UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel

Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar

Tese

Ensaios ecotoxicológicos como subsídio para a avaliação do impacto ambiental de uma formulação de glifosato em *Eisenia andrei* Bouché.

Louise Vargas Ribeiro

Pelotas, 2021

Louise Vargas Ribeiro

Ensaios ecotoxicológicos como subsídio para a avaliação do impacto ambiental de uma formulação de glifosato em *Eisenia andrei* Bouché.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Agronomia.

Orientador: Gustavo Schiedeck

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

R484e Ribeiro, Louise Vargas

Ensaios ecotoxicológicos como subsídio para a avaliação do impacto ambiental de uma formulação de glifosato em Eisenia andrei Bouché. / Louise Vargas Ribeiro ; Gustavo Schiedeck, orientador. — Pelotas, 2021.

59 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. Herbicida. 2. Histologia. 3. Bioensaios. 4. Minhocas. I. Schiedeck, Gustavo, orient. II. Título.

CDD : 630.2745

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Louise Vargas Ribeiro

Ensaios ecotoxicológicos como subsídio para a avaliação do impacto ambiental de uma formulação de glifosato em *Eisenia andrei* Bouché.

Tese aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 25/02/2021

Banca examinadora:

Prof. Dr. Gustavo Schiedeck (Orientador)
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof. Dr. Carlos Rogério Mauch
Doutor em Agronomia pela Universidade Politécnica de Valencia, Espanha.

Prof. Dr. Márcio Medeiros Gonçalves
Doutor em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas.

Profª. Drª. Marla Piumbini Rocha
Doutora em Biologia Celular e Estrutural pela Universidade Estadual de Campinas.

Agradecimentos

Agradeço à minha mãe Jussanete Vargas por ser incansável, auxiliando-me sempre e nunca me deixando desistir;

Ao meu noivo Tiago Schaun Bach por todo o amor, apoio e companheirismo nessa jornada;

Ao meu pai Flávio Ribeiro e aos meus irmãos Laura Ribeiro e Felipe Ribeiro por toda a torcida e incentivo;

Ao meu orientador Gustavo Schiedeck pela paciência, compra de materiais e por todos os ensinamentos nestes 9 anos de orientação;

À professora Marla Piumbini Rocha por toda a atenção dedicada ao trabalho, por sair de casa em plena pandemia e pelos cafés que me levava quando a minha energia se esgotava;

Ao Luís Augusto Cruz, Luís Otávio Centeno e Eliane Anthonisen por todo apoio nas atividades de laboratório, perrengues com o computador e descontração com a playlist de uma música só;

Às minhas colegas de trabalho Ane Martiele Pinto e Carla Pernas por me incentivarem todo tempo e me acompanharem na loucura do dia a dia;

Aos funcionários e colaboradores da Embrapa Clima Temperado Estação Experimental Cascata pela amizade e carinho;

Ao Gustavo Andrade por providenciar o Glifosato para este estudo;

Aos meus colegas e amigos Amanda Guedes, Camila Medeiros, Daniela Rodriguez e Willian Jandrey pela parceria, choradeira e principalmente pelas risadas;

Aos meus amigos da turma da Biologia, da Formação Pedagógica e do grupo “Amigos, tenham calma!”, por se preocuparem comigo e me fazerem rir um pouco pela tela do computador ou no celular;

Aos professores do PPG SPAF pela oportunidade e aprendizados;

À banca;

Muito Obrigada!

Quando não houver saída
Quando não houver mais solução
Ainda há de haver saída
Nenhuma ideia vale uma vida
Quando não houver esperança
Quando não restar nem ilusão
Ainda há de haver esperança
Em cada um de nós, algo de uma criança
Enquanto houver sol
Enquanto houver sol
Ainda haverá
Enquanto houver sol
Enquanto houver sol
Quando não houver caminho
Mesmo sem amor, sem direção
A sós ninguém está sozinho
É caminhando que se faz o caminho
Quando não houver desejo
Quando não restar nem mesmo dor
Ainda há de haver desejo
Em cada um de nós, aonde Deus colocou
Enquanto houver sol
Enquanto houver sol
Ainda haverá
Enquanto houver sol (Sérgio Britto, 2004).

Resumo

RIBEIRO, Louise Vargas. **Ensaios ecotoxicológicos como subsídio para a avaliação do impacto ambiental de uma formulação de glifosato em *Eisenia andrei* Bouché**. Orientador: Gustavo Schiedeck. 2021. 59f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Programa de Pós Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

Considerado um herbicida de baixa toxicidade pelas leis atuais brasileiras, o glifosato é alvo deste estudo, pois o seu uso constante acaba atingindo o solo e podendo causar danos à micro e macro organismos e ao meio ambiente. As minhocas fazem a manutenção da matéria orgânica e estruturação física do solo, promovendo a sua aeração, favorecendo assim a produção de cultivos, sendo recomendável a sua preservação como estratégia para manter o solo saudável. Portanto, o objetivo deste estudo é fornecer subsídios para a compreensão dos impactos sobre a biota do solo de uma das principais formulações de glifosato, amplamente utilizada na agricultura familiar, através de ensaios ecotoxicológicos com ênfase em avaliações histológicas da minhoca *Eisenia andrei* Bouché. Para tanto foram utilizadas doses de 0 (controle); 0,96; 1,92; 3,84; 7,68 e 15,68mg e.a Kg^{-1} do agrotóxico Roundup Transorb R® (produto contendo 588g L^{-1} i.a e 480g L^{-1} e.a). Foram preparadas 24 unidades experimentais contendo 400g do substrato de ensaio. O substrato foi umedecido até atingir a umidade de 60% com os tratamentos. Quinze minhocas adultas foram inseridas em cada unidade experimental. Este teste crônico teve duração de 35 dias e objetivou avaliar semanalmente a biomassa dos indivíduos adultos, a mortalidade de minhocas e o número de juvenis aos 56 dias de experimento nas doses testadas. Semanalmente duas minhocas foram retiradas das unidades experimentais para a análise histológica da morfometria dos tecidos: epitelial intestinal, cloragógeno e região do tiflosol. Nas condições em que o experimento foi realizado, não foi possível verificar efeito estatístico do glifosato sobre a mortalidade e reprodução das minhocas. Quanto à biomassa, em termos relativos, também não houve evidências do efeito dos tratamentos sobre as minhocas. Não obstante, a análise dos valores absolutos da massa média individual indica uma tendência significativa de redução desse parâmetro com o aumento da concentração do glifosato. Não houve diferença estatística para a espessura dos tecidos epitelial intestinal, cloragógeno e da região do tiflosol nos diferentes tratamentos. Contudo, percebe-se uma clara tendência dessas variáveis apresentarem maiores valores na ausência do glifosato. Da mesma forma, alterações morfológicas no corpo das minhocas, como perda de segmentos e necroses, apenas foram observadas nos indivíduos expostos ao glifosato. Tais constatações devem ser consideradas para novos e imprescindíveis estudos sobre o potencial de impacto ambiental do uso do glifosato.

Palavras-chave: Herbicida. Histologia. Bioensaios. Minhocas.

Abstract

RIBEIRO, Louise Vargas. **Ecotoxicological tests as a basis for assessing the environmental impact of a glyphosate formulation in *Eisenia andrei* Bouché**. Advisor: Gustavo Schiedeck. 2021. 59f. Thesis (PhD in Agronomy) - Postgraduate Program in Family Agricultural Production Systems, Faculty of Agronomy Eliseu Maciel, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2021.

Considered a low toxicity herbicide by current Brazilian laws, glyphosate is the target of this study, as its constant use ends up reaching the soil and can cause damage to micro and macro organisms and the environment. Earthworms maintain the organic matter and physical structure of the soil, promoting its aeration, thus favoring the production of crops, and its preservation is recommended as a strategy to keep the soil healthy. Therefore, the aim of this study is to provide subsidies for understanding the impacts on soil biota of one of the main glyphosate formulations, widely used in family farming, through ecotoxicological tests with an emphasis on histological assessments of the earthworm Eisenia andrei Bouché. For this purpose, doses of 0 (control) were used; 0.96; 1.92; 3.84; 7.68 and 15.68mg e.a Kg^{-1} of the pesticide Roundup Transorb R® (product containing 588g L^{-1} i.a and 480g L^{-1} e.a). 24 experimental units were prepared containing 400g of test substrate. The substrate was moistened until reaching 60% humidity with the treatments. Fifteen adult earthworms were inserted into each experimental unit. This chronic test lasted 35 days and aimed to weekly assess the biomass of adult individuals, the mortality of earthworms and the number of juveniles at 56 days of experiment in the doses tested. Weekly, two earthworms were removed from the experimental units for histological analysis of tissue morphometry: intestinal epithelial, chloragogen and tiflosol region. Under the conditions in which the experiment was carried out, it was not possible to verify the statistical effect of glyphosate on the mortality and reproduction of earthworms. As for biomass, in relative terms, there was also no evidence of the effect of treatments on earthworms. Nevertheless, the analysis of the absolute values of the individual average mass indicates a significant tendency of reduction of this parameter with the increase of the glyphosate concentration. There was no statistical difference for the thickness of the intestinal epithelial tissues, chloragogen and the tiflosol region in the different treatments. However, there is a clear tendency for these variables to present higher values in the absence of glyphosate. Likewise, morphological changes in the body of earthworms, such as loss of segments and necrosis, were only observed in individuals exposed to glyphosate. Such findings must be considered for new and essential studies on the potential environmental impact of the use of glyphosate.

Keywords: Herbicide. Histology. Bioassays. Earthworms.

Lista de Figuras

Figura 1 Corte histológico de minhoca. E – Epiderme, MC – Musculatura Circular, ML – Musculatura Longitudinal, T – Tiflosol, CL- Tecido Cloragógeno e EP – Epitélio intestinal..... 29

Figura 2 Probabilidade de sobrevivência de minhocas nos diferentes tratamentos. Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata, Pelotas, RS, Jul/2020 à Ago/2020..... 35

Figura 3 Relação Massa média relativa x tempo de exposição ao glifosato. Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata, Pelotas, RS, Jul/2020 à Ago/2020..... 40

Figura 4 Dose-resposta para Biomassa individual média. Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata, Pelotas, RS, Jul/2020 à Ago/2020..... 41

Figura 5 Cortes histológicos transversais de *Eisenia andrei* aos 28 dias de experimento. Imagens obtidas através de Microscópio Óptico com câmera acoplada na objetiva de 4x. Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Morfologia, Pelotas, RS, Set/2020..... 42

Figura 6 Alterações Morfológicas de minhocas submetidas aos tratamentos com Roundup Transorb R - Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata, Pelotas, RS, Jul/2020 à Ago/2020..... 44

Figura 7 Análise de componentes principais EPIT (Epitélio intestinal), TIFL (Tiflosol), CLOR (Tecido Clorgógeno), BM (Biomassa média das minhocas), BMhist (Biomassa das minhocas utilizadas para histologia). Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata, Pelotas, RS, Jul/2020 à Ago/2020..... 46

Lista de Tabelas

Tabela 1 Principais produtos à base do glifosato registrados no Brasil. 23

Tabela 2 Caracteres externos e Internos de *Eisenia andrei*..... 28

Tabela 3 Tratamentos e concentrações de Glifosato utilizadas no experimento. Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata, Pelotas, RS, Jul/2020..... 31

Tabela 4 Mortalidade e reprodução de minhocas submetidas aos diferentes tratamentos. Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata, Pelotas, RS, Jul/2020 à Ago/2020..... 36

Tabela 5 Biomassa (mg) de minhocas por tratamento (n=24) durante as 5 semanas de experimento. Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata, Pelotas, RS, Jul/2020 à Ago/2020..... 39

Tabela 6 Medidas dos tecidos em (µm) (n=24). Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Morfologia, Pelotas, RS, Set/2020..... 42

Tabela 7 Resultado do teste de Anderson-Darling para os tecidos Epitélio Intestinal, Cloragógeno e tiflosol nos diferentes tratamentos em relação à concentração em mg e.a. kg^{-1} de Roundup Transorb R. Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata, Pelotas, RS, Jul/2020 à Ago/2020..... 43

Sumário

1. Introdução 12
2 Revisão de Literatura 14
2.1 Agricultura Familiar 14
2.1.1 Agrotóxicos 17
2.1.1.1 Glifosato 20
2.2 Ecotoxicologia 24
2.3 *Eisenia andrei* (Bouché 1972) 27
2.4 Estudos histológicos 28
3. Material e métodos 30
3.1 Bioensaios 30
3.2 Teste ecotoxicológico 30
3.2.1 Substrato de ensaio 30
3.3 Contaminação com o glifosato 31
3.4 Análises histológicas 32
3.5 Análises estatísticas 33
4. Resultados e Discussão 35
4.1 Mortalidade, migração e reprodução 35
4.2 Biomassa 39
4.3 Análises histológicas 42
4.4 Alterações morfológicas 44
4.5 Análise multivariada 46
5 Conclusões 49
Referências 50

1. Introdução

As minhocas desempenham um papel importante no ecossistema do solo (ZHENG *et al*., 2013). Conhecidas como engenheiras dos agroecossistemas (LAVELLE *et al.*, 2001), elas favorecem a produção de cultivos, desempenhando funções como: manutenção da matéria orgânica e estruturação física no solo (PONGE *et al*., 2013).

Groenigen *et al.*, (2014) afirmam que, em média, a presença de minhocas em agroecossistemas leva a um aumento de 25% no rendimento nas culturas de soja, milho e trigo entre outras, e um aumento de 23% na biomassa da parte aérea, sendo assim, sua presença, é considerada indicativo de solo saudável e fértil pelos agricultores (LIMA; BRUSSAARD, 2010), e sua preservação, uma ótima e recomendável estratégia para os produtores.

No entanto, o crescimento da população mundial demanda o aumento da produção agrícola, necessária para suprir as necessidades nutricionais da humanidade (DÖRR, 2015). Por outro lado, a busca de melhores condições de vida vislumbrada nas cidades grandes, fez com que jovens abandonassem o campo, diminuindo assim, a mão-de-obra local (ALVES; SOUZA; MARRA, 2011).

Diante disso, dentre os vários sistemas de produção agrícola familiar, existem aqueles que utilizam agrotóxicos para o combate de doenças e parasitas nas suas lavouras, com o intuito de eliminar plantas espontâneas e aumentar a sua produção agrícola sem necessitar de mão de obra demasiada (PASINI *et al.*, 2017).

Cabe ressaltar que o uso de agrotóxicos pode causar outros efeitos no ambiente, podendo atingir e destruir espécies não alvo, prejudicando assim todo o ecossistema (RODRIGUES, 2007).

Braibante e Zappe (2012) apontam que existem mais de mil formulações de agrotóxicos, todas diferentes, incluindo inseticidas, herbicidas, fungicidas, nematicidas, fumigantes e outros compostos orgânicos. Dentre estes agrotóxicos, o herbicida Glifosato é o mais utilizado nos cultivos, tanto para o controle de plantas

espontâneas como também aplicado na dessecação de lavouras (MENDES *et al.*, 2020).

A venda deste produto e seus sais representam em torno de 1/3 do volume total de agrotóxicos vendidos no país (LANDAU; MARTINS, 2020), além do principio ativo, outras substâncias como surfactantes e adjuvantes também estão presentes nas formulações destes agrotóxicos (NODARI; HESS, 2020).

