

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**HERBICIDAS DESSECANTES NA FAUNA EDÁFICA E
GENOTOXICIDADE**

TESE DE DOUTORADO

Geovane Boschmann Reimche

Santa Maria, RS, Brasil

2014

HERBICIDAS DESSECANTES NA FAUNA EDÁFICA E GENOTOXICIDADE

Geovane Boschmann Reimche

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Linha de Pesquisa Bioecologia e Manejo de Organismos em Sistemas Agrícolas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Agronomia**

Orientadora: Prof^a. Solange Bosio Tedesco

Santa Maria, RS, Brasil

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Reimche, Geovane Boschmann
HERBICIDAS DESSECANTES NA FAUNA EDÁFICA E
GENOTOXICIDADE / Geovane Boschmann Reimche.-2014.
99 p.; 30cm

Orientadora: Solange Bosio Tedesco
Coorientadora: Zaida Inês Antonioli
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Agronomia, RS, 2014

1. Glycine max. L 2. Agrotóxicos 3. Mesofauna edáfica
4. Citotoxicidade 5. Alterações cromossômicas estruturais
I. Bosio Tedesco, Solange II. Inês Antonioli, Zaida
III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Tese de
Doutorado**

**HERBICIDAS DESSECANTES NA FAUNA EDÁFICA E
GENOTOXICIDADE**

elaborada por
Geovane Boschmann Reimche

Como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Agronomia

COMISSÃO EXAMINADORA:


Solange Bosio Tedesco, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)


Sérgio Luiz de Oliveira Machado, Dr. (UFSM)


Zaida Inês Antonioli, PhD. (UFSM)


Ana Claudia Kalil Huber, Dra. (URCAMP)


Ivan Renato Cardoso Krolow, Dr. (FEPAGRO)

Santa Maria, 21 de Agosto de 2014.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Olga e Bruno Reimche
e a minha irmã Rejane Reimche.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, saúde e por sempre estar comigo e guiar meus passos.

Aos meus pais e a minha irmã, que sempre me apoiaram em todos os momentos. Obrigado por todo amor, compreensão e confiança em mim sempre depositada.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia da UFSM, pela minha formação de qualidade, oportunidade de realizar este curso e disponibilização da sua estrutura para a condução de meu trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao professor Dr. Sérgio Luiz de Oliveira Machado e professora Dr^a. Solange Bosio Tedesco pelas orientações, tempo dedicado, acessibilidade, respeito, auxílio, todos os ensinamentos, confiança e sua amizade.

À professora PhD. Zaida Inês Antonioli, pela co-orientação e pelos seus conhecimentos, disponibilidade em me ajudar, ensinar e guiar.

À professora Dr^a Ana Claudia Kalil Huber e o Dr. Ivan Renato Cardoso Krolow (FEPAGRO) pelas contribuições e participação da Comissão Examinadora da Tese.

Aos professores PhD. Luis Antônio de Avila e Dr. Jerson Vanderlei Carús Guedes pelas suas contribuições e participação da Comissão Examinadora de Qualificação.

Ao professor Dr. Nelson Diehl Kruse, por sua imensa disponibilidade em me ajudar, ensinar e guiar.

Aos colegas do grupo de pesquisa do laboratório de herbologia da UFSM, em especial a Fernando Piccinini, pela ajuda na condução deste trabalho, e aos colegas Cezar Coradini, André Guareschi, Julcemar Didonet, Keli Souza da Silva, Kelen Müller Souto, Gustavo Spreckelson Casagrande, Joanei Cechin, Liange Reck, Andrisa Balbinot e Rodrigo Roso, meu agradecimento a todos.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente contribuíram pelo êxito do trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria - RS, Brasil

HERBICIDAS DESSECANTES NA FAUNA EDÁFICA E GENOTOXICIDADE

Autor: Geovane Boschmann Reimche

Orientadora: Solange Bosio Tedesco

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 21 de agosto de 2014

Com a introdução do sistema de plantio direto ocorreram mudanças no manejo de plantas daninhas, onde se intensificou o controle químico. O uso intenso de herbicidas pode ter efeito na ecologia de organismos não alvo presentes no solo. Nesse sentido foram conduzidos dois trabalhos objetivando avaliar o efeito de herbicidas sobre a composição da mesofauna edáfica em soja geneticamente modificada e resistência ao herbicida glifosato (soja RR[®]) (Capítulo I) e verificar o efeito citotóxico e de genotoxicidade de diferentes concentrações dos herbicidas glifosato, glufosinato, paraquat e saflufenacil, aplicados na operação de dessecação em pré-semeadura da soja RR[®] (Capítulo II). No capítulo I, os resultados mostraram que glufosinato favoreceu o aumento de colêmbolos (Entomobryomorpha) e ácaros (*Eupodes* sp. e *Scheloribates* sp. predadores Galumnidae e Mesostigmata). Paraquat favoreceu o aumento de colêmbolos (Entomobryomorpha) e ácaros (Pygmephoridae, *Scheloribates* sp. e Mesostigmata). A população dos ácaros (Pygmephoridae e *Scheloribates* sp.) aumentou com o tratamento glifosato; e dos ácaros (*Scheloribates* sp) com a aplicação de saflufenacil. Enquanto que na associação de glifosato com saflufenacil houve aumento da densidade de colêmbolos (Entomobryomorpha). A Ordem Haplotaxida apresentou maior sensibilidade aos herbicidas glufosinato, paraquat e saflufenacil. No capítulo II, os resultados mostraram que a formulação comercial e o padrão analítico do glifosato não apresentaram efeito citotóxico nas concentrações de 5, 10 ou 26ppm em células de *Allium cepa*; e apenas a formulação comercial apresentou ação genotóxica. O glufosinato não apresentou ação citotóxica, porém em células da planta teste se evidenciou pouca ação genotóxica. A formulação comercial de paraquat reduziu a divisão celular nas concentrações testadas (2, 4 e 11ppm), sem evidências de ação genotóxica. Saflufenacil não afetou a divisão celular e apresentou baixa ação genotóxica na concentração de 0,25ppm em células da planta teste.

Palavras-chave: *Glycine max.* L. Agrotóxicos. Mesofauna edáfica. Citotoxicidade. Alterações cromossômicas estruturais.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Programa de Pós-Graduação em Agronomia
Universidade Federal de Santa Maria - RS, Brazil

NON-SELECTIVE HERBICIDES ON EDAPHIC FAUNA AND GENOTOXICITY

Author: Geovane Boschmann Reimche

Adviser: Solange Bosio Tedesco

Place and Date of presentation: Santa Maria August 21, 2014.

The use of direct seeding system brought changes on the weed management, by the mean of increasing of chemical control. The intense use of herbicides may have effect over the ecology of non-target soil organism. Two studies were conduct aiming testing the effect of herbicides over composition of soil mesofauna under genetically modified glyphosate resistance soy (RR[®]) (Chapter I) and assess the cito-genotoxicity effect of glyphosate, ammonium glufosinate, paraquat and saflufenacil herbicide, applied during non-selective operation spray, before soy seeding (Chapter II). In Chapter I, results showed that in both agricultural years, soil mesofauna was dominate by Acari followed by Collembola, were Oribatida and Entomobryomorpha were the most predominating, respectively. In Chapter I, results showed of ammonium glufosinate favored an increase of springtails (Entomobryomorpha) and mites (Eupodes sp. *Scheloribates* sp. Galumnidae and Mesostigmata). Paraquat favored springtails (Entomobryomorpha) and mites (Pygmephoridae, *Scheloribates* sp. and Mesostigmata). Mite population (Pygmephoridae and *Scheloribates* sp.) increase with glyphosate treatment; and mites (*Scheloribates* sp.) with saflufenacil application; while in the glyphosate with saflufenacil association there was an increased springtails (Entomobryomorpha) density. The Haplotaxida Order show a greater sensitivity to glufosinato herbicides, paraquat and saflufenacil. In Chapter II, results showed that the glyphosate commercial formulation and analytical standard did not show cytotoxic effect at 5, 10 or 26ppm concentrations over the *A. cepa* cells; and only commercial formulation presented genotoxic. The glufosinate shows no cytotoxic action, but tested plant cells, evidenced little genotoxic effect. Paraquat commercial formulation reduced cell division at the test concentrations (2, 4 and 11ppm) without genotoxic evidence. Saflufenacil did not affect cell division and express a weak genotoxicity using 0,25ppm concentration in plant cells test.

Keywords: *Glycine max* L. Agrotoxics. Edaphic mesofauna. Citotoxicity. Structural cromossomal alterations.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1 - Imagem geral de um bloco com as unidades experimentais (parcela) do experimento a campo mostrando a disposição entre as unidades experimentais e as áreas neutras (bordadura). Santa Maria, RS. 2014.....23

Figura 2 - Extração da mesofauna edáfica. A) Local de retirada de amostra de solo da parcela; B) Vista do fundo de um dos tubos dos funis de extração; C) Vista de cima de tubos contendo a amostra de solo sob lâmpadas; D) Perfil completo de um extrator contendo de cima para baixo: a lâmpada (40W), cano PVC com fundo de malha de ferro + tela plástica de 1mm, funil e frasco coletor (álcool 70%+glicerina); E) Parte da estrutura com os extratores. Santa Maria, RS. 2014.....26

Figura 3 - Abundância relativa geral em percentagem (%) das principais Classes taxonômicas da fauna edáfica encontradas no presente estudo. (A) ano agrícola 2010/11 e (B) ano agrícola 2011/12. Santa Maria, RS, 201429

Figura 4 - Densidade de Acari (em relação ao tratamento testemunha) no solo ao longo do cultivo da soja implantada usando diferentes herbicidas na dessecação em pré-semeadura da cultura no ano agrícola 2010/11 (A) e 2011/12 (B). Linha vertical pontilhada indica dia da aplicação dos tratamentos (herbicidas). Santa Maria, RS. 201431

Figura 5 - Densidade de Collembola (em relação ao tratamento testemunha) no solo ao longo do cultivo da soja semeada usando diferentes herbicidas na pré-semeadura da cultura ano agrícola 2010/11 (A) e 2011/12 (B). Linha vertical pontilhada indica dia da aplicação dos tratamentos (herbicidas). Santa Maria, RS. 2014.34

Figura 6 - Diagrama de ordenação da análise das funções canônicas discriminantes dos organismos da fauna edáfica selecionados anteriormente (análise de discriminância por STEPWISE). (A) Diagrama com vetores indicando a principal direção dos organismos. (B) Diagrama com os centroides (pontos) dos tratamentos para a 1ª e 2ª função canônica discriminante. Tratamentos com o asterisco (*), diferem da testemunha pelo teste F ($p < 0,05$), baseado na distância de Mahalanobis entre as médias dos tratamentos, ano agrícola 2010/11. Santa Maria, RS42

Figura 7 - Diagrama de ordenação da análise das funções canônicas discriminantes dos organismos da fauna edáfica selecionados anteriormente (análise de discriminância por STEPWISE). (A) Diagrama com vetores indicando a principal direção dos organismos. (B) Diagrama com os centroides (pontos) dos tratamentos para a 1ª e 2ª função canônica discriminante. Tratamentos com o asterisco (*), diferem da testemunha pelo teste F ($p < 0,05$), baseado na distância de Mahalanobis entre as médias dos tratamentos, ano agrícola 2011/12. Santa Maria, RS. 2014.....43

Figura 8 - Abundância média da Ordem Entomobryomorpha (Collembola) e do gênero *Eupodes* sp. (Acari) no solo de lavoura de soja tratada com diferentes herbicidas nos anos agrícolas de 2010/11 (A) e 2011/12 (B). Santa Maria, RS. 201447

Figura 9 - Abundância média da Ordem Haploxida e a Família Pygmephoridae (Acari) no solo de lavoura de soja tratada com diferentes herbicidas nos anos agrícolas de 2010/11 (A) e 2011/12 (B). Santa Maria, RS. 201448

Figura 10 - Abundância média de *Scheloribates* sp. adultos e ninfas no solo de lavoura de soja tratada com diferentes herbicidas nos anos agrícolas de 2010/11 (A) e 2011/12 (B). Santa Maria, RS. 201449

Figura 11 - Abundância média da Família Galumnidae (Acari) e da Ordem Mesostigmata (Acari) no solo de lavoura de soja tratada com diferentes herbicidas nos anos agrícolas de 2010/11 (A) e 2011/12 (B). Santa Maria, RS. 2014.....50

