



Universidade Federal de São Carlos
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Curso de Engenharia Agrônoma



RAFAELA OLIVA DA SILVA

ESTUDO ECOTOXICOLÓGICO DO GLUFOSINATO DE AMÔNIO EM
***Eisenia andrei* (Bouché, 1972)**

ARARAS - 2024



Universidade Federal de São Carlos
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
Curso de Engenharia Agrônoma



RAFAELA OLIVA DA SILVA

ESTUDO ECOTOXICOLÓGICO DO GLUFOSINATO DE AMÔNIO EM
***Eisenia andrei* (Bouché, 1972)**

Monografia apresentada ao Curso de
Engenharia Agrônoma – CCA – UFSCar para
a obtenção do título de Engenheira Agrônoma

Orientador: Profa. Dra. Patricia Andrea
Monquero

ARARAS – 2024
AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e à Nossa Senhora, que me guiaram na fé, assegurando que eu nunca perdesse a esperança e permanecesse resiliente diante dos desafios enfrentados.

Aos meus queridos pais, Eliana e Roberto, cujo amor, confiança, apoio e sacrifícios, me proporcionaram a base sobre a qual construí meus sonhos. Vocês são a minha verdadeira essência.

À minha orientadora, Professora Dra. Patricia Andrea Monquero, sua orientação, paciência e dedicação, foram fundamentais em minha jornada acadêmica.

Ao meu namorado, Rafael, obrigada por estar sempre ao meu lado, compartilhando comigo os desafios e as alegrias, e por ser uma fonte constante de amor e motivação.

Ao Grupo de Estudos em Ciências Agrárias (GECA), pela amizade e colaboração de vocês que foram essenciais. Um agradecimento especial ao Bruno e André, cujo apoio durante a realização deste experimento foi fundamental.

À República KK por todos os aprendizados e desafios superados, que ajudaram a moldar minha jornada acadêmica e pessoal.

Agradeço profundamente às amigas que construí, que sempre estiveram presentes e que levarei comigo para sempre, principalmente a Raissa, Luana, Gabrielli, Aysla, Ana Júlia, Caroline, André, Gabriel e Gianluca.

À banca examinadora, Ana Júlia B. de Souza e Bruna F. Schedenfeldt, agradeço o tempo, consideração e orientações perspicazes, para enriquecer este trabalho, vocês são mulheres inspiradoras em minha vida.

RESUMO

No contexto da crescente utilização de agrotóxicos, principalmente do glufosinato de amônio, frente à resistência de plantas daninhas a herbicidas e ao desenvolvimento de culturas transgênicas tolerantes ao glufosinato de amônio, que ampliaram significativamente sua importância na agricultura, é crucial entender as consequências de sua aplicação e seu potencial ameaça aos ecossistemas, particularmente o terrestre. A espécie *Eisenia andrei* é frequentemente empregada em estudos ecotoxicológicos devido à sua importância ecológica na manutenção da estrutura e fertilidade do solo e sua sensibilidade a contaminantes. O presente estudo visou avaliar os efeitos ecotoxicológicos do herbicida glufosinato de amônio em minhocas da espécie *Eisenia andrei* (Bouché, 1972), focando em aspectos de ecotoxicidade aguda, crônica e comportamental. Os ensaios foram conduzidos conforme as normas International Organization for Standardization (ISO) (11268-1, 1993; 11268-2, 1998; 17512-1, 2008), todos os testes adotaram um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com seis concentrações do herbicida glufosinato de amônio (agudo: 0, 175, 340, 505, 670 e 835 mg i.a. kg⁻¹; crônico e comportamental 0, 3,3; 5; 6,7; 8,3 e 10 mg i.a. kg⁻¹) e quatro repetições para os testes agudo e crônico e cinco repetições para o teste comportamental. Os resultados apontaram impactos significativos na sobrevivência, biomassa, reprodução e comportamento das minhocas em determinadas concentrações. A Concentração Letal Mediana (CL₅₀) para mortalidade em 14 dias foi estabelecida em 611,68 mg i.a. kg⁻¹ indicando uma toxicidade moderada ao herbicida. A Concentração Efetiva Mediana (CE₅₀) para efeitos na reprodução em 56 dias e para induzir fuga em 48 horas foram determinadas em 4,49 mg i.a. kg⁻¹ e 3,30 mg i.a. kg⁻¹, respectivamente. As concentrações de 8,3 e 10 mg i.a. kg⁻¹ induziram as maiores respostas de fuga, contudo, não atingiram o limiar de 80% de fuga estabelecido pela ISO 17512-1 para classificar uma substância como tóxica. Estes achados ressaltam a importância de avaliar os riscos ecotoxicológicos de agrotóxicos, como o glufosinato de amônio, para práticas de manejo agrícola mais seguras e sustentáveis.

Palavras-chave: Contaminação do solo; herbicidas; minhocas; organismos não-alvo; oligoquetas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Recipiente-teste, utilizado nos ensaios agudo e crônico.....	19
Figura 2. Banho-maria.	20
Figura 3. Recipiente com divisória	21
Figura 4. Média da perda/ganho de biomassa (mg) de <i>E. andrei</i> com concentrações crescentes de glufosinato de amônio (mg i.a. kg ⁻¹ solo seco) aos 14 dias.....	26
Figura 5. Média de indivíduos juvenis de <i>E. andrei</i> após exposição com concentrações crescentes de glufosinato de amônio.	28
Figura 6. Ausência de alterações morfológicas em adultos de <i>E. andrei</i> , nos tratamentos 0 e 5 mg i.a. kg ⁻¹ , aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos...	29
Figura 7. Resultados do teste de fuga realizado com minhocas da espécie <i>E. andrei</i> quando expostas a um solo contaminado com diferentes concentrações de glufosinato de amônio após 48 horas.	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físicas e químicas do Latossolo utilizado nos testes ecotoxicológicos com <i>Eisenia andrei</i>	17
Tabela 2. Concentrações de glufosinato de amônio utilizadas nos testes ecotoxicológicos em <i>E. andrei</i> , em miligramas de ingrediente ativo (i.a.) por quilo de solo seco (mg kg^{-1}).....	18
Tabela 3. Parâmetros ecotoxicológicos ($\text{CE}_{50-48\text{h}}$, $\text{CL}_{50-14\text{d}}$ e $\text{CE}_{50-56\text{d}}$) e seus respectivos intervalos de confiança obtidos da exposição de <i>E. andrei</i> a concentrações nominais de glufosinato de amônio.	24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1. Ecotoxicologia Terrestre	10
2.2. Utilização de minhocas em estudos ecotoxicológicos do solo	12
2.3. Glufosinato de amônio	13
3. OBJETIVOS	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1. Espécie, solo e herbicida utilizado.....	17
4.2. Teste de ecotoxicidade aguda.....	18
4.4. Teste de ecotoxicidade crônica	19
4.5. Ensaio de comportamento	20
4.6. Análise estatística	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.1. Ecotoxicidade aguda: variação média da biomassa corporal	24
5.2. Ecotoxicidade crônica	26
5.3. Ensaio de comportamento	29
6. CONCLUSÃO	32
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

1. INTRODUÇÃO

A crescente preocupação com a sustentabilidade ambiental e a saúde dos ecossistemas tem colocado em destaque a necessidade de compreender os impactos de práticas agrícolas, especialmente o uso de agrotóxicos, sobre organismos não-alvos (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018).

O glufosinato de amônio, é conhecido por sua eficácia no controle de plantas daninhas. Seu uso é particularmente notável em cultivos transgênicos, onde este se estabeleceu como um substituto eficaz para o controle de biótipos resistentes ao glifosato (CHRISTOFFOLETI; NICOLAI, 2016; ALBRECHT et al., 2023). Além disso a introdução de cultivares transgênicos com resistência ao glufosinato representou uma mudança significativa nas práticas agrícolas, pois permitiu a aplicação do herbicida em maiores quantidades e com maior frequência, sem os riscos de danificar as culturas (DUKE; CERDEIRA, 2010). No entanto, esse aumento no uso deste herbicida acarreta preocupações significativas sobre suas consequências ecotoxicológicas.

Um estudo recente focou na avaliação ecotoxicológica do glufosinato de amônio e do glifosato em girinos de anfíbios. Os pesquisadores analisaram as propriedades de ligação desses herbicidas e os efeitos biológicos em girinos do sapo comum *Rhinella arenarum* durante um bioensaio crônico de 45 dias. O estudo revelou que ambos os herbicidas causaram anormalidades morfológicas, dano ao DNA, desregulação hormonal e estresse oxidativo aos girinos. Os resultados indicaram que o tratamento com glufosinato de amônio foi mais tóxico do que o glifosato, destacando as potenciais implicações ecotoxicológicas desses compostos em ecossistemas aquáticos (BOCCIONI et al., 2022).