Em 2019 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) reclassificou formulações de glifosato quanto à toxicidade, de classe toxicológica II (altamente tóxico) para classe V (produto improvável de causar dano agudo) (BRASIL, 2019). No entanto, estudos toxicológicos vêm demonstrando que produtos à base de glifosato são tóxicos para diversas formas de vida (NODARI; HESS, 2020), sendo responsável por modificações morfológicas e genéticas (ŚWIĄTEK; WOŹNICKA; BEDNARSKA, 2020; ANELLI JR, 2010).

Portanto, estudos de ecotoxicidade são necessários e podem ser realizados com diversos organismos. No solo, as minhocas estão entre os bons modelos experimentais por estarem em contato direto com o mesmo, “seja através da pele ou pelo trato gastrointestinal, sendo capazes de absorver agrotóxicos de cinco a dez vezes mais rápido que o próprio solo ou substratos minerais” (ESPINOZA-NAVARRO *et al.*, 2017). As espécies *Eisenia fetida* e *Eisenia andrei* são utilizadas nestes estudos devido a facilidade de criação e manuseio, alta taxa de reprodução e seu baixo custo de manutenção em laboratório, além disso, são espécies padrão para testes ecotoxicológicos segundo os protocolos internacionais e nacionais (NIVA; BROWN, 2019).

Atrelado a isso, o uso de análises histológicas pode ser uma abordagem complementar para testes de toxicidade padrão (fuga, mortalidade e reprodução), pois fornece mais informações sobre a resposta do organismo frente aos contaminantes ambientais e diante disso, a análise morfométrica é uma ferramenta valiosa para a determinação de mudanças quantitativas nos tecidos/células (ŚWIĄTEK; WOŹNICKA; BEDNARSKA, 2020).

Sendo assim, o objetivo deste trabalho é fornecer subsídios para a compreensão dos impactos sobre a biota do solo de uma das principais formulações de glifosato, amplamente utilizada na agricultura familiar através de ensaios ecotoxicológicos com ênfase em avaliações histológicas de tecidos de minhoca *Eisenia andrei* Bouché.

2 Revisão de Literatura

2.1 Agricultura Familiar

A definição de Agricultura Familiar (AF) pode diferir influenciada por questões sociais, culturais, políticas, regionais etc., mas mantém algumas singularidades que a caracterizam ou, pelo menos, identificam-na como tal.

O Dossiê Estatístico elaborado pelo Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária (INCRA) e pelo Fundo das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) (BRASIL, 2000), define a Agricultura Familiar a partir de três características centrais:

a) gestão da unidade produtiva e os investimentos nela realizados são feitos por indivíduos que mantém entre si laços de sangue ou de casamento;

b) a maior parte do trabalho é igualmente fornecida pelos membros da família;

c) a propriedade dos meios de produção (embora nem sempre da terra) pertence à família e é em seu interior que se realiza a sua transmissão em caso de falecimento ou de aposentadoria dos responsáveis pela unidade produtiva.

Nota-se nesta abordagem a relação entre terra, trabalho e família e que esses três fatores diferenciam a agricultura familiar das outras formas de agricultura (SILVA; JESUS, 2010).

A Lei n º 11.326, de 24 de julho de 2006, considera agricultor familiar e empreendedor familiar rural aquele que: pratica atividades no meio rural que:

> não detenha, a qualquer título, área maior do que 4 (quatro) módulos fiscais; utilize predominantemente mão-de-obra da própria família nas atividades econômicas do seu estabelecimento ou empreendimento; tenha percentual mínimo da renda familiar originada de atividades econômicas do seu estabelecimento ou empreendimento, na forma definida pelo Poder Executivo; dirija seu estabelecimento ou empreendimento com sua família (BRASIL, 2006).

No período colonial, os grandes proprietários permitiram a exploração de suas terras pelos pequenos agricultores para produzirem gêneros para a sua subsistência e comercializar o excedente, o que permanecem até hoje (BRASIL, 2016).

Com a Resolução de 17 de julho de 1822, publicada pela Coroa Portuguesa passou a vigorar o regime da ocupação ou posse, com os requisitos de cultura efetiva e moradia habitual. Esse fato, aliado à crise da economia exportadora, motivou uma expansão das pequenas explorações (BRASIL, 2016).

Em meados do século XIX, coincidindo com o início do declínio do regime escravocrata e o surgimento de um novo ciclo exportador, o do café, foi promulgada a Lei nº 601, de 18/9/1850, a Lei de Terras. Esta visava, a priori, corrigir as distorções da legislação colonial, mas o principal motivo foi dificultar o acesso à terra aos segmentos sociais alheios à elite: os escravos libertos e os trabalhadores livres, que continuaram marginalizados (BRASIL, 2016).

Neste sentido, Navarro (2010) ressalta que durante o processo de modernização da agricultura brasileira, as políticas públicas para a área rural, em especial à agrícola, privilegiaram os setores mais capitalizados e a esfera produtiva do commodities voltada ao mercado internacional, o que gerou resultados negativos para a agricultura familiar. Dentre os incentivos dados aos grandes produtores rurais citam-se:

> financiamento da produção por meio da institucionalização do Sistema Nacional de Crédito Rural (SNCR), garantia de preços e comercialização através da Política de Garantia Preços Mínimos (PGPM), transferência de tecnologia e assistência técnica pela Empresa Brasileira de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMBRATER), inovações tecnológicas promovidas pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), e garantia de seguro agrícola por meio do Programa de Garantia da Atividade Agropecuária (PROAGRO) (GRISA, 2010, p. 84).

A agricultura familiar somente foi incluída como propriedade quando foi lançado o Plano Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar (PLANAF), em agosto de 1995, mas este oferecia somente uma linha de crédito para custeio. Já o Decreto nº 1.946, de 28 de junho de 1996, cria o Programa Nacional dos Trabalhadores da Agricultura Familiar (PRONAF), que objetivou promover o desenvolvimento sustentável do segmento rural e propiciar o aumento da capacidade produtiva, a geração de empregos e a melhoria da renda, através da ampliação das linhas de créditos (BRASIL, 1996).

Através do PRONAF, institui-se o Seguro da Agricultura Familiar (SEAF), o Programa de Garantia de Preços da Agricultura Familiar (PGPAF) e o Programa Garantia Safra. Além destes, foi criado o Programa de Aquisição de Alimentos da

Agricultura Familiar (PAA), pelo art. 19 da Lei nº 10.696, de 02 de julho de 2003 que possui duas finalidades básicas: promover o acesso à alimentação e incentivar a agricultura familiar (BRASIL, 2003). Neste novo programa, o Governo Federal passa a:

> adquirir os alimentos a preços de referência e distribuir às pessoas em situação de vulnerabilidade social, atendendo igualmente a rede de equipamentos públicos de alimentação e nutrição, instituições socioassistenciais e escolas ou, ainda, a formação de estoques reguladores (GRISA, 2010, p. 85).

Um novo alento à agricultura familiar veio com a Lei 11.947, de 16 de junho de 2009, em seu Art. 2º, Inciso V, que tem como diretriz:

> o apoio ao desenvolvimento sustentável, com incentivos para a aquisição de gêneros alimentícios diversificados, produzidos em âmbito local e preferencialmente pela agricultura familiar e pelos empreendedores familiares rurais, priorizando as comunidades tradicionais indígenas e de remanescentes de quilombos (BRASIL, 2009).

Em 2011, foram instituídos o Programa de Apoio à Conservação Ambiental e o Programa de Fomento às atividades Produtivas Rurais, sob a Lei nº 12.512, para estimular a geração de trabalho e renda com sustentabilidade, com enfoque ao combate à fome (BRASIL, 2011) e, um ano após, pelo Decreto nº 7.794, de 20 de agosto de 2012, foi instituída a política nacional de agroecologia e produção orgânica (BRASIL, 2012).

O Decreto 9.064, de 31 de maio de 2017, dispõe sobre a Unidade Familiar de Produção Agrária, institui o Cadastro Nacional da Agricultura Familiar (CAF) e regulamenta a Lei Nº 11.326, de 24 de julho de 2006 no que diz respeito aos Empreendimentos Familiares Rurais com especificidades que não se encontram na Lei nº 11.326/2006, como identificar “empresa familiar rural”, “cooperativa singular da agricultura familiar”, “cooperativa central da agricultura familiar” e “associação da agricultura familiar” (BRASIL, 2019a).

Além do amparo legal da União, no Rio Grande do Sul, os agricultores familiares contam com o apoio técnico da Associação Riograndense de Empreendimentos de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER/RS) e da Embrapa através de pesquisas voltadas na área (ZIBETTI, 2013).

Nas adjacências de Pelotas, no Sul do Estado do Rio Grande do Sul, os produtores familiares contam também com o apoio da Embrapa Clima Temperado,

do Centro de Apoio e Promoção da Agroecologia (CAPA) e das cooperativas e associações que este acompanha, proporcionado uma maior interação entre os conhecimentos, dos cuidados e técnicas a serem aplicadas, da produção e venda dos produtos.

Apesar das transformações sofridas ao longo do tempo, do advento da tecnologia, da “especialização das maquinarias, da engenharia genética para homogeneizar os cultivos e a quimificação, características que vão comprometer a sustentabilidade da agricultura”, os agricultores familiares garantem à sociedade alimentos mais saudáveis, conservam os recursos naturais e se propiciam uma melhor qualidade de vida permanecendo no campo, buscando uma proximidade cada vez maior da agricultura familiar com a sustentabilidade (PASQUALOTTO; KAUFMANN; WIZNIEWSKY, 2019).

Silva e Jesus (2010) consideram a agricultura familiar de suma importância no processo de desenvolvimento rural. Seu potencial na atualidade vai além da produção de alimentos, discute-se hoje, o seu papel de oportunizar e promover ocupação e renda nos espaços rurais, assim como a responsabilidade pela utilização sustentável dos recursos naturais.

Porém, cabe ressaltar que agricultura familiar não é, ainda, sinônimo de produção orgânica sem uso de agrotóxicos e com manejo correto do solo, com preservação do ambiente explorado. Ao contrário, com o uso constante da agricultura, o solo se desgasta e acaba perdendo a fertilidade e a produtividade (BRAGA *et al.,* 2002). Para repor os nutrientes perdidos e controlar plantas espontâneas, os agricultores familiares recorrem aos fertilizantes e aos agrotóxicos, alguns permitidos e defendidos por legislações nacionais e internacionais.

2.1.1 Agrotóxicos

Partindo-se do princípio que as plantas espontâneas prejudicam as produções e que os agrotóxicos permitidos, principalmente os pesticidas fazem este controle, segundo as leis que os permitem, sem causar danos maiores ao meio ambiente, dedica-se este espaço para se revelar alguns conceitos, leis e argumentos sobre o uso de agrotóxicos na agricultura familiar.

A Lei 7.802/ 89 (1990) que define os agrotóxicos como:

> [...] os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (BRASIL, 1990).

O Decreto 4.074/2002 regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, e dispõe sobre:

> A pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências (BRASIL, 2002).

As permissões e proibições continuam em discussão e a Lei 7.802/ 89 (1990), Lei dos Agrotóxicos, ainda vigente, está sendo constantemente reformulada e readaptada.

A mais recente modificação proposta vem do Projeto de Lei n° 4146, de 2019, que introduz conceitos relacionados a “produto novo, produto equivalente e avaliação de risco, e estabelecer procedimentos relativos à avaliação de risco, classificação e registro de produtos” (BRASIL, 2019).

O referido projeto trata do registro de agrotóxicos, seus componentes e afins e a sua Ementa propõe o procedimento de avaliação de risco através das seguintes etapas: 1) identificação do perigo; 2) caracterização do perigo (incluindo avaliação dose-resposta); 3) avaliação da exposição; e 4) caracterização do risco.

Os eminentes riscos e a disseminação de produtos agrotóxicos preocuparam/preocupam ambientalistas e cientistas, o que gerou e continua gerando um crescente fluxo de estudos sobre os seus efeitos nocivos, promovendo classificações e orientações de uso.

A classificação dos agrotóxicos, por finalidade de uso, é definida pelo poder de ação do ingrediente ativo sobre organismos-alvo, como: inseticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas, reguladores e inibidores de crescimento etc. Em pesquisa com agricultores familiares do Rio de Janeiro, Brito, Gomide e Câmara (2009) ressaltam que, dentre os 30 nomes de produtos referidos pelos agricultores como de uso frequente, destacam-se os herbicidas (principalmente glifosato), inseticidas e fungicidas.

Tanto os agrotóxicos convencionais quanto os permitidos na agricultura orgânica podem gerar impactos ao meio ambiente quando aplicados diretamente ao solo para controlar insetos indesejados ou quando se depositam no solo por escorrerem das aplicações foliares. Seja qual for a fonte de contaminação, as minhocas são expostas a estes agrotóxicos através de contato com a pele ou por ingestão de solo contaminado (AHMED, 2015).

Silva (2013), explica que:

> Apesar dos agrotóxicos serem utilizados apenas com o propósito de controlar alguns dos fatores que alteram a produtividade, essas substâncias causam efeitos indesejáveis ao meio ambiente, atuando especificamente na destruição de espécies não-alvo, na contaminação do solo e de águas subterrâneas ou superficiais, no desenvolvimento de imunidade contra os agrotóxicos e na acumulação dessas substâncias na cadeia alimentícia, repassando-a a vários ecossistemas.

A concentração de resíduos dos agrotóxicos no solo devido à perda, o que pode atingir até 90% do percentual aplicado, é um dos principais contaminantes do mesmo (MACHADO, 2016). De acordo com Valarini *et al.* (2004), “o solo exerce um papel fundamental no comportamento dos agrotóxicos, uma vez que possui propriedades que interferem nos processos de adsorção, dessorção, degradação ou decomposição”.

Existem autores que afirmam que o glifosato é totalmente degradado pelo solo, porém, outros estudos comprovam que a degradação varia conforme o tipo de solo e também com a variação da temperatura, aumentando quando a mesma aumenta. Além desses fatores, a adsorção e a degradação são inversamente proporcionais, quando a adsorção é forte, a degradação é reduzida (DÖRR, 2015). A “permanência dos herbicidas também é influenciada pelos processos de degradação física, química ou biológica da substância” (QUEIROZ; SILVA; BIANCO, 2011). Porém, “o destino dos agrotóxicos no solo depende, principalmente, do grau em que são adsorvidos às partículas do solo ou dissolvidos na solução do solo (VALARINI *et al*., 2004).

Segundo Landau e Martins (2020):

> os agrotóxicos são substâncias ou agentes venenosos usados principalmente para matar ou controlar quimicamente plantas espontâneas de lavouras, muitas vezes sem selecionarem apenas os organismos-alvo, atingindo a comunidade de macro e microfauna ao seu redor.

Para que se tenha um controle sobre os danos dos agrotóxicos no meio ambiente e para que, com este controle se possa contribuir para amenizar e até excluir tais danos, é necessário e de suma importância que se obtenha apoio governamental. Uma das formas de amparo aos pesquisadores é através da Lei 7.802/89 (1990) § 3º, que incentiva e ampara as Entidades públicas e privadas de ensino, assistência técnica e pesquisa a “realizar experimentação e pesquisas, e poderão fornecer laudos no campo da agronomia, toxicologia, resíduos, química e meio ambiente” (BRASIL, 1990).

2.1.1.1 Glifosato

O glifosato foi sintetizado em 1970, por um grupo de pesquisadores da Monsanto (EUA) e é comercializado em mais de 119 países do mundo e utilizado em mais de 100 culturas (DOMÍNGUEZ *et al*., 2016). É “um ácido orgânico fraco constituído de uma glicina e metade de fosfometil e a sua fórmula molecular e fórmula é constituída por $C_3H_8NO_5P$ (MACHADO, 2016).