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1** - Análise de variância por medidas repetidas (ANOVA-RM) da abundância de Acari e Collembola encontrados no solo da lavoura de soja tratada com diferentes herbicidas. Santa Maria, RS. 2014.....33
- Tabela 2** - Densidade e frequência (Freq.) dos artrópodes mais abundantes (frequência > 10%) no solo da cultura da soja tratada com sem herbicida (testemunha) (TES), glifosato (GLI), paraquat (PAR), glufosinato (GLU), saflufenacil (SAF) e associação de glifosato com saflufenacil (GLI e SAF) no ano agrícola 2010/11. Santa Maria, RS. 201436
- Tabela 3** - Densidade e frequência (Freq.) dos artrópodes mais abundantes (frequência > 10%) no solo da cultura da soja tratada com sem herbicida (testemunha) (TES), glifosato (GLI), paraquat (PAR), glufosinato (GLU), saflufenacil (SAF) e associação de glifosato com saflufenacil (GLI e SAF) no ano agrícola 2011/12. Santa Maria, RS. 201437
- Tabela 4** - Resumo da seleção de variáveis pelo STEPWISE usando o procedimento STEPDISC (SAS) visando a seleção dos táxons com o maior poder de discriminação entre os tratamentos testados no ano agrícola 2010/11. Santa Maria, RS. 201438
- Tabela 5** - Resumo da seleção de variáveis pelo STEPWISE usando o procedimento STEPDISC (SAS) visando a seleção dos táxons com o maior poder de discriminação entre os tratamentos testados no ano agrícola 2011/12. Santa Maria, RS. 201439
- Tabela 6** - Efeito do tratamento com herbicidas na cultura da soja anos agrícolas 2010/11 e 2011/12 sobre a fauna edáfica local, Eixos canônicos (primeiro e segundo) e seus coeficientes selecionadas pelo SAS STEPWISE. Santa Maria, RS. 201440
- Tabela 7** - Análise de variância por medidas repetidas (ANOVA-RM) da densidade dos principais táxons encontrados no solo da lavoura de soja tratada com diferentes herbicidas. Santa Maria, RS. 2014.....44
- Tabela 8** - Análise de variância por medidas repetidas da densidade dos artrópodes do solo da lavoura de soja transgênica dessecada em pré-semeadura utilizando diferentes tratamentos herbicidas. Santa Maria, RS. 201445
- Tabela 9** - Análise de variância por medidas repetidas da densidade dos artrópodes do solo da lavoura de soja transgênica dessecada em pré-semeadura utilizando diferentes tratamentos herbicidas. Santa Maria, RS. 201446

CAPÍTULO II

Tabela 1 - Tratamentos e concentrações testadas e as suas equivalências em doses do produto comercial. Santa Maria, RS. 2014.....69

Tabela 2 - Número total, em interfase, divisão e índice mitótico de células meristemáticas de pontas de raízes de *A. cepa*, tratadas com diferentes concentrações do herbicida glifosato na sua formulação comercial e equivalente ácido. Santa Maria, RS. 2014.....71

Tabela 3 - Aberrações cromossômicas e mitóticas em células meristemáticas das pontas de raízes de *A. cepa*, tratadas com diferentes concentrações do herbicida glifosato na sua formulação comercial e ingrediente ativo. Santa Maria, RS. 2014 ..73

Tabela 4 - Número total, em interfase, divisão e índice mitótico de células meristemáticas de pontas de raízes de *A. cepa*, tratadas com diferentes concentrações do herbicida glufosinato na sua formulação comercial e ingrediente ativo. Santa Maria, RS. 2014.....76

Tabela 5 - Aberrações cromossômicas e mitóticas em células meristemáticas das pontas de raízes de *A. cepa*, tratadas com diferentes concentrações do herbicida glufosinato na sua formulação comercial e ingrediente ativo. Santa Maria, RS. 201477

Tabela 6 - Número total, em interfase, divisão e índice mitótico de células meristemáticas de pontas de raízes de *A. cepa*, tratadas com diferentes concentrações do herbicida paraquat na sua formulação comercial e ingrediente ativo. Santa Maria, RS. 2014.....78

Tabela 7 - Aberrações cromossômicas e mitóticas em células meristemáticas das pontas de raízes de *A. cepa*, tratadas com diferentes concentrações do herbicida paraquat na sua formulação comercial e ingrediente ativo. Santa Maria, RS. 201480

Tabela 8 - Número total, em interfase, divisão e índice mitótico de células meristemáticas de pontas de raízes de *A. cepa*, tratadas com diferentes concentrações do herbicida saflufenacil na sua formulação comercial e ingrediente ativo. Santa Maria, RS. 2014.....81

Tabela 9 - Aberrações cromossômicas e mitóticas em células meristemáticas das pontas de raízes de *A. cepa*, tratadas com diferentes concentrações do herbicida saflufenacil na sua formulação comercial e ingrediente ativo. Santa Maria, RS. 201482

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* L. A1 e A2) Anáfase com ponte; A3) Interfase com ponte; B1) Prófase com quebra cromossômica; C1) Anáfase com cromossomo solto; D) Multipolaridade; E) Anomalia dos fusos; F) Célula binucleada; G1 e G2) Cromossomos aderidos; H1) Célula em Interfase com quatro micronúcleos e H2) Célula em Interfase com um micronúcleo. Santa Maria, RS, 201496

APÊNDICE B - Caracterização química e física do solo da área do experimento. Santa Maria, RS, 201497

APÊNDICE C - Precipitação pluvial e temperatura compensada média, durante o cultivo no ano agrícola 2010/11. Os dados foram obtidos junto a Estação Climatológica Principal da UFSM, pertencente ao 8º DISME/INMET/MA. Flechas indicam o dia em que foi realizado coleta de amostras de solo. Santa Maria, RS, 201498

APÊNDICE D - Precipitação pluvial e temperatura compensada média, durante o cultivo ano agrícola 2011/12. Os dados foram obtidos junto a Estação Climatológica Principal da UFSM, pertencente ao 8º DISME/INMET/MA. Flechas indicam o dia em que foi realizado coleta de amostras de solo. Santa Maria, RS, 201499

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 Objetivos específicos	17
3 CAPÍTULO I: AÇÃO DE HERBICIDAS DESSECANTES NA COMPOSIÇÃO DA MESOFAUNA EDÁFICA	18
3.1 Introdução	20
3.2 Material e métodos	22
3.2.1 Condições experimentais	22
3.2.2 Tratamentos	24
3.2.3 Amostragem da mesofauna	24
3.2.4 Análise de dados.....	27
3.3 Resultados e discussão	28
3.3.1 Diversidade geral de organismos	28
3.3.2 Impacto dos herbicidas sobre a riqueza de organismos do solo	30
3.3.3 Impacto dos herbicidas sobre a abundância de Acari e Collembola do solo....	31
3.3.4 Herbicidas sobre a abundância de organismos do solo	34
3.3.4.1 Grupos com capacidade preditiva dos impactos dos herbicidas	35
3.3.4.2 Efeito de impacto dos herbicidas sobre a abundância total dos grupos	41
3.3.4.3 Impacto dos herbicidas sobre os principais grupos encontrados	41
3.4 Conclusões	55
3.5 Referências bibliográficas	55
4 CAPÍTULO II: CITOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE HERBICIDAS DESSECANTES USANDO BIOENSAIOS COM <i>Allium Cepa</i> L.	63
4.1 Introdução	65
4.2 Material e métodos	67
4.2.1 Condições Experimentais.....	67
4.2.2 Tratamentos	67
4.2.3 Análise do ciclo celular de <i>Allium cepa</i> L.....	69
4.2.4 Análise de dados.....	70
4.3 Resultados e discussão	70
4.4 Conclusões	83
4.5 Referências bibliográficas	83
5 CONSIDERAÇÕES GERAIS	90
6 SUGESTÕES DE NOVOS TEMAS DE PESQUISAS	92
REFERÊNCIAS	93
APÊNDICES	95

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial de soja, atrás apenas dos Estados Unidos (FAO, 2013), com produção superior a 68 milhões de toneladas de grãos. O Rio Grande do Sul (RS) apresenta a terceira maior produção, representando aproximadamente 15 % da produção nacional (IBGE, 2012).

Dentre os componentes nocivos que ocorrem em lavouras de soja estão as plantas concorrentes, que competem com a cultura por água, luz e nutrientes, causando redução na produtividade de grãos. O controle químico, por sua eficiência e praticidade, é atualmente o método mais empregado no controle de plantas daninhas. Herbicidas que apresentam atividade residual no solo, impedindo ou reduzindo a germinação e a emergência de plantas daninhas, são insumos de grande importância para garantir a produção de grãos.

Com a liberação do plantio de genótipos de soja resistente ao herbicida glifosato, usando a tecnologia Roundup Ready[®] (RR) no Brasil, o uso deste herbicida que já era expressivo devido as aplicações na dessecação em pré-semeadura da soja, aumentou ainda mais com a possibilidade de realizar de uma a duas aplicações em pós-emergência. O glifosato prove uma flexibilidade no tempo de aplicação e controla um amplo espectro de plantas. Entretanto, não todas as plantas daninhas são completamente controladas com uma única aplicação (STARKE e OLIVER, 1998; NORSWORTHY et al., 2001). Para muitas das plantas problemáticas para se controlar usando o glifosato, o controle é altamente dependente ao tamanho da planta no momento da aplicação (JORDAN et al., 1997). Além do mais, o uso intenso de glifosato em lavouras de soja RR[®] tem favorecido a seleção de plantas daninhas tolerantes e biótipos resistentes ao herbicida. Convém enfatizar que a resistência é um fenômeno natural que ocorre espontaneamente em populações de plantas daninhas, não sendo, portanto, o herbicida o agente causador, mas sim selecionador dos indivíduos resistentes que normalmente se encontram em baixa frequência inicial.

Em nível mundial e também no Brasil, existem inúmeros casos de biótipos resistentes a herbicidas, pertencentes a diversas espécies de plantas daninhas de grande expressividade, como a Buva (*Conyza bonariensis* L. Cronq.) no RS.

Contudo, existem plantas que possuem certo grau de tolerância ao glifosato como a Trapoeraba (*Commelina benghalensis* L.), Corda-de-viola (*Ipomoea triloba* L.), Guanxuma (*Sida rhombifolia* L.) e Poaia-branca (*Richardia brasiliensis* Gomes) de modo que, para o efetivo controle destas e de outras plantas, consideradas daninhas em áreas agrícolas antecedendo o cultivo de culturas agrícolas, são necessários diversos cuidados.

A dessecação precoce das plantas daninhas, com o emprego de outros herbicidas não seletivos e/ou de amplo espectro de ação, além do glifosato, bem como a associação deste, com outros herbicidas, antecedendo a semeadura da cultura é uma das maneiras de melhor controle das plantas daninhas problema, no cultivo de culturas RR[®]. Esse manejo, além de contribuir na prevenção de plantas daninhas resistentes, podem também aumentar a eficiência de controle sobre espécies tolerantes e ampliar o espectro de espécies controladas com uma única aplicação. A busca por herbicidas que atendam a esses aspectos pode representar grande contribuição no sentido de tornar a produção de soja mais competitiva, econômica e de qualidade.

Enquanto os herbicidas são muito importantes para a agricultura, sob certas circunstâncias podem agir como poluentes que deterioram o solo e água. Enquanto a maioria dos herbicidas não são intencionalmente aplicados ao solo, eles podem entrar no ambiente solo por: interceptação direta da calda pela superfície do solo durante as aplicações iniciais, pelo escoamento do produto da vegetação e lixiviação do material das plantas em decomposição (ZABALLOY et al., 2008). Existe ainda uma grande preocupação acerca dos efeitos dos herbicidas no ambiente, principalmente sobre o ecossistema do solo. A fauna edáfica é tradicionalmente utilizada como bioindicadora em estudos de detecção e monitoramento da qualidade ambiental (LANGELLOTTO e DENNO, 2004; PAOLETTI et al., 2007). Dentre estes organismos bioindicadores presentes no solo, os artrópodes são particularmente importantes devido a diversidade de espécies e habitat, além de comporem os processos biológicos nos ecossistemas naturais. Além disso, são organismos sensíveis às mudanças do ambiente podendo ser utilizados em estudos de monitoramento (THOMAZINI e THOMAZIN, 2002).

