

Evento: XXV Seminário de Iniciação Científica

EFEITO DO GLIFOSATO NO CRESCIMENTO DE OLIGOQUETAS: UMA ANÁLISE DE PARÂMETROS BIOMÉTRICOS SECUNDÁRIOS¹
EFFECT OF GLYPHOSATE ON GROWTH OF OLIGOCHAETES: AN ANALYSIS OF SECONDARY BIOMETRIC PARAMETERS

Geovane Barbosa Dos Santos², Diovana Gelati De Batista³, Henrique Ribeiro Müller⁴, Thiago Gomes Heck⁵, Paulo Ivo Homem De Bittencourt Jr.⁶, Antônio Azambuja Miragem⁷

¹ Pesquisa Institucional desenvolvida no Departamento de Ciências Biológicas, do Instituto Federal Farroupilha campus Santa Rosa, pertencente ao Grupo de Pesquisa em Resposta Celular ao Estresse (GPreCE).

² Aluno do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Farroupilha (IFFAR) campus Santa Rosa, bolsista PROBIC/IFFAR, bgeovane.2011@gmail.com.

³ Aluna do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Farroupilha (IFFAR) campus Santa Rosa, bolsista PROBIC/FAPERGS, diovana.g.debatista@hotmail.com.br.

⁴ Aluno do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Farroupilha (IFFAR) campus Santa Rosa, bolsista PROBIC/CNPQ, hribeiomuller@gmail.com.

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

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

⁷ Professor Doutor do Departamento de Ciências Biológicas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Farroupilha (IFFAR) campus Santa Rosa, Orientador, antonio.miragem@iffarroupilha.edu.br

INTRODUÇÃO

Com o crescimento da população mundial [ONU, 2013], houve um aumento, em grande escala, da produção de alimentos agrícolas e, conseqüentemente da necessidade da aplicação de *defensivos* [Duke, 2014]. Dentre os agroquímicos, o herbicida glifosato é um dos mais utilizados no mundo [Benbrook, 2016], a sua ação não seletiva faz com que organismos não alvos sejam afetados, como, por exemplo, as minhocas [Zeller *et al.*, 2014].

As minhocas possuem uma grande importância no solo, já que estimulam a atividade microbiana, facilitando a ciclagem dos nutrientes; misturam e agregam partículas do solo; aumentam a porosidade do solo à medida que se movimentam no meio; melhoram a capacidade de retenção de água do solo; fornecem canais para o crescimento das raízes, e ainda enterram e trituram resíduos de plantas [Tugel *et al.*, 2000]. Devido ao grande espectro de funções que realizam, estes animais são considerados “engenheiros do ecossistema” [Lavelle *et al.*, 2006].

Contudo, é evidente a importância ecológica destes animais, bem como sua posição fundamental

Evento: XXV Seminário de Iniciação Científica

no sistema trófico terrestre, e considerando que apresentam a capacidade de bioacumularem os resíduos tóxicos provenientes das aplicações agrícolas, desencadeando processos de *biomagnificação* ao longo da cadeia trófica. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar a influência do glifosato no desenvolvimento de *oligoquetas*, a partir dos parâmetros biométricos primários: peso, comprimento e área superficial, e estabelecer a correlação entre estas variáveis.

METODOLOGIA

Participaram do presente estudo oligoquetas adultas, com clitelo aparente, da espécie *Eisenia andrei* [Dominguez e Edwards, 2011]. Durante os experimentos, os animais foram mantidos em potes plásticos, denominados unidades experimentais (U.E.), revestidos com papel pardo para impedir a passagem de luz. Foi preparado um composto (*habitat* experimental) contendo 950 g de solo puro (95 %) e 50 g de erva-mate (5 %), que serviu de matéria orgânica vegetal, base de alimento para os animais (composto com as mesmas concentrações que a colônia permanente). Levando em consideração as condições favoráveis para o desenvolvimento e reprodução das oligoquetas, o teor de umidade foi regulado, semanalmente, para 60% [Edwards, 1995].