É amplamente utilizado devido à sua comprovada eficiência na eliminação de plantas espontâneas, anuais e perenes e se apresenta no comércio com três tipos: glifosato-isopropilamônio, glifosato-trimesium (patenteado por ICI, atual Syngenta) e o glifosato-sesquisódio (patenteados por Monsanto e vendido como Roundup®) (AMARANTE JÚNIOR; SANTOS, 2002).

De acordo com a ANVISA (2019), o glifosato tem sua aplicação liberada para as culturas, seguindo os seguintes critérios:

> a) Aplicação em pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de: algodão, ameixa, amendoim, arroz, banana, batata-doce, batata-yacon, beterraba, caju, caqui, cacau, café, cana-de-açúcar, cará, carambola, cenoura, citros, coco, ervilha, feijão, feijão-caupi, figo, fumo, grão-de-bico, gengibre, goiaba, inhame, lentilha, maçã, mamão, mandioca, mandioquinha-salsa, mangaba, milho, nabo, nectarina, pastagem, pêra, pêssego, rabanete, seringueira, soja, trigo e uva.
> b) Aplicação como maturador de cana-de-açúcar.
> c) Aplicação para eliminação de soqueira no cultivo de arroz e cana-de-açúcar
> d) Aplicação em pós-emergência das plantas infestantes em florestas de eucalipto e pinus.
> e) Aplicação para o controle da rebrota do eucalipto.
> f) Aplicação como dessecante nas culturas de aveia preta, azevém e soja. Algodão, ameixa, arroz, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, coco, feijão, fumo, maçã, mamão, milho, nectarina, pastagens, pera, pêssego, soja, trigo, uva.

Existe um limite máximo de resíduo (LMR) de agrotóxicos que pode ser aceito nos alimentos consumidos pelos seres humanos e este limite é estabelecido pelo *Codex Alimentarius Commission*, um corpo subsidiário da FAO (*Food and Agriculture Organization*) e da Organização Mundial da Saúde (OMS) (AMARANTE JÚNIOR; SANTOS, 2002). No Brasil, este controle é feito pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no que concerne à tolerância, e intervalo de segurança, ou carência, que é o intervalo entre a aplicação do pesticida e a colheita (BRASIL, 2020).

A Resolução - RDC nº 441, de 2 de dezembro de 2020, que dispõe sobre a manutenção do ingrediente ativo Glifosato em produtos agrotóxicos no País, determina medidas de mitigação de riscos à saúde e alterações no registro decorrentes da sua reavaliação toxicológica.

No seu Capítulo I que fala do objetivo e do âmbito de aplicação, consta, em seu Art. 1º que:

> Esta Resolução estabelece a manutenção do ingrediente ativo Glifosato em produtos agrotóxicos no País, determina medidas de mitigação de riscos à saúde e alterações no registro decorrentes de sua reavaliação toxicológica.
>
> § 1º Esta Resolução se aplica a todos os produtos técnicos e formulados à base do ingrediente ativo Glifosato atualmente registrados e que venham a ser registrados no Brasil.
> § 2º Os pedidos de avaliação toxicológica de registro e pós-registro e as alterações da monografia do ingrediente ativo Glifosato aprovados após 1º de outubro de 2019 relacionados aos produtos formulados que não se enquadrem nos parâmetros e características utilizados na avaliação de risco realizada durante a reavaliação do Glifosato devem ser submetidos à avaliação de risco ocupacional e de residentes e transeuntes pela Anvisa (BRASIL, 2020).

Já no Capítulo II, das Disposições Gerais, o seu Art. 2º altera o ingrediente ativo glifosato, no seu índice monográfico G01 como se verifica:

> I - inclusão do formaldeído, na concentração de 1,0g Kg^{-1}, entre os contaminantes de importância toxicológica para o ingrediente ativo, mantendo-se o N-nitrosoglifosato na concentração de 0,001g Kg^{-1};
> II - inclusão da definição de resíduos de Glifosato para conformidade com o Limite Máximo de Resíduo (LMR) como Glifosato;
> III - inclusão da definição de resíduos de Glifosato para avaliação do risco dietético como a soma de Glifosato e AMPA, expressos como Glifosato;
> IV - inclusão do Nível Aceitável de Exposição Ocupacional (Acceptable Operator Exposure Level - AOEL) de 0,1mg kg^{-1} de peso corpóreo por dia;
> V - inclusão da Dose de Referência Aguda (DRfA) de 0,5mg kg^{-1} de peso corpóreo; e

> VI - alteração da Ingestão Diária Aceitável (IDA) para 0,5mg kg^{-1} de peso corpóreo (BRASIL, 2020).

Seguindo as especificações desta resolução, lê-se, no Art. 3º, que “fica proibido o componente polioxietileno amina (POEA) em concentração acima de 20% nos produtos formulados à base de Glifosato (BRASIL, 2020).

Ainda se considera pertinente frisar as obrigações impostas no seu Art. 4º que fala das informações, restrições e proibições que devem conter nas bulas e nos rótulos dos produtos formulados à base de Glifosato.

> I - obrigação de utilização de tecnologia de redução da deriva de 50% para doses acima de 1.800g ha^{-1} (formulações SL/SC e WG/SG) nas aplicações costal, estacionária/semi-estacionária e tratorizada; e
> II - obrigação de utilização de tecnologia de redução da deriva de 50% e bordadura de cinco metros para doses acima de 3.700g ha^{-1} (formulação SL/SC) nas aplicações costal, estacionária/semi-estacionária e tratorizada. A bordadura terá início no limite externo da plantação em direção ao seu interior e será obrigatória sempre que houver povoações, cidades, vilas, bairros, bem como moradias ou escolas isoladas, a menos de 40 metros do limite externo da plantação (BRASIL, 2020).

Dentre as formulações do glifosato, está o Roundup Transorb R®, agrotóxico avaliado neste estudo, que tem em sua composição 588g L^{-1} (58,8% m/v) de sal de Potássio de N-(phosphonomethyl)glycine; 480g L^{-1} de equivalente ácido de N-(phosphonomethyl) glycine) e 820g L^{-1} de outros ingredientes. Encontra-se à venda no mercado em concentrações de 48% (m/v) e as doses aplicadas são em torno de 5L ha^{-1}. Da mesma maneira que outros organofosforados (em geral inseticidas, inibidores da enzima colinesterase)”, pode ser nocivo ao ambiente, principalmente pela ação prolongada e resistência de algumas ervas (AMARANTE JÚNIOR; SANTOS, 2002).

A Tabela 1 mostra os principais ingredientes ativos (i.a) das composições comercializadas no Brasil. (AGROFIT, 2021).

Tabela1 – Principais produtos à base do glifosato registrados no Brasil.

Nome Comum	Grupo Químico	Número de i.a. cadastrados
Glifosato	glicina substituída	61
Glifosato Sal de Dimetilamina	glicina substituída	3
G**lifosato-sal de amônio**	glicina substituída	14
Glifosato-Sal de Di-amônio	glicina substituída	3
G**lifosato-sal de isopropilamina**	glicina substituída	28
G**lifosato-sal de potássio**	glicina substituída	11

Fonte: Agrofit, (2021).

Dentre estas formulações há várias combinações de ingredientes ativos, equivalente ácido e outros ingredientes. Conforme as proporções destas substâncias o produto pode ser mais ou menos tóxico.

O glifosato era considerado pela legislação brasileira um herbicida de classe toxicológica II, ou seja, altamente tóxico e classificação quanto ao potencial de periculosidade Ambiental: III – Produto Perigoso ao Meio Ambiente, porém em 2019 através do ato nº 58 de 27 de agosto, 93 produtos à base de glifosato foram reclassificados, inclusive o Roundup Transorb R®, que passou para classe 5, produto improvável de causar dano agudo (BRASIL, 2019).

A tecnologia Transorb permite a entrega mais rápida do produto e em maiores quantidades à raiz da planta invasora, oferecendo menos risco de perda em condições adversas como chuva. O que permite a rápida translocação do princípio ativo é o surfactante usado nesta formulação (MODESTO, MARTINEZ, 2010).

O surfactante usado na sua formulação é uma mistura contendo 15% de polioxietileno amina (POEA) e outros surfactantes não especificados (HOWE *et al.*, 2004).

Howe *et al.* (2004) ainda indicam que este produto é mais tóxico do que a formulação original do Roundup®, portanto estudos abordando diferentes formulações são necessários.

Esta abordagem se torna valiosa quando se tem informações que o glifosato é o agrotóxico mais vendido no Brasil, totalizando em 2014 a venda de 193.948 toneladas e que os limites máximos de resíduo deste agrotóxico no país superam em duzentas vezes aos limites da União Europeia (BOMBARDI, 2017).

No ranking nacional, os maiores consumidores de glifosato são os Estados do Mato Grosso (38 mil toneladas) e do Rio Grande do Sul e Paraná (aproximadamente 25 mil toneladas) (BOMBARDI, 2017). Os últimos dados revelam que entre os anos de 2014 e 2018, foram vendidas 943.626,43 toneladas de glifosato, representando 35,5% do total das vendas de agrotóxicos do país (IBAMA, 2020).

Atentando-se para estas informações Gill *et al*., (2017) revisou a toxicidade do glifosato em diversos organismos, desde unicelulares até os humanos e destacou que o mesmo causa efeitos toxicológicos agudos e crônicos graves.

No entanto, Barja e Santos (2005) afirmam que o glifosato pode ser considerado como um herbicida “amigável” ao meio ambiente devido à sua biodegradação e forte adsorção ao solo. Porém há estudos que apontam o contrário, dentre eles alguns específicos com minhocas, por exemplo:

Correia e Moreira (2010) em ensaio com *Eisenia fetida* expostas em longo prazo (56 dias) em solo contaminado com glifosato nas concentrações de 0, 10, 100, 500 e 1000mg kg^{-1}, verificaram que não houve mortalidade, no entanto, demonstraram efeitos tóxicos no desenvolvimento e na reprodução dos organismos, até na menor dose testada.

Buch *et al.* (2013) observaram que minhocas evitaram solos em concentração de (30mg i.a. kg^{-1}) de um produto contendo 480g.L^{-1} i.a.

O herbicida demonstrou também efeitos graves na reprodução de *Lumbricus terrestris* e *Aporrectodea caliginosa* nas doses de 0.59, 2.9, 5.79 e 11,59g m^2 durante ensaios em terrários (STELLIN *et al.,* 2017).

2.2 Ecotoxicologia

Bianchinni Martins e Jorge (2009) definem a ecotoxicologia como: a ciência que estuda os efeitos adversos de substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações ou comunidades (animais ou vegetais), nos ambientes terrestres e aquáticos.

Niva e Brown (2019) destacam a importância da ecotoxicologia terrestre, que consiste na obtenção de dados para as matrizes contaminadas como, por exemplo: solos, através da realização de ensaios em laboratório e/ou in situ. Sendo assim, são expostos organismos testes a um solo contaminado, objetivando-se avaliar o efeito da contaminação na sobrevivência, crescimento, reprodução, mudanças comportamentais, dentre outros fatores.

Ressalta-se que, a classificação dos testes ecotoxicológicos varia de acordo com o tempo de exposição (agudo ou crônico), com o modo de ação (mortalidade, crescimento ou reprodução) ou com o efeito de resposta (letal ou subletal) (NIVA; BROWN, 2019).

Os testes ecotoxicológicos têm como intuito determinar a relação da dose ou concentração de uma ou mais substâncias em um determinado meio com o efeito e/ou resposta destas em um determinado organismo vivo (LIMA, 2009).

Alguns organismos têm sido mais utilizados para os testes ecotoxicológicos terrestre, dentre eles estão as minhocas (*Eisenia andrei e Eisenia fetida*), enquitreídeos (*Enchytraeus sp*. e *Cognettia sp*.) e colêmbolos (*Folsomia candida*).

Apesar de não serem minhocas recorrentes em solos agrícolas, as espécies epigêicas *E. andrei* e *E. fetida* são as mais utilizadas nestes testes, devido a sua fácil adaptação em laboratório e geração relativamente curta em salas com temperatura controlada (FOUNTAIN; HOPKIN, 2005). Além disso, estudos como o de Buch, Sauter e Brown (2010) apontam que estas espécies tiveram comportamento semelhante à espécie *Pontoscolex corethrurus* (espécie predominante em agroecossistemas tropicais) em testes agudos e comportamentais.

A maioria dos trabalhos utilizam protocolos como os da ISO (Organização Internacional de Padronização), OECD (Organização Econômica para Cooperação e Desenvolvimento) e EPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos) para a realização de ensaios, por serem internacionalmente reconhecidos (SISINNO *et al.,* 2006).

Segundo Niva e Brown (2019, p.45) no Brasil:

> os ensaios ecotoxicológicos com oligoquetas (mortalidade, reprodução, comportamento de fuga e bioacumulação) têm sido utilizados principalmente no setor acadêmico, mas também podem ter aplicações, por exemplo, no setor regulatório de registro de substâncias a serem comercializadas e no setor de licenciamento de atividades com potencial de contaminação para avaliação da qualidade do solo. Além disso, a aplicação

> dos ensaios ecotoxicológicos com organismos terrestres como ferramenta de avaliação e controle, ainda não é realizada com a mesma frequência com que são requisitados os ensaios com organismos aquáticos, basicamente, por falta de demanda legal e pouco conhecimento, inclusive, dos técnicos dos órgãos ambientais sobre os dados produzidos e sua interpretação.

Estudos mais recentes têm incorporado biomarcadores que são definidos como mudanças biológicas mensuráveis, desde os níveis bioquímicos e moleculares até os comportamentais, em resposta a contaminantes (CASTELLANOS; HERNANDEZ, 2007).

Estes biomarcadores informam sobre as mudanças que ocorrem nos níveis mais baixos de organização biológica e podem fornecer previsões sobre as consequências ecológicas desde o início da poluição por concentrações subletais (ASENSIO *et al*., 2007). Dentre estes biomarcadores estão os estudos histológicos, que segundo Wang (2015), juntamente com a reprodução são os testes mais apropriados para avaliar contaminantes ambientais.

2.3 *Eisenia andrei* (Bouché 1972)

E. andrei é uma minhoca da família Lumbricidae. Esta espécie é muito utilizada na minhocultura, pois possui facilidade de adaptação às condições de cativeiro e elevada taxa de multiplicação (BROWN; JAMES, 2007). Na Tabela 2 encontram-se algumas características internas e externas destes organismos.

Apresentam expectativa de vida de 4,5 à 5 anos e peso médio de 0,55g, no entanto podem chegar à 2,5g (NIVA; BROWN, 2019).

Em relação à reprodução, atingem a maturidade sexual em torno de 21 e 28 dias. A cópula ocorre na superfície e a liberação do casulo geralmente ocorre dentro de 48h, sendo que cada indivíduo produz 0,35 a 0,50 casulos por dia (NIVA; BROWN, 2019).

As espécies de minhoca *E. andrei e E. fetida* “espécie muito semelhante à *E. andrei*” são utilizadas em testes ecotoxicológicos em função do papel fundamental que desempenham na macrofauna, pelo seu curto ciclo de vida, pela sua alta tolerância à umidade e temperatura e pela sua operação relativamente simples (DOMÍNGUEZ; PÉREZ-LOSADA, 2010). Além disso, são espécies padrão recomendadas pelos protocolos internacionais para os testes ecotoxicológicos de substâncias químicas para regiões temperadas (OECD, 1984; ISO 17512, 2007) e tropicais (IBAMA, 1990; ABNT - NBR 15.537, 2007, 2014).