Os efeitos dos agrotóxicos sobre componentes físicos e biológicos do solo, embora complexos, têm sido frequentemente avaliados. Entretanto, a maioria dos estudos é conduzida em condições de laboratório, utilizando-se de metodologias

baseadas em bioensaios (CORTET et al., 2002). Embora facilmente demonstráveis em condições controladas, a campo os efeitos sobre a fauna edáfica podem ser variáveis, e por isto devem ser avaliados e interpretados com muito critério e cautela, através de indicadores apropriados e de maior proximidade das condições de campo (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

Outro importante aspecto dos agrotóxicos no ambiente, que vem sendo estudado, são os possíveis efeitos citotóxicos e genotóxico. Muitos estudos usando diferentes bioensaios tem demonstrado fortes efeitos citotóxicos e genotóxico dos herbicidas, inseticidas e fungicidas (NITHYAMEENAKSHI et al., 2006, DIMITROV et al., 2006; BASARAN; UNDEGER, 2005).

Os bioensaios com vegetais demonstraram serem testes eficientes para o monitoramento da genotoxicidade de poluentes da água e do solo, incluindo os agrotóxicos (GRANT, 1999). Entre as plantas superiores, *Allium cepa* L. é considerada como excelente bioindicadora de efeitos genotóxicos e mutagênicos de poluentes ambientais (GRANT, 1999). Além da simplicidade, alta sensibilidade e baixo custo, os testes com *A. cepa* têm sido selecionados por alguns pesquisadores devido à alta correlação observada com os resultados de outros bioensaios. Esta característica é essencial para se acessar corretamente os riscos ambientais, bem como para realizar extrapolações dos resultados obtidos para outras espécies (MA et al., 1995). Por exemplo, Rank et al. (1997) observaram uma correlação de 82% entre os testes com *A. cepa* e os ensaios de carcinogenicidade em roedores.

Vários estudos têm demonstrado em diferentes organismos que alguns agrotóxicos podem ser tóxicos e/ou genotóxicos e influenciar na sobrevivência, fertilidade e composição genética das populações. Entretanto, raras informações que existem a respeito desse assunto em condições de clima e solos do RS ou em sistema de plantio direto.

As hipóteses gerais estabelecidas para esta pesquisa foram:

- Os herbicidas usados na operação de manejo em pré-semeadura da soja Roundup Ready[®] afetam qualitativa e quantitativamente a fauna edáfica.
- Nas concentrações aplicadas em lavouras visando o controle de plantas daninhas, os herbicidas glifosato, glufosinato, paraquate e saflufenacil são potencialmente tóxicos e/ou genotóxicos e influenciam na composição genética das plantas.

2 OBJETIVOS

Estudar a ação dos herbicidas glifosato, glufosinato, paraquat e saflufenacil na mesofauna edáfica e caracterizar o efeito citotóxico e genotóxico dos mesmos utilizando *Allium cepa* como planta teste.

2.1 Objetivos específicos

Comprovar o efeito desses herbicidas sobre a composição da fauna edáfica durante o período de cultivo da soja RR[®].

Avaliar o efeito citotóxico de diferentes concentrações dos herbicidas aplicados na operação de dessecação em pré-semeadura da soja RR[®] e também analisar a genotoxicidade desses herbicidas.

3 CAPÍTULO I: AÇÃO DE HERBICIDAS DESSECANTES NA COMPOSIÇÃO DA MESOFAUNA SOLO

RESUMO

Esse trabalho teve por objetivo estudar o impacto da operação de dessecação usando herbicidas em pré-semeadura da soja sobre a comunidade da mesofauna edáfica. O experimento foi conduzido a campo na área experimental do Departamento de Defesa Fitossanitária da Universidade Federal de Santa Maria, em Santa Maria, RS, nos anos agrícolas 2010/2011 e 2011/2012, em um delineamento experimental de blocos ao acaso com seis tratamentos e quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos pela dessecação em pré-semeadura da cultura usando, (herbicida e dose): glifosato (1080g ha^{-1}), paraquat (400g ha^{-1}), glufosinato (500g ha^{-1}), saflufenacil ($0,140\text{g ha}^{-1}$), associação de glifosato e saflufenacil ($1080+0,140\text{g ha}^{-1}$) além do tratamento testemunha. As amostragens para o levantamento da densidade e diversidade da mesofauna do solo, foram realizadas com um trado metálico em cinco épocas, sendo que a primeira foi realizada três dias antes da aplicação dos tratamentos herbicidas (-3), 15, 40, 70 e 130 dias após a aplicação dos herbicidas. A extração da mesofauna das amostras de solo foi realizada através de um extrator de alto gradiente. A mesofauna edáfica nos dois anos agrícolas foram dominadas por Acari seguida de Collembola, onde predominaram Oribatida e Entomobryomorpha como as mais comuns. Os resultados mostraram que glufosinato favoreceu o aumento de colêmbolos (Entomobryomorpha) e ácaros (*Eupodes* sp. e *Scheloribates* sp. predadores Galumnidae e Mesostigmata). Paraquat favoreceu o aumento de colêmbolos (Entomobryomorpha) e ácaros (Pygmephoridae, *Scheloribates* sp. e Mesostigmata). A população dos ácaros (Pygmephoridae e *Scheloribates* sp.) aumentou com o tratamento glifosato; e dos ácaros (*Scheloribates* sp.) com a aplicação de saflufenacil; enquanto que na associação de glifosato com saflufenacil houve aumento da densidade de colêmbolos (Entomobryomorpha). A Ordem Haplotaxida apresentou maior sensibilidade aos herbicidas glufosinato, paraquat e saflufenacil.

Palavras-chave: *Glycine max* L. Organismos não alvos. Microartrópodes. Acari. Collembola.

ABSTRACT

This work aimed study the impact of the operation of chemical weed control using herbicides in pre-planting of soybeans on edaphic mesofauna community. The experiment was conducted under field conditions at the Plant Protection Department experimental field of the Universidade Federal de Santa Maria in Santa Maria, RS, during 2010/2011 and 2011/2012 growing season, in a complete randomized block with six treatments and four replications. The treatments were an before seeding spray using (herbicide and dose): glyphosate (1080g ha^{-1}), paraquat (400g ha^{-1}), gluphosinate-ammonium (500g ha^{-1}), saflufenacil ($0,140\text{g ha}^{-1}$), glyphosate + saflufenacil ($1080 + 0,140\text{g ha}^{-1}$) beyond the control treatment. The survey sampling for density and diversity of soil mesofauna were performed in five seasons using a metal auger, the first of which was held three days before herbicide treatment (-3), 15, 40, 70 and 130 days after herbicide application. The mesofauna was extract from the soil samples by a high gradient extractor. Results shows that ammonium gluphosinate favored springtails (Entomobryomorpha) and mites (*Eupodes* sp. *Scheloribates* sp. Galumnidae and Mesostigmata) increase. Paraquat favored springtails (Entomobryomorpha) and mites (Pygmephoridae, *Scheloribates* sp. and Mesostigmata). Mite population (Pygmephoridae and *Scheloribates* sp.) increase with glyphosate treatment; and mites (*Scheloribates* sp.) with saflufenacil application; while in glyphosate with saflufenacil association there was an increased springtails (Entomobryomorpha) density. The Haplotaxida Order shows a greater sensitivity to gluphosinate, paraquat and saflufenacil herbicides.

Keywords: *Glycine max* L. Non-target organisms. Microarthropods. Acari. Collembola.

3.1 Introdução

O manejo sustentável é assunto chave em pesquisa agrícola. O manejo integrado, tem sido proposto como novo caminho para sobrepor muitos problemas associados com a agricultura convencional (VEREIJKEN, 1986).

Um bioindicador pode ser definido como uma espécie, família ou grupo funcional que reage de modo específico a certos tipos de mudanças ambientais (PAOLETTI; BRESSAN, 1996; VAN STRAALLEN, 1998).

O solo é um ambiente compacto onde a vida está concentrada em espaços porosos que tipicamente compreende 30% a mais de 60% do volume do solo, nas camadas superficiais (LAVELLE, 2012). Além dos microorganismos (bactérias, fungos, micorrizas etc.), o solo também é conhecido por abrigar muitos outros organismos da fauna do solo e nas últimas décadas, está muito bem documentado que os invertebrados do solo (ex. nematoides, ácaros e colêmbolos) podem servir como bons bioindicadores das mudanças no ambiente e manejo agrícola (PAOLO et al., 2010; BONGERS; FERRIS, 1999; NEHER, 2001; PONGE et al., 2003; RUF, 1998).

Dentre os bioindicadores, como artrópodes do solo, a mesofauna edáfica é geralmente o grupo melhor representado em termos de abundância, riqueza e diversidade (FILSER, 2002). Dentre esses organismos, o grupo pertencente a mesofauna do solo, classifica como aqueles organismos que possuem um diâmetro corporal entre 100µm e 2mm (WURST et al. 2012), como por exemplo ácaros, colêmbolos, proturos, dipluros e pequenos insetos entre outros, que se destacam devido a sua grande diversidade de espécies e habitat. Os mais numerosos são os ácaros Oribatei (Cryptostigmata) e Collembola, os quais, juntos constituem mais ou menos 72 a 92% dos indivíduos do total da fauna de Artropoda do solo (SINGH; PILLAI, 1975).

Além de serem considerados bons bioindicadores, os organismos da fauna do solo é um fator de grande importância para os processos que estruturam os ecossistemas terrestres. Esses organismos exercem um papel fundamental na decomposição do material vegetal, na ciclagem de nutrientes e na regulação indireta dos processos biológicos do solo, além de estabelecerem interações em diferentes

níveis com os microrganismos, que são fundamentais para a manutenção da fertilidade e produtividade do ecossistema (CORREIA; OLIVEIRA, 2005).

Parte dos agrotóxicos usualmente aplicados, alcança o solo, mesmo sendo aspergido sob culturas em crescimento e assim, podem alcançar o solo e o aumento do uso de herbicidas pode causar contaminação do solo com substâncias químicas tóxicas. Poluentes e outros fatores de degradação podem causar ambas, mudanças quantitativas (alterações densidade) e qualitativas (alterações na riqueza e/ou diversidade na fauna), as quais afetam o funcionamento do solo (BRUCE et al., 1997; CHAUVAT; PONGE, 2002; GILLET; PONGE, 2003).

Os herbicidas são usados continuamente para o controle de plantas daninhas em culturas e tem se tornado um dos principais agroquímicos em sistemas ecológicos edáficos. Muitos trabalhos têm sido feitos para estudar o impacto de herbicidas em solos agrícolas, porém com resultados muitas vezes contrastantes e baseados em espécies modelo previamente estabelecidos por teste de toxicidade, como por exemplo *Eisenia andrei* (minhoca) e *Folsomia candida* (colêmbolo). Baseados em testes toxicológicos agudos, alguns autores têm encontrados que o impacto dos herbicidas sobre a fauna do solo ser desprezível (FOX, 1964), mas outros tem reportado o contrário (SABATINI et al., 1998).

O uso dos herbicidas podem afetar diretamente os componentes da mesofauna, se forem tóxicos, ou indiretamente, através de seus efeitos sobre a biomassa vegetal (EDWARD; STAFFORD, 1979). A influência dos herbicidas sobre a mesofauna varia com o grupo químicos dosagem, persistência, número de pulverizações, efeito sobre a vegetação e condições climáticas (POPOVICI et al., 1977; EIJSACKERS; BUND, 1980; SUBAGJA; SNIDER, 1981). BELDEN; LYDY (2000) afirmam que o uso de herbicidas pode exercer efeitos nocivos sobre a entomofauna, embora a magnitude de respostas possa estar mais diretamente ligada a efeitos indiretos decorrentes de mudanças no habitat.

Na cultura da soja, o uso da prática de manejo químico das plantas daninhas recomendada, a qual preconiza o uso de herbicidas de ação total ou amplo espectro sobre plantas daninha problema (resistência/tolerância ao glifosato) de forma precoce antes da semeadura da soja, mostra-se cada vez mais usual no Brasil. Desta forma, levando em consideração o manejo integrado das pragas, é de grande importância o conhecimento do efeito que o emprego desses herbicidas podem causar no ambiente da lavoura de soja. Assim, levando-se em consideração que a

biodiversidade pode ser impactada sob diversas formas, ainda existe falta de conhecimento em relação ao impacto de limitações antropogênicas como o uso desses herbicidas, sobre organismos do solo.

Assim, objetivou-se com esse trabalho, estudar o impacto da operação de dessecação usando herbicidas em pré-semeadura da soja sobre a comunidade da mesofauna edáfica.

3.2 Material e métodos

3.2.1 Condições Experimentais

Os experimentos foram conduzidos na área experimental do Departamento de Defesa Fitossanitária, no Campus da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), RS, nos biênios agrícolas 2010/2011 e 2011/2012. O solo do local é classificado como Argissolo Vermelho distrófico arênico pertencente à unidade de mapeamento São Pedro, segundo Embrapa (2013), e a descrição das características químicas e físicas básicas do solo encontram-se no APÊNDICE B. O clima da região é do tipo Cfa - temperado chuvoso com distribuição de chuva uniforme ao longo do ano e subtropical do ponto de vista térmico (MORENO, 1961). Os dados de tempo (temperatura compensada média e precipitação) observados durante todo o período do estudo para os dois anos agrícolas, estão presentes no APÊNDICE C e D.

