

**Evento:** XXV Seminário de Iniciação Científica

**EFEITOS DA EXPOSIÇÃO A HERBICIDA À BASE DE GLIFOSATO SOBRE A MORTALIDADE E REPRODUÇÃO DE OLIGOQUETAS<sup>1</sup>**  
**EFFECTS OF GLYPHOSATE-BASED HERBICIDE ON MORTALITY AND REPRODUCTION OF OLIGOCHAETES**

**Diovana Gelati De Batista<sup>2</sup>, Geovane Barbosa Dos Santos<sup>3</sup>, Henrique Ribeiro Müller<sup>4</sup>, Thiago Gomes Heck<sup>5</sup>, Paulo Ivo Homem De Bittencourt Jr.<sup>6</sup>, Antônio Azambuja Miragem<sup>7</sup>**

<sup>1</sup> Pesquisa Institucional desenvolvida no Departamento de Ciências Biológicas, do Instituto Federal Farroupilha (IFFAR) campus Santa Rosa, pertencente ao Grupo de Pesquisa em Resposta Celular ao Estresse (GPRCE).

<sup>2</sup> Aluna do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Instituto Federal Farroupilha (IFFAR) campus Santa Rosa, bolsista PROBIC/FAPERGS, diovana.g.debatista@hotmail.com.br

<sup>3</sup> Aluno do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Instituto Federal Farroupilha (IFFAR) campus Santa Rosa, bolsista PROBIC/IFFAR, bgeovane.2011@gmail.com

<sup>4</sup> Aluno do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Instituto Federal Farroupilha (IFFAR) campus Santa Rosa, bolsista PROBIC/CNPq, hribeiomuller@gmail.com

<sup>5</sup> Professor Doutor do Departamento de Ciências da Vida da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI), Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral à Saúde (PPGAIS), thiago.heck@unijui.edu.br

<sup>6</sup> Professor Doutor do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), pauloivo@ufrgs.br

<sup>7</sup> Professor Doutor do Departamento de Ciências Biológicas do Instituto Federal Farroupilha (IFFAR) campus Santa Rosa, Orientador, antonio.miragem@iffarroupilha.edu.br

## **INTRODUÇÃO**

Os pesticidas vêm sendo utilizados cada vez mais nos últimos anos, para o aumento da produtividade agrícola [Duke, 2014]. Entretanto, contaminam o meio ambiente e desafiam a sobrevivência dos organismos vivos nele presentes [Clair et al., 2012; Masiá *et al.*, 2013]. Dentre os agrotóxicos, o glifosato é um herbicida não seletivo amplamente utilizado [Benbrook, 2016; Myers *et al.*, 2016], que afeta principalmente o ecossistema edáfico, atingindo e prejudicando organismos não alvo, como as oligoquetas [Buch, 2013]. As oligoquetas, por sua função ecológica como “engenheiras do ecossistema” [Lavelle *et al.*, 2006] e por suas características alimentares e anatômicas, respondem diretamente às alterações no ambiente edáfico, bioacumulando contaminantes e sofrendo mudanças fisiológicas, reprodutivas e comportamentais mensuráveis [Correia e Moreira, 2010; Santadino, Coviella e Momo, 2014; Salvio *et al.*, 2016], que comprometem sua sobrevivência.

O tratamento crônico com glifosato, durante sete dias, levou a uma redução na biometria e à mortalidade de oligoquetas *Eisenia andrei* expostas a diferentes dosagens do agroquímico [Buch, 2013]. Repetidas doses desse mesmo herbicida não provocaram a morte de minhocas *Lumbricus terrestris* e *Aporrectodea caliginosa*, mas reduziram sua taxa de produção de casulos [Gaupp-Berghausen *et al.*, 2015]. Além disso, outro recente estudo demonstrou que, a longo prazo, a

**Evento:** XXV Seminário de Iniciação Científica

população de oligoquetas *Eisenia andrei* tende a diminuir significativamente, em resposta ao contato com o herbicida [Santadino, Coviella e Momo, 2014]. A partir deste contexto, o objetivo deste estudo foi verificar o efeito crônico do glifosato na taxa de mortalidade e reprodução de oligoquetas expostas a diferentes dosagens do agrotóxico.