Tabela 2 – Caracteres externos e Internos de *Eisenia andrei*.

Caracteres Externos	***Eisenia andrei***
Pigmentação	Avermelhada dorsalmente
Comprimento	2,7 -13 cm
Diâmetro	2 - 6 mm
Segmentos	65 – 131
Prostômio	Epilóbico
Cerdas	Organização tipo Lumbricina com 4 pares, estreitamente pareadas
Clitelo	Em forma de sela, nos segmentos 24/27-31/34
Traves Puberais	Presentes, geralmente nos segmentos 28-30 .
Marcas Genitais	Frequentemente nos segmentos 8-12; e 27-35
Poros Dorsais	Presentes e pequenos, iniciando em 3/4-5/6
Poros espermatecais	Dois pares dorsais, em 9/10 e 10/11 .
Poros femininos	No segmento 14
Poros masculinos	Pareados, no segmento 15, em forma oval
Caracteres Internos	***Eisenia andrei***
Moela	No segmento 27
Glândula calcífera	No segmento 11
Tiflosol	Início nos segmentos 20-23, final nos segmentos 60-109
Nefrídeos	Vesículas em formato de salsicha, sem dutos definidos.
Corações	Nos segmentos 7-11
Espermatecas	Nos segmentos 9 e 10
Testículos	Nos segmentos 10 e 11

Fonte: Adaptado de Blakemore (2002).

2.4 Estudos histológicos

A histologia é uma ferramenta útil para determinar a influência de pesticidas agrícolas, poluentes industriais, resíduos orgânicos, etc., pois fornece informações úteis, como consequências no crescimento, danos e desorganização dos tecidos. (KUMAR; SINGH, 2017). Nesse sentido, respostas histopatológicas em minhocas têm sido relatadas como indicadores valiosos de contaminação terrestre (GIOVANETTI *et al*., 2010; KILIÇ, 2011).

A parede do intestino da *Eisenia andrei* é dobrada dorsalmente e se forma um tiflosol que aumenta a área de absorção e a superfície intestinal (BABIĆ *et al*., 2016). O tecido cloragógeno das minhocas está localizado no canal gastrintestinal, separando o epitélio de absorção do celoma. Constitui o principal sítio de acumulação e detoxificação de metais, sendo que alterações morfológicas no tecido

cloragógeno da minhoca indicam uma maneira de lidar com grandes quantidades de metais e substâncias tóxicas (MORGAN *et al.*, 2002; GIOVANETTI *et al*., 2010). Além do tecido cloragógeno, outro tecido utilizado nos estudos de toxicidade é o epitélio de revestimento do intestino (Figura 1).

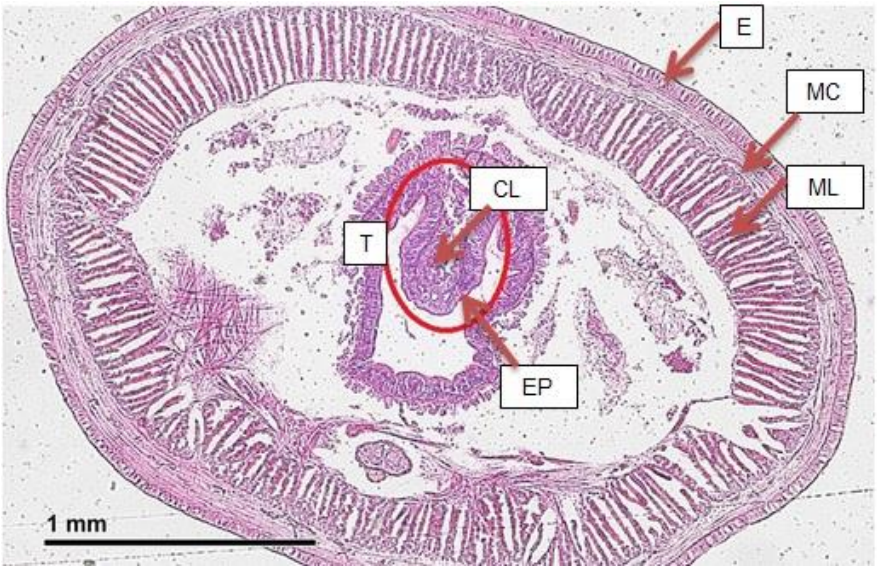

Figura 1 – Corte histológico de minhoca. E – Epiderme, MC – Musculatura Circular, ML – Musculatura Longitudinal, T – Tiflosol, CL- Tecido Cloragógeno e EP – Epitélio intestinal.
Fonte: https://pt.wikipedia.org/wiki/Tiflossole.

Alguns estudos relatados na literatura avaliam os tecidos intestinais de minhocas expostas a metais (LOURENÇO *et al*., 2011), herbicida Butacloro (GOBI; GUNASEKARAN, 2010.; inseticida monocrotofós (ABBIRAMY *et al.* (2018), dioxinas (ROUBALOVÁ *et al.* 2018), nano partículas de óxido de níquel (ADEEL, 2019) e herbicida glifosato (MOHSSEN, 2000).

3. Material e métodos

3.1 Bioensaios

O estudo foi realizado em laboratório, na Embrapa Clima Temperado - Estação Experimental Cascata (EEC) e no Departamento de Morfologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Baseando-se nos protocolos OECD (1984; 2004); ISO (1993; 2012); CETESB (1990); ABNT (2007; 2014), com adaptações, minhocas da espécie *E. andrei* foram obtidas do minhocário da EEC. Estas foram mantidas em laboratório, acomodadas em caixa de plástico resistente, com substrato de pó de fibra de coco e esterco bovino (50:50v/v), com pH neutro e mantidas a 20 ± 2ºC.

O esterco foi obtido na EEC, a partir da criação de base ecológica de bovinos da raça Jersey. O esterco coletado foi seco em estufa a 60ºC, processado em um triturador de resíduos e peneirado em peneira de 2mm para obtenção de partículas menores.

3.2 Teste ecotoxicológico

3.2.1 Substrato de ensaio

O substrato utilizado para os testes ecotoxicológicos foi formulado, de acordo com as recomendações ISO 11268-2 (2012). Este consiste em uma mistura de 70% de areia industrial fina, 20% de caulim P.A e 10% de matéria orgânica (pó de fibra de coco) (GARCIA, 2004). Para evitar contaminação de outros organismos, o substrato passou por dois ciclos de congelamento e descongelamento.

Quatrocentos gramas deste substrato foram inseridos nos recipientes testes, os quais consistem em caixas organizadoras de plástico transparente, retangulares, com volume total de 1,02L com tampa perfurada para permitir as trocas gasosas e evitar a fuga de indivíduos.

3.3 Contaminação com o glifosato

Os substratos receberam o tratamento como produto comercial Roundup Transorb R® (480g L^{-1} e.a) em 6 concentrações, incluindo o controle, conforme Tabela 3.

Tabela 3 – Tratamentos e concentrações de Glifosato utilizadas no experimento. Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata, Pelotas, RS, Jul/2020.

Tratamentos	mg i.a kg^{-1}	mg e.a kg^{-1}
T1 - controle	0	0
T2 – 1L ha^{-1}	1,17	0,96
T3 - 2L ha^{-1}	2,35	1,92
T4 - 4L ha^{-1}	4,70	3,84
T5 - 8L ha^{-1}	9,40	7,68
T6 - 16L ha^{-1}	18,81	15,36

A bula do produto comercial recomenda doses de uso de 1 a 4,5L ha^{-1} dependendo da planta que se deseja controlar. Como base para determinar as concentrações de estudo foi definida uma aplicação de 1L ha^{-1}, considerando uma profundidade de 5 cm em um solo com densidade de 1000kg m^{-3}. As demais concentrações foram definidas como o dobro da concentração imediatamente anterior.

A umidade foi verificada e ajustada em torno de 60%, e o pH medido conforme indicação das normas já citadas (6,0 ± 0,5) e antes do início do experimento as minhocas foram aclimatadas no solo teste sem tratamento por um período de 24h.

Quinze indivíduos foram lavados, pesados em grupos e inseridos em cada unidade experimental, alimentados semanalmente com esterco bovino seco e triturado. Para cada concentração foram realizadas 4 repetições, totalizando 24 unidades experimentais. Os recipientes e os organismos foram pesados semanalmente.

O ensaio teve duração total de 56 dias, sendo que uma semana após a metade deste tempo (35 dias) os indivíduos adultos foram retirados, mantendo-se nas unidades experimentais somente casulos e juvenis, os quais foram contabilizados ao final do experimento.

Semanalmente foram retirados dois indivíduos por unidade experimental para a realização das análises histológicas.

3.4 Análises histológicas

Os indivíduos selecionados para avaliação histológica foram identificados e deixados por 4h em papel filtro umedecido para que ocorresse a limpeza do conteúdo intestinal. As amostras foram fixadas por imersão em formol 10% durante um período de 4h, após foram lavadas e armazenadas em álcool 70%. No laboratório de Histologia da UFPel, o material foi cortado transversalmente no 35° segmento, logo abaixo do clitelo, visto que segmentos anteriores poderiam dificultar a visualização das estruturas estudadas.

As peças foram inseridas em frasco contendo álcool 70%, 80% e 90% respectivamente, por 40 minutos. A seguir, levaram três banhos de 40min de álcool absoluto para a conclusão do processo de desidratação. Em seguida foram diafanizadas com três banhos de xilol de 40min cada. Adiante, foram colocadas em cassetes histológicos de plástico e levaram 3 banhos de parafina, mantida em estufa à 60º para o processo de inclusão. Depois de parafinado o material foi cortado em micrótomo semiautomático Leica modelo RM2245 a uma espessura de 5µm, três cortes foram colocados em lâminas e estas, levadas à estufa a 56°C por 24h. O processo de coloração foi realizado com os corantes: Hematoxilina e Eosina, e a montagem da lâmina foi finalizada utilizando bálsamo do Canadá.

Para a análise histológica foram preparadas, visualizadas, fotografadas e medidas 192 minhocas, totalizando 2 minhocas por unidade experimental por semana (n=48), ao final de 4 semanas foram confeccionadas três lâminas com três cortes histológicos cada. Somente os melhores cortes foram selecionados para a realização das medidas. As imagens dos cortes foram capturadas por uma câmera digital Moticam 5.0 acoplada a um microscópio Nikon Eclipse E200. Foram observadas nas objetivas de 40x os tecidos cloragógeno e epitélio intestinal e na objetiva de 10x a região do tiflosol, além disso, algumas lâminas foram fotografadas na objetiva de 4x para ter uma visão mais ampla dos cortes.

Foram medidas as espessuras dos tecidos cloragógeno e epitelial e a região do tiflosol, através do software Motic Images Plus 2.0. Foram realizadas três medidas por fotografia para cada tecido/região.

3.5 Análises estatísticas

A probabilidade de sobrevivência das minhocas em cada tratamento foi calculada por meio do estimador não-paramétrico de Kaplan-Meier e esquema de censura intervalar, com a última observação ocorrendo aos 35 dias. As minhocas retiradas para as avaliações histológicas foram consideradas como dados censurados aleatórios. A comparação das curvas de probabilidade entre os tratamentos foi feita pelo teste de Rank ($p<0.05$), com a estatística de Cramér-von Mises e peso LogRank.

O efeito dos tratamentos sobre a produção de casulos e minhocas juvenis ao final dos 35 dias de exposição foi avaliado através de modelo linear generalizado com distribuição de Poisson ($p<0.05$) e função de ligação logaritmo.

A biomassa média das minhocas dos tratamentos ($n=24$) em cada data de avaliação foi submetida à análise de variância com nível de confiança de 95%. Os resíduos foram testados quanto à normalidade pelo gráfico QQ-plot e pelo teste de Anderson-Darling, o homocedasticidade pelo gráfico dos resíduos x valores ajustados e a independência pelo gráfico dos resíduos x ordem de coleta.

A biomassa média relativa das minhocas em cada grupo foi calculada dividindo a biomassa média inicial, anterior à aplicação dos tratamentos, pela biomassa média em cada dia de avaliação.

A curva dose-resposta foi calculada com o valor médio da biomassa individual média das minhocas nas seis datas de avaliação. Foi utilizado o modelo linear generalizado, com distribuição Gaussiana e função de ligação logaritmo.

A espessura média do epitélio, do cloragógeno e do tiflosol das minhocas amostradas dos tratamentos em cada data de avaliação foi submetida à análise de variância com nível de confiança de 95%. Os resíduos foram testados quanto à normalidade pelo gráfico QQ-plot e pelo teste de Anderson-Darling, o homocedasticidade pelo gráfico dos resíduos x valores ajustados e a independência pelo gráfico dos resíduos x ordem de coleta.

A curva dose-resposta foi calculada com o valor médio da biomassa individual média das minhocas nas quatro datas de avaliação. Foi utilizado o modelo linear generalizado, com distribuição Gaussiana e função de ligação logaritmo.

Para a análise de componentes principais foi calculada a média dos valores médios nas quatro datas de amostragem, totalizando 24 valores (6 tratamentos com

4 repetições) para cada variável. Foi utilizado o foco na distância entre as amostras e transformação logarítmica nos dados das variáveis. O gráfico foi construído por meio de centróide. Foi utilizado o programa Canoco 4.5 (TER BRAAK; ŠMILLAUER, 2002).

4. Resultados e Discussão

4.1 Mortalidade, migração e reprodução

Foi observada a morte de 23 minhocas ao longo de 35 dias de exposição aos tratamentos, sendo que 57% dessas mortes ocorreram nos primeiros sete dias. Contudo, não houve diferença significativa (p=0,1198) quanto à distribuição dessas mortes e a probabilidade de sobrevivência no final do período foi superior à 80% em todos os tratamentos (Figura 2).

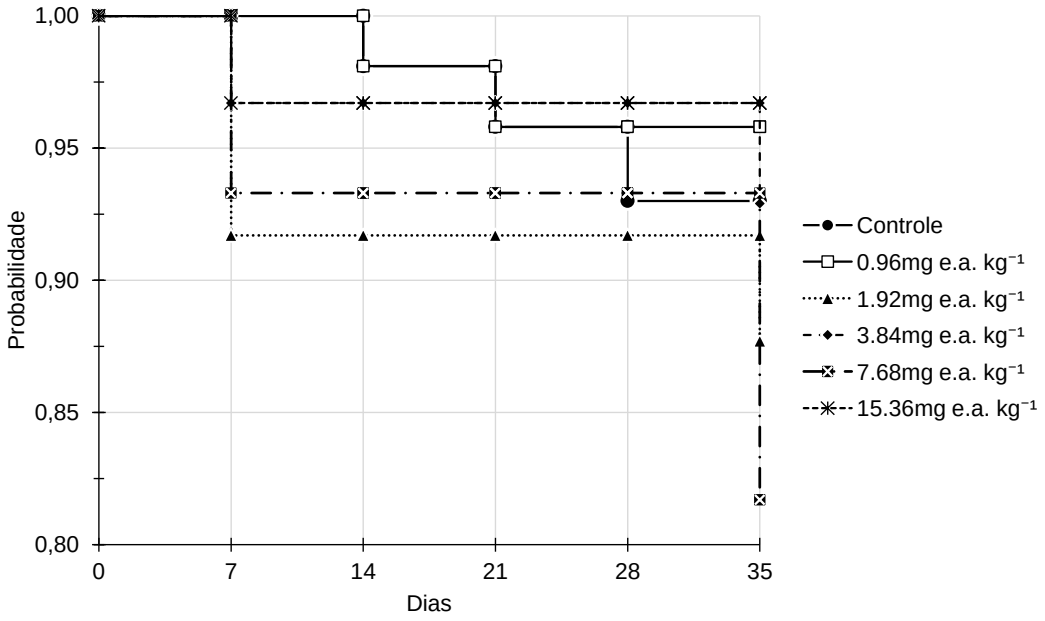

Figura 2 – Probabilidade de sobrevivência de minhocas nos diferentes tratamentos. Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata, Pelotas, RS, Jul/2020 à Ago/2020.