O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com seis tratamentos e quatro repetições. O experimento foi conduzido em unidades experimentais que possuíam 24m² (6x4m), sendo que foi deixada uma área de neutra de dois metros (2m) entre cada unidade experimental dentro de cada bloco bem como entre blocos. Estas áreas neutras foram alocadas como uma forma de impedir que houvesse contaminação entre as próprias unidades experimentais (Figura 1).



Figura 1 - Imagem geral de um bloco com as unidades experimentais (parcela) do experimento a campo mostrando a disposição entre as unidades experimentais e as áreas neutras (bordadura). Santa Maria, RS. 2014.

Nos dois anos agrícolas, a área do experimento era composta por uma vegetação composta basicamente de plantas de azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) formando uma cobertura durante o inverno/ primavera, e que antes da instalação do experimento, em torno de 20 a 15 dias, as plantas de azevém estavam naturalmente mortas, formando uma cobertura do solo avaliada em 3,4 e 3,1 toneladas de palhada no primeiro e segundo ano agrícola do estudo. As poucas plantas remanescentes da entre anos agrícolas foram removidas por meio de arranque manual.

A semeadura da soja foi realizada mecanicamente com uma semeadora-adubadora no espaçamento de 0,45m entre fileiras e com densidade de 18 sementes por metro, utilizando-se a cultivar Fundacep 55RR, instalada sob sistema de semeadura direta. A adubação foi realizada utilizando-se a fórmula 5-20-20 (N-P-K) segundo as recomendações técnicas para a cultura (REUNIÃO..., 2010). A

semeadura da soja foi realizada em 26/12/2010 e 24/01/2012, respectivamente no primeiro e segundo ano agrícola estudado.

3.2.2 Tratamentos

Os tratamentos foram constituídos da aplicação isolada do herbicida glifosato (N-(fosfonometil)glicina), na dose de (1080g ha^{-1}) usando a formulação comercial Roundup Original[®] (360gL^{-1} de equivalente ácido de glifosato) (Monsanto[®]). O herbicida glufosinato de amônio (4-hidroxi(metil) fosfinol-DL-holoalanina sal de amônio), na dose de (500g ha^{-1}) usando a formulação comercial Finale[®] (200gL^{-1} de equivalente glufosinato sal de amônio) (Bayer[®]). O herbicida paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto), na dose de (400g ha^{-1}) na formulação comercial Gramoxone[®] (200gL^{-1} de paraquat) (Syngenta[®]) e o herbicida saflufenacil N'-(2-chloro-4-fluoro-5-[1,2,3,6-tetrahydro-3-methyl-2,6-dioxo-4-(trifluoromethyl) pyrimidin-1-yl]benzoyl}N-iso-propyl-N-methylsulfamide), na dose de (42g ha^{-1}) na formulação comercial Heat[®] (700g kg^{-1} de saflufenacil) (BASF[®]). No tratamento testemunha (controle) foi aplicado apenas água no mesmo volume da calda empregada com os herbicidas. Para a aspersão da calda para cada herbicida e a água, foi utilizado um pulverizador costal pressurizado com CO₂ e vazão equivalente a 120L, provido de barra com 1,5m de comprimento e quatro pontas Teejet XR110.02 com jato em forma de leque e espaçados de 0,50m um do outro, aos 5 dias antes da semeadura da soja.

3.2.3 Amostragem da mesofauna edáfica

Para os levantamentos da densidade e diversidade de organismos pertencentes à mesofauna do solo, procedeu-se a coleta cinco épocas, sendo que a primeira foi realizada três dias antes da aplicação dos tratamentos herbicidas (-3) e aos 15, 40, 70 e 130 dias após a aplicação dos herbicidas.

As amostras foram obtidas através de um trado metálico, com 5cm de diâmetro interno e 4,5cm de altura. Para isso, as mesmas foram coletas introduzindo-se o trado até 4,5cm de profundidade no solo nas entre linhas das plantas de soja, em três diferentes locais dentro de cada unidade experimental, obtendo-se três amostras por parcela. Cada amostra de solo foi cuidadosamente retirada do trado com o auxílio de uma espátula, embalada em saco de polietileno previamente identificado e acondicionada em uma caixa de isopor e levada para o laboratório.

A extração da mesofauna das amostras de solo foi realizada através de um extrator de alto gradiente (MACFADYEN, 1961) com funil modificado de Berlese-Tullgren. Este aparato, consiste de 40 extratores construídos a base de canos de PVC contendo uma tela metálica (abertura da malha de 3,0mm) para suportar a massa de solo, além de uma tela de nylon (abertura de malha de 1,8mm) logo acima da malha metálica para impedir que grandes quantidades de solo caiam. Abaixo da estrutura de com as telas, estava fixado um funil de polietileno, este, direcionava os organismos diretamente para o frasco com a solução fixadora. Presentes acima do tubo (15cm do topo do tubo) há a fontes de luz e calor (lâmpada de 40Watts) para aquecer e desidratar lentamente as amostras (Figura 2).

O método de extração se baseia na resposta dos invertebrados do solo a uma fonte de luz e calor, que induz os organismos a migrar em busca de umidade e temperaturas mais amenas, caindo através da tela passando pelo funil que o direciona diretamente para um frasco de vidro contendo solução fixadora de álcool etílico 75% (FINNAMORE et al., 2008) preenchida pelo menos duas vezes durante a extração.

Todas as lâmpadas eram ligadas a um circuito com um dimmer, utilizado para controlador a intensidade da corrente elétrica média e assim variar a intensidade de luz e calor emitido pelas lâmpadas. Desta forma as lâmpadas permaneceram com o mínimo de luz no primeiro dia. A temperatura foi diariamente aumentada de 25 a 45°C no 14º dia, medindo-se a temperatura média do topo da amostra de solo de quatro amostras usando-se quatro medidores de temperatura digital com sonda externa.

Para garantir um bom gradiente de temperatura entre o topo da amostra de solo e base da mesma (temperatura normal/ambiente), toda a estrutura contendo os extratores foi mantida em local com temperatura ambiental (medida a 1m dos

extratores) variando entre 23-24°C controlado por um ar condicionado, durante os 14 dias.

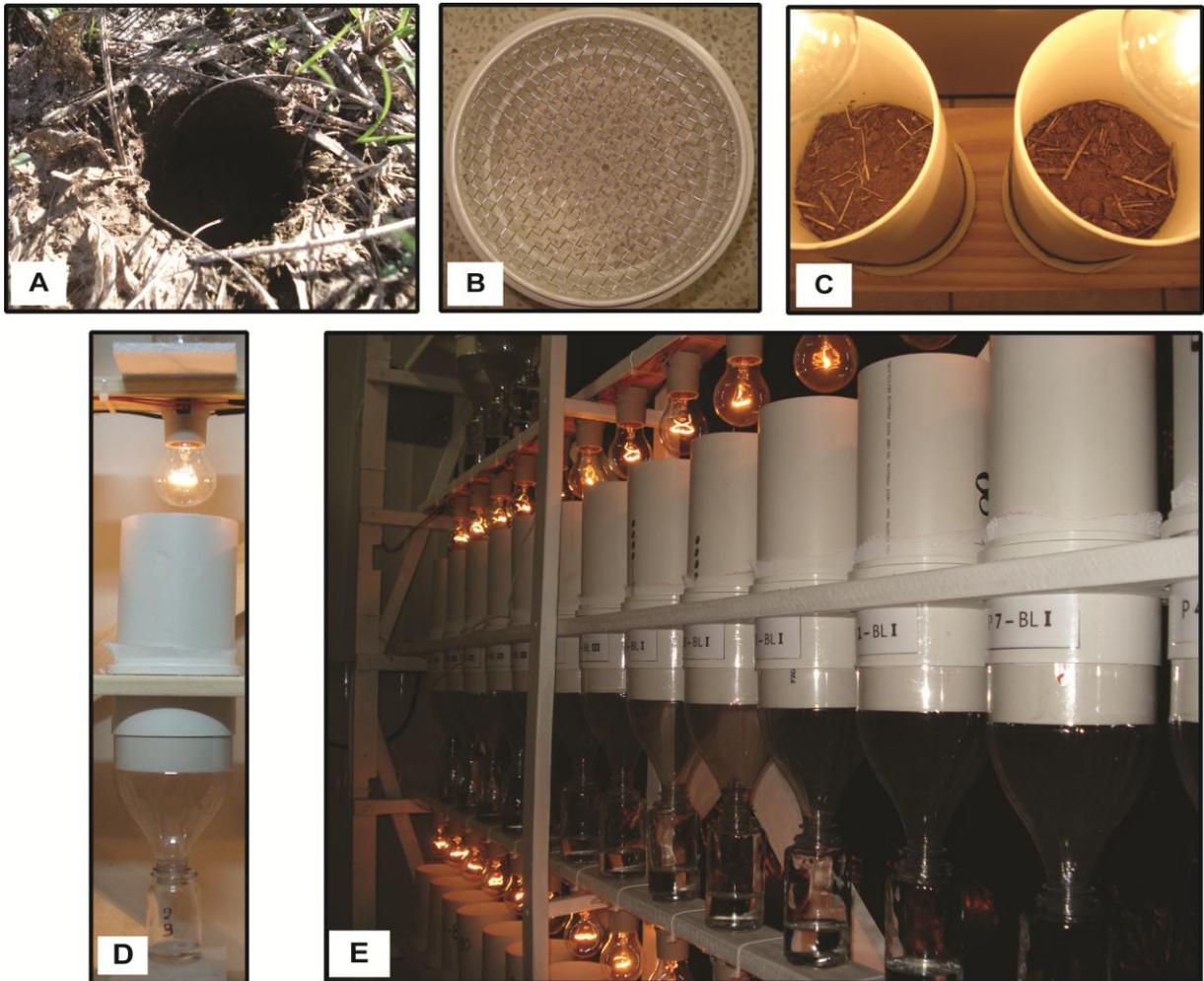


Figura 2 - Extração da mesofauna edáfica. A) Local de retirada de amostra de solo da parcela; B) Vista do fundo de um dos tubos dos funis de extração; C) Vista de cima de tubos contendo a amostra de solo sob lâmpadas; D) Perfil completo de um extrator contendo de cima para baixo: a lâmpada (40W), cano PVC com fundo de malha de ferro + tela plástica, funil e frasco coletor (álcool 70%+glicerina); E) Parte da estrutura com os extratores. Santa Maria, RS. 2014.

Após o período de extração, o recipiente de vidro contendo a solução foi recolhido completado novamente com álcool 75% para posterior triagem. Posteriormente essas amostras foram transferidas para placa de Petri contendo

graduações para contagem e identificação dos organismos utilizando-se um microscópio óptico invertido. Os colêmbolos foram agrupados a nível de Ordem, e os ácaros foram agrupados em Oribatida, Prostigmata, Mesostigmata e Astigmata, seguindo BELLINGER, (2014) e KRANTZ, (1970). Os indivíduos mais abundantes de ácaros foram identificados em nível de gênero com a ajuda do Dr. Jeferson Luiz de Carvalho Mineiro do Instituto Biológico (Campinas, SP).

3.2.4 Análise de dados

Apenas os táxons que estiveram presente a partir de 10% das amostras foram considerados “abundantes” e incluídos nas análises estatísticas, procedeu-se assim devido ao fato de que táxons invertebrados com abundância muito baixa, não exibem qualquer informação possível efeito dos tratamentos, e o efeito do acaso, se torna muito possível. Antes da análise dos dados, a normalidade e homogeneidade das densidades foram verificadas através dos testes de Liliefors e Bartlett ($P < 0,05$), respectivamente. As densidades observadas foram transformadas para a escala de $\log_{10}(n+1)$ para análises estatísticas. Comparações foram feitas entre cada tratamento e o tratamento testemunha (controle sem herbicida).

Os dados da composição relativa nos dois anos agrícolas foram inicialmente submetidos a um processo seletivo que determinou quais foram os organismos que mais explicavam a variância observada usando a análise de discriminante com o procedimento de seleção forward stepwise usando o procedimento PROC STEPDISC com seleção STEPWISE do programa SAS[®] (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 2003).