Estudos anteriores focaram no impacto de herbicidas, incluindo o glufosinato de amônio, em ecossistemas aquáticos e vertebrados. Acarretando uma lacuna significativa no entendimento dos efeitos desses compostos em componentes vitais dos ecossistemas terrestres, particularmente nas minhocas, cuja reação a herbicidas ainda é pouco compreendida, conforme apontado por Sisino et al. (2019).

Minhocas, como *E. andrei*, desempenham um papel ecológico na manutenção da estrutura e fertilidade do solo, e são reconhecidas por sua sensibilidade à poluição ambiental. Devido a essas características, elas são frequentemente usadas como organismos modelo para avaliar os riscos ecotoxicológicos de poluentes em ecossistemas terrestres (SFORZINI et al., 2010).

Estudos envolvendo essas minhocas são fundamentais para compreender como diferentes substâncias impactam o solo e os organismos que nele vivem, fornecendo informações valiosas para a avaliação de riscos ambientais e a gestão sustentável de ecossistemas. Além disso, enquanto a toxicidade aguda de produtos químicos é frequentemente documentada, seus efeitos subletais e crônicos em organismos do solo permanecem pouco explorados (SISINNO et al., 2019).

Este estudo visa, portanto, avaliar os efeitos ecotoxicológicos do glufosinato de amônio em *E. andrei*, contribuindo para práticas de manejo agrícola mais seguras e sustentáveis.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ecotoxicologia Terrestre

A ecotoxicologia é uma ciência que avalia os impactos de contaminantes ambientais em organismos e ecossistemas. Ela utiliza abordagens interdisciplinares para estudar a dinâmica, o destino e os efeitos de poluentes, contribuindo para a compreensão dos riscos ambientais e a elaboração de medidas de mitigação (OLIVEIRA; BALDAN, 2022). Estes estudos medem os efeitos imediatos ou de longo prazo de contaminantes em organismos não-alvo. Eles podem avaliar a mortalidade, mudanças comportamentais, efeitos subletais, e alterações fisiológicas e bioquímicas (CARVALHO; PIVOTO, 2011).

Com a implementação da Lei nº 7.802/89, revogado pela Lei nº 14.785, de 2023, surgiu a exigência de que os agrotóxicos fossem submetidos a uma rigorosa avaliação e classificação em relação ao seu Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA) pelo IBAMA, para a concessão do registro de agrotóxicos no território brasileiro (BRASIL, 2023). Dentro deste contexto, os fabricantes de agrotóxicos precisam realizar testes ecotoxicológicos com seus produtos em processo de registro. Após a avaliação e validação destes testes pelo IBAMA, os resultados são categorizados em uma escala de periculosidade ambiental, variando de 1 a 4, o que reflete o grau de risco que cada produto representa para o meio ambiente (BRASIL, 2022a).

Uma variedade de organismos é utilizada em estudos ecotoxicológicos. Isso inclui microorganismos, como bactérias e fungos, que são cruciais para processos de biodegradação e ciclagem de nutrientes; invertebrados, como abelhas e outros insetos polinizadores, que são indicadores de toxicidade em ecossistemas terrestres; e vertebrados, como peixes e aves (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2014).

A ecotoxicologia terrestre lida com a interação entre poluentes e os componentes do ecossistema terrestre. Um dos principais desafios é a complexidade do solo, que pode variar enormemente em composição, estrutura e propriedades, afetando assim a disponibilidade e o movimento dos contaminantes. Além disso, a diversidade de habitats terrestres e a interação entre múltiplas espécies tornam os estudos ecotoxicológicos terrestres particularmente desafiadores (BARETTA et al., 2019).

Os estudos sobre agrotóxicos no contexto da ecotoxicologia terrestre são fundamentais, considerando que esses produtos são grandes contaminantes

ambientais em diversas situações. Uma vez no solo, interagem com a fauna edáfica, influenciando os ecossistemas terrestres (NUNES, 2010). Além disso, aplicações de agrotóxicos podem resultar em resíduos que afetam negativamente os ecossistemas. Podendo se espalhar além da área de aplicação através de processos como lixiviação, carreamento superficial e volatilização, com a perda de agrotóxicos variando significativamente (SPADOTTO; GOMES, 2021).

De acordo com Baretta et al. (2019), este campo abrange a análise de dados de matrizes contaminadas através de ensaios laboratoriais ou *in situ*, utilizando espécies padrões para caracterizar o risco da contaminação. Há dois tipos principais de avaliações: a prospectiva, que estima o risco potencial de substâncias químicas antes da sua introdução no ambiente, e a retrospectiva, que avalia solos já contaminados em comparação com locais de referência.

Neste contexto, o estudo de Oliveira, Ferreira e Coneglian (2021) sobre o herbicida ametrina, ilustra uma aplicação prática da avaliação prospectiva. A pesquisa avaliou o impacto do herbicida ametrina em colêmbolos da espécie *Folsomia candida*, usando diferentes concentrações do produto em latossolo vermelho. Foi notado um comportamento de fuga dos colêmbolos, mais pronunciado na concentração mais elevada de $22,2 \text{ l.kg}^{-1}$ de solo seco, com 46,6% dos organismos exibindo fuga. A mortalidade manteve-se abaixo de 20%. Entretanto, a maioria dos organismos preferiu o solo não contaminado, apontando para uma potencial toxicidade da ametrina.

A padronização de estudos ecotoxicológicos por meio de normas nacionais e internacionais contribuem para a integridade metodológica e validade dos dados obtidos em investigações ambientais. Normativas estabelecidas por organizações reconhecidas, tais como a Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), International Organization for Standardization (ISO) e a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), delineiam procedimentos que garantem a uniformidade e a replicabilidade dos resultados ecotoxicológicos. Do ponto de vista acadêmico, a adesão a protocolos padronizados facilita a comparação entre estudos e a extrapolação de dados laboratoriais para contextos reais, contribuindo para a construção de conhecimento científico confiável e aplicável às práticas de conservação ambiental (SISINNO et al, 2019).

Os estudos ecotoxicológicos, são, portanto, fundamentais para a tomada de decisões em relação ao uso de agrotóxicos e para o desenvolvimento de práticas agrícolas mais sustentáveis.

2.2. Utilização de minhocas em estudos ecotoxicológicos do solo

As minhocas são organismos essenciais para a manutenção da saúde e da produtividade do solo. Contribuem significativamente para a decomposição de resíduos e a mineralização da matéria orgânica e melhoram as propriedades físicas e químicas do solo, que por sua vez, beneficia o rendimento e a qualidade das culturas (RÖMBKE; JÄNSCH; DIDDEN, 2005).

Além disso, a diversidade de espécies de minhocas é essencial para o funcionamento biológico do solo, influenciando diretamente serviços ecossistêmicos como a saúde do solo, a produtividade agrícola, a regulação do ciclo da água, a recuperação de terras degradadas e o equilíbrio dos gases de efeito estufa. Contudo, é importante ressaltar que atividades humanas podem reduzir drasticamente essa diversidade, representando uma ameaça significativa para esses serviços ecossistêmicos (DEWI; SENGE, 2015).

A relevância dos organismos modelo em estudos ambientais reflete-se na adoção frequente de minhocas para avaliar o impacto de contaminantes químicos em ecossistemas terrestres. No cenário global, testes ecotoxicológicos frequentemente empregam minhocas, das espécies *E. andrei* ou *E. fetida*. Entretanto, essas espécies são raramente encontradas em solos agrícolas tropicais e têm uma sobrevivência limitada nesses ambientes, devido à sua necessidade de matéria orgânica fresca. No Brasil, assim como em outros países, essas espécies foram escolhidas como padrão para estudos, apesar de não refletirem adequadamente a fauna edáfica tropical. Seu uso predominante se dá em processos de vermicompostagem (SISINNO et al, 2019).

Um estudo conduzido por Zortéa et al. (2022) avaliou o comportamento e a reprodução das minhocas *E. andrei* quando expostas a doses crescentes de cipermetrina, um medicamento veterinário. Os resultados mostraram que doses de até 6 mg kg⁻¹ no solo não causaram letalidade, mas doses de 3 mg kg⁻¹ reduziram a taxa de reprodução e induziram as minhocas a fugir dos solos contaminados. Concluindo-se risco ambiental devido à alta toxicidade da cipermetrina.

Uma pesquisa recente conduzida por Schedenfeldt et al. (2024) investigou a toxicidade de formulações comerciais dos herbicidas sulfentrazone (Boral® 500 SC), clomazone (Gamit® 360 CS) e indaziflan (Alion®) em *E. andrei*. Os resultados sugeriram riscos agudos significativos com o Gamit® 360 CS, enquanto a exposição crônica levantou preocupações tanto para o Gamit® 360 CS quanto para o Boral® 500 SC, indicando possíveis riscos a longo prazo. Os efeitos agudos do Alion® foram

inconclusivos, mas a exposição crônica sugeriu um possível risco.

Ademais, há questões importantes ainda a serem abordadas sobre os efeitos de poluentes em minhocas, sugerindo a necessidade de condução de pesquisas ecotoxicológicas adicionais para entender melhor os impactos dos agrotóxicos em minhocas.