Buch, Sauter e Brown (2010), avaliando a sensibilidade das espécies *Eisenia andrei* e *Pontoscolex corethrurus* em concentrações de 0, 7, 14, 21, 30 e 47mg i.a. kg^{-1} glifosato (480g L^{-1} i.a.), observaram que o mesmo não apresentou efeito toxicológico agudo (teste de mortalidade) para ambas as espécies e que somente na concentração mais alta ocorreu 3,3% de mortalidade para *P. corethrurus* e 4% para *E. andrei*.

Se projetada a mortalidade somente nos tratamentos com glifosato (20 minhocas mortas) (Tabela 4), excetuando-se o tratamento controle, com o ingrediente ativo (588g L^{-1}), a mortalidade chegaria a 6,7% [20÷(5*60)*100]. Sendo assim um pouco superior ao encontrado pelos autores. Apesar de os produtos terem formulações diferentes, a maior dose utilizada pelos autores é mais de duas vezes superior às do presente estudo. Portanto, infere-se que o produto ora utilizado possa ser mais tóxico para as minhocas, pois seu ingrediente ativo é um sal de potássio.

Pasini *et al.* (2017) ao avaliarem diferentes ingredientes ativos de glifosato, verificaram que o produto que apresenta sal de potássio em sua constituição foi mais tóxico para um inimigo natural *Trichogramma pretiosum* (vespa parasitoide) dias após a pulverização com o produto na cultura do milho.

No entanto, como não houve diferença significativa entre os tratamentos, o fato de haver minhocas mortas pode estar relacionado com outros fatores e não somente ao produto em si.

Tabela 4 – Mortalidade e reprodução de minhocas submetidas aos diferentes tratamentos. Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata, Pelotas, RS, Jul/2020 à Ago/2020.

Tratamentos	Mortalidade		Reprodução			
	nº mortas	%	nº casulos	%	nº juvenis	%
Controle	3	13	11	21	2	8
0,96mg e.a. kg^{-1}	2	9	12	23	7	29
1,92mg e.a. kg^{-1}	6	26	5	10	7	29
3,84mg e.a. kg^{-1}	3	13	10	19	4	17
7,68mg e.a. kg^{-1}	7	30	9	17	0	0
15,36mg e.a. kg^{-1}	2	9	5	10	4	17
Total	23	100	52	100	24	100

Um destes fatores é explicado por Pochron *et al.* (2019) que avaliaram que a temperatura interfere na mortalidade de minhocas *Eisenia fetida*. Quando estes organismos se encontravam em solo não aquecido, morreram mais rápido, independentemente da massa. Diante do exposto, acredita-se que pelo experimento ter sido realizado no período do inverno e em alguns momentos possa ter ocorrido algum problema com a climatização do ambiente, houve maior mortalidade, principalmente na primeira semana.

Pochron *et al.* (2020), utilizando 60,7mg i.a. kg^{-1} de um produto comercial a base de glifosato, também relatam que, apesar dos recipientes com as minhocas serem fechados para evitar fugas, alguns indivíduos não foram localizados, o mesmo ocorrido neste ensaio, sendo assim não se pôde determinar se migraram ou

morreram fora do recipiente. Para a análise de sobrevivência, as minhocas desaparecidas são computadas como mortas, mesmo que não saibamos se realmente morreram.

Em relação ao ensaio ecotoxicológico de reprodução, o mesmo é validado quando a mortalidade de minhocas adultas ao final dos 28 dias não ultrapasse aos 10% (NIVA; BROWN, 2019). Neste estudo, a taxa de mortalidade total (n=360) foi de 6,4%.

Não houve diferença significativa para o número de minhocas juvenis (p=0,3952) e número de casulos produzidos (p=0,1703) (Tabela 4).

Um fator importante a ser observado foi a manipulação destes organismos semanalmente para verificação da biomassa. Em geral, a pesagem dos organismos é realizada no início e ao final do experimento. No entanto para acompanhar as análises histológicas, optou-se por pesar os organismos semanalmente, o que consequentemente pode ter aumentado o estresse, assim como também acarretou uma maior produção de muco após a lavagem dos mesmos para posterior pesagem. Domínguez *et al.* (2016) afirmam que a alta produção de muco demanda maior energia, além disso, o muco é imprescindível para a formação de casulos, portanto é possível que a cada semana os indivíduos consumissem essa energia necessária para a reprodução após um evento estressante.

Na literatura há contradições em relação ao efeito do glifosato na produção de casulos. Correia e Moreira (2010) relatam a ausência total de produção de casulo de *Eisenia fetida*, enquanto Casabé *et al.* (2007) não encontraram nenhum efeito negativo na produção do casulo da mesma espécie, exceto por sua viabilidade.

Esses resultados contraditórios podem ser explicados porque Correia e Moreira (2010) utilizaram o glifosato nas taxas de aplicação de 1–100mg kg^{-1} solo, enquanto Casabé *et al.* (2007) usou um solo agrícola onde a concentração de glifosato estava abaixo o limite de detecção.

Yasmin; D'Souza (2007) utilizando doses 4x superiores às recomendadas para um produto contendo (480g L^{-1} i.a). de glifosato, constatou que o mesmo não teve um efeito significativo na reprodução de *E. fetida.*

As normas referidas para os testes ecotoxicológicos também determinam um número mínimo de juvenis ao final do experimento (30 indivíduos por réplica do tratamento controle), estes números não foram constatados no experimento, assim

como Correia e Moreira (2010) também não observaram estes valores, tendo ao final do teste apenas 4 indivíduos nos grupos controle.

García-Pérez *et al.* (2016) também relataram efeitos não significativos quanto a produção de casulos, além disso, observaram que em consequência do glifosato, minhocas que apresentavam maturidade sexual (clitelo aparente) não demostraram essa estrutura bem evidente ao longo do experimento.

Piola *et al*. (2013) ressaltam que o efeito do glifosato pode impedir processos metabólicos como a fosforilação oxidativa, o que ocasiona a perda de energia e consequentemente à morte. Entretanto, relatam também que a maior toxicidade do produto não está relacionada com o glifosato em si, e sim devido às substâncias adjuvantes presentes nas formulações comerciais.

Em um experimento utilizando duas formulações diferentes de agrotóxicos à base de glifosato: sal monoamônio (72% e.a; 85,4% e.a) Piola *et al.* (2013) verificaram que há diferença para glifosatos com formulações distintas, e mesmo o produto de (72% e.a) apresentar menor concentração, se mostrou mais tóxico para minhocas *E. andrei.*

Portanto, a sinergia do glifosato com substâncias não informadas nas formulações podem trazer respostas ecotoxicológicas diferentes para cada produto comercial.

4.2 Biomassa

Em relação à biomassa, não houve diferença significativa entre os tratamentos em nenhuma das datas avaliadas (Tabela 5).

Tabela 5 – Biomassa (mg) de minhocas por tratamento (n=24) durante as 5 semanas de experimento. Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata, Pelotas, RS, Jul/2020 à Ago/2020.

Tratamentos	1° dia	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias
Controle	755(±23)	725 (±36)	851 (±26)	881 (±32)	960 (±50)	859 (±50)
0,96mg e.a. kg^{-1}	761(±21)	759 (±42)	805 (±24)	846 (±31)	933 (±26)	811 (±34)
1,92mg e.a. kg^{-1}	724(±32)	739 (±24)	832 (±36)	875 (±39)	946 (±68)	841 (±40)
3,84mg e.a. kg^{-1}	734 (±6)	679 (±29)	802 (±25)	851 (±29)	941 (±47)	877 (±23)
7,68mg e.a. kg^{-1}	718(±25)	679 (±29)	774 (±29)	785 (±32)	896 (±32)	835 (±30)
15,36mg e.a. kg^{-1}	701 (±22)	673 (±34)	791 (±34)	814 (±35)	852 (±36)	763 (±20)
Média	732	709	809	842	921	831
GL	5	5	5	5	5	5
F	0,9944	1,2521	0,8963	1,2062	0,7879	1,3699
p-valor	0,4487	0,3266	0,5045	0,3459	0,5719	0,2817

Buch *et al*. (2013) também não observaram diferença significativa em relação à biomassa de minhocas da espécie *Eisenia. andrei* e *Pontoscolex corethrurus* mesmo nas concentrações mais altas de glifosato (47mg ia.kg^{-1}).

Entretanto, de forma geral, a biomassa relativa das minhocas entre o 1° e o 28° dias aumentou em todos os tratamentos (Figura 3), variando entre 21% e 30%. No 35° dia todos os grupos mostraram tendência de desaceleração de biomassa, mas ainda mantiveram um aumento médio de 13%, variando entre 7% e 19%.

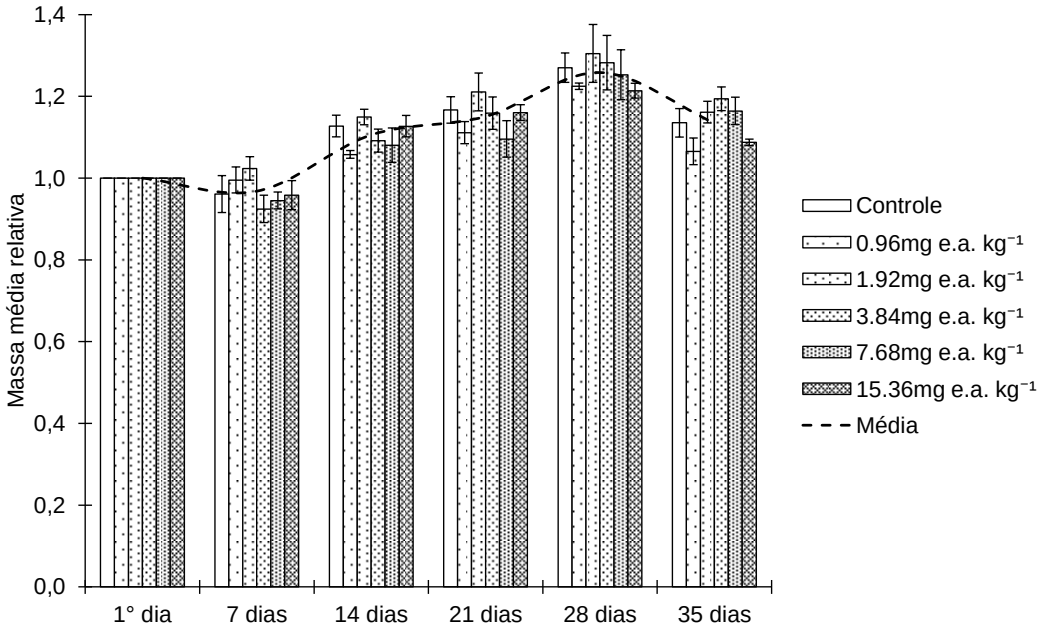

Figura 3 – Relação Massa média relativa x tempo de exposição ao glifosato. Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata, Pelotas, RS, Jul/2020 à Ago/2020.

Segundo Pochron *et al.* (2020) quando as minhocas vivem em solo que fornece fontes de alimento abundantes, podem ser capazes de acumular massa corporal, mesmo durante o processamento metabólico de contaminantes. Os autores ainda observaram que variáveis como temperatura das unidades experimentais e peso inicial das minhocas são fatores que interferem nas respostas ao herbicida glifosato.

O aumento relativo da biomassa até 28 dias de experimento pode estar relacionado com a retirada semanal de minhocas das unidades experimentais para as análises histológicas, visto que a quantidade de alimento disponível, independente do número de minhocas se manteve estável semanalmente.

Já a redução de biomassa aos 35 dias pode ser uma resposta de tendência à estabilização de peso, no entanto esta afirmativa necessitaria de um estudo mais aprofundado e a longo prazo.

Contudo, a curva dose-resposta para biomassa médio em todo experimento foi significativa ($p=0,0031$, $pseudoR^2=0,9121$) (Figura 4), indicando que o aumento da concentração de i.a. kg^{-1} do glifosato reduziu a biomassa média individual das minhocas.

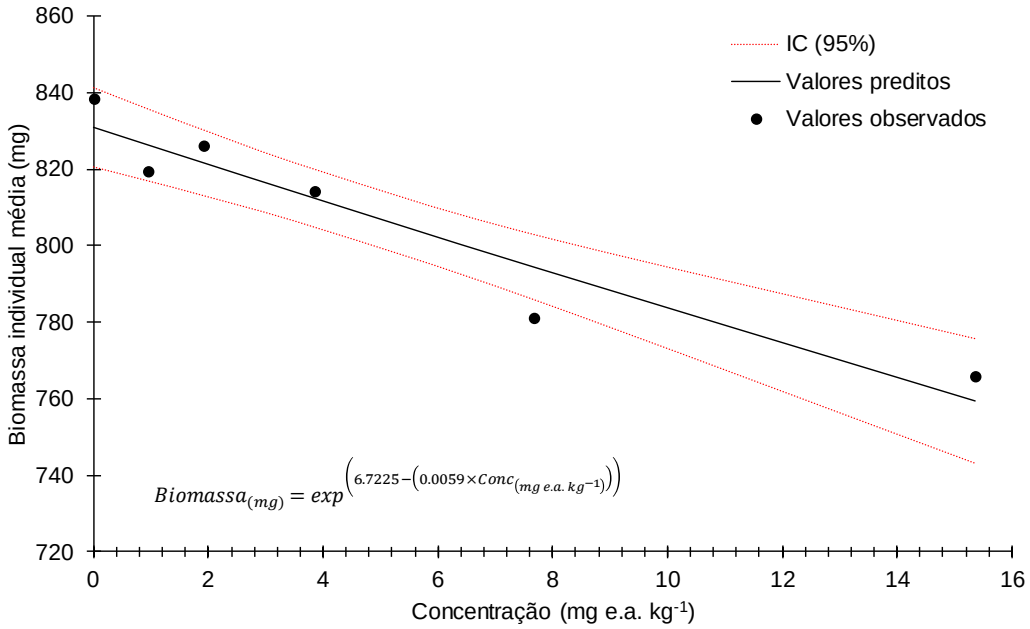

Figura 4 – Dose-resposta para biomassa individual média. Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata, Pelotas, RS, Jul/2020 à Ago/2020.

Niemeyer, Vilaça e Silva (2006), ao avaliarem os efeitos na biomassa do crustáceo *Cubaris murina* quando expostos a 4,8; 9,6; 14,4; e 19,2mg g^{-1} de solo de Roundup®, constataram que o peso médio final em todos os tratamentos foi menor do que no controle.

Da mesma forma, Domínguez *et al.* (2016), estudando um metabólito do glifosato - AMPA (ácido Aminometilfosfônico), perceberam que concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000µg kg^{-1}, elevadas, mas não letais, produziram maior estresse nas minhocas e que isto levou em uma maior perda de biomassa em comparação com o controle.

4.3 Análises histológicas

A Figura 5 demostra cortes histológicos transversais nos diferentes tratamentos.