Para os organismos selecionados, os dados foram submetidos à análise de variáveis canônicas. Esta técnica de ordenação indireta permite a representatividade dos dados originais num conjunto de variáveis que possibilita representar graficamente as respostas da comunidade em função dos tratamentos (KEDWARDS et al., 1999). A significância entre a abundância da comunidade de organismos em função dos tratamentos foi testada pelo teste F aproximando ($p < 0,05$), usando a distância de Mahalanobis entre as respectivas médias canônicas. As análises foram

feitas usando o procedimento CANDISC do programa SAS[®] (STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM, 2003).

Para os organismos selecionados pelo procedimento STEPDISC, responsáveis pelo aparecimento de diferenças entre os tratamentos, foram individualmente submetidos a uma análise de variância usando a análise de variância de medidas repetidas (ANOVA-RM) para verificar diferenças na abundância dos organismos ao longo do tempo. Para cada teste, a hipótese de simetria composta dos dados foi verificada com o teste de esfericidade, e quando significativo ($P < 0,05$), para determinar a significância da interação entre termos do sujeito, foi usado o ajustamento de Greenhouse-Geisser para os graus de liberdade do erro (DIXON, 1992).

Também para os principais organismos foram feitas curvas de flutuação da população para cada tratamento.

3.3 Resultados e discussão

3.3.1 Diversidade geral de organismos

No total da fauna do solo avaliada foram 9078 e 14964 indivíduos que incluem artrópodes, nematóides e anelídeos, no primeiro e segundo ano respectivamente. A proporção entre as Ordens coletadas não variou entre os anos, sendo respectivamente no primeiro e segundo ano: Acari (86,8 e 87,3%), Collembola (6,2 e 5,7%), Hymenoptera (1,9 e 1,9%), Nematoda (1,7 e 2,1%), Coleoptera (1,6 e 1,9%), Symphyla (0,8 e 0,3%), Haplotaxida (0,3 e 0,3%), Diplura (0,2 e 0,1%), Araneae (0,2 e 0,1%), Chilopoda (0,2 e 0,1%), Thysanoptera (0,1 e 0,2%) e Pseudoscorpiones (0,03 e 0,0%) (Figura 3). De acordo com Lavelle; Spain (2001), Collembola e Acari são geralmente dominantes entre a mesofauna, tanto numericamente como na biomassa.

Os ácaros do solo, representam respectivamente no primeiro e segundo ano agrícola, 84,6 e 74% pertenciam a Subordem Oribatida. Outros táxons de ácaros

foram Prostigmata (9,2 e 18,1%) e Mesostigmata (4,2 e 4,4%). Astigmata mais Endostigmata compreenderam 2 e 3,5%.

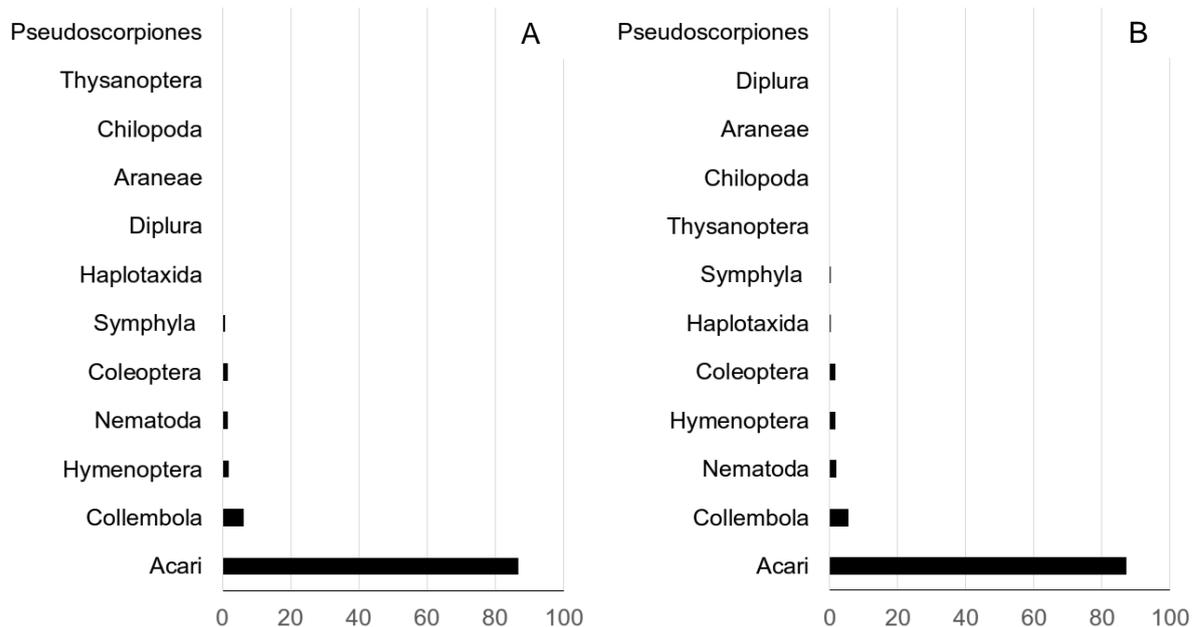


Figura 3 - Abundância relativa em porcentagem (%) geral das principais Classes taxonômicas da fauna edáfica encontradas no presente estudo. (A) Ano agrícola 2010/11 e (B) ano agrícola 2011/12. Santa Maria, RS. 2014.

A comunidade de Acari foi dominada pelos Oribatida mesmo que a diversidade de gêneros foi baixa. Esses resultados estão de acordo com os de Gormsen et al. (2006), que encontraram uma soma de 67,5% do total de ácaros, em solo agrícola. Os Oribatida geralmente ocorrem em altos números no topo da camada do solo, alimentando-se principalmente em plantas, fungos e material em decomposição, assim, possuindo um papel central na cadeia alimentar no solo (WALTER; PROCTOR, 1999). Os ácaros Oribatida possuem baixa atividade metabólica, baixo desenvolvimento e baixo fecundidade. Adultos vivem relativamente um longo tempo, por exemplo, estimativas de desenvolvimento de ovo até adulto varia de vários meses aos dois anos em solos temperados (MARJORE, 2008). A comunidade dos oribatídeos é citada como úteis para avaliação do impacto de pesticidas sob espécies de oribatídeos (SIEPEL, 1995). Entretanto, outras pesquisas mostram que a sensibilidade de espécies de oribatídeos como

(*Platynothrhus peltifer*) em testes de laboratório foi encontrado como baixo, mostrando que o mesmo não foi padronizado pela Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD) (VAN GESTEL; DOORNEKAMP, 1998). A dominância dos Oribatida no presente estudo pode ser atribuída a abundância do gênero *Scheloribates*, conhecido por sua tolerância a distúrbios ambientais (BEHAN-PELLETIER, 1999).

O segundo grupo de ácaros mas abundantes, os Mesostigmata, são na grande maioria, ácaros predadores. Esses ácaros não têm influência direta na decomposição de material orgânico no solo, porém na predação de espécies saprófagas da mesofauna, as quais afetam a ciclagem de nutrientes (HEAL; DIGHTON, 1985). A grande maioria dos Mesostigmata são predadores de topo, ocupam a posição central na cadeia alimenta detritívora no solo e indicam distúrbios ecológicos (KOEHLER, 1999) e poluentes do solo (RUFF, 1998).

3.3.2 Impacto dos herbicidas sobre a riqueza de organismos do solo

Considerando-se a classificação dos grupos dos organismos encontrados, no primeiro ano foram observados 28 grupos. Tomando como base as coletas realizadas após a aplicação dos tratamentos, a riqueza dos grupos foi pouco afetada. No tratamento controle foram observados 24 grupos, glifosato 23, paraquat 22, glufosinato 20, saflufenacil 23 e na associação de saflufenacil com glifosato 24. Já no segundo ano, foram observados 26 grupos, destes o controle apresentou 18, glifosato 21, paraquat 22, glufosinato 21, saflufenacil 21 e na associação saflufenacil com glifosato 18, também, sem grandes diferenças. A dessecação em pré- semeadura da soja empregando diferentes herbicidas, não alterou a riqueza dos grupos mais importantes de invertebrados no solo. O maior ou menor número de grupos presentes nos tratamentos, foi devido à presença ou ausência de alguns táxons em algumas amostras, porém esses táxons não representavam a comunidade geral, devido à baixa densidade.

3.3.3 Impacto dos herbicidas sobre a densidade de Acari e Collembola do solo

Com relação a densidade média (ind./m²), o grupo dos ácaros foi predominante em relação ao grupo de colêmbolos, compreendendo estes dois juntos, 93% do total de organismos extraídos das amostras de solo, igualmente nos dois anos agrícolas.

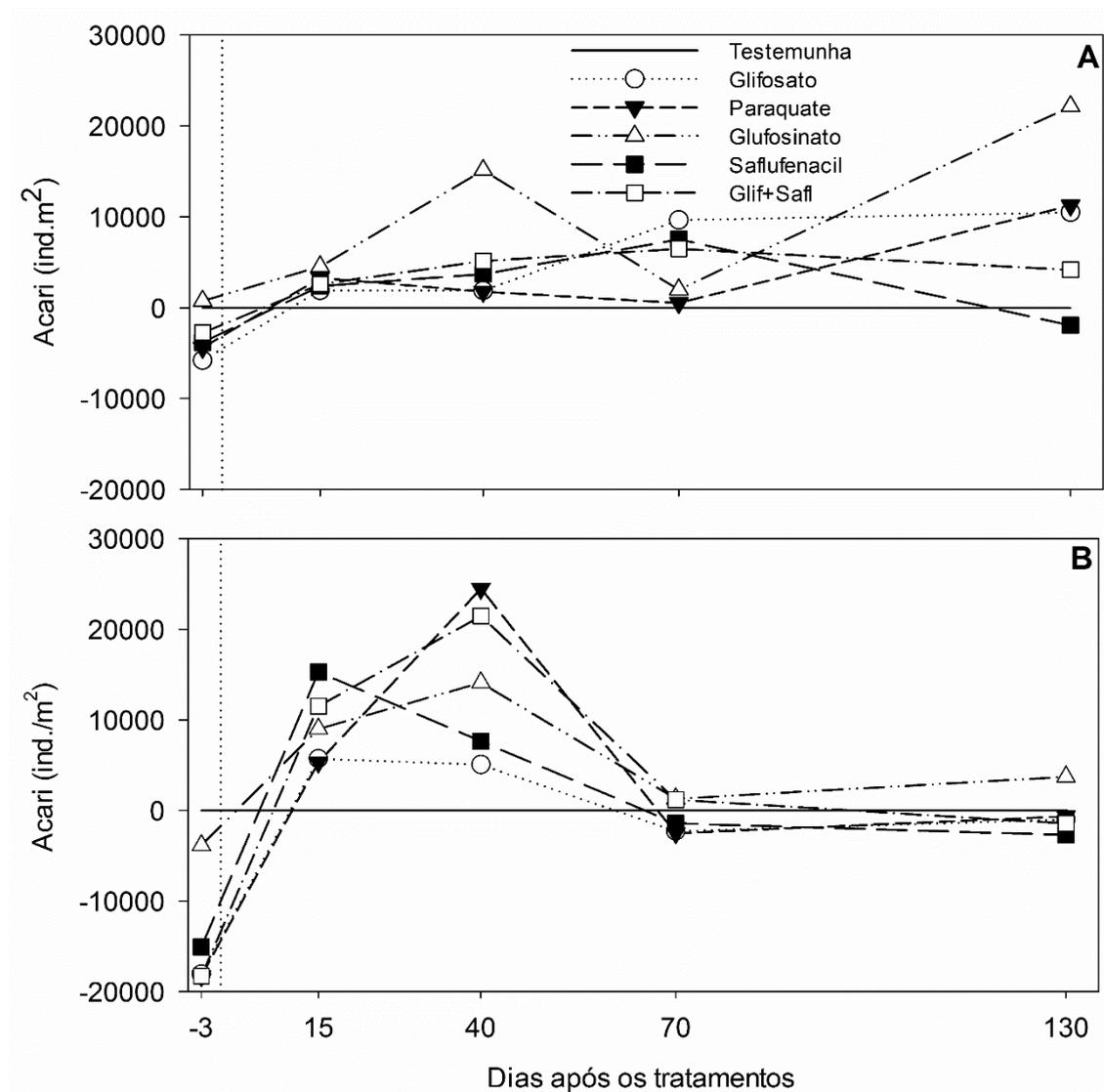


Figura 4 - Densidade de Acari (em relação ao tratamento testemunha) no solo ao longo do cultivo da soja implantada usando diferentes herbicidas na dessecação em pré-semeadura da cultura no ano agrícola 2010/11 (A) e 2011/12 (B). Linha vertical pontilhada indica dia da aplicação dos tratamentos (herbicidas). Santa Maria, RS. 2014.

