.*, 2015; Brito *et al.*, 2017; Zajac *et al.*, 2018; Harper *et al.*, 2019). Nesse sentido, a análise dos componentes químicos das cinzas de macrófitas, que se mostraram similares ao apresentado em estudos anteriores, possibilita apontar a composição do material testado como uma das justificativas para a mortalidade total de *Daphnia similis* no ensaio agudo. Tendo em vista que alguns elementos, ao se apresentarem em níveis elevados, podem representar um problema para o sistema hídrico (Brito, 2014; Silva *et al.*, 2015; Brito *et al.*, 2017; Harper *et al.*, 2019). Este é o caso, por exemplo, do sódio, do cálcio e do magnésio, aqui reportados em grandes concentrações. O cálcio, inclusive, é apontado como tendo uma significativa influência sobre a toxicidade das cinzas, além de já ter sido elencado como um dos principais elementos responsáveis por efeitos tóxicos deste poluente sobre crustáceos (Stiernstrom *et al.*, 2013; Brito, 2014; Brito *et al.*, 2017; Harper *et al.*, 2019).

Ademais, entre os componentes registrados nas cinzas analisadas, é possível notar valores representativos de manganês e zinco. De modo que, considerando que estes dois elementos já foram apontados como potencialmente tóxicos, é possível que a concentração visualizada tenha excedido o nível de tolerância dos microcrustáceos (Stiernstrom *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2015; Harper *et al.*, 2019). Ainda, há de considerar a elevada concentração de potássio na composição do material, uma vez que este elemento, em altas proporções, pode ser um indicio de contaminação e ocasionar efeitos prejudiciais sobre os organismos, fato que pode justificar a toxicidade das cinzas sobre os dafnídeos (Brito, 2014; Brito *et al.*, 2017; Castelões, 2019). Por fim, a elevada concentração de alumínio na amostra de cinza, somada a presença de cobre, níquel e chumbo, também se apresenta como um indicativo de toxicidade do material, fundamentando a mortalidade observada nos testes com microcrustáceos (Stiernstrom *et al.*, 2013; Harper *et al.*, 2019).

Adicionalmente, a avaliação da qualidade da água após a exposição às diferentes concentrações de cinzas também levanta a possibilidade de que alterações nas características do ambiente, devido a presença do poluente, possam ter resultado nas taxas de mortalidade visualizadas. Tal cenário se deve ao fato de que os dafnídeos são organismos sensíveis a modificações ambientais (Brito, 2014; Brito *et al.*, 2017). Este dado, somado ao aumento de pH e o declínio na presença de oxigênio dissolvido em todas as amostras contendo cinzas de

macrófitas, pode indicar que a elevada taxa de indivíduos imóveis nas amostras está relacionada com a alteração destes dois parâmetros. Situação similar havia sido reportada anteriormente por Brito (2014), segundo o qual a aplicação de cinzas coletadas após queimadas no Cerrado também teria resultado em valores elevados de pH e queda no oxigênio dissolvido, tendo, ainda, registrado uma alta toxicidade do poluente para *Ceriodaphnia dubia*. Adicionalmente, o aumento do pH, devido a poluição da água por cinzas de queimadas no hemisfério norte, foi apontado por Harper *et al.* (2019), causando elevadas taxas de mortalidade em *Daphnia magna*. Tais circunstâncias evidenciam a importância da realização de análises secundárias acerca do efeito das cinzas sobre a qualidade do ambiente hídrico, sendo fortuita a aplicação de novas avaliações envolvendo distintos parâmetros.

3.5. CONCLUSÃO

Os resultados referentes as análises aqui realizadas permitiram evidenciar a ocorrência de efeitos prejudiciais das cinzas, provenientes de queimadas, sobre o ecossistema aquático e os organismos das regiões tropicais. Tendo sido registradas elevadas taxas de mortalidade de dafnídeos para todas as concentrações testadas, além de mudanças na qualidade da água conforme as amostras eram acrescidas de cinzas. Assim, a toxicidade do composto avaliado vai de encontro a dados reportados pela literatura prévia, podendo ser justificada pela alta sensibilidade dos microcrustáceos utilizados. Além disso, o cenário visualizado também pode ser vinculado ao poluente testado. De modo que, o tipo e a composição do material são pontos de grande influência sobre sua toxicidade, podendo acarretar modificações na qualidade do ambiente e, conseqüentemente, afetar a sobrevivência dos organismos presentes.