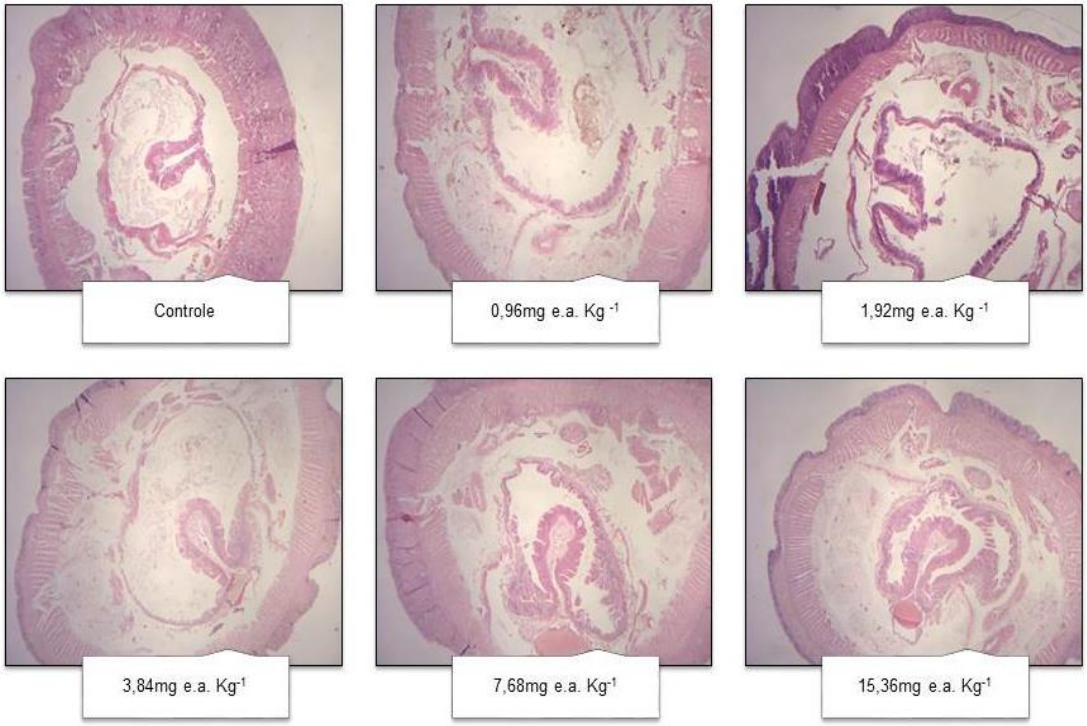

Figura 5 - Cortes histológicos transversais de *Eisenia andrei* aos 28 dias de experimento. Imagens obtidas através de Microscópio Óptico com câmera acoplada na objetiva de 4x. Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Morfologia, Pelotas, RS, Set/2020.

Não houve diferença estatística entre os tratamentos para a espessura média do epitélio, do tecido cloragógeno e do tiflosol. (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6 – Medidas dos tecidos em (µm) (n=24). Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Morfologia, Pelotas, RS, Set/2020.

Tratamentos	Epitélio (*µ*m)	Cloragógeno (*µ*m)	Tiflosol (*µ*m)
Controle	85,37 (±4,61)	54,99 (±4,11)	360,96 (±8,50)
0,96mg e.a. kg-¹	78,85 (±6,27)	51,80 (±2,79)	356,81 (±13,75)
1,92mg e.a. kg-¹	77,64 (±2,84)	50,25 (±4,12)	333,72 (±8,52)
3,84mg e.a. kg-¹	82,67 (±3,68)	49,36 (±3,40)	356,36 (±1,80)
7,68mg e.a. kg-¹	80,42 (±1,73)	51,21 (±2,99)	353,97 (±4,97)
15,36mg e.a. kg-¹	83,29 (±3,44)	51,08 (±2,30)	343,97 (±2,71)
Média	81,37	51,45	350,97
GL	5	5	5
Estat. F	0,5266	0,3314	1,6844
p-valor	0,7532	0,8874	0,1893

Tabela 7 – Resultado do teste de Anderson-Darling para os tecidos Epitélio Intestinal, Cloragógeno e tiflosol nos diferentes tratamentos em relação à concentração em mg e.a. kg^{-1} de Roundup Transorb R. Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata, Pelotas, RS, Jul/2020 à Ago/2020.

Tecidos	Preditor	Estimativa	Desvio Padrão	Estat. T	p-valor	Limite Inferior	Limite Superior
Epitélio	Intercepto	4,392	0,022	199,184	$3,81e^{-09}$	4,349	4,435
	Concentração	0,001	0,003	0,431	0,688	-0,004	0,007
Cloragógeno	Intercepto	3,950	0,022	178,045	$5,97e^{-09}$	3,907	3,994
	Concentração	-0,002	0,003	-0,667	0,541	-0,008	0,004
Tiflosol	Intercepto	5,868	0,017	340,846	$4,45e^{-10}$	5,834	5,902
	Concentração	-0,001	0,002	-0,641	0,551	-0,006	0,003

Diferindo desses resultados, Mohssen (2000) observou que o glifosato causou danos ao tecido epitelial de *Pheretima elongata.* O autor ainda relata que alguns indivíduos que sobreviveram à exposição do herbicida, regeneraram suas células da mucosa intestinal e que na quarta semana de exposição o revestimento epitelial recuperou características e arquitetura, sugerindo o alto poder regenerativo das minhocas.

De Silva e Chandrasekara (2017) concluíram que o glifosato é um herbicida seguro para minhocas *Perionyx excavatus*, se for utilizado corretamente de acordo com as instruções do produto, pois não causou mortalidade para minhocas após a exposição prolongada à sua dose de campo, embora o tenha causado inicialmente algumas aberrações histopatológicas na parede do corpo, mudanças estas que foram rapidamente regeneradas, fato considerado uma adaptação para enfrentar os produtos químicos nocivos na formulação herbicida.

4.4 Alterações morfológicas

Apesar de algumas variáveis não terem se mostrado sensíveis ao Roundup Transorb R®, puderam-se observar alterações morfológicas em minhocas tratadas com o produto (Figura 6).

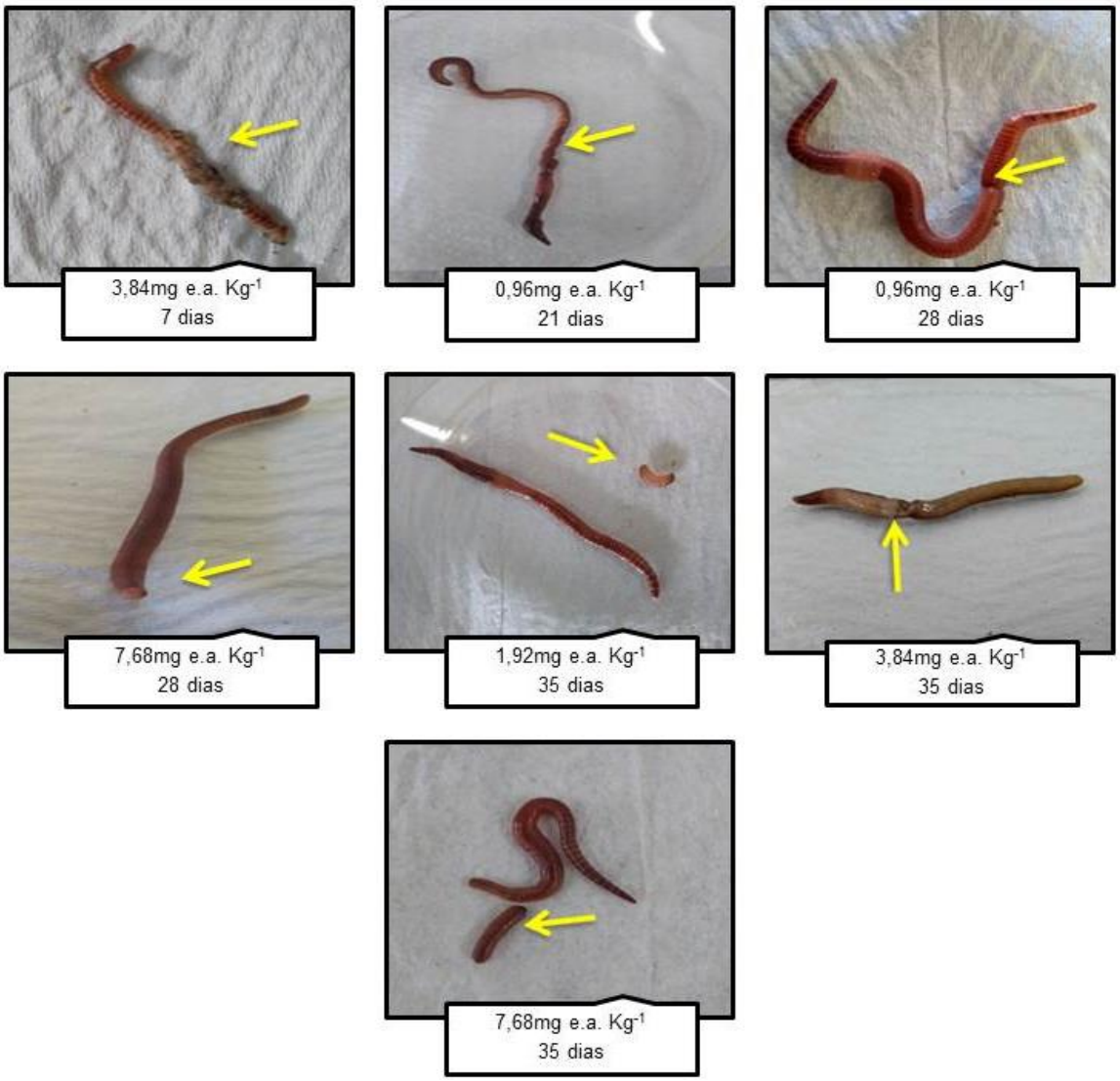

Figura 6- Alterações morfológicas de minhocas (setas amarelas) submetidas aos tratamentos com Roundup Transorb R - Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata, Pelotas, RS, Jul/2020 à Ago/2020.

Dentre as principais alterações, observaram-se perda de segmentos e necrose. Abbiramy *et al.* (2018) observaram lesões, inflamações e separação de partes posteriores do corpo de organismos da espécie *Eisenia fetida* tratadas com o inseticida Monocrotofós. Correia e Moreira (2010) também observaram anormalidades morfológicas em minhocas, porém somente na dose de 1000mg kg^{-1}

de solo, dentre elas: elevações no corpo, enrolamento e ondulação. A dose utilizada no trabalho de Correia e Moreira (2010) é extremamente elevada, no entanto a concentração do glifosato utilizada no estudo apresentava pureza de 99,7%, ou seja, os autores testaram o glifosato puro. Isso ressalta novamente a importância de estudos que utilizem formulações diferentes para compreendermos os verdadeiros agentes de toxicidade.

A maioria dos estudos utilizando as minhocas como bioindicadores, aplicaram doses superiores às utilizadas à campo. Utilizando o mesmo produto desde estudo, Zebral *et al*., (2017) evidenciaram que o mesmo, em doses de (0,36, 1,80, 3,62 e 5,43mg glifosato a.e L^{-1}), a redução de parâmetros craniofaciais em peixes, como o tamanho dos olhos destes organismos, induzida pelo herbicida.

4.5 Análise multivariada

A concentração de glifosato explicou 66,9% das variações observadas na biomassa média e na espessura média dos tecidos e da região do tiflosol das minhocas após 28 dias de exposição, sendo que o componente principal 1 explicou 37,5% e o componente principal 2 explicou 29,4% (Figura 7).

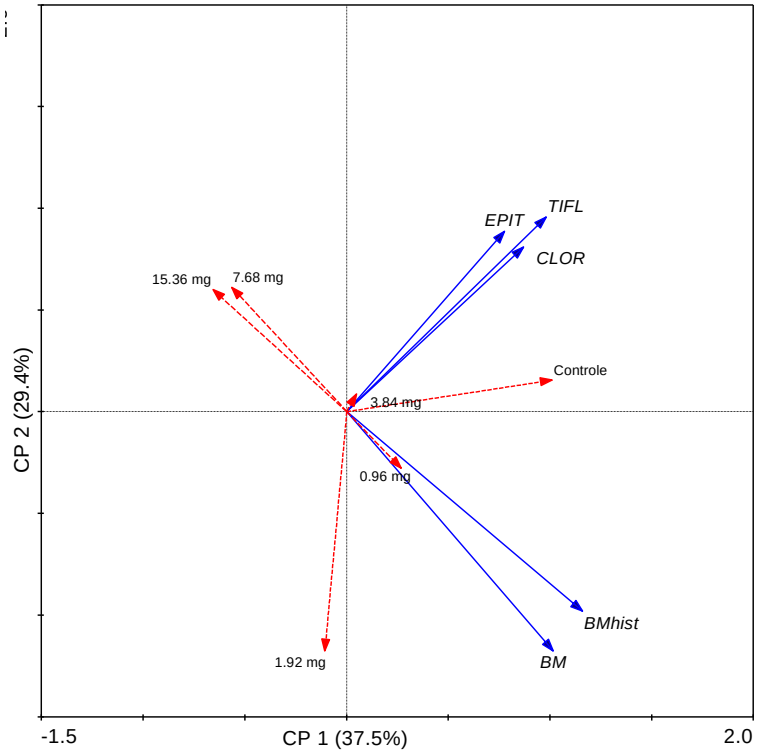

Figura 7 – Análise de componentes principais EPIT (Epitélio intestinal), TIFL (Tiflosol), CLOR (Tecido Clorgógeno), BM (Biomassa média das minhocas), BMhist (Biomassa das minhocas utilizadas para histologia). Embrapa Clima Temperado – Estação Experimental Cascata, Pelotas, RS, Jul/2020 à Ago/2020.

A biomassa média das minhocas amostradas em cada data de avaliação e a biomassa média das minhocas usadas na análise histológica foram bem correlacionadas entre si, indicando um bom processo de amostragem. Por outro lado, não houve correlação entre a biomassa das minhocas dissecadas e a espessura do epitélio, do tecido cloragógeno e da região do tiflosol.

Com relação à biomassa, as minhocas expostas às maiores concentrações do glifosato foram as que apresentaram os menores valores médios (exceto para

1,92mg que apresentou uma maior biomassa em relação aos outros tratamentos)(Figura 7).

Os tecidos analisados e a região do tiflosol mostraram estar forte e positivamente correlacionados entre si. As minhocas no controle foram as que tiveram a maior espessura média do epitélio, cloragógeno e tiflosol. As concentrações 0,96mg, 3,84mg, 7,68mg e 15,36mg tiveram valores próximos à média para os tecidos e a região do tiflosol, enquanto a concentração 1,92mg foi a que produziu menores espessuras nos tecidos das minhocas. Portanto, nem sempre as maiores doses produzem os maiores efeitos.

Ribeiro (2016) verificou que minhocas *E. andrei* tratadas com extrato pirolenhoso destilado tiveram alterações significativas na espessura do tecido epitelial intestinal em comparação com as do controle. No entanto para o extrato pirolenhoso bruto com doses de 1,54mL Kg^{-1} e 6,10mL $Kg^{-1,}$ a autora percebeu que a dose mais alta apresentou espessuras iguais as do controle, diferentemente da dose de 1,54mL Kg^{-1} que teve espessura superior do tecido. Em relação ao tecido cloragógeno, diferindo do presente estudo, o mesmo se mostrou mais espesso nas duas formulações do produto em relação ao controle.