2.3. Glufosinato de amônio

No Brasil, as vendas de agrotóxicos em 2022 foram de 800.652 toneladas de ingredientes ativos. No mesmo período, os dez ingredientes ativos mais comercializados no país, em toneladas, foram: Glifosato e seus sais; 2,4-D; Atrazina, Mancozebe; Acefato; Clorotalonil, Dibrometo de Diquat, Glufosinato – Sal de Amônio, Clorpirifós e Metomil (BRASIL, 2022b).

O glufosinato de amônio é herbicida eficaz no combate a uma vasta gama de plantas daninhas. A eficiência desse herbicida deve-se primordialmente à sua habilidade de mimetizar o glutamato, bloqueando de maneira irreversível a enzima glutamina sintetase. Este mecanismo de ação é importante no contexto de desafios crescentes impostos por biótipos de plantas daninhas que desenvolveram resistência a herbicidas convencionais, como o glifosato. Além disso, a ascensão de culturas transgênicas, tolerantes ao glufosinato de amônio, permitiu aos agricultores o uso do herbicida, sem danificar as culturas que foram geneticamente modificadas. Esse avanço iniciou-se em culturas com a tecnologia LibertyLink® (LL), que é amplamente cultivada no Brasil (CHRISTOFFOLETI; NICOLAI, 2016).

Além da tecnologia LL, o mercado brasileiro também disponibiliza outras variedades transgênicas, como a soja e milho Enlist e outros diversos híbridos de milho tolerantes ao glufosinato de amônio, estes incluem as tecnologias Herculex, Yieldgard, VTPRO, entre outros (OLIVEIRA et al., 2021).

Essa diversidade de culturas transgênicas ampliou significativamente o uso do glufosinato de amônio na agricultura. No entanto, essa popularização do glufosinato de amônio traz consigo implicações importantes. Ao passo que oferece uma solução eficaz para o manejo de plantas daninhas, especialmente em um cenário de resistência crescente a outros herbicidas, também levanta questões sobre seu uso sustentável e impactos ambientais (RAMAN, 2017).

O glufosinato de amônio é um herbicida com propriedades químicas e físicas que influenciam significativamente seu comportamento e eficácia no ambiente.

Uma das características mais notáveis deste composto é sua alta solubilidade em água ($1.370.000 \text{ mg L}^{-1}$ a pH 7,0 e 20°C). Além disso, apresenta fraca adsorção ao solo, com um coeficiente de partição orgânico-carbono (K_{oc}) de aproximadamente 100 ml.g^{-1} (RODRIGUES; ALMEIDA, 2018).

Um aspecto importante do glufosinato de amônio é sua rápida degradação por microrganismos do solo, com uma meia-vida aproximada de 7 dias. Isso significa que o herbicida não persiste por longos períodos no solo, reduzindo o risco de impactos ambientais de longo prazo (TAKANO; DAYAN, 2020).

O glufosinato de amônio, classificado na classe III de periculosidade ambiental, é reconhecido como um produto que representa perigo moderado ao meio ambiente (AGROFIT, 2024). Estudos sobre sua toxicidade foram realizados em espécies animais, proporcionando um entendimento sobre os riscos associados à sua exposição.

Os resultados obtidos por Ebert, Leist e Mayer (1990) indicaram que o glufosinato apresenta uma toxicidade oral de nível moderado, além de irritação ocular e uma toxicidade dérmica consideradas leves em ratos. De forma complementar, pesquisas de teratogenicidade conduzidas com ratos e coelhos não evidenciaram riscos teratogênicos. Avaliações sobre a toxicidade crônica, realizadas tanto em ratos quanto em cães, não identificaram efeitos adversos notáveis para dosagens de 2 e 5 mg kg^{-1} de peso corporal diariamente, respectivamente.

O estudo conduzido por Babalola, Truter e Van Wyk (2021), avaliou a embriotoxicidade, teratogenicidade e inibição do crescimento em embriões de *Xenopus laevis* (rã-de-unhas-africana). Os embriões foram expostos a concentrações variando de $1,6$ a $3,0 \text{ mg L}^{-1}$ durante um período de 96 horas. Os resultados indicaram uma CL_{50} de 96 horas em $2,2 \text{ mg L}^{-1}$ de equivalente ácido (ae) e uma CE_{50} em $2,01 \text{ mg L}^{-1}$ ae, com um Índice Teratogênico de 1,1, sugerindo um risco moderado de indução de malformações. Além disso, a concentração efetiva mais baixa observada para a inibição do crescimento foi de $2,0 \text{ mg L}^{-1}$, resultando em uma proporção mínima de concentração inibidora do crescimento (MCIG) de 0,89, acima do valor de referência padrão de 0,30, indicando que o herbicida não atua como inibidor de crescimento nas concentrações testadas.

Os herbicidas no solo, estejam adsorvidos nas partículas, matéria orgânica ou na solução do solo, interagem com a fauna edáfica, como as minhocas, que podem os absorver tanto pela ingestão quanto pelo contato cutâneo, o que pode levar à intoxicação, acúmulo de substâncias em seus tecidos, alterações na produção e no

peso dos casulos, efeitos fisiológicos e morfológicos, além de mudanças comportamentais como aversão ao solo contaminado e a morte (ANDRÉA, 2010; AZEVEDO e CORONAS, 2018).

Portanto pesquisas sobre os efeitos ecotoxicológicos do glufosinato de amônio em organismos não-alvo, como as minhocas, são fundamentais para compreender as ramificações ambientais de seu uso intensivo.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar os efeitos ecotoxicológicos do herbicida glufosinato de amônio na espécie de minhoca *E. andrei*, com foco específico em: Ecotoxicidade aguda, crônica e análise comportamental.

Objetivos Específicos

1. Avaliação de ecotoxicidade aguda (letalidade): Determinar a concentração letal mediana (CL₅₀) para mortalidade em 14 dias, do glufosinato de amônio para *E. andrei*, identificando a dosagem na qual o composto se torna fatal para 50% dos indivíduos testados. E avaliar a variação média da biomassa corporal dos organismos ao final da exposição.
2. Avaliação de ecotoxicidade crônica (reprodução): Examinar como diferentes concentrações de glufosinato de amônio afetam a capacidade reprodutiva de *E. andrei* e determinar a concentração efetiva mediana (CE₅₀) para efeitos na reprodução em 56 dias.
3. Análise comportamental (fuga): Observar comportamento de fuga de *E. andrei* expostas a solo contaminado com diferentes doses de glufosinato de amônio e determinar a concentração efetiva mediana (CE₅₀) que causou fuga após 48 horas de exposição.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Espécie, solo e herbicida utilizado

O experimento foi conduzido no Laboratório de Ecotoxicologia e Química Ambiental (LEQA) do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), *campus* Araras, São Paulo.

Os ensaios ecotoxicológicos realizados seguiram rigorosamente as normas estabelecidas pela ISO, incluindo: Ecotoxicidade aguda com minhoca (ISO 11268-1, 1993); Ecotoxicidade crônica (ISO 11268-2, 1998) e Ensaio de fuga para minhoca (ISO 17512-1, 2008).

Para todos os testes, o solo utilizado foi um Latossolo Vermelho distrófico, de uma profundidade de 0 a 20 cm em uma área que nunca havia sido previamente exposta à aplicação de agrotóxicos (Tabela 1).

Tabela 1. Propriedades físicas e químicas do Latossolo utilizado nos testes ecotoxicológicos com *Eisenia andrei*

P-resin	O.M	pH	K	Ca	Mg	H+Al	SB	CEC	BS	TOC
mg/kg dry soil	g/kg dry soil	Ca/Cl ₂	-----	mmolc/kg dry soil	-----					%
0.021	0.015	5.1	0.05	0.072	0.025	0.057	0.088	0.158	0.147	3.3

*P-resin determinada usando resinas de troca iônica; determinação de pH pelo método CaCl₂; O.M.: Matéria Orgânica; SB: Soma de Bases; BS: Saturação de Bases. TOC: Carbono Orgânico Total.

Fonte: Laboratório de Química e Fertilidade do Solo do CCA/UFSCar.

Foi utilizado o herbicida Finale® (200 g L⁻¹), cujo ingrediente ativo é o glufosinato de amônio, seguindo a concentração baseada na quantidade de ingrediente ativo (i.a.), expressa em miligramas (mg) de i.a. por quilo (kg) de substrato seco (mg i.a. kg⁻¹). As concentrações utilizadas para cada teste são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2. Concentrações de glufosinato de amônio utilizadas nos testes ecotoxicológicos em *E. andrei*, em miligramas de ingrediente ativo (i.a.) por quilo de solo seco (mg.kg^{-1}).