Considerando tais circunstâncias, é de grande valia a realização de análises mais detalhadas acerca do efeito das cinzas sobre a qualidade do ambiente hídrico, sendo fortuita a avaliação do impacto deste poluente sobre outros parâmetros ambientais. Ainda, tais análises podem ser acrescidas por verificações a longo prazo e pela aplicação de novos testes utilizando organismos de outros níveis tróficos.

3.6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 12713/2016: Ecotoxicologia aquática: Toxicidade aguda: Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 2016.

BEATRICI, A. C. Avaliação da fertilidade e sensibilidade de *Daphnia similis* (Crustacea, Cladocera) submetida a três diferentes dietas. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Ciências Biológicas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2001.

BOUFLEUER, E. M. S., ROCKER, C., DALEASTE, R., SEBASTIEN, N. Y., PETRIKOSKI, S. M. Assessment of mortality and reproduction of *Daphnia magna* subjected to the herbicide Glyphosate. *Acta Iguazu*, v.5, p.25-33, 2016.

BRITO, D. Q. D. Avaliação ecotoxicológica das cinzas de queimadas do Cerrado em ambientes aquáticos. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Rural), Universidade de Brasília. Planaltina-DF, p.120, 2014.

BRITO, D. Q., PASSOS, C. J. S., MUNIZ, D. H. F., OLIVEIRA-FILHO, E. C. Aquatic ecotoxicity of ashes from Brazilian savana wildfires. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017. DOI: 10.1007/s11356-017-9578-0

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*, v.73, p.878-882, 2004. DOI: 10.1007/s00128-004-0508-8

CANNIFF, P. M., HOANG, T. C. Microplastic ingestion by *Daphnia magna* and its enhancement on algal growth. *Science of The Total Environment*, v.633, p.500-507, 2018. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.03.176

CASTELÕES, L. Pesquisas comprovam efeitos danosos das cinzas de queimadas no solo e na água. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Cerrados, Planaltina – DF, 29 jan. 2019. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/40809567/pesquisas-comprovam-efeitos-danosos-das-cinzas-de-queimadas-no-solo-e-na-agua> >. Acesso em 02 de fev. de 2022.

CHANG, A. C., LUND, L. J., PAGE, A. L., WARNEKE, J. E. Physical Properties of Fly Ash-Amended Soils. *Journal of Environment Quality*, v.6, n.3, p.267-270, 1977. DOI: 10.2134/jeq1977.00472425000600030007x

COELHO, R. S. Avaliação da toxicidade de fluidos de usinagem através da ecotoxicologia aquática. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Universidade de São Paulo. São Carlos, p.136, 2006.

COSTA, R. C., OLIVI, P., BOTTA, C. M. R., ESPINDOLA, E. L. G. Toxicity in aquatic environments: discussion and evaluation methods. *Química Nova*, v.31, n.7, 2008.

DEMIRBAS, A. Heavy Metal Contents of Fly Ashes from Selected Biomass Samples. *Energy Sources*, v.27, p.1269-1276, 2005. DOI: 10.1080/009083190519384

FILHO, W. L., AZEITEIRO, U. M., SALVIA, A. L., FRITZEN, B., LIBONATI, R. Fire in Paradise: Why the Pantanal is burning. *Environmental Science & Policy*, v.123, p.31-34, 2021. DOI: 10.1016/j.envsci.2021.05.005

FREIRE, M. M., SANTOS, V. G., GINUINO, I. S. F., ARIAS, A. R. L. Biomarkers to assess the environmental health of aquatic ecosystems. *Oecologia Brasiliensis*, v.12, n.3, 2008.

HARPER, A. R., SANTIN, C., DOERR, S. H., FROYD, C. A., ALBINI, D., OTERO, X. L., VINAS, L., PEREZ-FERNANDEZ, B. Chemical composition of wildfire ash produced in contrasting ecosystems and its toxicity to *Daphnia magna*. *International Journal of Wildland Fire*, v.28, p.726-737, 2019. DOI: 10.1071/WF18200

LAMEIRA, V. Estudo dos efeitos letais e subletais (Reprodução e Teratogênese) do fármaco Triclosan para *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia*, *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladocera, Crustacea). Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo. São Paulo, p.210, 2008.

MAGALHÃES, D. P. & FERRÃO-FILHO, A. S. Ecotoxicology as a tool to monitoring aquatic systems. *Oecologia Brasiliensis*, v.12, n.3, p.355-381, 2008.