Amaral *et al.* (2006) utilizando organismos de *Lumbricus terrestres* também observaram um aumento da espessura do tecido cloragógeno nos solos tratados com Zn e Cd, sugerindo que este tecido aumentou sua atividade para detoxificar substâncias exógenas. Para o tecido epitelial os autores observaram uma redução da espessura radial do epitélio intestinal.

Em relação ao tecido epitelial espera-se que os indivíduos expostos ao tratamento controle obtenham uma maior espessura, pois o intestino é o principal órgão de absorção de nutrientes, sendo que, o aumento de sua superfície está relacionado com sua atividade funcional, sendo a maior altura das vilosidades e o grande número de mitoses celulares no intestino, indicadores de que as funções das vilosidades intestinais estão ativas (MEKBUNGWAN; YAMAUCHI; SAKAIDA, 2004).

Quanto à redução de espessura do tecido cloragógeno nos organismos tratados com o glifosato, sugere-se que possa estar relacionada com a destruição de algumas células deste tecido, assim como foi constatado por Lourenço *et al*. (2011), onde *E. andrei* em solos contaminados com resíduos de uma mina de urânio abandonada, tornaram o tecido mais fino quando comparado ao tratamento controle, além de perderem sua forma com comprometimento da sua integridade estrutural.

Roubalová *et al.* (2018) apontam em seu estudo com dioxinas que o tecido cloragógeno foi preservado apenas na região do tiflosol, o que também foi evidenciado nesse estudo.

Niemeyer *et al*. (2018) sugerem que sejam ampliados os testes crônicos para verificar o comportamento a longo prazo das minhocas, visto que, em testes com 4 produtos à base de glifosato com doses de até 10 vezes às esperadas a entrar em contato com o solo, não ocorreram respostas significativas quanto ao evitamento (fuga) de *E. andrei.*

Além disso, é importante a realização de mais pesquisas abrangendo outras formulações e outros biomarcadores, como por exemplo: espermatozoides, para avaliar a reprodução mais especificamente (LOPES *et. al.*, 2014; RIBEIRO, 2016), análises sanguíneas, bioquímicas (enzimas), espécies reativas de oxigênio (MODESTO; MARTINEZ, 2010) entre outras.

5 Considerações Finais

Nas condições em que o experimento foi realizado, não foi possível verificar efeito estatístico do glifosato sobre a mortalidade e reprodução das minhocas. Contudo, esse fato não significa que não possa haver em outros contextos experimentais, sobretudo se utilizado um maior número de indivíduos e de unidades amostrais. Ressalta-se ainda que a estratégia metodológica de pesar semanalmente os indivíduos pode influenciar de forma significativa o desempenho reprodutivo das minhocas e por isso requer maiores estudos.

Quanto à biomassa, em termos relativos, também não houve evidências do efeito dos tratamentos sobre as minhocas. Porém, a retirada de semanal de indivíduos para as avaliações histológicas pode ter provocado um confundimento desses efeitos uma vez que a disponibilidade de alimento era aumentada para os indivíduos restantes. Não obstante, a análise dos valores absolutos da massa média individual indica uma tendência significativa de redução desse parâmetro com o aumento da concentração do glifosato, o que precisa ser mais bem averiguado em estudos futuros.

Não houve diferença estatística para a espessura dos tecidos epitelial intestinal e cloragógeno e da região do tiflosol nos diferentes tratamentos. Novamente, ressalta-se que a limitação prática de analisar um número maior de indivíduos pode ter sido determinante nesse quesito. Contudo, percebe-se uma clara tendência dessas variáveis apresentarem maiores valores na ausência do glifosato. Da mesma forma, alterações morfológicas no corpo das minhocas, como perda de segmentos e necroses, apenas foram observadas nos indivíduos expostos ao glifosato.

Tais constatações devem ser consideradas para novos e imprescindíveis estudos sobre o potencial de impacto ambiental do uso do glifosato. Nesse sentido recomenda-se a necessidade de nova estratégia de acompanhamento do experimento, com o aumento do número de indivíduos e unidade experimentais, bem como a inclusão de outras variáveis complementares, como a avaliação espermática das minhocas.

Referências

ABBIRAMY, S. K.; VINITHA, V.; SANGEETHA, G.; MONISHA, M. Monocrotophos, Its Toxic Effect (dermal) on *Eisenia fetida* (Savigny), **Toxicol. Environ. Health. Sci**. Vol. 10(5), 330-335, 2018.

ADEEL, M.; MA, C.; ULLAH, S.; RIZWAN, M.; HAO, Y.; CHEN, C.; JILANI, G.; SHAKOOR, N.; LI, M.; WANG, L.; TSANG, D. C. W.; RINKLEBE, J.; RUI, Y.; XING, B. Exposure to nickel oxide nanoparticles insinuates physiological, ultrastructural and oxidative damage: A life cycle study on *Eisenia fetida.* **Environmental Pollution**, n. 254, 2019.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA (2019). Regularização de produtos – Agrotóxicos, Glifosato. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/en/registros-eautorizacoes/agrotoxicos/produtos/monografia-de-agrotoxicos/autorizadas. Acesso em 28 nov 2019.

AGROFIT. Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 04 fev 2021.

AHMED, S. T. The impact of four pesticides on the earthworm *Lumbricus terrestris* (Annelida:Oligochaeta), **Zanco Journal of Pure and Applied Sciences**, v.27,n.6, 2015.

ALVES, E.; SOUZA, G. S.; MARRA, R. Êxodo e sua contribuição à urbanização de 1950 a 2010. **Revista de Política Agrícola**, Ano XX, n. 2, p. 80-88, Abr/Mai/Jun 2011.

AMARAL, A.; SOTO, M.; CUNHA, R; MARIGÓMEZ, I ; RODRIGUES, A. Bioavailability and cellular effects of metals on *Lumbricus terrestris* inhabiting volcanic soils. Environmental Pollution. n. 142 p. 103-108, 2006.

AMARANTE JÚNIOR, O. P.; SANTOS, T. C.R. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. Quim. Nova, vol. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.

ANELLI JR, Luis Carlos. **Efeitos de diferentes formulações do herbicida Roundup® sobre a função cardiorrespiratória de matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei, Characidae).** 2010. Tese (Doutorado emCiências Fisiológicas), Universidade Federal São Carlos, São Carlos, SP, 2010.

ASENSIO, V.; KILLE, P.; MORGAN, A. J.; SOTO, M.; MARIGOMEZ, I. Metallothionein expression and Neutral Red uptake as biomarkers of metal exposure

and effect in *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris* exposed to Cd. **European Journal of Soil Biology**. 43: p. 233–238, 2007.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. Norma Brasileira. Ecotoxicologia terrestre - **Ecotoxicidade aguda - Método de ensaio com minhocas**. ABNT NBR 15537: 2007. 11 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. Norma Brasileira. Ecotoxicologia terrestre - **Ecotoxicidade aguda – Método de ensaio com minhocas (Lumbricidae)**. ABNT NBR 15537: 2014. 13 p.

BABIĆ, S.; BARIŠIĆ, J.; MALEV, O.; KLOBUČAR, G.; TOPIĆ POPOVIĆ, N.; STRUNJAK-PEROVIĆ, I.; KRASNIĆI, N.; ČOŽ-RAKOVAC, R.; SAUERBORN KLOBUČAR, R. Sewage sludge toxicity assessment using earthworm *Eisenia fetida*: can biochemical and histopathological analysis provide fast and accurate insight?, **Environ Sci Pollut Res,** 2016.

BARJA, B. C.; SANTOS, M. A. Aminomethylphosphonic acid and glyphosate adsorption onto goethite: a comparative study. **Environ Sci Technol** n. 39, p. 585–592, 2005

BIANCHINNI, A.; MARTINS, S. E.; JORGE, M. B. O Modelo do Ligante Biótico e suas aplicações em Ecotoxicologia. 2009. Disponível em: < http://www.inct-ta.furg.br/english/difusao/BLMM.pdf>. Acesso em 23 nov 2017.

BLAKEMORE, R. J. Cosmopolitan earthworms: an eco-taxonomic guide to the peregrine species o f the World. Kippax: VermEcology, 2002.

BOMBARDI, Larissa Mias. **Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Europeia.** São Paulo: FFLCH - USP, 296 p, 2017.
BIANCHINNI, A.; MARTINS, S. E.; JORGE, M. B. O Modelo do Ligante Biótico e suas aplicações em Ecotoxicologia. 2009. Disponível em: <http://www.inct-ta.furg.br/english/difusao/BLMM.pdf>. Acesso em 23 nov 2017.

BRAGA, B. *et al*. O meio terrestre. In: **Introdução à engenharia ambiental**. São Paulo. Prentice Hall, 2002, cap. 9, p. 124-168.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. **A Química dos Agrotóxicos**. Química nova na escola, Vol. 34, N° 1, p. 10-15, 2012.

BRASIL. Decreto n° 1.946, de 28 de junho de 1996. Cria o Programa Nacional de Fortalecimento da Agricultura Familiar - PRONAF, e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/D1946.htm>. Acesso em: 23 set. 2017.

BRASIL. DECRETO Nº 4.074, DE 4 DE JANEIRO DE 2002. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a

inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm. Acesso em 2 fev 2021.

BRASIL. Decreto nº 7.794, de 20 de agosto de 2012. Institui a Política Nacional de Agroecologia e Produção Orgânica. Disponível em: http://www.agroecologia.gov.br/biblioteca/decreto-n%C2%BA-7794-de-20-de-agosto-de-2012. Acesso em 13 mar 2018.

BRASIL. Lei n. 7802. 11 jul.1989: **Lei dos agrotóxicos**. Brasília: IBAMA, 1990. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm. Acesso em: 15 mar 2017.

BRASIL. Lei 11.326, de 24 de julho de 2006. Estabelece as diretrizes para a formulação da Política Nacional da Agricultura Familiar e Empreendimentos Familiares Rurais. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2006/lei/l11326.htm. Acesso em: 08 nov 2017.

BRASIL Lei nº 12.512, de 14 de outubro de 2011. Institui o Programa de Apoio à Conservação Ambiental e o Programa de Fomento às Atividades Produtivas Rurais. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2011/lei/l12512.htm. Acesso em: 25 jan 2019.

BRASIL. Lei nº 10.696, de 02 de julho de 2003. Dispõe sobre a repactuação e o alongamento de dívidas oriundas de operações de crédito rural, e dá outras providências. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/2003/L10.696.htm. Acesso em: 29 out 2019.

BRASIL. (2019a). Ministério da Agricultura Pecuária e abastecimento MAPA. **Cadastro Nacional da Agricultura Familiar** (CAF). Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/agricultura-familiar/dap/cadastro-nacional-da-agricultura-familiar-caf. Publicado em 06/09/2019 12h23. Atualizado em 20/11/2019 10h12. Acesso em 06 jan 2021.

BRASIL. (2019b). Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento/Secretaria de Defesa Agropecuária/Departamento de Sanidade Vegetal e Insumos Agrícolas/Coordenação - Geral de Agrotóxicos e Afins. **ATO nº 58, de 27 de agosto de 2019.** Disponível em: https://www.in.gov.br/web/dou/-/ato-n-58-de-27-de-agosto-de-2019-213474289. Acesso em 21 dez, 2020.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Agrário. Instituto Nacional de Colonização e reforma Agrária (INCRA). **Novo retrato da agricultura familiar:** o Brasil redescoberto - Projeto de Cooperação Técnica. Brasília: INCRA/FAO, 2000. Disponível em: http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/AGRONOMIA_1271_1095426409.pdf. Acesso em: 25 ago 2018.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento Agrário. **Plano Safra da Agricultura Familiar 2012/2013.** Disponível em: < http://www.mda.gov.br/planosafra/arquivos/view/Cartilha_Plano_Safra.pdf>. Acesso em: 20 out. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada. **Resolução - RDC nº 441, de 2 de dezembro de 2020.** Dispõe sobre a manutenção do ingrediente ativo Glifosato em produtos agrotóxicos no País, determina medidas de mitigação de riscos à saúde e alterações no registro decorrentes da sua reavaliação toxicológica. Disponível em:<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-441-de-2-de-dezembro-de-2020-293190758>. Acesso em 20 dez 2020.

BRASIL. Projeto de Lei n° 4146, de 2019. Acrescenta dispositivos à Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, para introduzir conceitos relativos a produto novo, produto equivalente e avaliação de risco, e estabelecer procedimentos relativos à avaliação de risco, classificação e registro de produtos. Dsiponível em: <https://www25.senado.leg.br/web/atividade/materias/-/materia/137828>. Acesso em: 06 fev 2021.

BRITO, P. F.; GOMIDE, M.; CÂMARA, V. M. Agrotóxicos e saúde: realidade e desafios para mudança de práticas na agricultura, **Physis Revista de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, n. 19, v. 1, p. 207-225, 2009.

BROWN, G. G.; JAMES, S. W. Ecologia, biodiversidade e biogeografia das minhocas no Brasil. *In*: BROWN, G.G.; FRAGOSO, C. **Minhocas na América Latina:** Biodiversidade e ecologia. Londrina: Embrapa Soja, 2007. 545 p.

BUCH, A. C.; SAUTER. K. D. ; BROWN G.G. **Minhocas nativas em testes ecotoxicológicos**. In: 4º Encontro Latino-Americano de Ecologia e Taxonomia de Oligoquetas. Curitiba, Brasil, 2010.

BUCH, A.C., BROWN, G.G., NIVA, C.C., SAUTTER, K.D., SOUSA, J.P. Toxicity of three pesticides commonly used in Brazil to Pontoscolex corethrurus (Muller, 1857) and *Eisenia andrei* (Bouch_e 1972). **Appl. Soil Ecol**. N. 69, p. 32-38, 2013.

CASABÉ, N.; PIOLA, L.; FUCHS, J.; ONETO, M.L.; PAMPARATO, L.; BASACK , S.; GIMÉNEZ, R.; MASSARO, R.; PAPA, J. C.; KESTEN, E. Ecotoxicological Assessment of the Effects of Glyphosate and Chlorpyrifos in an Argentine Soya **Field. J Soils Sediments**, 2007. DOI: http://dx.doi.org/10.1065/ jss2007.04.224

CASTELLANOS, L. R.; HERNANDEZ, J. C. A. Earthworm biomarkers of pesticide contamination: Current status and perspectives. **Journal of Pesticide Science**. n. 32, p. 360–371, 2007.

CENTRO DE APOIO E PROMOÇÃO DA AGROECOLOGIA (CAPA). Disponível em: < http://www.capa.org.br/page/atuacao-pelotas/>. Acesso em 19 out. 2017.

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

CORREIA, F. V.; MOREIRA, J. C.; NASCIMENTO, C. A.; BARRETO, E. O. Glifosato, superplantas e subminhocas. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, Aquidabã, v.6, n.1, Dez 2014, Jan, Fev, Mar, Abr, Mai 2015.

CORTET, J.; JÉRÔME, C.; VAUFLERY, A. G.-D.; NICOLE, P.-B.; LUCIEN, G.; CHRISTINE, T.; DANIEL, C. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. **European journal of soil biology**, v. 35, n. 3, p. 115–134, 1999.

DE SILVA, S. M. S.; CHANDRASEKARA, W.U. Is the Widely Used Weedicide Glyphosate that Bad? Toxic Effects of Glyphosate on the Earthworm *Perionyx excavatus* (Perrier, 1872), International Forestry and Environment Symposium Department of Forestry and Environmental Science, University of Sri Jayewardenepura, Sri Lanka, 2016.