Teste	Glufosinato (mg i.a. kg^{-1})
Agudo	0, 175, 340, 505, 670 e 835
Crônico	0; 3,3; 5; 6,7; 8,3; 10
Comportamento	0; 3,3; 5; 6,7; 8,3; 10

Em cada recipiente foram inseridas 10 minhocas adultas e cliteladas da espécie *Eisenia andrei*, com peso entre 250 a 600 mg, providas de matrizes da empresa Minhobox™. As minhocas foram mantidas em uma área isolada do laboratório para evitar contaminação externa, mantidas em caixas organizadoras de plástico e alimentadas a cada 15 dias com substrato Minhobox™, à base de esterco bovino, com umidade inerente, dispensando a necessidade de umedecê-lo regularmente, assegurando assim condições ambientais estáveis e controladas para o desenvolvimento das minhocas durante o período do estudo.

Os ensaios foram realizados em uma câmara incubadora BOD, com temperatura e luminosidade controladas, a 20 ± 2 °C e 12 horas luz por 12 horas escuro, para garantir um ambiente consistente e replicável para todos os testes (ISO 11268-1, 1993).

4.2. Teste de ecotoxicidade aguda

Um ensaio preliminar de 14 dias foi realizado para definir um intervalo de concentrações a ser utilizado no ensaio definitivo. Os recipientes foram preparados com o substrato em triplicatas para as concentrações, sugeridas pela norma ISO (ISO 16387, 2014): 0, 1, 10, 100, 500 e 1.000 mg kg^{-1} , em seguida foram inseridos 10 organismos em cada recipiente.

Para preparar a solução com herbicida, foram realizadas medições das substâncias que foram posteriormente diluídas em água destilada. Em seguida, a solução herbicida foi combinada com 500 g de solo seco, utilizando sacos de autoclave para assegurar uma distribuição uniforme. Após a mistura, o solo foi homogeneizado de maneira adequada para garantir a uniformidade na dispersão do herbicida. O solo tratado foi então alocado em recipientes-teste de plástico transparente, com capacidade de 1 litro, que possuíam tampas perfuradas, permitindo

assim as trocas gasosas (Figura 1).



Figura 1. Recipiente-teste, utilizado nos ensaios agudo e crônico.

As doses definitivas, determinadas a partir deste teste, estão expressas na Tabela 1.

O ensaio definitivo de ecotoxicidade aguda, adotou um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com seis concentrações do herbicida (Tabela 1) e quatro repetições. As minhocas foram colocadas na superfície dos solos tratados com glufosinato de amônio, nos recipientes-teste. Inicialmente, foram alimentadas com 5 gramas de esterco e 5 mL de água destilada para cada 500 gramas de solo. Essa alimentação foi repetida no sétimo dia do experimento, que teve uma duração total de 14 dias. Ao final deste período, avaliou-se a redução da biomassa corporal e letalidade. A avaliação da biomassa corporal foi realizada pesando-se individualmente cada minhoca no início e no final do teste. A partir dessas medições, calculou-se a variação no peso dos organismos. Com base nesses dados, foi possível determinar a concentração letal mediana (CL_{50}) para mortalidade em 14 dias e a alteração na biomassa corporal das minhocas para cada condição de tratamento testada.

4.4. Teste de ecotoxicidade crônica

Assim como no teste agudo, este ensaio envolveu um DIC, com seis concentrações do glufosinato de amônio (Tabela 1) e quatro repetições.

Este teste se assemelhou ao agudo, com diferença no tempo de exposição de 56 dias. A alimentação (5 gramas de esterco e 5 ml de água destilada) foi realizada semanalmente até 28 dias. Após este período, os adultos foram removidos dos recipientes, sendo observadas alterações morfológicas (afilamento, alteração de pigmentação, estrangulamento, fragmentação/perda de segmentos), além da contagem de sobreviventes e a medição de sua biomassa.

Os casulos e juvenis foram deixados nos recipientes, e mantidos por mais 28 dias nas mesmas condições. Para avaliar a reprodução, após o segundo período de 28 dias, os recipientes foram expostos a um banho-maria por 20-30 minutos, para que os juvenis emergissem à superfície, facilitando sua extração e contagem (Figura 2). Este método forneceu um indicativo dos efeitos dos poluentes no ciclo reprodutivo de *E. andrei*, indicando a concentração efetiva mediana (CE_{50}) para efeitos na reprodução em 56 dias.



Figura 2. Banho-maria.

4.5. Ensaio de comportamento

O comportamento de fuga das minhocas *E. andrei* foi avaliado para determinar a aversão ao solo contaminado com glufosinato de amônio, através da concentração efetiva mediana (CE₅₀) que causou fuga após 48 horas.

Neste teste adotou-se um delineamento inteiramente casualizado (DIC), com seis concentrações (Tabela 1) e cinco repetições.

Neste teste as minhocas adultas foram colocadas em um recipiente dividido em duas seções (Figura 3), contendo solo controle e solo contaminado com doses do herbicida, detalhadas na Tabela 1. Após 48 horas de exposição, um divisor foi inserido para separar os solos, e o número de minhocas em cada seção foi contabilizado. Conforme estabelecido pela norma ISO 17512-1 (2008), uma amostra é considerada tóxica se houver fuga de mais de 80% das minhocas para o solo controle.



Figura 3. Recipiente com divisória

A determinação da porcentagem de fuga do solo-teste (ou da concentração de uma substância) foi efetuada conforme a equação abaixo.

$$x (\%) = \left(\frac{n_c - n_t}{N} \right) \times 100$$

Onde:

x = fuga, expressa em porcentagem;

n_c = número de minhocas no solo controle (por recipiente-teste ou no solo controle de todas as replicatas);

n_t = número de minhocas no solo-teste (por recipiente-teste ou no solo-teste de todas as replicatas);

N = número total de minhocas (geralmente 10 por recipiente-teste ou no solo controle de todas as replicatas).

4.6. Análise estatística

A variação da biomassa individual (mg) e do número de adultos sobreviventes no teste agudo, assim como o número de juvenis no teste crônico, foi submetida ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk ($p > 0,05$) e à homogeneidade de Bartlett ($p > 0,05$). A análise de variância (ANOVA) foi conduzida, e as médias foram comparadas pelo teste de Dunnett ($p \leq 0,05$) para identificar a Concentração de Efeito Não Observado (CENO) e a Concentração de Efeito Observado (CEO). Quando necessário, aplicou-se a transformação $\log(x+1)$ (NIVA; BROWN, 2019). Adicionalmente, concentrações que reduziram a reprodução em 50% em relação ao tratamento controle (CE_{50}) foram determinadas por análise de regressão não linear, utilizando o modelo Exponencial.

As análises de fuga foram executadas para determinar CEO e CENO, pelo teste Exato de Fisher ($p < 0,05$) utilizando um teste unicaudal para permitir comparações entre a distribuição observada de minhocas e a distribuição esperada, assumindo a ausência de resposta de fuga (NATAL-DA-LUZ et al., 2004). A determinação da Concentração Efetiva Mediana que causou fuga após 48 horas de exposição (CE_{50-48h}) e da Concentração Mediana Letal (CL_{50-14d}) foi realizada com o método estatístico de Trimmed Spearman-Kärber ($p < 0,05$) (ABNT, 2011), utilizando o programa Trimmed Spearman-Kärber Method Version 1.5 (HAMILTON et al., 1977). Todas as análises foram realizadas no software Statistica v7.0 (STATSOFT, 2004).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes com *E. andrei* foram validados conforme os critérios das normas ISO. No ensaio de ecotoxicidade aguda o tratamento controle apresentou mortalidade menor que 10% e perda de biomassa corporal das minhocas menor que 20% (ISO, 2012). Ecotoxicidade crônica com controle contendo 30 juvenis por replicata e mortalidade inferior a 10% (ISO, 1998). Ensaio comportamental, havendo no controle uma média de 40% a 60% das minhocas em cada compartimento e mortalidade menor que 10% (ISO, 2008).

A Tabela 2 apresenta os parâmetros ecotoxicológicos obtidos a partir da exposição de minhocas (*E. andrei*) a concentrações nominais de glufosinato de amônio. Os testes realizados incluíram avaliações de mortalidade em 14 dias (CL_{50}), efeitos na reprodução em 56 dias (CE_{50}) e fuga após 48 horas (CE_{50}).

A concentração letal mediana (CL_{50}) para mortalidade em 14 dias, foi determinada como 611,68 mg i.a. kg^{-1} , com intervalos de confiança de 95% entre 592,53 e 631,44 mg i.a. kg^{-1} . Sendo classificada como moderadamente tóxico, segundo categorização de toxicidade aguda para minhocas, estabelecidos por Lewis et al. (2016). Portanto, foi possível observar que a CL_{50} , é equivalente a aproximadamente 700 vezes a dose máxima sugerida para o cultivo de soja, que corresponde a 0,8 mg i.a. kg^{-1} solo (AGROFIT, 2023). Embora a dosagem mencionada possa demonstrar baixa sensibilidade de minhocas em estudos de ecotoxicidade aguda, é importante considerar sua relevância em ensaios que envolvem doses subletais, bem como os que abordam efeitos crônicos e comportamentais.