MAZIERO, J. S., ROGERO, S. O., ALEMANY, A. Ecotoxicological study of silver nanoparticle on *Daphnia similis*. *Journal of the Health Sciences Institute*, v.34, n.3, p.133-139, 2016.

MIGUEL, M. Efeito do hormônio sintético 17 α -etinilestradiol no invertebrado aquático *Daphnia magna* (Crustacea, Cladocera). Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo. São Carlos, p.110, 2016.

MINSHALL, G.W., ROBINSON, C.T., LAWRENCE, D.E., ANDREWS, D.A., BROCK, J.T. Benthic macroinvertebrate assemblages in five central Idaho (USA) streams over a 10-year

period following disturbance by wildfire. *International Journal of Wildland Fire*, v.10, p.201-213, 2001. DOI: 10.1071/WF01018

NAYAK, A. K., RAJA, R., RAO, K. S., SHUKLA, A. K., MOHANTY, S., SHAHID, M., TRIPATHI, R., PANDA, B. B., BHATTACHARYYA, P., KUMAR, A., LAL, B., SETHI, S. K., PURI, C., NAYAK, D., SWAIN, C. K. Effect of fly ash application on soil microbial response and heavy metal accumulation in soil and rice plant. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.114, p.257-262, 2015. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.03.033

NOBRE, F. S. M. Avaliação ecotoxicológica dos metais-traço cobre e zinco, isolados e em mistura, para *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia silvestrii*. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária) – Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão, p.53, 2015.

NUNES, M. E. T., ESPÍNDOLA, E. L. G. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. *Ecotoxicology*, v.21, p.1063-1071, 2012. DOI: 10.1007/s10646-012-0859-6

PINTO, M. M., LIBONATI, R., TRIGO, R. M., TRIGO, I. F., DACAMARA, C. C. A deep learning approach for mapping and dating burned areas using temporal sequences of satellite images. *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing*, v.160, p.206-274, 2020. DOI: 10.1016/j.isprsjprs.2019.12.014

PRAHARAJ, T., POWELL, M. A., HART, B. R., TRIPATHY, S. Leachability of elements from sub-bituminous coal fly ash from India. *Environment International*, v.27, p.609-615, 2002. DOI: 10.1016/s0160-4120(01)00118-0

RENZI, M., GRAZIOLI, E., BLASKOVIC, A. Effects of Different Microplastic Types and Surfactant-Microplastic Mixtures Under Fasting and Feeding Conditions: A Case Study on *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2019. DOI: 10.1007/s00128-019-02678-y

SANDBACKA, M., CHRISTIANSON, I., ISOMAA, B. The acute toxicity of surfactants on fish cells, *Daphnia magna* and fish – A comparative study. *Toxicology in Vitro*, v.14, p.61-68, 2000. DOI: 10.1016/s0887-2333(99)00083-1

SARKAR, A., RAY, D., SHRIVASTAVA, A. N., SARKER, S. Molecular Biomarkers: Their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology*, v.15, n.4, p.333-40, 2006. DOI: 10.1007/s10646-006-0069-1

SCRIMGEOUR, G. J., TONN, W. M., PASZKOWSKI, C. A., GOATER, C. Benthic macroinvertebrate biomass and wildfires: evidence for enrichment of boreal subarctic lakes. *Freshwater Biology*, v.46, p.367-378, 2001. DOI: 10.1046/j.1365-2427.2001.00682.x

SEGUNDO, H. P. C. Diagnóstico Ecotoxológico do Rio Apodi-Mossoró (RN) utilizando as espécies zooplancônicas *Ceriodaphnia dubia* e *Daphnia similis* (Cladocera, Crustacea). Monografia (Bacharel em Ecologia) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, p.40, 2018.

SHAHIDUL ISLAM, M., TANAKA, M. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*, v.48, p.624-649, 2004. DOI: 10.1016/j.marpolbul.2003.12.004

SILVA, V., ABRANTES, N., COSTA, R., KEIZER, J. J., GONÇALVES, F., PEREIRA, J. L. Effects of ash-loaded post-fire runoff on the freshwater clam *Corbicula fluminea*. *Ecological Engineering*, v.90, p.180-189, 2016. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2016.01.043

SILVA, V., PEREIRA, J. L., CAMPOS, I., KEIZER, J. J., GONÇALVES, F., ABRANTES, N. Toxicity assessment of aqueous extracts of ash from forest fires. *CATENA*, v.135, p.401-408, 2015. DOI: 10.1016/j.catena.2014.06.021

SILVEIRA, R. M. Bioensaios de toxicidade e organismos bioindicadores como instrumento para a caracterização ambiental do Rio Itajaí-Mirim, SC. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade do Vale do Itajaí. Itajaí, p.125, 2007.