A média total dos organismos que pertencem ao grupo Acari encontrados nas amostras de solo das parcelas experimentais estão representados como desvio da densidade em relação ao encontrado na testemunha (Figura 4). A análise da variância de medidas repetidas indicou que ocorreu efeito significativo na interação entre época de coleta versus tratamentos e/ou no tratamento isolado, para a população total média de ácaros em todos os tratamentos no ano 2010/11 e 2011/12 (Tabela 1). Verificando os gráficos na Figura 4 A e B, no geral, a densidade de ácaros foi maior do que na testemunha. Para a ordem Acari, a análise de variância univariada para o efeito dos tratamentos dentro de cada época, mostra efeito significativo dos tratamentos na coleta do dia 40 ($F= 6,24$, g.l= 5, $p= 0,001$) e 130 ($F= 8,67$, g.l= 5, $p\leq 0,000$) para o primeiro ano e nos dias 15 ($F= 3,49$, g.l= 5, $p= 0,022$), 40 ($F= 4,95$, g.l= 5, $p= 0,005$) e 70 ($F= 7,68$, g.l= 5, $p\leq 0,000$).

Os desvios na densidade de Collembola nos tratamentos com herbicidas em relação a testemunha encontrada nas amostras de solo, estão exibidos na Figura 5 A e B, respectivamente para a o ano agrícola 2010/11 e 2011/12.

A análise da variância de medidas repetidas (Tabela 1) indicou que houve efeito significativo para as densidades de Collembola em paraquat no primeiro ano e glifosato e saflufenacil (interação com tempo) no segundo ano. Os gráficos da Figura 5 A e B, mostram que a densidade total média de colêmbolos variou bastante entre os tratamentos, a análise univariada mostrou um efeito significativo dos tratamentos na coleta realizada no dia 40 para o primeiro ano ($F= 5,55$, g.l= 5, $p= 0,002$) e no segundo ano ($F= 5,55$, g.l= 5, $p= 0,002$).

No presente trabalho, mesmo não significativo, existe uma tendência de um aumento na densidade de colêmbolos nos primeiros dias após a aplicação dos herbicidas, observado principalmente no primeiro ano. Em geral, trabalhos na literatura citam que a aplicação de herbicidas não afeta ou é pouco adverso sobre população de Collembola (EDWARDS, 1989; HAQUE et al., 2011; LINS et al., 2007). Contudo, estudos de RENAUD, (2004), ao aplicar glifosato encontram uma redução na abundância, diversidade e riqueza de Collembola.

Tabela 1 - Análise de variância por medidas repetidas (ANOVA-RM) da densidade de Acari e Collembola encontrados no solo da lavoura de soja com aplicação de herbicidas. Santa Maria, RS. 2014.

Fonte de variação*	2010/11			2011/12		
	G-G ¹	F	p	G-G	F	p
Acari						
TEST x GLIF	-	21,74	0,003	-	1,96	0,211
TEST x PARA	-	5,30	0,060	-	0,62	0,462
TEST x GLUF	-	81,70	0,000	-	8,06	0,029
TEST x SAFLU	-	8,99	0,024	-	0,03	0,870
TEST x SAFLU+GLIF	-	8,89	0,024	-	4,14	0,088
Tempo	-	50,16	0,000	-	139	0,000
Tempo x TEST x GLIF	-	1,48	0,239	-	4,35	0,008
Tempo x TEST x PARA	-	3,15	0,032	-	8,99	0,000
Tempo x TEST x GLUF	-	10,33	0,000	-	1,83	0,156
Tempo x TEST x SAFLU	-	2,53	0,067	-	14,0	0,000
Tempo x TEST x SAFLU e GLIF	-	1,46	0,243	-	8,53	0,000
Collembola						
TEST x GLIF	-	1,12	0,328	-	9,30	0,022
TEST x PARA	-	9,58	0,021	-	3,18	0,124
TEST x GLUF	-	5,30	0,060	-	0,21	0,662
TEST x SAFLU	-	1,69	0,241	-	2,74	0,148
TEST x SAFLU+GLIF	-	1,02	0,351	-	4,39	0,080
Tempo	-	2,87	0,028	-	2,43	0,054
Tempo x TEST x GLIF	-	0,60	0,659	-	1,68	0,185
Tempo x TEST x PARA	-	0,52	0,718	-	0,43	0,779
Tempo x TEST x GLUF	-	1,59	0,209	-	0,21	0,927
Tempo x TEST x SAFLU	-	0,46	0,763	-	3,24	0,029
Tempo x TEST x SAFLU e GLIF	-	0,94	0,455	-	0,27	0,894

*Siglas: TEST=Testemunha (Controle), GLIF=Glifosato, PARA=Paraquat, GLUF=Glufosinato, e SAFLU=Saflufenacil.

¹Graus de liberdade do erro corrigidos pelo método de Greenhouse-Geisser.

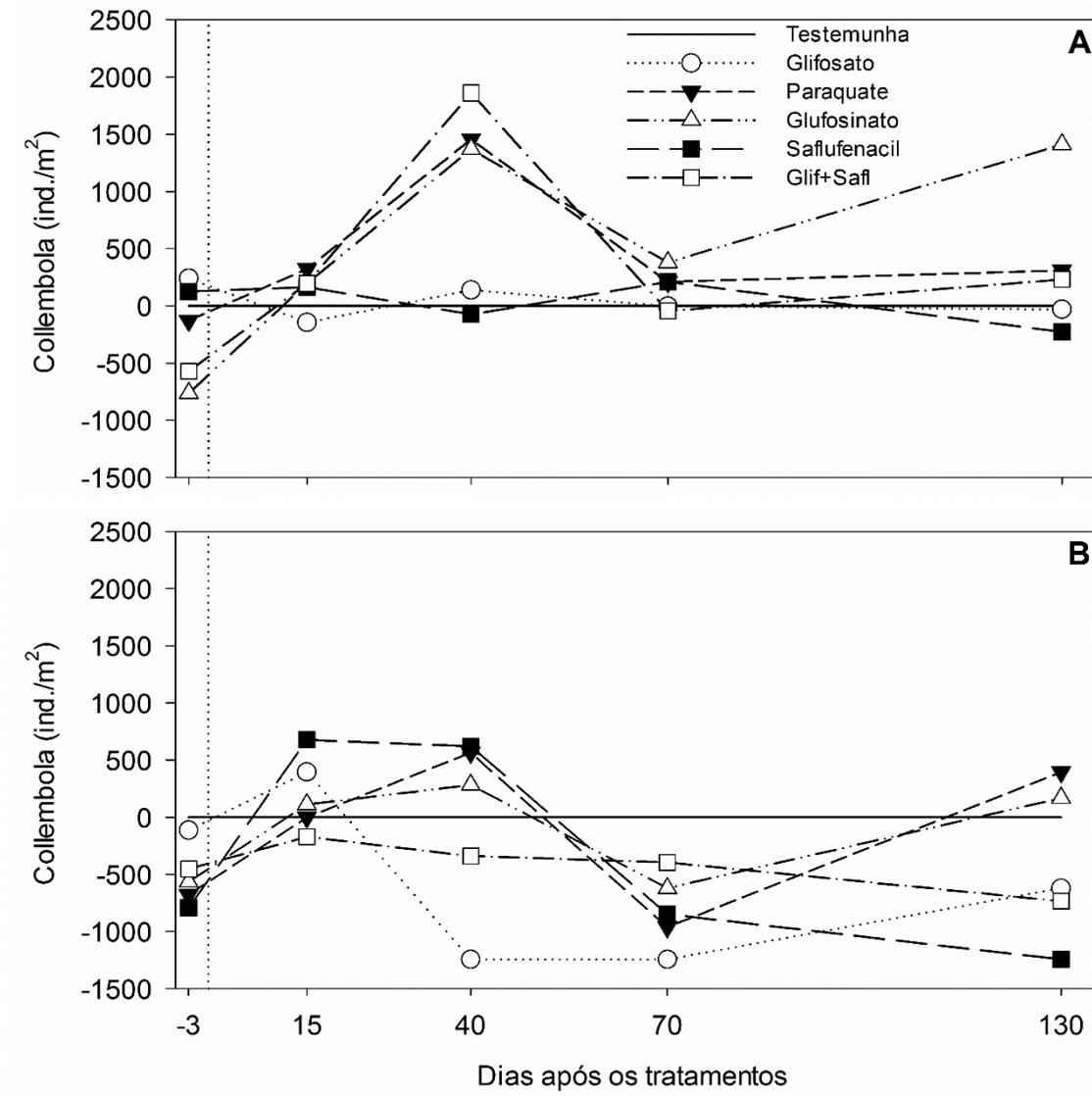


Figura 5 - Densidade de Collembola (em relação ao tratamento testemunha) no solo ao longo do cultivo da soja semeada usando diferentes herbicidas na pré-semeadura da cultura no ano agrícola 2010/11 (A) e 2011/12 (B). Linha vertical pontilhada indica dia da aplicação dos tratamentos (herbicidas). Santa Maria, RS. 2014.

3.3.4 Herbicidas sobre a densidade de organismos do solo

3.3.4.1 Grupos com capacidade preditiva dos impactos dos herbicidas

Do total de grupos de organismos do solo identificados, 19 e 22 grupos apresentaram uma frequência maior do que 10% no primeiro e segundo ano agrícola, respectivamente (Tabela 2 e 3). Quanto a frequência dos organismos nos dois anos, não houve grande mudança. No geral, os organismos de maior frequência de ocorrência e que estiveram em pelo menos 50% das amostras, foram os ácaros Oribatida das famílias Scheloribatidae, Galumnidae e Euphthiracaridae, família Eupodidae (Prostigmata), Ordem Mesostigmata, collembolas da Ordem Entomobryomorpha, a família Formicidae e as Ordens Nematoda e Coleoptera (Tabela 2 e 3).

Por meio da análise discriminante usando o método de seleção STEPWISE foram obtidos os grupos que melhor explicam a máxima discriminação entre os tratamentos. No primeiro ano os grupos selecionados foram: os ácaros detritívoros *Scheloribates* sp. adultos e ninfas, *Eupodes* sp., e Pygmephoridae e os ácaros predadores da família Galumnidae assim como os colêmbolos Entomobryomorpha (Tabela 4). Já no segundo ano foram os ácaros Pygmephoridae, *Eupodes* sp., Galumnidae e Mesostigmata assim como os organismos da Ordem Haploxida (Oligochaeta) (Tabela 5). Desta forma, estes foram os grupos selecionados para análises adicionais.

Pelos resultados dos coeficientes canônicos (baseados entre as estruturas canônicas padronizadas) da análise das variáveis canônicas CVA para os diferentes tratamentos no ano agrícola 2010/11, no eixo 1, os grupos que mais contribuíram positivamente para divergência entre os tratamentos foram: *Eupodes* sp. Pygmephoridae e *Scheloribates* sp. adulto. Já a família Galumnidae foi a que mais contribuiu negativamente na explicação dos dados no eixo 1. No eixo 2 Entomobryomorpha e *Scheloribates* sp. adultos e Galumnidae foram os grupos que mais contribuíram positivamente para a divergência entre os tratamentos. *Scheloribates* sp. ninfas foi a que mais contribuiu negativamente na explicação dos dados no eixo 2 (Tabela 6).

Tabela 2 - Densidade e frequência (Freq.) dos artrópodes mais abundantes (frequência > 10%) no solo da cultura da soja tratada com sem herbicida (testemunha) (TES), glifosato (GLI), paraquat (PAR), glufosinato (GLU), saflufenacil (SAF) e associação de glifosato com saflufenacil (GLI e SAF) no ano agrícola 2010/11. Santa Maria, RS. 2014.