DOMÍNGUEZ, A.; BROWN, G. G.; SAUTTER, K. D.; OLIVEIRA, C. M. R.; VASCONCELOS, E.C.; NIVA, C. C.; BARTZ, M. L. C.; BEDANO, J. C. Toxicity of AMPA to the earthworm *Eisenia andrei* Bouché, 1972 in tropical artificial soil, **Scientific Reports** 6:19731, 2016. DOI: 10.1038/srep19731

DOMÍNGUEZ J, PÉREZ-LOSADA M. *Eisenia fétida* (Savigny, 1826) y *Eisenia andrei* Bouché, 1972 son dos especies diferentes de lombrices de tierra. **Acta Zoológica Mexicana***,* 2:321–331, 2010.

DÖRR, F. Efeito do herbicida glifosato sobre o crescimento e produção de metabólitos secundários em *Mycrocystis auruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii*. 2015. Tese (Doutorado em Toxicologia e Análises toxicológicas) Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2015.

ESPINOZA-NAVARRO, O.; PONCE-LAROSA, C.; BUSTOS-OBREGÓN, E. Organophosphorous pesticides: Their effects on biosentinel species and humans. Control and application in Chile. **Int. J. Morphol.,** n. 35, v. 3, p. 1069-1074, 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. ResourceSTAT: Pesticides Consumption, 2009. Genebra, FAO, 2011. Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/424/default.aspx>. Acesso em: 21 Set. 2017.

FOUNTAIN, M. T.; HOPKIN, S. P. Folsomia candida (Collembola): a “standard” soil arthropod. **Annual review of entomology**, v. 50, p. 201–222, 2005.

GARCIA, M. Effects of pesticides on soil fauna: development of ecotoxicological test methods for tropical regions. 2004. 291 f. Tese (Doutorado) – Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät, Universidade de Bonn. Bonn.

GARCÍA-PÉREZ, J. A., ALARCÓN, E., HERNÁNDEZ, Y., HERNÁNDEZ, C. Impact of litter contaminated with glyphosate-based herbicide on the performance of *Pontoscolex corethrurus*, soil phosphatase activities and soil pH. **Applied Soil Ecology**, 104, 31–41, 2016. doi:10.1016/j.apsoil.2016.03.007

GILL, J. P. K. *et al.* Glyphosate toxicity for animals. **Environmental Chemistry Letters**, *[S. l.]*, v. 16, n. 2, p. 401–426, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1007/s10311-017-0689-0

GIOVANETTI, A.; FESENKO, S.; COZZELLA, M. L.; ASENCIO, L. D.; SANSONE, U. Bioaccumulation and biological effects in the earthworm *Eisenia fetida* exposed to natural and depleted uranium. **Journal of environmental radioactivity**, v. 101, n. 6, p. 509–516, jun. 2010.

GOBI, M.; GUNASEKARAN, P. Effect of Butachlor Herbicide on Earthworm *Eisenia fetida*—Its Histological Perspicuity, **Applied and Environmental Soil Science,** v. 2010, 2010.

GRISA, C. As políticas públicas para a agricultura familiar no Brasil: um ensaio a partir da abordagem cognitiva. Desenvolvimento em Debate, v.1, n.2, p.83-109, janeiro–abril e maio–agosto 2010.

GROENIGEN, J. W. V. LUBBERS, I. M.; VOS, H. M. J., BROWN, G. G.; DEYN, G. B.; GROENIGEN, K. J. V. Earthworms increase plant production: a meta-analysis. **Scientific reports**, n.4, 2014.

HOWE, C.M., BERRILL, M., PAULI, D.B., HELBING, C.C., WERR, K., VELDHOEN, N. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. **Environ. Toxicol. Chem**.n. 23, p.1928–1938, 2004.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE – IBAMA. Relatórios de comercialização de agrotóxicos. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacaodeagrotoxicos#boletinsanuais>. Acesso em: nov. 2020.

INTERNACIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO/FDIS 17512-1:2007: Soil quality – Avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemicals on behaviour – Part 1: Test with earthworms (*Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*), Geneva, 2007.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO 11268-1. Soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using soil substrate. Genebra: ISO. 1993.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION.ISO 11268-2. Soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction. Genebra: ISO. 2012.

KILIÇ¸ G. A .Histopathological and biochemical alterations of the earthworm (*Lumbricus terrestris*) as biomarker of soil pollution along Porsuk River Basin (Turkey). **Chemosphere**, n. 83, p.1175–1180, 2011.

KUMAR, S.; SINGH, S. M. Histopathological changes in two earthworm species after o, o-diethyl s-(ethylthio) methyl phasphoroditl toxicity. **International Journal of Science and Technology**, v. 6, n 5, p. 2898 – 2906, 2017.

LANDAU, E. C., & MARTINS, J. L. A. Variação geográfica do uso de agrotóxicos e afins. Dinâmica Da Produção Agropecuária e Da Paisagem Natural No Brasil Nas Últimas Décadas: Cenário Histórico, Divisão Política, Características Demográficas, Socioeconômicas e Ambientais, 2020.

LAVELLE, P.; BARROS, E.; BLANCHART, E.; BROWN, G. G.; DESJARDINS, T.; MARIANI, L.; ROSSI, J. P. SOM management in the tropics: why feeding the soil macrofauna? **Nutrient Cycling in Agroeco-systems**, n.61, p. 53-61, 2001.

LIMA, A. C. R.; BRUSSAARD, L. Earthworms as soil quality indicators: local and scientific knowledge in rice management systems. **Acta Zoológica Mexicana**, 26, Número especial 2, p. 109-116, 2010.

LIMA, C.A. **Avaliação de risco ambiental como ferramenta para o descomissionamento de uma indústria de metalurgia de zinco.** 2009. 238f. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

LOPES, F. M., VARELA JUNIOR A. S., CORCINI, C. D., SILVA, A. C., GUAZZELLI, V. G., TAVARES, G., ROSA, C. E. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. **Aquat. Toxicol.** 155: 322 – 326p, 2014.

LOURENÇO, J.; SILVA, A.; CARVALHO, F.; OLIVEIRA, J.; MALTA, M.; MENDO, S.; GONÇALVES, F.; PEREIRA, R. Histopathological changes in the earthworm *Eisenia andrei* associated with the exposure to metals and radionuclides. **Chemosphere**, v. 85, n. 10, p. 1630–1634, nov. 2011.

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.(Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária). Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2016.

MEKBUNGWAN, A.; YAMAUCHI, K.; SAKAIDA, T. Intestinal Villus Histological Alterations in Piglets fed Dietary Charcoal Powder Including Wood Vinegar Compound Liquid. Journal of Veterinary **Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia**, n.33, v. 1, p. 11–16, 2004. https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.2004.00501.x

MENDES, K. F., SOUSA, R. N., & LAUBE, A. F. S. Current Approaches to Pesticide Use and Glyphosate-Resistant Weeds in Brazilian Agriculture. Multifunctionality and Impacts of Organic and Conventional Agriculture, March, 2020. https://doi.org/10.5772/intechopen.91872

MODESTO,K. A.; MARTINEZ, C. B.R. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity, **Chemosphere**, n. 81, p. 781–787, 2010.

MOHSSEN, M. Histochemical and histopathological study of the intestine of the earthworm *Pheretima enlongate* to a field dose of the herbicide glyphosate. **The Environmentalist**, v. 20, p. 105 – 111, 2000.

MORGAN, A. J.; JOHN MORGAN, A.; TURNER, M. P.; MORGAN, J. E. Morphological plasticity in metal-sequestering earthworm chloragocytes: Morphometric electron microscopy provides a biomarker of exposure in field populations. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**, v. 21, n. 3, p. 610–618, 2002.

NAVARRO, Z. **A agricultura familiar no Brasil:** entre a política e as transformações da vida econômica. In: GASQUEZ, J.G.; VIEIRA FILHO, J.E.R.; NAVARRO, Z. **A agricultura brasileira:** desempenho, desafios e perspectivas. Brasília: IPEA, p.185-209, 2010.

NIEMEYER, J. C.; DE SANTO, F. B.; GUERRA, N.; RICARDO FILHO, A. M.; PECH, T. M. 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. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.127

NIEMEYER, J. C.; VILAÇA, D.; SILVA, E. M. Ensaio na Biomassa de *Cubaris murina* Brandt (Crustacea: Isopoda) Expostos ao solo com glifosato em laboratório. **Revista JBSE**, Rio Grande do Sul, vol. 1, n. 1, jan. 2006.

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

NODARI, R. O.; HESS, S. C. Campeão de vendas, cientificamente o Glifosato é um agrotóxico perigoso. Extensio: **Revista Eletrônica de Extensão**, 17(35), 2–18, 2020. https://doi.org/10.5007/1807-0221.2020v17n35p2

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT.OECD Nº 207. Earthworm, Acute Toxicity Tests. 1984. 9p.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. OECD Nº 222. Guideline for the testing of chemicals. Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida/ Eisenia andrei*). 2004. 18p.

PASINI, R. A.;, GRÜTZMACHER, A. D.; SPAGNOL, D.; ZANTEDESCHI, R.; FRIEDRICH, F. F. Persistência de herbicidas dessecantes aplicados em milho transgênico sobre *Trichogramma pretiosum* Riley, 1879 (Hymenoptera: Trichogrammatidae, **Revista Ciência Agronômica**, v. 48, n. 1, p. 175-181, jan-mar, 2017.

PASQUALOTTO, N.; KAUFMANN, M. P.; WIZNIEWSKY, J. G**. Agricultura familiar e desenvolvimento rural sustentável**. – 1. ed. – Santa Maria, RS: UFSM, NTE, 2019. 1 e-book

PIOLA, L., FUCHS, J., ONETO, M. L., BASACK, S., KESTEN, E., & CASABÉ, N. Comparative toxicity of two glyphosate-based formulations to *Eisenia andrei* under laboratory conditions. **Chemosphere**, 91(4), 545–551, 2013. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.12.036

POCHRON, S., CHOUDHURY, M., GOMEZ, R., HUSSAINI, S., ILLUZZI, K., MANN, M., MEZIC, M., NIKAKIS, J., TUCKER, C. Temperature and body mass drive earthworm (*Eisenia fetida*) sensitivity to a popular glyphosate-based herbicide. **Applied Soil Ecology**, 139(March), 32–39, 2019. https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.03.015

POCHRON, S., SIMON, L., MIRZA, A., LITTLETON, A., SAHEBZADA, F., YUDELL, M. Glyphosate but not Roundup® harms earthworms (*Eisenia fetida*). **Chemosphere,** *241*, 125017, 2020. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125017

PONGE, J. F.; PÉRÈS, G.; GUERNION, M.; CAMACHO, N. R.; CORTET, J.; PERNIN, C.; VILLENAVE, C.; CHAUSSOD, R.; LAURENT, F. M.; BISPO, A.; CLUZEAU, D. The impact of agricultural practices on soil biota: A regional study. **Soil Biology & Biochemistry**, n. 67, p. 271-284, 2013.

RIBEIRO, Louise Vargas. **Contribuição ao estudo do extrato pirolenhoso no ambiente: ecotoxicologia, histopalogia e análise de parâmetros espermáticos em *Eisenia andrei*.** 2016. Dissertação (Mestrado em Sistemas de Produção Agrícola Familiar) Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

RODRIGUES, Beatriz, Kawamura. **Avaliação dos impactos de agrotóxicos na região do Alto Mogi-Guaçu (MG) por meio de ensaios laboratoriais com *Danio rerio* (Cypriniformes, Cyprinidae)**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) Escola de Engenharia de São Carlos, SP, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2007.

ROUBALOVÁ, R.; DVOŘÁK, J.; PROCHÁZKOVÁ, P.; ŠKANTA, F.; NATIVIDADA, I. N. P.; SEMERÁDA, J.; CAJTHAML, T.; BILEJ, M. The role of CuZn- and Mn-superoxide dismutases in earthworm *Eisenia andrei* kept in two distinct field-contaminated soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 159, p. 363–371, 2018.

SANTOS, M. J .G.; SOARES, A. M. V. M.; LOUREIRO, S. Joint effects of three plant protection products to the terrestrial isopod *Porcellionides pruinosus* and the collembolan *Folsomia candida*. **Chemosphere** n. 80, p. 1021-1030, 2010

SILVA, M. A. **Alterações nas propriedades químicas de solos tratados com diferentes doses do herbicida glifosato**. (TCC-Trabalho de Conclusão de Curso). Curso Superior de Engenharia Ambiental. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Londrina, 2013.

SILVA, J. R.; JESUS, P. **Os desafios do novo rural e as perspectivas da agricultura familiar no Brasil.** Disponível em: <http://connepi.ifal.edu.br/ocs/index.php/connepi/CONNEPI2010/paper/viewFile/1407/457>. Acesso em 16 Ago. 2017.

SISINNO, C. L. S.; BULUS, M. R. M.; RIZZO, A. C.; MOREIRA, J. C. Ensaio de Comportamento com Minhocas (*Eisenia fetida*) para Avaliação de Áreas Contaminadas: Resultados Preliminares para Contaminação por Hidrocarbonetos. **J. Braz. Soc. Ecotoxicol**., v. 1, n. 2, p . 137-140, 2006.

STELLIN, F.; GAVINELLI, F.; STEVANATO, P.; CONCHERI, G.; SQUARTINI, A.; PAOLETTI, M. G. Effects of different concentrations of glyphosate (Roundup 360®) on earthworms (*Octodrilus complanatus, Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea caliginosa*) in vineyards in the North-East of Italy, **Applied Soil Ecology**, 2017.

ŚWIĄTEK, Z. M.; WOŹNICKA, O.; BEDNARSKA, A. J. Unravelling the ZnO-NPs mechanistic pathway: Cellular changes and altered morphology in the gastrointestinal tract of the earthworm *Eisenia andrei*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, *[S. l.]*, v. 196, n. March, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110532

TER BRAAK, C.J.F.; ŠMILLAUER, P. CANOCO Reference Manual and CanoDraw for Windows User's Guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Ithaca, NY: Microcomputer Power; 2002. 500 p.

VALARINI, P. J. et al. Dinâmica e efeitos de agrotóxicos no meio ambiente. In: FREIRE, F. C. O.; CARDOSO, J. E.; VIANA, F. M. P. (Ed.). **Doenças em fruteiras tropicais de interesse agroindustrial**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003. p. 625-687.

WANG, Y.; CHEN, C.; QIAN, Y.; ZHAO, X.; WANG, Q. Ternary toxicological interactions of insecticides, herbicides, and a heavy metal on the earthworm *Eisenia fetida*. **Journal of Hazardous Materials**, *[S. l.]*, v. 284, p. 233–240, 2015. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.11.017

YASMIN, S.; D'SOUZA, D. Effect of pesticides on the reproductive output of *Eisenia fetida*. Bulletin of Environmental **Contamination and Toxicology**, 79(5), 529–532, 2007. https://doi.org/10.1007/s00128-007-9269-5

ZEBRAL, Y. D. et al. Effects of a glyphosate-based herbicide in pejerrey *Odontesthes humensis* embryonic development. Chemosphere, [S. l.], v. 185, p. 860–867, 2017. Disponível em: https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.07.069

ZHENG, K., LIU, Z., LI, Y., CUI, Y., & LI, M. Toxicological responses of earthworm (*Eisenia fetida*) exposed to metal-contaminated soils. **Environmental Science and Pollution Research**, 20(12), 8382–8390, 2013. https://doi.org/10.1007/s11356-013-1689-7

ZIBETTI**,** Volnei Knopp. **Produção e qualidade biológica de húmus de minhoca para uso na supressão de *Sclerotium rolfsii* Sacc**. 2013. Dissertação (Mestrado em Sistemas de Produção Agrícola Familiar) Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.