SPENCER C.N., GABEL K.O., HAUER, F.R. Wildfire effects on stream food webs and nutrient dynamics in Glacier National Park, USA. *Forest Ecology and Management*, p.141–153, 2003. DOI: 10.1016/S0378-1127(03)00058-6

STIERNSTROM, S., LINDE, M., HEMSTROM, K., WIK, O., YTREBERG, E., BENGTTSSON, B. E., BREITHOLTZ, M. Improved understanding of key elements governing the toxicity of energy ash eluates. *Waste Management*, v.33, p.842–849, 2013. DOI: 10.1016/J.WASMAN.2012.12.008

TATARAZAKO, N., ODA, S., WATANABE, H., MORITA, M., IGUCHI, T. Juvenile hormone agonists affect the occurrence of male *Daphnia*. *Chemosphere*, v.53, p.827-833, 2003. DOI: 10.1016/S0045-6535(03)00761-6

VASCONCELOS, G. V. Utilização de bioensaios para avaliação da ecotoxicidade em resíduos de escoamento de caminhão limpa-fossa: Lodo de fossa séptica. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, p.105, 2012.

VERMA, C., VERMA, R. Leaching Behaviour of Fly Ash: A Review. *Nature Environment and Pollution Technology*, v.18, n.2, p.403-412, 2019.

VESELA, S., VIJVERBERG, J. Effect of body size on toxicity of zinc in neonates of four differently sized *Daphnia* species. *Aquatic Ecology*, v.41, p.67-73, 2007. DOI: 10.1007/s10452-006-9050-6

ZAJAC, G., SZYSZLAK-BARGLOWICZ, J., GOLEBIOWSKI, W., SZCZEPANIK, M. Chemical Characteristics of Biomass Ashes. *Energies*, v.11, n.11, 2018. DOI: 10.3390/en11112885

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As avaliações dispostas no presente trabalho permitiram compreender um pouco melhor o efeito da degradação de cinzas provenientes de queimadas sobre áreas úmidas tropicais. Foi possível verificar o impacto deste poluente sobre dois ambientes. A resposta dos organismos edáficos utilizados em comparação com os microcrustáceos dulcícolas mostraram que estes últimos dispõem de maior sensibilidade ao poluente aplicado, com sua aplicação sendo de grande valia para avaliações envolvendo as cinzas. Adicionalmente, mesmo que os anelídeos tenham se mostrado mais tolerantes ao composto utilizado, sua aplicação em alguns dos testes foi fortuita para elucidar efeitos secundários, incluindo variáveis comportamentais e morfológicas, das cinzas de queimadas.

Ademais, as avaliações físico-químicas do solo e da água após a exposição às cinzas do Pantanal permitiram identificar a ocorrência de alterações em alguns parâmetros ambientais, circunstância que pode acarretar em uma diversidade de impactos secundários sobre o ecossistema. Tais modificações podem estar vinculadas aos elementos componentes das cinzas utilizadas, critério que, por sua vez, também apresentou discrepâncias conforme a origem do poluente. Ainda, as análises ligadas a emissão de gases vinculados ao efeito estufa possibilitaram a identificação de alterações na condição do solo, que, embora se mantenha como um consumidor de metano, passa a apresentar a condição de emissor de dióxido de carbono.

A realização de mais estudos a respeito do impacto das cinzas produzidas por incêndios florestais sobre o ecossistema, especialmente ensaios crônicos e avaliações envolvendo novos parâmetros ambientais, se fazem necessários. Somente com estes testes crônicos teremos uma melhor compreensão do cenário atual, com ocorrência mais frequente de de queimadas, e a consequente liberação de cinzas, e poderemos buscar medidas de mitigação dos efeitos. Os resultados aqui apresentados contribuem para suprir a completa escassez de informações ecotoxicológicas acerca dos efeitos das cinzas nas regiões tropicais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, K. G. C. Correlação entre fator de toxicidade e parâmetros físico-químicos para efluentes domésticos tratados. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba, p.97, 2012.
- BERGIER, I., ASSINE, M. L., MCGLUE, M. M., ALHO, C. J. R., SILVA, A., GUERREIRO, R. L., CARVALHO, J. C. Amazon rainforest modulation of water security in the Pantanal

wetland. *Science of The Total Environment*, v.619-620, p.1116-1125, 2018. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.11.163

BORGES, G. D. Bioindicação através da *Eisenia fetida* em substrato do campo Morozoni, Treviso, Santa Catarina, Brasil. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 2013.