Um estudo sobre toxicidade ao herbicida glufosinato de amônio, realizado em lagostins vermelhos adultos (*Procambarus clarkii*), avaliou os efeitos agudos do herbicida, determinando um valor de CL_{50} de 96 horas de 1214 mg L^{-1} . Este dado sugere uma toxicidade moderada/não tóxica, do herbicida para esta espécie em exposições de curta duração. A análise mostrou uma taxa de mortalidade de 85% em lagostins expostos a uma concentração de 2000 mg L^{-1} , enquanto o grupo controle não apresentou mortalidade. Destacando uma significativa relação dose-resposta e uma taxa de mortalidade em concentrações mais altas. (ZHANG et al., 2023).

Em contraste, o estudo realizado por Said, Al-Badwy e Mohamed (2023) sobre os efeitos do glufosinato de amônio sobre o caracol terrestre *Monacha cartusiana*, determinou um valor de CL_{50} significativamente menor, de 66,6 mg/L após 96 horas de exposição. Esse resultado indica uma maior sensibilidade deste

organismo ao glufosinato de amônio, demonstrando a importância de considerar a toxicidade específica do herbicida para diferentes espécies em avaliações de risco ambiental.

Ao conciliar os resultados deste estudo com os de pesquisas anteriores, observa-se uma diversidade de respostas à exposição ao glufosinato de amônio. Destacando a importância de realizar testes utilizando doses subletais, tanto crônicas quanto de evasão, pois eles oferecem respostas mais concretas sobre os impactos subletais e prolongados (MAGALHÃES; FERRÃO, 2008).

A concentração efetiva mediana (CE_{50}) para efeitos na reprodução em 56 dias foi calculada como 4,49 mg i.a. kg^{-1} , com intervalos de confiança de 95% variando entre 3,58-5,41mg i.a. kg^{-1} . Os dados para estimativa de CE_{50} se ajustaram com uma curva exponencial ($y=78,06 * e^{-41,53 * 4,49}$) com $R^2=95,19\%$.

No teste de fuga - 48h (CE_{50}), a concentração efetiva mediana que causou fuga após 48 horas de exposição, revelou-se em 3,30 mg i.a. kg^{-1} . Os intervalos de confiança não puderam ser calculados, isso pode estar relacionado a porcentagem de fuga logo nas doses mais baixas testadas.

Os resultados indicam uma resposta significativa às concentrações testadas de glufosinato de amônio, destacando a sensibilidade das minhocas aos efeitos do agente, principalmente em doses subletais. A ausência de intervalos de confiança para CE_{50} na fuga sugere a importância de considerar a variabilidade e complexidade inerentes aos dados, sugerindo a realização de pesquisas futuras que explorem doses reduzidas de glufosinato de amônio.

Tabela 3. Parâmetros ecotoxicológicos (CE_{50-48h} , CL_{50-14d} e CE_{50-56d}) e seus respectivos intervalos de confiança obtidos da exposição de *E. andrei* a concentrações nominais de glufosinato de amônio.

Teste	Parâmetro Ecotoxicológico	Glufosinato (mg i.a. kg^{-1})
Mortalidade - 14d	CL_{50}	611,68 (592,53-631,44)
Reprodução - 56d	CE_{50}	4,49 (3,58-5,41)
Fuga - 48h	CE_{50}	3,30*

*Os dados não permitiram calcular os intervalos de confiança de 95%.

5.1. Ecotoxicidade aguda: variação média da biomassa corporal

A Figura 4 ilustra a variação média da biomassa de *E. andrei* exposta a concentrações crescentes de glufosinato de amônio (0, 175, 340, 505, 670 e 835 mg

i.a. kg⁻¹) após 14 dias de exposição.

Observou-se uma tendência dose-dependente, onde com o aumento na concentração do herbicida, observa-se uma tendência geral de diminuição da biomassa de *E. andrei*.

No grupo de controle, observou-se uma biomassa média inicial de 84,25 mg. Quando submetidas a uma concentração de 175 mg i.a. kg⁻¹, as minhocas apresentaram uma redução na biomassa para 61,5 mg. Um declínio ainda mais acentuado ocorreu em 340 mg i.a. kg⁻¹, com a biomassa média caindo para 30,25 mg. Curiosamente, em 505 mg i.a. kg⁻¹, notou-se um leve aumento na biomassa para 36,5 mg, sugerindo uma resposta potencialmente complexa ao herbicida. No entanto, as concentrações mais altas de 670 e 835 mg i.a. kg⁻¹ foram letais, resultando em nenhuma biomassa.

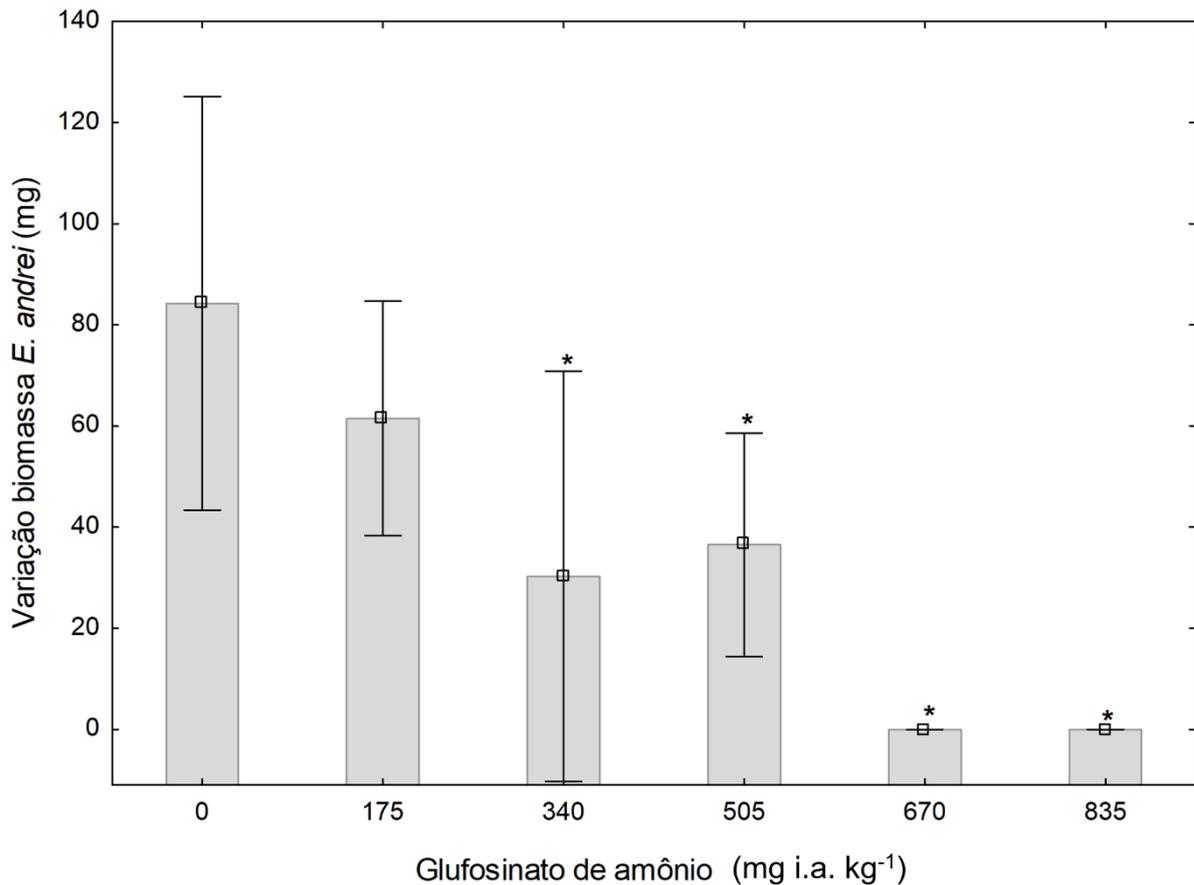
Enquanto a concentração de 175 mg i.a. kg⁻¹ não mostrou diferenças significativas em comparação com o controle, as concentrações mais elevadas (340, 505, 670 e 835 mg i.a. kg⁻¹) resultaram em uma diminuição estatisticamente significativa da biomassa, portanto a CENO e a CEO foram de 175 e 340 mg i.a. kg⁻¹, respectivamente.

A falta de efeito observado na concentração mais baixa pode sugerir a existência de um limiar de toxicidade, abaixo do qual *E. andrei* é capaz de tolerar a presença do herbicida sem efeitos prejudiciais observáveis sobre a biomassa (VEIGA; FERNANDES, 1999). Por outro lado, as diferenças significativas observadas nas concentrações mais altas reforçam a noção de que o glufosinato de amônio pode ser nocivo para a fauna do solo, especialmente em doses elevadas.

A redução na biomassa de *E. andrei* em altas concentrações de glufosinato de amônio pode ser atribuída a efeitos tóxicos do herbicida, que são consistentes com o estudo de Wang et al. (2022) que relataram a sensibilidade de *E. fetida* ao glufosinato de amônio. O estudo descreve um declínio no peso das minhocas expostas ao herbicida por um período prolongado, a redução no peso foi observada em todas as concentrações testadas, indicando que mesmo baixas concentrações podem ter efeitos adversos, com uma redução de peso de cerca de 28% a 38% após 56 dias de exposição. Esse resultado é consistente com a tendência de diminuição da biomassa observada na Figura 4.