Os grupos experimentais foram divididos em 3 tratamentos diferentes, sendo eles: **controle (CTRL)**, somente composto, igual ao da colônia permanente, sem contaminação; **grupo glifosato (GLY)**, contaminado com Glifosato Nortox NA®, Nortox S/A, PR, Brasil a uma concentração de 3L/ha; **grupo superglifosato (SGLY)**, contaminado com Glifosato Nortox NA®, Nortox S/A, PR, Basil a uma concentração de 10 L/ha. Os efeitos da contaminação com glifosato foram analisados em dois períodos de exposição diferentes: 7 e 14 dias, sendo que em cada U.E., foram colocados 5 organismos. O software Microsoft® Excel 2013 foi utilizado para distribuir aleatoriamente estes animais, de modo que a massa média dos animais de cada grupo fosse aproximada.

Após o período de exposição, os animais foram coletados e imediatamente pesados em balança analítica (AS 220/C/2) e fotografados com câmera digital (Gran Prime SM-G531H, 13 Megapixels). A pesagem dos animais foi realizada para possibilitar a comparação *pré-* e *pós-*tratamento, bem como os registros fotográficos foram utilizados para cálculo do comprimento e área superficial dos animais, esta última variável sendo realizada apenas após eutanásia dos indivíduos. Para a fotografia, os animais foram colocados sobre uma malha quadriculada 1 cm x 1 cm e a câmera sobre um suporte a uma altura fixa de 30 cm da malha. Para a eutanásia utilizou-se solução resfriada (-5 °C) de Álcool 70%, 1:1 com água destilada.

Depois de sofrerem a eutanásia e terem passado pelos procedimentos de fotografia e pesagem, os animais foram dissecados, com corte longitudinal, e prensados com uma placa de vidro, processo que se denominou "sanduíche", com o intuito de verificar a área superficial dos mesmos. Para esse procedimento utilizou-se uma tesoura cirúrgica, bisturi, pinça dente de rato e duas placas de vidros 10 cm x 15 cm. Para realizar a medição da área superficial e comprimento utilizou-se o software Autodesk AutoCAD® 2013, conforme protocolo padronizado para este estudo.

Os resultados foram submetidos a Análise de Variância (ANOVA) para erros do tipo I, após teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Quando ANOVA (uma via) detectou diferença entre os grupos, e onde o valor de P foi menor que 0.05, a diferença estatística foi identificada através do procedimento de comparação múltipla com o Teste de Múltiplas Comparações de Tukey-Kramer. Para a comparação de efeitos *pré* e *pós*-tratamento, ANOVA foi seguido do teste de Dunnett para múltiplas comparações. A frequência e a ocorrência para os casulos e animais juvenis foram checados com o Teste Exato de Fischer. Os resultados foram expressos em média e erro padrão.

Evento: XXV Seminário de Iniciação Científica

Os dados foram tabulados e analisados no software GraphPad 3.0 para Windows.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados a seguir demonstram a influência do glifosato na taxa de crescimento, massa corporal e área superficial em oligoquetas de forma secundária. Ao realizarmos o cálculo do Coeficiente de Correlação de *Pearson* (R), para determinar a força de correlação biométrica das *oligoquetas*, verificamos que, ao longo de 14 dias, os coeficientes calculados, apresentaram forte correlação ($R > 0.71$) para ambos os grupos, quando os momentos de coleta da medida biométrica estavam cronologicamente pareados, ou seja, se foram correlacionados os valores antes da exposição ao glifosato ou ambos correlacionados após o tratamento com glifosato. Quando comparados os dados *pré*-tratamento e os *pós*-tratamento, os animais do grupo GLY *sempre* apresentaram correlações fracas ($R < 0.40$), conforme apresentados no Quadro 1. Uma vez que Jiménez *et al.* (2000) demonstraram que, para todas as espécies por eles testadas, tanto sul-americanas e quanto europeias, apresentam forte correlação entre o peso e a medida do diâmetro *pré*-clitelar, o que corrobora com nossos achados e reforça a afirmação da existência de relação entre as medidas corporais, independente da região do planeta. Correia e Moreira (2010) verificaram que alguns animais saíram com constrictões cutâneas, inchaços na parte clitelar e excesso de muco, o que pode ter influenciado diretamente nas relações biométricas desses animais, garantindo que as mesmas fossem enfraquecidas.