BRITO, D. Q. D. Avaliação ecotoxicológica das cinzas de queimadas do Cerrado em ambientes aquáticos. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Desenvolvimento Rural), Universidade de Brasília. Planaltina-DF, p.120, 2014.

BRITO, D. Q., PASSOS, C. J. S., MUNIZ, D. H. F., OLIVEIRA-FILHO, E. C. Aquatic ecotoxicity of ashes from Brazilian savana wildfires. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017. DOI: 10.1007/s11356-017-9578-0

CHANG, A. C., LUND, L. J., PAGE, A. L., WARNEKE, J. E. Physucal Properties of Fly Ash-Amended Soils. *Journal of Environment Quality*, v.6, n.3, p.267-270, 1977. DOI: 10.2134/jeq1977.00472425000600030007

CHIARAVALLOTI, R. M., HOMEWOOD, K., ERIKSON, K. Sustainability and Land tenure: Who owns the floodplain in the Pantanal, Brazil?. *Land Use Policy*, v.64, p.511-524, 2017. DOI:10.1016/J.LANDUSEPOL.2017.03.005

CHINI, P. Uso de minhocas da espécie *Eisenia fetida*, como bioindicadoras em solos contaminados com agrotóxicos. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária), Universidade do Sul de Santa Catarina. Palhoça, p.75, 2014.

COSTA, C. H. Estudo Ecotoxicológico para valorização do resíduo produzido no processo de polimento de piso porcelanato na indústria cerâmica. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

COSTA, C. R., OLIVI, P., BOTTA, C. M. R., ESPINDOLA, E. L. G. A Toxicidade em Ambientes Aquáticos: Discussão e Métodos de Avaliação. *Química Nova*, v.31, n.7, p.1820-1830, 2008. DOI: 10.1590/S0100-40422008000700038

EARL, S.R.; BLINN, D.W. Effects of wildfire ash on water chemistry and biota in South-Western USA streams. *Freshwater Biology*, v.48, p.1015–1030, 2003. DOI: 10.1046/j.1365-2427.2003.01066.x

EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, U.S.). Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms. (4th edition), U.S. Environmental Protection Agency, 2002.

FERREIRA, D. G. Biorremediação de Solo Argiloso Contaminado com Gasolina Aditivada com Diferentes Teores de Etanol. Dissertação (Mestrado em Ciência) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

FERREIRA, J. P. L., OLIVEIRA M. M., LARANJEIRA I., LEITÃO T. E., QUINTA-NOVA L., FERNANDEZ P., LOPES M. H., PARALTA, E. A. Avaliação do impacto de fogos florestais em recursos Hídricos subterrâneos. 2004.

FILHO, W. L., AZEITEIRO, U. M., SALVIA, A. L., FRITZEN, B., LIBONATI, R. Fire in Paradise: Why the Pantanal is burning. *Environmental Science & Policy*, v.123, p.31-34, 2021. DOI: 10.1016/j.envsci.2021.05.005

GARCÍA-ALIX, A., JIMENEZ-ESPEJO, F. J., LOZANO, J. A., JIMÉNEZ-MORENO, G., MARTINEZ-RUIZ, F., SANJUÁN, G. L., JIMÉNEZ, G. A., ALFONSO, E. G., RUIZ-PUERTAS, G., ANDERSON, R. S. Anthropogenic impact and lead pollution throughout the Holocene in Southern Iberia. *Science of The Total Environment*, v.449, p.451-460, 2013. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.01.081

HARDESTY, J., MYERS, R., FULKS, W. Fire, ecosystems, and people: a preliminary assessment of fire as a global conservation issue. *George Wright Forum*, v.22, n.4, p.78-87, 2005.

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

MAGALHÃES, D. P. & FERRÃO-FILHO, A. S. Ecotoxicology as a tool to monitoring aquatic systems. *Oecologia Brasiliensis*, v.12, n.3, p.355-381, 2008.