Os resultados indicam uma clara suscetibilidade de minhocas ao glufosinato de amônio, destacando a importância de avaliações ecotoxicológicas para o uso sustentável de herbicidas e a conservação da biodiversidade do solo. Os

resultados coletivos sugerem que as avaliações de toxicidade aguda podem não ser suficientes para capturar os riscos ambientais, reforçando a necessidade de incorporar avaliações ecotoxicológicas que incluem efeitos subletais e crônicos essenciais para garantir uma avaliação de risco ambiental mais completa.



*Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste de Dunnett para biomassa. (⌊) Desvio padrão.

Figura 4. Média da perda/ganho de biomassa (mg) de *E. andrei* com concentrações crescentes de glufosinato de amônio (mg i.a. kg⁻¹ solo seco) aos 14 dias.

5.2. Ecotoxicidade crônica

A Figura 5 ilustra a relação entre a concentração do herbicida e o número médio de juvenis observados.

Conforme indicado, notou-se uma diminuição significativa no número de juvenis com o aumento da concentração de glufosinato de amônio. Concentrações de 3,3; 5; 6,7; 8,3 e 10 mg i.a. kg⁻¹ resultaram em uma redução estatisticamente significativa no número de juvenis, comparado ao grupo controle (0 mg i.a. kg⁻¹).

No grupo controle, onde não foi aplicado glufosinato de amônio, observou-

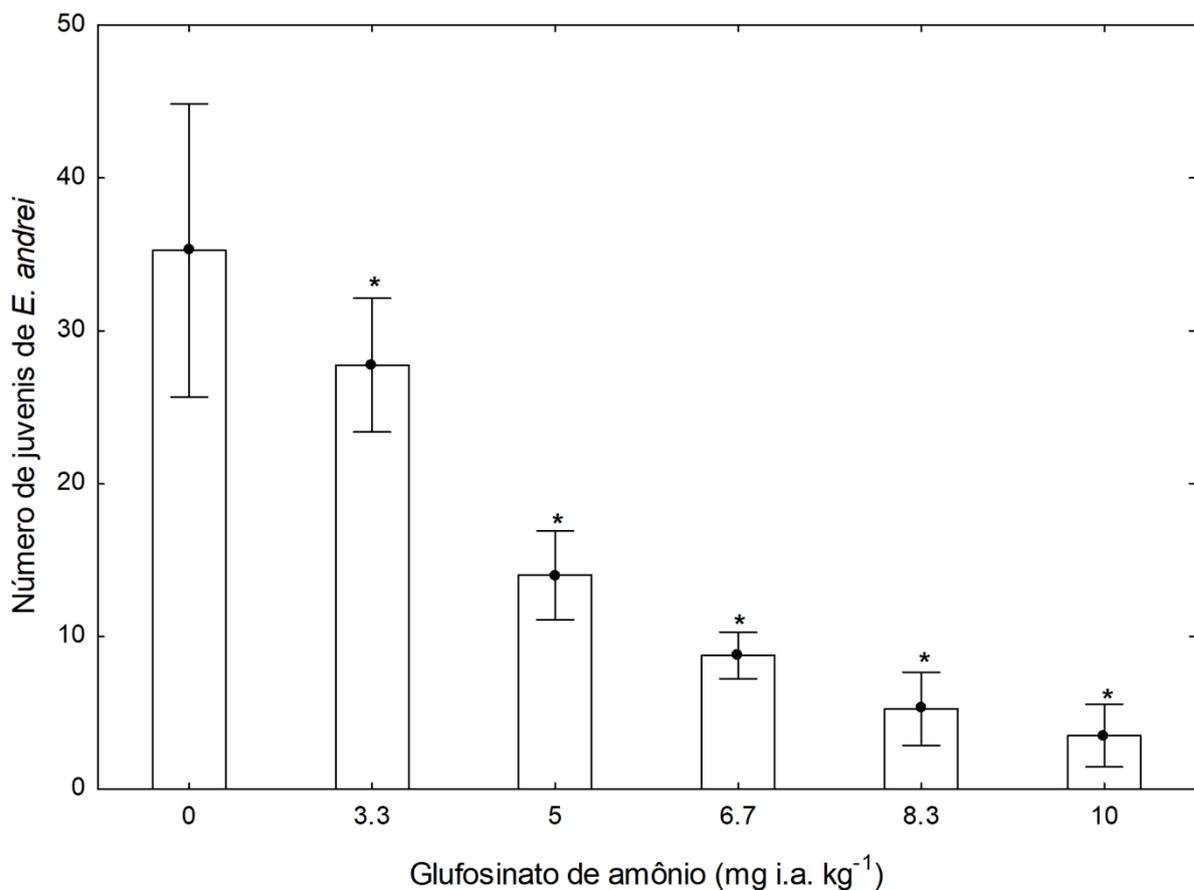
se um número médio de 35,25 juvenis. Contudo, quando as minhocas foram expostas a 3,3 mg i.a. kg⁻¹ do herbicida, o número médio de juvenis diminuiu para 27,75, indicando já na dose mais baixa uma influência do herbicida sobre a reprodução da espécie. Esse efeito torna-se mais pronunciado com o aumento da concentração. A uma concentração de 5 mg i.a. kg⁻¹, o número médio de juvenis caiu para 14. Em 6,7 mg i.a. kg⁻¹, o número médio de juvenis foi reduzido para 8,75. Em 8,3 mg i.a. kg⁻¹, observou-se uma média de apenas 5,25 juvenis. A concentração de 10 mg i.a. kg⁻¹, resultou na média mais baixa, com apenas 3,5 juvenis.

Esses achados estão alinhados com Wang et al. (2022) que documentam a toxicidade do glufosinato-amônio para minhocas da espécie *E. fetida*, embora este estudo não tenham apresentado mortalidade aguda em minhocas expostas até 2000 mg i.a. kg⁻¹ de glufosinato de amônio, observou-se uma diminuição progressiva na produção de casulos e juvenis após 56 dias de exposição, onde no grupo controle (0 mg i.a. kg⁻¹) a média de casulos e juvenis foi de 7,67±1,53 e 4,33±1,15, respectivamente. No entanto, já em concentrações de 0,4 mg i.a. kg⁻¹, houve uma redução para 3,67 casulos e 1,33 juvenis. Esta tendência de declínio acentuou-se com o aumento das concentrações, com a produção de casulos e juvenis caindo para zero em concentrações ≥ 10 mg i.a. kg⁻¹. Este efeito sugere que a exposição crônica ao herbicida pode levar a uma redução na fecundidade, mesmo em doses que não resultam em mortalidade imediata.

Observa-se a consistência destes achados com estudos anteriores, destacando que a exposição prolongada ao herbicida pode resultar em uma diminuição na reprodução das minhocas. Tal efeito ressalta os impactos subletais dos herbicidas, onde, mesmo na ausência de efeitos letais diretos, a viabilidade reprodutiva das minhocas é comprometida de forma progressiva e significativa.

No estudo realizado por Correia e Moreira (2010), investigou-se os efeitos dos herbicidas glifosato e 2,4-D sobre a sobrevivência, crescimento e reprodução de minhocas da espécie *E. fetida*. O experimento, que durou 56 dias, destacou inicialmente a ausência de casulos e juvenis nas amostras de solo tratadas com ambos os herbicidas, indicando uma supressão significativa na reprodução. Além disso, enquanto a exposição ao glifosato não resultou em mortalidade das minhocas, observou-se uma redução drástica de 50% em seu peso médio em todas as concentrações testadas. Por outro lado, o 2,4-D mostrou-se altamente letal, causando 100% de mortalidade nas concentrações mais altas (500 e 1000 mg kg⁻¹) e entre 30% e 40% de mortalidade nas concentrações mais baixas dentro de 14 dias.

Portanto, os resultados sugerem uma toxicidade reprodutiva do glufosinato de amônio, onde maiores concentrações do herbicida estão associadas a uma menor produção de juvenis de minhocas, mesmo em concentrações que não induzem mortalidade, assim como em estudos anteriores com outros herbicidas. Evidenciando a necessidade de uma avaliação ecotoxicológica detalhada dos herbicidas, levando em conta não apenas os efeitos letais, mas também os subletais, particularmente no que diz respeito à reprodução de organismos-chave do solo.



*Diferença estatística significativa ($p \leq 0,05$) pelo teste de Dunnett. (⊥) Desvio padrão.

Figura 5. Média de indivíduos juvenis de *E. andrei* após exposição com concentrações crescentes de glufosinato de amônio.