Táxon*	Hábito	Número de indivíduos m ⁻² (média das cinco coletas)						Freq. (%)
		TES	GLI	PAR	GLU	SAF	GLI e SAF	
Coleoptera (Ad+Lv)	Dt	170	162	171	337	279	190	56,4
Entomobryomorpha (Collembola) (Ad)	Dt	581	531	1135	1272	600	1132	90,1
Euphthiracaridae (Acari: Oribatida) (Ad)	Dt	103	180	55	131	74	153	50,5
<i>Eupodes</i> sp. (Acari: Prostigmata) (Ad+Nf)	Dt	414	987	414	1321	552	644	82,2
Formicidae (Hymenoptera) (Ad)	Dt	258	191	138	154	309	177	63,4
Haploxida (Oligochaeta) (Jv)	Dt	41	11	23	24	12	8	22,8
Microzetidae (Acari: Oribatida) (Ad)	Dt	99	297	53	64	198	216	44,6
Nanorchestidae (Acari: Endeostigmata) (Ad)	Dt	42	117	42	62	55	99	33,7
Nematoda (Ad)	Dt	103	220	74	106	125	195	61,4
Oppiidae (Acari: Oribatida) (Ad)	Dt	85	244	318	318	11	32	24,8
Pygmephoridae (Acari: Prostigmata) (Ad)	Dt	276	641	134	162	255	446	48,5
<i>Schelorbate</i> sp. (Acari: Oribatida) (Ad)	Dt	1314	2556	2801	5690	2778	2185	95,0
<i>Schelorbate</i> sp. (Acari: Oribatida) (Nf)	Dt	1563	4149	3501	5405	2387	3661	98,0
Aranaeae (Aranha) (Ad)	Pd	11	0	11	42	43	74	12,9
Galumnidae (Acari: Oribatida) (Ad)	Pd	896	870	1301	1719	1246	1645	84,2
Mesostigmata (Acari) (Ad+Nf)	Pd	175	785	477	1020	400	460	70,3
<i>Oripoda</i> sp. (Acari: Oribatida) (Ad)	Pd	66	2	0	0	11	3	20,0
Symphylella (Symphyla) (Ad)	Pd	88	127	64	255	25	81	34,7
<i>Tyrophagus</i> sp. (Acari: Astigmata) (Ad)	Pd	85	127	202	170	106	187	37,6

*J=Jovem, Lv=Larva, Nf=Ninfa, Ad=Adulto, Pd=Predador, Dt=Detritívoro.

Tabela 3 - Densidade e frequência (Freq.) dos artrópodes mais abundantes (frequência > 10%) no solo da cultura da soja tratada com sem herbicida (testemunha) (TES), glifosato (GLI), paraquat (PAR), glufosinato (GLU), saflufenacil (SAF) e associação de glifosato com saflufenacil (GLI e SAF) no ano agrícola 2011/12. Santa Maria, RS. 2014.

Artrópodes*	Hábito	Número de indivíduos m ⁻² (média das cinco coletas)						Freq. (%)
		TES	GLI	PAR	GLU	SAF	GLI e SAF	
Coleoptera (Ad+Lv)	Dt	232	173	467	467	481	580	69,3
Cunaxidae (Acari: Prostigmata) (Ad)	Dt	42	42	198	127	42	113	32,7
Entomobryomorpha (Collembola) (Ad)	Dt	1075	538	1287	1203	920	806	82,2
Euphthiracaridae (Acari: Oribatida) (Ad)	Dt	49	77	70	75	101	62	43,6
<i>Eupodes</i> sp. (Acari: Prostigmata) (Ad+Nf)	Dt	1061	580	1316	1386	1655	1528	85,1
Formicidae (Hymenoptera) (Ad)	Dt	424	170	460	293	446	267	68,3
Haploxida (Oligochaeta) (Jv)	Dt	107	42	42	71	46	0	26,7
Microzetidae (Acari: Oribatida) (Ad)	Dt	28	71	129	118	57	99	36,6
Nanorchestidae (Acari: Endeostigmata) (Ad)	Dt	57	85	354	170	580	269	38,6
Nematoda (Ad)	Dt	340	311	410	424	523	453	64,4
Oppiidae (Acari: Oribatida) (Ad)	Dt	0	14	28	0	14	0	12,9
Pygmephoridae (Acari: Prostigmata) (Ad)	Dt	14	439	707	42	0	453	17,8
Rhagidiidae (Acari: Prostigmata) (Ad)	Dt	71	184	198	42	127	99	38,6
Symphyleona (Collembola) (Ad)	Dt	241	85	28	99	198	99	24,8
<i>Schelorbates</i> sp. (Acari: Oribatida) (Ad)	Dt	2041	2802	4584	5537	3477	3961	96,7
<i>Schelorbates</i> sp. (Acari: Oribatida) (Nf)	Dt	453	1514	2211	1358	707	3395	68,3
Thripidae (Thysanoptera) (Ad)	Fs	14	28	14	42	28	57	15,8
Chilopoda (Ad)	Pd	0	0	14	14	28	0	12,0
Galumnidae (Acari: Oribatida) (Ad)	Pd	1613	1259	1627	2759	2759	3155	84,2
Mesostigmata (Acari) (Ad+Nf)	Pd	212	226	640	920	637	622	71,3
Symphylella (Symphyla) (Ad)	Pd	42	42	57	71	28	85	20,8
<i>Tyrophagus</i> sp. (Acari: Astigmata) (Ad)	Pd	42	265	289	184	241	113	37,6

*J=Jovem, Lv=Larva, Nf=Ninfa, Ad=Adulto, Dt=Detritívoro, Fs=Fitófago sugador, Pd=Predador.

Tabela 4 - Resumo da seleção de variáveis pelo STEPWISE usando o procedimento STEPDISC (SAS) visando a seleção dos táxons com o maior poder de discriminação entre os tratamentos testados no ano agrícola 2010/11. Santa Maria, RS. 2014.

Variáveis	R ² parcial	Análise de covariância*		Lambda de Wilks	p >Lambda	Correlação quadrática parcial	
		Valor de F	p>F			Médias da correlação canônica	p>ASCC
Detritívoros							
<i>Scheloribates</i> sp. (adultos)	0,177	3,06	0,014	0,822	0,014	0,035	0,014
<i>Scheloribates</i> sp. (ninfas)	0,145	2,39	0,046	0,702	0,004	0,063	0,004
Entomobryomorpha	0,111	1,74	0,137	0,624	0,003	0,084	0,004
<i>Eupodes</i> sp.	0,096	1,45	0,219	0,564	0,004	0,101	0,005
Pygmephoridae	0,115	1,72	0,141	0,449	0,002	0,138	0,004
Predadores							
Galumnidae	0,099	1,48	0,206	0,508	0,004	0,119	0,005

*Nível de significância para entrada e permanência da variável no modelo foi de 0,35 e 0,40, respectivamente.

Tabela 5 - Resumo da seleção de variáveis pelo STEPWISE usando o procedimento STEPDISC (SAS) visando a seleção dos táxons com o maior poder de discriminação entre os tratamentos testados no ano agrícola 2011/12. Santa Maria, RS. 2014.

Variáveis	R ² parcial	Análise de covariância*		Lambda de Wilks	p >Lambda	Correlação quadrática parcial	
		Valor de F	p>F			Médias da correlação canônica	p>ASCC
Detritívoros							
Pygmephoridae	0,134	2,05	0,082	0,865	0,082	0,026	0,082
Haploxida	0,333	2,00	0,090	0,749	0,037	0,052	0,041
<i>Eupodes</i> sp.	0,114	1,66	0,156	0,663	0,026	0,074	0,028
Predadores							
Galumnidae	0,088	1,22	0,308	0,604	0,032	0,091	0,031
Mesostigmata	0,092	1,26	0,291	0,549	0,034	0,108	0,034

*Nível de significância para entrada e permanência da variável no modelo foi de 0,35 e 0,40, respectivamente.

No ano agrícola 2011/12, no eixo 1, os grupos que mais contribuíram positivamente para divergência entre os tratamentos foram: Pygmephoridae, já Haploxida e os organismos da Ordem Mesostigmata, contribuíram negativamente neste eixo 1. No eixo 2, *Eupodes* sp. e Mesostigmata foram os que contribuíram positivamente, já Haploxida bem como Galumnidae, foram as que mais contribuíram negativamente na explicação dos dados pelo eixo 2 (Tabela 6).

Tabela 6 - Efeito do tratamento com herbicidas na cultura da soja no ano agrícola 2010/11 e 2011/12 sobre a fauna edáfica local, Eixos canônicos (primeiro e segundo) e seus coeficientes selecionadas pelo SAS STEPWISE. Santa Maria, RS. 2014.

Variáveis	Eixos canônicos			
	2010/11		2011/12	
	1	2	1	2
Detritívoros				
Entomobryomorpha	0,15	0,51	-	-
<i>Eupodes</i> sp.	0,60	-0,42	0,37	0,70
Haploxida	-	-	-0,68	-0,53
Pygmephoridae	0,54	-0,32	0,87	-0,25
<i>Scheloribates</i> sp. (Ad*)	0,90	0,53	-	-
<i>Scheloribates</i> sp. (Nf)	-0,26	-0,69	-	-
Predadores				
Galumnidae	-0,56	0,66	0,09	-0,54
Mesostigmata	-	-	-0,41	0,72
<i>F</i>	1,96	1,45	1,62	1,30
gl (numerador/denominador)	30/266	20/223	25/231	16/193
p> <i>F</i>	0,002	0,101	0,034	0,199
Correlação canônica parcial	0,475	0,390	0,378	0,248

*Nf=Ninfa, Ad=Adulto.

Desta forma, dos grupos de organismos encontrados no presente trabalho nos dois anos, apresentam a melhor capacidade preditiva dos impactos dos tratamentos. Sabendo-se da importância dos oito grupos acima descritos, pode-se destacar que destes grupos mais importantes, *Eupodes* sp., Pygmephoridae e Galumnidae foram os que mostraram importante capacidade preditiva, em ambos os anos estudos. Assim, estes grupos possibilitam entender os efeitos do uso dos herbicidas químicos no cultivo de soja sobre a maioria dos organismos encontrados.

3.3.4.2 Efeito de impacto dos herbicidas sobre a densidade total dos grupos

A análise das variáveis canônicas para os tratamentos testados indicou diferenças significativas entre os mesmos, considerando a composição e a abundância dos grupos no ano agrícola 2010/11 (Lambda de Wilks=0,4493; $F=1,96$; gl (numerador/denominador) =30/266; $P<0,0028$) bem como para o ano agrícola 2011/12 (Lambda de Wilks=0,5490; $F=1,62$; gl (numerador/denominador) =25/231,8; $p<0,0349$). Foram calculados dois eixos canônicos para cada ano de estudo. No primeiro ano, apenas um deles foi significativo ($p=0,002$ e $p=0,101$, respectivamente para eixo 1 e 2), sendo que o poder de explicação dos eixos é de 47% e 39%, respectivamente no eixo 1 e 2, e juntos explicam 86% do total da variância observada (Tabela 6). Da mesma forma, no ano 2, apenas um dos eixos foi significativo ($p=0,034$ e $p=0,199$, respectivamente para eixo 1 e 2), sendo que o eixo 1 e 2 explicam 37 e 24% da variância acumulada, respectivamente (Tabela 6).

Considerando o conjunto dos organismos encontrados em cada tratamento, o diagrama de ordenação dos eixos canônicos no ano agrícola 2010/11, mostrou pouca separação entre as amostras dos tratamentos com herbicida e o tratamento testemunha, sendo que os tratamentos com saflufenacil, glufosinato e glifosato diferiram estatisticamente ($p<0,05$) do tratamento testemunha (Figura 6). No ano agrícola 2011/12, não se pôde visualizar uma separação entre os tratamentos sendo que apenas no tratamento de saflufenacil + glifosato foi significativo ($p<0,05$) da testemunha (Figura 7).

3.3.4.3 Impacto dos herbicidas sobre os principais grupos encontrados

A análise de medidas repetidas para a densidade dos principais grupos selecionados pelas análises anteriores detectou efeito significativo de alguns herbicidas (Tabela 7 a 9 e Figura 2 a 5).