MALEKNIA, S. D.; BELL, T. L.; ADAMS, M. A. Eucalypt smoke and wildfires: Temperature dependent emissions of biogenic volatile organic compounds. *International Journal of Mass Spectrometry*, v.279, p.126–133, 2009. DOI: 10.1016/j.ijms.2008.10.027

MARENGO, J. A., CUNHA, A. P., CUARTAS, L. A., LEAL, K. R. D., BROEDEL, E., SELUCHI, M. E., MICHELIN, C. M., BAIÃO, C. F. P., ÂNGULO, E. C., ALMEIDA, E. K., KAZMIERCZAK, M. L., MATEUS, N. P. A., SILVA, R. C., BENDER, F. Extreme Drought in the Brazilian Pantanal in 2019-2020: Characterization, Causes, and Impacts. *Frontiers in Water*, v.3, 2021. DOI: 10.3389/frwa.2021.639204

MARQUES, J. F., ALVES, M. B., SILVEIRA, C. F., SILVA, A. A., SILVA, T. A., SANTOS, V. J., CALIJURI, M. L. Fires dynamics in the Pantanal: Impacts of anthropogenic activities and climate change. *Journal of Environmental Management*, v.299, 2021. DOI:10.1016/j.jenvman.2021.113586

MATAVELI, G. A. V., PEREIRA, G., OLIVEIRA, G., SEIXAS, H. T., CARDOZO, F. S., SHIMABUKURO, Y. E., KAWAKUBO, F. S., BRUNSELL, N. A. 2020 Pantanal's widespread fire: short- and long-term implications for biodiversity and conservation. *Biodiversity and Conservation*, v.30, p.3299-3303, 2021.

MIOTO, C. L., FILHO, A. C. P., ALBREZ, E. A. Contribution to the characterization of Pantanal's sub-regions. *Entre-Lugar, Dourados*, n.6, p.165-180, 2012.

NAYAK, A. K., RAJA, R., RAO, K. S., SHUKLA, A. K., MOHANTY, S., SHAHID, M., TRIPATHI, R., PANDA, B. B., BHATTACHARYYA, P., KUMAR, A., LAL, B., SETHI, S. K., PURI, C., NAYAK, D., SWAIN, C. K. Effect of fly ash application on soil microbial response and heavy metal accumulation in soil and rice plant. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.114, p.257-262, 2015. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2014.03.033

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. Tese (Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

PINTO, M. M., LIBONATI, R., TRIGO, R. M., TRIGO, I. F., DACAMARA, C. C. A deep learning approach for mapping and dating burned areas using temporal sequences of satellite

images. ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing, v.160, p.206-274, 2020. DOI: 10.1016/j.isprsjprs.2019.12.014

SCHULZ, C., WHITNEY, B. S., ROSSETTO, O. C., NEVES, D. M., CRABB, L., OLIVEIRA, E. C., LIMA, P. L. T., AFZAL, M., LAING, A. F., FERNANDES, L. C. S., SILVA, C. A., STEINKE, V. A., STEINKE, E. T., SAITO, C. H. Physical, ecological and human dimensions of environmental change in Brasil`s Pantanal wetland: Synthesis and research agenda. Science of The Total Environment, v.687, p.1011-1027, 2019. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.06.023

SILVA, V., ABRANTES, N., COSTA, R., KEIZER, J. J., GONÇALVES, F., PEREIRA, J. L. Effects of ash-loaded post-fire runoff on the freshwater clam *Corbicula fluminea*. Ecological Engineering, v.90, p.180-189, 2016. DOI: 10.1016/j.ecoleng.2016.01.043

SILVEIRA, R. M. Bioensaios de Toxicidade e organismos bioindicadores como instrumento para a caracterização ambiental do Rio ItajaíMirim, SC. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2007.

SPENCER C.N., GABEL K.O., HAUER, F.R. Wildfire effects on stream food webs and nutrient dynamics in Glacier National Park, USA. Forest Ecology and Management, p.141–153, 2003. DOI: 10.1016/S0378-1127(03)00058-6

TRUHAUT, R. Ecotoxicology: Objectives, Principles and Perspectives. Ecotoxicology and Environmental Safety. New York, V.1, p. 151-173, 1977. DOI: 10.1016/0147-6513(77)90033-

1