**METODOLOGIA**

Participaram deste estudo oligoquetas adultas, com clitelo aparente, pertencentes à espécie *Eisenia andrei* [Bouché, 1972]. Durante os experimentos, os animais foram mantidos em potes plásticos com volume total de 1.350 cm<sup>3</sup> e área superficial de 0,023 m<sup>2</sup>, denominados unidades experimentais (U.E.). O composto utilizado (habitat experimental) continha 950 g de solo (95 %) e 50 g de erva-mate (5 %), que serviu de matéria orgânica vegetal, base de alimento para os animais. A umidade do meio foi regulada semanalmente para 60% e a temperatura foi monitorada diariamente, numa faixa de 20 a 25<sup>o</sup> C - estas são as condições ideais para sobrevivência de oligoquetas em laboratório [Edwards, 1995; Suthar 2009]. Os grupos experimentais foram divididos em 4 tratamentos diferentes, sendo eles: grupo controle (CTRL), solo nas condições normais supracitadas, sem contaminação; grupo glifosato (GLY), solo contaminado com agrotóxico (Glifosato Nortox NA ®, Nortox S/A, PR, Brasil), em solução aquosa (mimetizando o uso real na lavoura), aplicado o processo de redução de volume proporcional, a fim de manter a concentração e diluição média padrão sugerida pelo fabricante (3 L/ha, em 100 L de água); grupo superglifosato (SGLY), solo contaminado com glifosato a uma concentração de 10 L/ha, simulando a concentração total aproximada de três aplicações sequenciais - que é a rotineiramente utilizada durante as safras - da dosagem indicada pelo fabricante (3 L/ha); e grupo ultraglifosato (UGLY), solo contaminado com glifosato a uma concentração de 30 L/ha, de modo a verificarmos efeitos de aplicações extremas. Colocaram-se 5 organismos/U.E., com as características de maturação supracitadas. Foram analisados dois períodos de exposição diferentes: 7 e 14 dias. A sete dias de exposição, os grupos CTRL, GLY e SGLY foram avaliados quanto à variável mortalidade de animais. A 14 dias, foram analisados os grupos CTRL e GLY para a variável mortalidade, e CTRL e UGLY para as variáveis relativas à reprodução das oligoquetas - número de casulos e número de juvenis.

Após cada período de exposição, foram coletados e quantificados todos os animais de cada U.E. (juvenis e adultos) pelo método de catação manual [Anderson e Ingram, 1993]. Depois da remoção de todas as oligoquetas, os casulos foram coletados através do peneiramento do solo das U.E. [OECD 222, 2004].

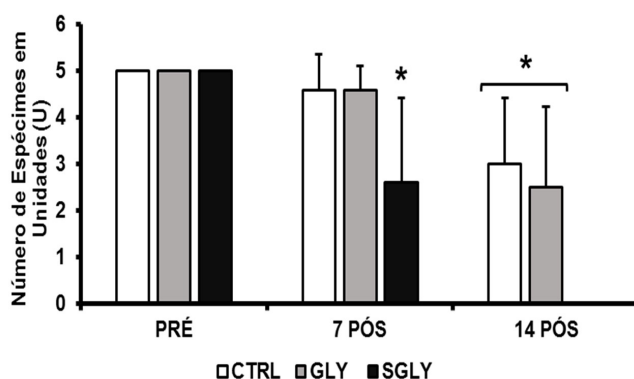
Os resultados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) para erros do tipo I, após teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Quando ANOVA (uma via) detectou diferença entre os grupos, e onde o valor de P foi menor que 0.05, a diferença estatística foi identificada através do procedimento de comparação múltipla com o Teste de Múltiplas Comparações de Tukey-Kremer. Para a comparação de efeitos pré- e pós-tratamento, ANOVA foi seguido do teste de Dunnet para múltiplas comparações. A frequência e a ocorrência para os casulos e animais juvenis foram checados com o Teste Exato de Fischer. Os resultados foram expressos em média e erro padrão. Os dados foram tabulados e analisados no software GraphPad 3.0 para Windows.

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A contaminação com glifosato levou à redução no número de oligoquetas dos grupos analisados, com efeitos dependentes da dose e do período de exposição. Após o período de sete dias, houve uma redução no número de espécimes apenas do grupo SGLY (P=0,0104), que teve uma taxa de

Evento: XXV Seminário de Iniciação Científica

mortalidade de 48 % (Figura 1), enquanto os grupos CTRL e GLY apresentaram 91,4 % de sobrevivência em ambos os tratamentos (Figura 1). Contudo, após 14 dias de exposição, observamos uma redução nas oligoquetas tanto do grupo CTRL, como do grupo GLY ( $P=0,0403$ ), que tiveram uma taxa de mortalidade de 40 e 50 % em relação aos animais inicialmente inoculados, respectivamente (Figura 1).