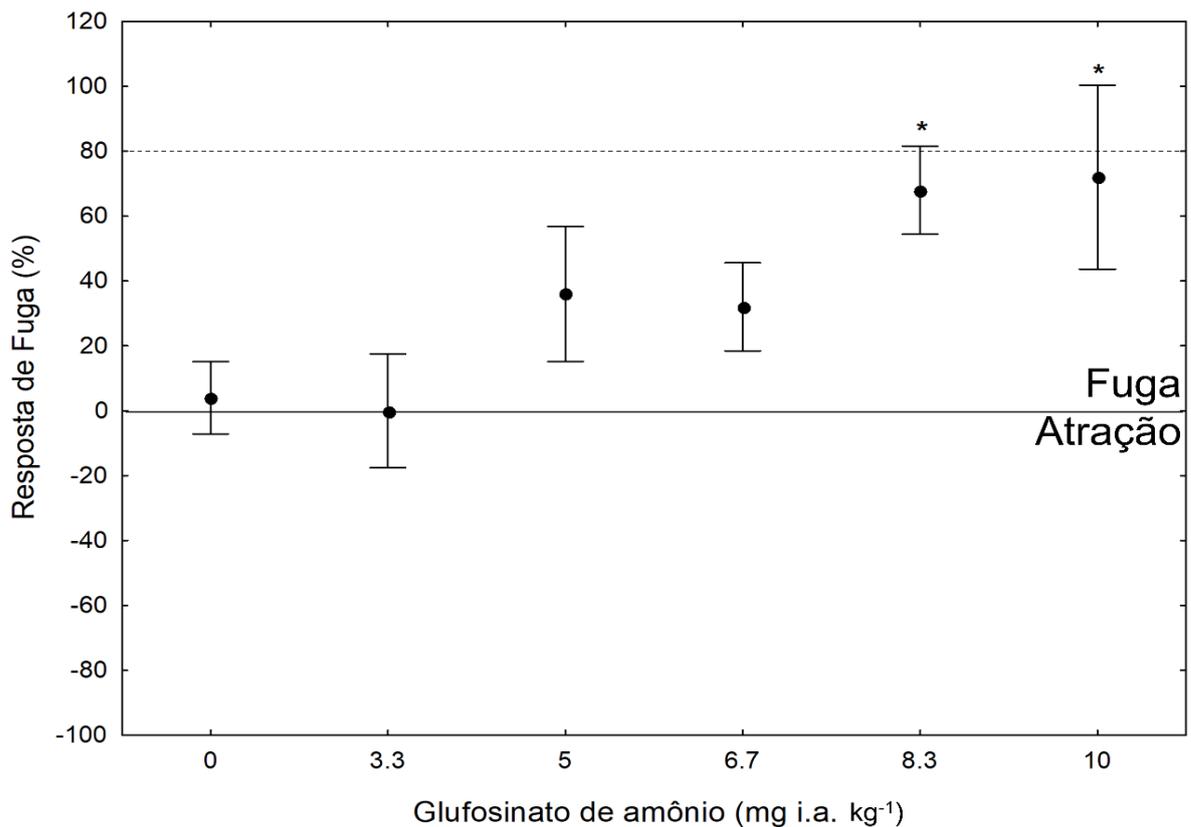
Nos resultados obtidos após o período de 28 dias, é relevante notar que, ao remover os adultos dos recipientes para análise, não se constatou a presença de quaisquer alterações morfológicas significativas, conforme pode ser observado na Figura 6 para as concentrações de 0 e 5 mg i.a. kg⁻¹.



Figura 6. Ausência de alterações morfológicas em adultos de *E. andrei*, nos tratamentos 0 e 5 mg i.a. kg⁻¹, aos 28 dias após a aplicação dos tratamentos.

5.3. Ensaio de comportamento

A Figura 6 mostra os resultados do teste de fuga realizado em *E. andrei* expostas a concentrações crescentes de glufosinato de amônio (0, 3,3, 5, 6,7, 8,3 e 10 mg i.a. kg⁻¹), após 48 horas.



Os resultados expressam valores médios \pm erro padrão.

*Diferença estatística significativa ($p < 0,05$) pelo teste exato de Fisher.

Figura 7. Resultados do teste de fuga realizado com minhocas da espécie *E. andrei* quando expostas a um solo contaminado com diferentes concentrações de glufosinato de amônio após 48 horas.

Ao analisar os resultados, observou-se um aumento geral na resposta de fuga com o aumento da concentração de glufosinato de amônio. A maior resposta de fuga está nas concentrações de 8,3 e 10 mg i.a. kg⁻¹, a figura indica que essas concentrações são estatisticamente significativas em relação ao controle (0 mg i.a. kg⁻¹) e que a CENO e CEO foram respectivamente 6,7 e 8,3 mg i.a. kg⁻¹. Em 8,3 mg i.a. kg⁻¹, há um aumento significativo na tendência de fuga, com a porcentagem média em 68%. Já na concentração de 10 mg i.a. kg⁻¹, a porcentagem média de fuga foi superior, atingindo 72%.

Santo et al. (2018), explorou os efeitos ecotoxicológicos do herbicida metsulfuron-methyl, tanto em sua forma pura quanto em combinação com adjuvante. Nos testes comportamentais com a espécie de minhoca *E. andrei*, foram empregadas doses variando de 0,075 mg kg⁻¹ a 300 mg kg⁻¹. Os resultados indicaram uma resposta de evitação nas duas concentrações mais altas do herbicida quando aplicado sozinho e em todas as concentrações quando combinado com o adjuvante, destacando o

potencial aumento da toxicidade pela adição de adjuvantes às formulações de herbicidas.

Schedenfeldt et al. (2024), observaram que o herbicida Boral® 500 SC induziu um comportamento de evasão nas minhocas em concentrações tão baixas quanto 1 mg kg^{-1} . Por outro lado, as formulações Gamit® 360 CS e Alion® só começaram a mostrar um efeito significativo de evasão nas minhocas em concentrações mais elevadas, variando de 50 a 75 mg kg^{-1} para o Gamit® 360 CS e de 75 a 100 mg kg^{-1} para o Alion®.

Em concordância com os estudos anteriores, a resposta de fuga positiva e significativa nas concentrações mais altas deste estudo sugere que o glufosinato de amônio é aversivo para as minhocas, levando-as a se afastar da área contaminada. Porém, nenhuma das concentrações testadas provocou uma fuga de 80%, que é o limiar para considerar uma substância como tóxica, baseado no critério da ISO 17512-1 (2008), onde deve-se encontrar mais de 80% dos organismos expostos na amostra de solo do controle.

O comportamento de fuga demonstrado por *E. andrei* reforça a relevância de estudos comportamentais como indicadores sensíveis da presença de contaminantes no solo e seus potenciais riscos para a fauna do solo.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, conclui-se que o herbicida glufosinato de amônio exerce um impacto significativo sobre a espécie de minhoca *E. andrei*, manifestando-se através de efeitos letais e subletais em diferentes concentrações. A mortalidade aguda, avaliada pela CL_{50} em 14 dias, situou-se em 611,68 mg i.a. kg^{-1} , enquadrando o glufosinato de amônio como moderadamente tóxico para essa espécie.

A análise da biomassa de *E. andrei* revelou uma tendência dose-dependente de redução na biomassa com o aumento das concentrações de glufosinato de amônio. Além disso, observou-se que concentrações acima de 175 mg i.a. kg^{-1} resultam em diminuições significativas da biomassa, com a CENO estabelecida em 175 mg i.a. kg^{-1} e a CEO em 340 mg i.a. kg^{-1} .

Os efeitos subletais foram particularmente evidentes em concentrações bem inferiores à CL_{50} , destacando uma sensibilidade das minhocas ao composto. A CE_{50} para efeitos na reprodução e a resposta de fuga em 48 horas foram calculadas em 4,49 mg i.a. kg^{-1} e 3,30 mg i.a. kg^{-1} , respectivamente, indicando que doses subletais do herbicida podem afetar significativamente a reprodução e o comportamento de fuga das minhocas.

O estudo também destacou a ausência de efeitos morfológicos adversos nos indivíduos analisados, o que sugere que, apesar dos impactos observados na biomassa, reprodução e comportamento de fuga, o herbicida não provocou alterações morfológicas evidentes nas minhocas sob as condições experimentais aplicadas.

Para o futuro, é importante a realização de estudos que explorem a dosagem recomendada na bula do glufosinato de amônio, além disso avaliar seus efeitos em uma gama ainda mais ampla de organismos-alvo, incluindo aqueles ainda não considerados em pesquisas anteriores. Além disso, a investigação sobre as interações entre o glufosinato e misturas de herbicidas pode fornecer insights valiosos sobre sinergias potenciais ou efeitos antagônicos, o que é crucial para entender o impacto cumulativo desses compostos no ambiente. Tais estudos contribuirão significativamente para a formulação de práticas agrícolas mais seguras e ecologicamente responsáveis, alinhadas com os princípios da agricultura sustentável e da proteção ambiental.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO 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.

AGROFIT. Banco de informações sobre os produtos agroquímicos e afins registrados no Ministério da Agricultura. 2024.