Quadro 1. Valores do Coeficiente de Correlação de Pearson entre as variáveis experimentais em diferentes pontos temporais, em relação ao período de incubação nas U.E. para os grupos CTRL e GLY.

Variáveis	Grupos	
	CTRL	GLY
C x M (pré)	0,9761	0,82133
C x M (pós)	0,93085	0,99917
M (pós) x M (pré)	0,99285	-0,2279
C (pós) x C (pré)	0,89001	0,33915
A ² x M (pré)	0,99901	-0,2581
A ² x M (pós)	0,98654	0,99951
A ² x C (pré)	0,96545	0,33315
A ² x C (pós)	0,97807	0,99741

C=comprimento; M= massa; A²= Área Superficial

No experimento com duração de 7 dias, avaliado pela comparação entre as médias *pré*- e *pós*-tratamento em todos os grupos, verificamos que não houve diferenças na massa corporal ($P = 0,4412$), comprimento ($P = 0,4173$) e área superficial ($P = 0,7639$) dos animais expostos (Tabela 2). Ademais, analisamos também estas mesmas variáveis (massa, comprimento e área superficial)

Evento: XXV Seminário de Iniciação Científica

em animais dos grupos CTRL e GLY, expostos durante 14 dias a estes tratamentos. Do mesmo modo, não foram encontradas diferenças entre as médias de massa ($P=0,1084$), comprimento ($P=0,1378$) e área superficial ($P=0,1209$) dos organismos (Tabela 2). Salvio *et al.* (2016) verificaram que o herbicida glifosato não alterou a biomassa de oligoquetas da espécie *Octalasion cyaneum*. Não foram encontradas diferenças significativas na massa de minhocas submetidas a diferentes concentrações do herbicida glifosato [Buch, 2013]. Santadino, Coviela e Momo (2014), constataram que oligoquetas *Eisenia andrei*, expostas aos tratamentos agudo e crônico com glifosato, apresentaram uma taxa negativa em seu crescimento, enquanto que os grupos não submetidos a nenhum contaminante apresentaram taxas positivas de crescimento. D'Souza (2007) verificou que os herbicidas carbendazim, dimeotato e glifosato reduziram o crescimento e reprodução de minhocas da espécie *Eisenia foetida*.

Tabela 2: Dados biométricos, animais submetidos a 7 e 14 dias de exposição nas concentrações de 0L/Ha (CTRL) 3L/Ha (GLY) e 10L/Ha (SGLY):

Variável	7 dias			Valor P	14 dias		Valor P
	CTRL	GLY	SGLY		CTRL	GLY	
MASSA (g)							
Pré-exposição	0,248 ± 0,013	0,255 ± 0,013	0,269 ± 0,015	0,5743	0,244 ± 0,029	0,236 ± 0,002	0,8063
Pós-exposição	0,243 ± 0,006	0,220 ± 0,012	0,255 ± 0,034	0,4401	0,364 ± 0,067	0,283 ± 0,023	0,3723
Valor P ¹	0,5886	0,0294*	0,7708		0,6204	0,1919	
COMPRIMENTO (cm)							
Pré-exposição	5,313 ± 0,223	5,187 ± 0,138	4,955 ± 0,182	0,4473	6,077 ± 0,638	5,527 ± 0,130	0,4872
Pós-exposição	5,279 ± 0,181	4,785 ± 0,126	5,455 ± 0,498	0,2598	7,279 ± 0,754	6,405 ± 0,359	0,4051
Valor P ¹	0,9146	0,0852	0,3321		0,9125	0,1167	
ÁREA (cm²)	5,383 ± 0,242	5,205 ± 0,249	5,595 ± 1,263	0,7641	6,870 ± 0,195	6,565 ± 0,217	0,3735