**Figura 1.** Médias de animais pré- e pós-exposição, submetidos a períodos de exposição (7 e 14 dias). (CTRL) grupo controle; (GLY) contaminado com glifosato a 3 L/ha; (SGLY) contaminado com glifosato a 10L/ha. Dados em Média  $\pm$  EPM. \* $P<0,01$ .

A mortalidade de minhocas expostas ao glifosato em concentrações indicadas para aplicação na lavoura não é comum na literatura. Foi verificado apenas 4% de perdas em oligoquetas *Eisenia andrei* expostas ao herbicida durante sete dias à concentração mais elevada entre as testadas, que foi de 47mg/Kg de solo [Buch, 2013]. Em nossos resultados, por outro lado, para o mesmo período de exposição, a dosagem prescrita para aplicação na lavoura, grupo GLY, (contando com a possível biodegradação, independente de bioacumulação e biomagnificação) não apresentou redução significativa no número de oligoquetas. Minhocas *Aporrectodea caliginosa* e *Lumbricus terrestris* expostas a repetidas doses de glifosato, em concentração abaixo da indicada pelo fabricante, num total de aplicação do herbicida de 176,12 ml m<sup>-2</sup>, também não apresentaram taxas significativas de mortalidade, com aproximadamente 90% de sobrevivência para *L. terrestris* e 100% para *A. caliginosa* [Gaupp-Berghausen *et al.*, 2015]. Entretanto, observamos também uma dependência temporal na sobrevivência das oligoquetas, uma vez que um maior período de exposição - 14 dias - provocou um aumento na taxa de mortalidade dos grupos CTRL e GLY. Ademais, a exposição crônica ao glifosato em diferentes concentrações também não apresentou mortalidade de oligoquetas *Eisenia foetida*. Contudo, os animais apresentaram redução em sua biomassa, excessiva secreção mucosa, alterações morfológicas e redução em sua atividade [Correia e Moreira, 2010]. Além disso, o glifosato, a uma concentração de 30 L/ha (grupo UGLY), após 14 dias, levou a um aumento de 192,3 % no número de juvenis e a uma redução de 50% no número de casulos das oligoquetas, quando comparado com o grupo CTRL (Tabela 1).

**Tabela 1.** Efeitos sobre a produção de casulos e geração de filhotes de oligoquetas expostas ao glifosato (30L/ha) durante 14 dias.

**Evento:** XXV Seminário de Iniciação Científica

Variável	Grupos		
	CTRL	U-GLY	Teste Exato de Fischer
Casulos	38	16	P<0,0001
Juvenis	13	38	

Dados expressos com o número total de casulos e filhotes coletados em cada um dos diferentes tratamentos.

Foi observado um comportamento de inversão, não proporcional, o que torna a forma de inversão muito relevante, uma vez que, houve uma pronunciada alteração no tempo de maturação destes animais. Santadino, Coviella e Momo [2014] avaliaram os efeitos agudo e crônico do glifosato (Monsanto, SL, 48 %) em oligoquetas *Eisenia andrei*. No referido estudo, foram aplicadas duas concentrações diferentes do agroquímico: 6 L/ha (concentração conforme indicação agrônoma para plantas perenes), e 12 L/ha (o dobro da primeira). O número de casulos dos grupos contaminados foi significativamente maior do que nos grupos controle, ao contrário dos nossos resultados. Por outro lado, o que contrapõe novamente nossos achados, a quantidade de animais juvenis encontrados foi relativamente menor nos grupos que continham glifosato, o que, segundo os autores, indicou um efeito negativo do herbicida na viabilidade dos casulos. Assim, visto que a concentração do agroquímico utilizada em nossos experimentos foi de 30 L/ha para avaliar seus efeitos na reprodução das oligoquetas, as diferenças supracitadas podem ser consequência das doses utilizadas, sendo necessário a realização de novos experimentos para dados que abranjam menores concentrações do contaminante. No entanto, fica evidente uma participação importante do agrotóxico na desregulação metabólica destes organismos, os quais sofrem alterações expressivas em sua reprodução e desenvolvimento.

A partir dos nossos resultados, podemos acreditar fortemente numa possível redução no tempo de maturação e de eclosão dos casulos expostos ao glifosato. Ademais, este nascimento prematuro reflete a presença no meio de indivíduos não aptos ou incapazes de sobreviver. Além disso, neste tratamento, o número de animais juvenis foi maior do que o do controle. Assim, são necessários estudos que compreendam também a viabilidade destes casulos, bem como, ensaios que demonstrem as vias celulares e metabólicas afetadas, causadoras destas desordens orgânicas.

#### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A exposição ao herbicida à base de glifosato afeta a sobrevivência de oligoquetas, tendo efeitos dependentes da dose de aplicação e do período de exposição. As concentrações mais elevadas e tempos mais longos de contaminação resultaram em maior taxa de mortalidade. Ademais, este agroquímico altera a capacidade reprodutiva destes animais, aumentando a geração de filhotes. Pensando que a dosagem de 10 L/ha, utilizada no grupo SGLY, simulou a dose real do herbicida que é aplicada nas lavouras de diversas cultivares, os efeitos observados indicam riscos à fauna edáfica e às características físicas do solo, visto que as minhocas são elementos chave para a manutenção do equilíbrio ambiental. Como perspectiva para futuros estudos, apontamos a necessidade da avaliação dos efeitos deste herbicida a nível celular em oligoquetas, de modo a identificar-se as vias comprometidas pela contaminação. Do mesmo modo, a investigação das implicações do agroquímico para a viabilidade dos casulos após a contaminação com diferentes

**Evento:** XXV Seminário de Iniciação Científica

dosagens e tempos de exposição também faz-se necessária.

**Palavras-chave:** minhoca; fauna edáfica; agrotóxico; pesticida; ecotoxicologia.

**Keywords:** earthworm; edaphic fauna; agrotoxic; pesticide; ecotoxicology.

#### **REFERÊNCIAS**

ANDERSON, J.M.; INGRAM, J.S.I. Tropical Soil Biology and Fertility: A Handbook of Methods. 2ª Ed. **C.A.B Internafional**. 1993.

BENBROOK, C. M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environmental Science Europ**. V. 28, n. 3, 2016.

BUCH, A.C. et al. Toxicity of three pesticides commonly used in Brazil to *Pontoscolex corethrurus* (Müller, 1857) and *Eisenia andrei* (Bouché, 1972). **Applied Soil Ecology**. V. 69, p. 32- 38, 2013.

CLAIR, E. et al. A glyphosate-based herbicide induces necrosis and apoptosis in mature rat testicular cells in vitro, and testosterone decrease at lower levels. **Toxicology in Vitro**. Volume 26, Issue 2, March 2012, p. 269-279.

CORREIA, F. V; MOREIRA, J. C. Effects of Glyphosate and 2,4-D on Earthworms (*Eisenia foetida*) in Laboratory Tests. **Bull Environ Contam Toxicol**. V. 85, p. 264-268, 2010.

DUKE, S. O. Perspectives on transgenic, herbicide-resistant crops in the United States almost 20 years after introduction. **Pest Manag Sci**. V.71, n. 5, p. 652-7, 2014.

EDWARDS, C. A. Historical overview of vermicomposting. **BioCycle**. 36, 6:56, 1995.

GAUPP-BERGHAUSEN, M. Glyphosate-based herbicides reduce the activity and reproduction of earthworms and lead to increased soil nutrient concentrations. **Scientific Reports**. V. 5, n. 12886, 2015.

LAVELLE, P. et al. Soil invertebrates and ecosystem services. **Eur J Soil Biol**, Jersey: v. 42, n. 1, p. 3-15, 2006.

MASIÁ, A. et al. Screening of currently used pesticides in water, sediments and biota of the Guadalquivir River Basin [Spain]. **Journal of Hazardous Materials**. V. 263, 1, 15.p. 95-104. 2013

MYERS, J. P. et al. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures. **Environ Health**.V.17, p.15-19, 2016.

Organization for Economic Co-Operation and Development (OECD). Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida/ Eisenia Andrei*). 2004. 18p. (**Guideline for the testing of chemicals**, Section 2, n. 222).

SALVIO, C. et al. Survival, Reproduction, Avoidance Behavior and Oxidative Stress Biomarkers in the Earthworm *Octolasion cyaneum* Exposed to Glyphosate. **Bull Environ Contam Toxicol**. 2016. V. 96, p. 314-319.

SANTADINO, M.; COVIELLA, C.; MOMO, F. Glyphosate Sublethal Effects on the Population Dynamics of the Earthworm *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). **Water Air Soil Pollut**. 225:2207. 2014.

SUTHAR, S. Vermicomposting of vegetablemarket solid waste using *Eisenia fetida*: Impact of bulking material on earthworm growth and decomposition rate. **Ecological Engineering**. V. 35, p. 914-920. 2009.