ALBRECHT, L. P. et al. Formulações de glufosinate na dessecação pré-colheita da soja. **Nativa**, v. 11, n. 1, p. 96-100, 2023.

ANDRÉA, M. M. O uso de minhocas como bioindicadores de contaminação de solos. **Acta zoológica mexicana**, v. 26, p. 95-107, 2010.

AZEVEDO, A. R.; CORONAS, M. V. Uso de testes de fuga com minhocas *Eisenia andrei* e *Eisenia fetida* para identificação da toxicidade de agrotóxicos no Brasil: Uma breve revisão da literatura. **Ciência e Natura**, p. 18-26, 2018.

BABALOLA, O. O.; TRUTER, J. C.; VAN WYK, J. H. Lethal and teratogenic impacts of imazapyr, diquat dibromide, and glufosinate ammonium herbicide formulations using frog embryo teratogenesis assay-xenopus (FETAX). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 80, p. 708-716, 2021.

BARETTA, D. et al. Ecotoxicologia terrestre com ênfase na fauna edáfica. *In*: NIVA, C. C. et al. Ecotoxicologia terrestre: métodos e aplicações dos ensaios com oligoquetas. Brasília: **Embrapa**, p. 23-36, 2019.

BOCCIONI, A. P. C. et al. Comparative assessment of individual and mixture chronic toxicity of glyphosate and glufosinate ammonium on amphibian tadpoles: A multibiomarker approach. **Chemosphere**, v. 309, p. 136554, 2022.

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Avaliação ambiental para registro de agrotóxicos, seus componentes e afins de uso agrícola. 2022a.

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Relatórios de comercialização de agrotóxicos. 2022b.

BRASIL. Lei nº 14.785, de 8 de agosto de 2023. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem, a rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e das embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, de produtos de controle ambiental, de seus

produtos técnicos e afins. Brasília, DF: **Diário Oficial da União**, 2023.

CARVALHO, N. L.; PIVOTO, T. S. Ecotoxicologia: conceitos, abrangência e importância agronômica. Brasília: **Revista Monografias Ambientais**, v. 2, n. 2, p. 176-192, 2011.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; NICOLAI, M. Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas. Piracicaba: **HRAC**. 2016.

CORREIA, F. V.; MOREIRA, J. C. Effects of glyphosate and 2,4-D on earthworms (*Eisenia foetida*) in laboratory tests. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 85, n. 3, p. 264-268, 2010.

DEWI, W. S.; SENGE, M. Earthworm diversity and ecosystem services under threat. **Reviews in Agricultural Science**, v. 3, p. 25-35, 2015.

DUKE, S. O.; CERDEIRA, A. L. Transgenic crops for herbicide resistance. *In*: Kole, C.; Michler, C.H.; Abbott, A.G.; Hall, T.C. (Eds). Transgenic crop plants. Berlin: **Springer**, p. 133-166, 2010.

EBERT, E.; LEIST, K.-H.; MAYER, D. Summary of safety evaluation toxicity studies of glufosinate ammonium. **Food and Chemical Toxicology**, v. 28, n. 5, p. 339-349, 1990.

HAMILTON, M. A. et al. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental science & technology**, v. 11, n. 7, p. 714-719, 1977.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 11268-1**: soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*): part 1: M: determination of acute toxicity using artificial soil substrate. Geneva, 1993.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 11268-2**: soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*): part 2: determination of effects on reproduction. Geneve, 1998.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 16387**: soil quality effects of pollutants on Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.): determination of effects on reproduction and survival. Geneve, 2014.

ISO. International Organization for Standardization. **ISO 17512-1**: soil quality: avoidance test for evaluating the quality of soils and the toxicity of chemicals: part 1: test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*). Geneve, 2008.

LEWIS, K. A. et al. An international database for pesticide risk assessments and management. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 22, n. 4, p. 1050-1064, 2016.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em debate**, v. 42, p. 518-534, 2018.

MAGALHÃES, D.; FERRÃO, A. S. F. A Ecotoxicologia como Ferramenta no Biomonitoramento de Ecossistemas. Rio de Janeiro: **Instituto Oswaldo Cruz**, 2008.

MENG, X. et al. Comparing toxicity and biodegradation of racemic glufosinate and L-glufosinate in green *algae Scenedesmus obliquus*. **Science of The Total Environment**, v. 823, 2022.

NATAL-DA-LUZ, T. et al. Avoidance tests with collembola and earthworms as early screening tools for site-specific assessment of polluted soils. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 23, n. 9, p. 2188-2193, 2004.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Assessment of Ecotoxicity. *In: A Framework to Guide Selection of Chemical Alternatives*. Washington: **The National Academies Press**, p. 84-86, 2014.

NIEMEYER, J. C. et al. Do recommended doses of glyphosate-based herbicides affect soil invertebrates? Field and laboratory screening tests to risk assessment. **Chemosphere**, v. 198, p. 154-160, 2018.

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: Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Ciências da Engenharia Ambiental) Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2010.

OLIVEIRA, F. G.; BALDAN, L. T. Fundamentos de Ecotoxicologia. Palotina: **UFPR**, 2022.

OLIVEIRA, J. J.; FERREIRA, L. J.; CONEGLIAN, Ca. M. R. Comportamento de fuga de *Folsomia candida* expostos a solos contaminados com ametrina. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v. 11, n. 1, p. 315-321, 2021.

OLIVEIRA, R. S. J. et al. Mecanismos de Ação de Herbicidas. *In: BARROSO, A. A. M.; MURATA, A. T. (Orgs.). Matologia: estudos sobre plantas daninhas*. Jaboticabal: **Fábrica da Palavra**, p. 170-204, 2021.

RAMAN, R. The impact of Genetically Modified (GM) crops in modern agriculture: A review. **GM crops & food**, v. 8, n. 4, p. 195-208, 2017.

RESENDE, A. P. O. et al. Ecotoxicological risk assessment of contaminated

soil from a complex of ceramic industries using earthworm *Eisenia fetida*. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 81, n. 20, p. 1058-1065, 2018.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 7. ed. 2018.

RÖMBKE, J.; JÄNSCH, S.; DIDDEN, W. The use of earthworms in ecological soil classification and assessment concepts. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, n. 2, p. 249-265, 2005.

SAID, R. M.; AL-BADWY, A. H.; MOHAMED, A. A. Oxidative and histological effects of herbicide glufosinateammonium and cyanobacteria extracted anatoxin-a on land snails *Monacha cartusiana*. **Jordan Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 1, 2023.

SANTO, F. B. et al. Screening effects of metsulfuron-methyl to collembolans and earthworms: the role of adjuvant addition on ecotoxicity. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 24143-24149, 2018.

SCHEDENFFELDT, B. F. et al. Toxicity assesment of commercial herbicide formulations to *Eisenia andrei* (Bouché, 1972) in oxisols. **Chemosphere**, p. 141118, 2024.

SFORZINI, S. et al. Use of the earthworm *Eisenia andrei* as model organism for soil toxicity assessments. **Comparative Biochemistry and Physiology**, n. 157, p. 34, 2010.

SHARMA, D. K.; TOMAR, S.; CHAKRABORTY, D. Role of earthworm in improving soil structure and functioning. **Current Science**, p. 1064-1071, 2017.

SISINNO, C. L. S. et al. Importância e aplicações dos ensaios ecotoxicológicos com oligoquetas. *In*: NIVA, C. C. et al. Ecotoxicologia terrestre: métodos e aplicações dos ensaios com oligoquetas. Brasília: **Embrapa**, p. 45-70, 2019.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F. Perdas de agrotóxicos. **Embrapa Meio Ambiente**. 2021.

STATSOFT, I. N. C. et al. STATISTICA (data analysis software system). **Version**, v. 7, p. 1984-2004, 2004.

STATSOFT. STATISTICA (Data analysis software system). Version 7, 2007.

TAKANO, H. K.; DAYAN, F. E. Glufosinate-ammonium: a review of the current state of knowledge. **Pest Management Science**, v. 76, n. 12, p. 3911-3925, 2020.

VEIGA, L. H. S.; FERNANDES, H. M. Avaliação de Risco para a Saúde

Humana e Ecossistemas. *In*: BRILHANTE, O. M.; CALDAS, L. Q. A. (Coord.). Gestão e Avaliação de Risco em Saúde Ambiental. Rio de Janeiro: **Editora Fiocruz**, cap. 4, p. 119-144, 1999.

WANG, B. et al. Toxicity of glufosinate-ammonium in soil to earthworm (*Eisenia fetida*). **Journal of Soils and Sediments**, v. 22, n. 5, p. 1469-1478, 2022.

ZHANG, Y. et al. Sub-acute toxicity of the herbicide glufosinate-ammonium exposure in adult red swamp crayfish (*Procambarus clarkii*). **Environmental Pollution**, v. 337, p. 122605, 2023.

ZORTÉA, T. et al. Aplicação de cipermetrina em solo para a avaliação da reprodução e comportamento de minhocas *Eisenia andrei*. **Revista Acta Ambiental Catarinense**, v. 19, n. 1, p. 01-09, 2022.