Os dados estão apresentados em Média ± E.P. Grupo controle (CTRL) n= 7; glifosato (GLY) n=7; superglifosato (SGLY) n=5. O valor de P apresenta o nível de significância entre valores dos diferentes tratamentos, por ANOVA (one way) seguido de Dunnett. Já o Valor P¹ apresenta o nível de significância entre os períodos de exposição, para cada grupo de tratamento, aplicado o Teste T Pareado. *P<0,05.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Concluimos que, mesmo sem apresentar alterações biométricas primárias na massa, comprimento e área superficial dos animais, ao longo dos 14 dias de exposição, os animais submetidos ao herbicida à base de glifosato perderam suas correlações corporais, sugerindo fortemente que esse agroquímico provoque alterações metabólicas imperceptíveis por medidas diretas. Estes problemas metabólicos induzidos por glifosato provavelmente desenvolvem, nos vermes, reações como a perda de atividades enzimáticas, aumento do stress celular e apoptose, reduzindo suas capacidades vitais, prejudicando, ao longo do tempo o seu desenvolvimento. Por isso, são necessárias novas avaliações, sob a ótica de marcadores de estresse celular para confirmarmos nossas novas hipóteses.

Evento: XXV Seminário de Iniciação Científica

Palavras-chaves: minhoca; fauna edáfica; agrotóxico; pesticida; ecotoxicologia.

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

AGRADECIMENTOS

À FAPERGS e CNPq pelo apoio financeiro e ao Instituto Federal Farroupilha pelo financiamento e infraestrutura para realização dos experimentos.

REFERÊNCIAS

- BENBROOK, C. M. Trends in Glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environmental Sciences**. v. 28, n. 3, 2016.
- BUCH, A.C. *et al.* Toxicity of three pesticides commonly used in Brazil to *Pontoscotlex corethrurus* [Müller, 1857] and *Eisenia andrei* [Bouché, 1972]. **Applied Soil Ecology**. V. 69, p.32- 38, 2013.
- CORREIA, F. V.; MOREIRA, J. C. Effects of Glyphosate and 2,4-D on Earthworms (*Eisenia foetida*) in Laboratory Tests. **Bull Environ Contam Toxicol**. V.85, p, 264-268. 2010.
- DOMÍNGUEZ, J.; EDWARDS, C. A. Biology and ecology of earthworm species used for vermicomposting. In: Edwards, C. A. et al. (Ed.) **Vermiculture technology**. Boca Raton: CRC Press, p. 27-40, 2011.
- DUKE, SO. Perspectives on transgenic, herbicide-resistant crops in the United States almost 20 years after introduction. **Pest Manag Sci**. V.71, n.5, p. 652-7, 2014.
- D'SOUZA D; YASMIN S. "Effect of pesticides on the reproductive output of *Eisenia fetida*". **Bull Environ Contam Toxicol**, vol.79, n. 5, p.529-532, 2007.
- EDWARDS, C. A. Historical overview of vermicomposting. **BioCycle**, 36, 6: 56. 1995.
- JIMÉNEZ, J.J. *et al.* Biometric relationships in earthworms (Oligochaeta). **Eur J Soil Biol**. V.36, p. 45-50, 2016.
- LAVELLE, P. *et al.* Soil invertebrates and ecosystem services. **Eur J Soil Biol**. V. 42, n. 1, p. 3-15, 2006.
- ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS (2013). **Relatório** - Perspectivas da População Mundial: Revisão de 2012. Disponível em: Acesso em: Maio/2017.
- SALVIO, C. *et al.* Survival, Reproduction, Avoidance Behavior and Oxidative Stress Biomarkers in the Earthworm *Octolasion cyaneum* Exposed to Glyphosate. **Bull Environ Contam Toxicol**. V.96, p.314-319, 2016.
- SANTADINO, M.; COVIELLA, C.; MOMO, F. Glyphosate Sublethal Effects on the Population Dynamics of the Earthworm *Eisenia fetida* (Savigny, 1826). **Water Air Soil Pollut**. 225:2207. 2014.
- TUGEL, A.J., A.M. LEWANDOWSKI, AND D. HAPPE-VONARB, eds. 2000. Soil Biology Primer. Ankeny, IA: **Soil and Water Conservation Society**. Disponível em: < <http://www.envirothonpa.org/wp-content/uploads/2014/04/7-Soil-Biology-Primer.pdf> > Acesso em: Abril/2017.
- ZELLER, *et al.* Glyphosate herbicide affects belowground interactions between earthworms and symbiotic mycorrhizal fungi in a model ecosystem. **Scientific Reports**. V.4, n.5634, 2014.