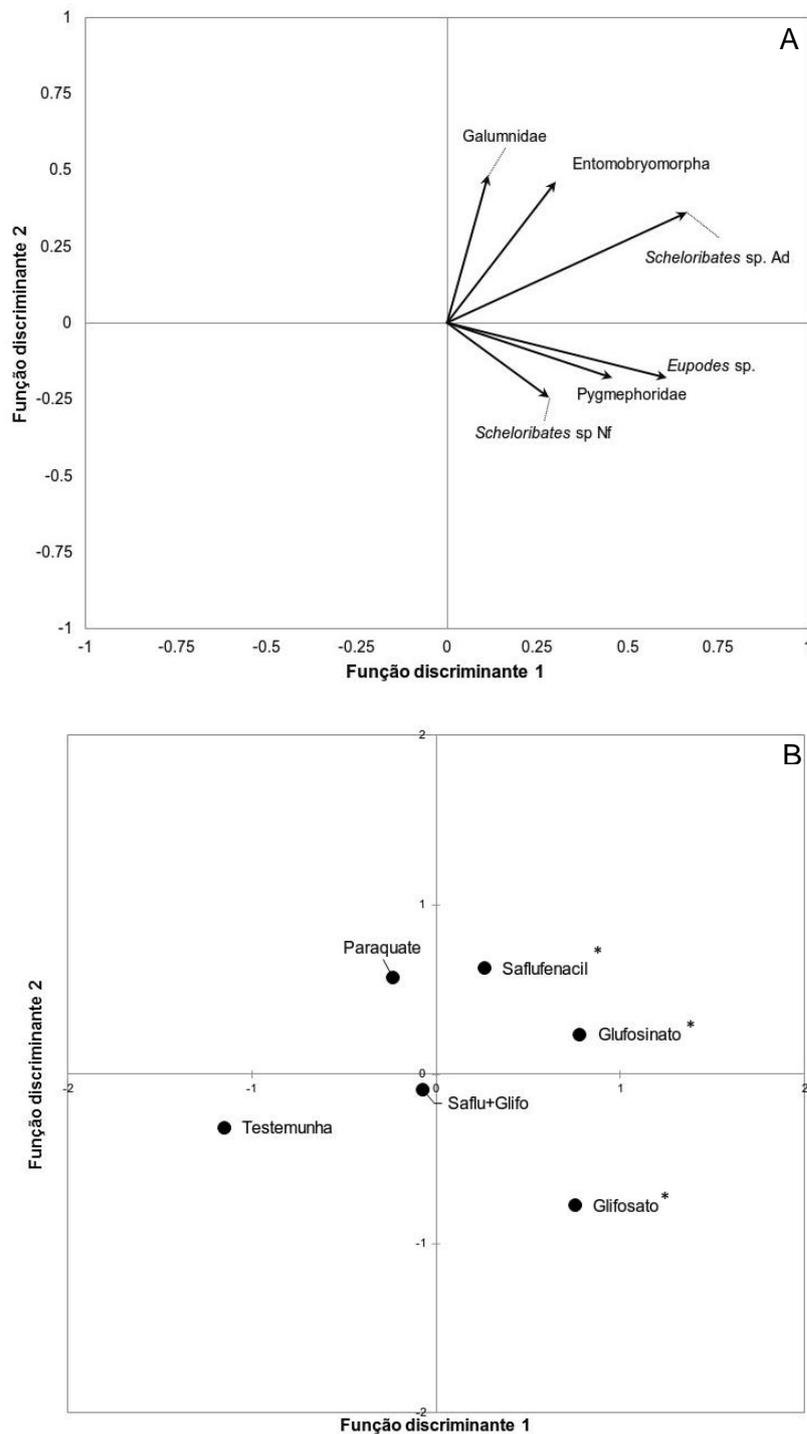


Figura 6 - Diagrama de ordenação da análise das funções canônicas discriminantes dos organismos da fauna edáfica selecionados anteriormente (análise de discriminância por STEPWISE). (A) Diagrama com vetores indicando a principal direção dos organismos. (B) Diagrama com os centroides (pontos) dos tratamentos para a 1ª e 2ª função canônica discriminante. Tratamentos com o asterisco (*) diferem da testemunha pelo teste F ($p < 0,05$), baseado na distância de Mahalanobis entre as médias dos tratamentos no ano agrícola 2010/11. Santa Maria, RS. 2014.

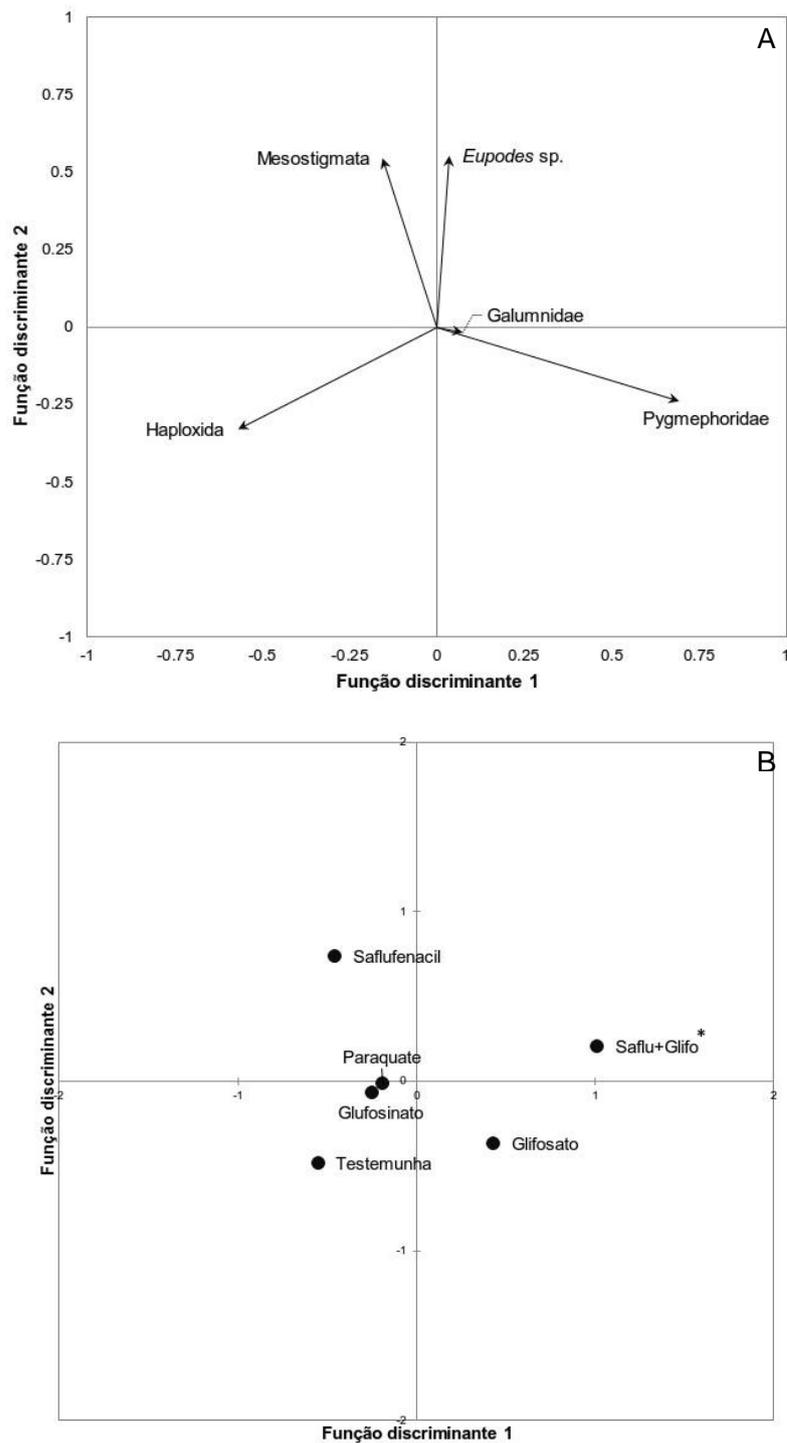


Figura 7 - Diagrama de ordenação da análise das funções canônicas discriminantes dos organismos da fauna edáfica selecionados anteriormente (análise de discriminância por STEPWISE). (A) Diagrama com vetores indicando a principal direção dos organismos. (B) Diagrama com os centroides (pontos) dos tratamentos para a 1ª e 2ª função canônica discriminante. Tratamentos com o asterisco (*) diferem da testemunha pelo teste F ($p < 0,05$), baseado na distância de Mahalanobis entre as médias dos tratamentos, no ano agrícola 2011/12. Santa Maria, RS. 2014.

Tabela 7 - Análise de variância por medidas repetidas (ANOVA-RM) da densidade dos principais táxons encontrados no solo da lavoura de soja tratada com diferentes herbicidas. Santa Maria, RS. 2014.

Fonte de variação*	2010/11			2011/12		
	G-G ¹	F	p	G-G	F	p
<i>Entomobryomorpha</i>						
TEST x GLIF	-	2,32	0,178	-	2,21	0,210
TEST x PARA	-	20,31	0,004	-	0,78	0,424
TEST x GLUF	-	10,20	0,018	-	0,00	0,976
TEST x SAFLU	-	3,30	0,118	-	0,84	0,409
TEST x SAFLU+GLIF	-	1,83	0,024	-	3,76	0,124
Tempo	2,85	2,91	0,045	2,64	1,84	0,165
Tempo x TEST x GLIF	-	0,97	0,441	-	1,51	0,24
Tempo x TEST x PARA	1,62	0,96	0,397	-	0,88	0,492
Tempo x TEST x GLUF	-	2,02	0,122	1,80	0,44	0,636
Tempo x TEST x SAFLU	1,92	0,90	0,428	-	1,89	0,160
Tempo x TEST x SAFLU e GLIF	-	1,40	0,263	6,61	0,33	0,689
<i>Eupodes sp.</i>						
TEST x GLIF	-	4,72	0,072	-	0,65	0,463
TEST x PARA	-	1,11	0,331	-	0,82	0,414
TEST x GLUF	-	7,86	0,003	-	1,67	0,265
TEST x SAFLU	-	0,25	0,631	-	2,90	0,163
TEST x SAFLU+GLIF	-	2,94	0,136	-	2,33	0,201
Tempo	2,52	20,54	0,000	-	9,18	0,000
Tempo x TEST x GLIF	-	2,44	0,074	1,15	0,15	0,748
Tempo x TEST x PARA	1,99	1,54	0,253	1,81	1,53	0,275
Tempo x TEST x GLUF	1,70	2,87	0,108	-	0,78	0,551
Tempo x TEST x SAFLU	1,92	1,15	0,346	-	1,47	0,257
Tempo x TEST x SAFLU e GLIF	2,15	1,78	0,205	-	0,91	0,479
<i>Haploxida</i>						
TEST x GLIF	-	4,62	0,075	-	1,95	0,158
TEST x PARA	-	0,00	0,960	-	0,50	0,518
TEST x GLUF	-	3,67	0,103	-	0,45	0,535
TEST x SAFLU	-	2,41	0,171	-	0,10	0,758
TEST x SAFLU+GLIF	-	1,58	0,254	-	9,52	0,036
Tempo	2,07	5,76	0,006	-	7,99	0,000
Tempo x TEST x GLIF	-	2,88	0,095	-	0,88	0,562
Tempo x TEST x PARA	-	5,69	0,018	-	0,93	0,433
Tempo x TEST x GLUF	-	4,14	0,040	-	0,94	0,428
Tempo x TEST x SAFLU	-	5,02	0,025	-	1,38	0,305
Tempo x TEST x SAFLU e GLIF	-	1,766	0,212	-	0,85	0,460

*Siglas: TEST=Testemunha (Controle), GLIF=Glifosato, PARA=Paraquat, GLUF=Glufosinato, e SAFLU=Saflufenacil.

¹Graus de liberdade do erro corrigidos pelo método de Greenhouse-Geisser.

Tabela 8 - Análise de variância por medidas repetidas da densidade dos artrópodes do solo da lavoura de soja transgênica dessecada em pré-semeadura utilizando diferentes tratamentos herbicidas. Santa Maria, RS. 2014.

Fonte de variação*	2010/11			2011/12		
	G-G ¹	F	p	G-G	F	p
<i>Pygmephoridae</i>						
TEST x GLIF	-	9,86	0,051	-	-	-
TEST x PARA	-	5,92	0,050	-	-	-
TEST x GLUF	-	3,20	0,147	-	-	-
TEST x SAFLU	-	-	-	-	-	-
TEST x SAFLU+GLIF	-	0,68	0,439	-	-	-
Tempo	-	7,57	0,000	2,42	1,75	0,186
Tempo x TEST x GLIF	-	0,89	0,499	-	-	-
Tempo x TEST x PARA	-	0,18	0,907	-	-	-
Tempo x TEST x GLUF	-	0,09	0,959	-	-	-
Tempo x TEST x SAFLU	-	0,15	0,859	-	-	-
Tempo x TEST x SAFLU e GLIF	-	0,38	0,768	-	-	-
<i>Scheloribates</i> sp.(adultos)						
TEST x GLIF	-	5,53	0,050	-	0,02	0,882
TEST x PARA	-	1,91	0,215	-	0,52	0,508
TEST x GLUF	-	16,68	0,006	-	1,45	0,294
TEST x SAFLU	-	9,61	0,021	-	0,00	0,985
TEST x SAFLU+GLIF	-	1,54	0,254	-	1,42	0,298
Tempo	2,21	21,3	<0,00	1,94	27,7	0,000
Tempo x TEST x GLIF	1,85	2,24	0,153	-	0,99	0,437
Tempo x TEST x PARA	2,18	1,87	0,191	-	0,74	0,577
Tempo x TEST x GLUF	1,84	3,87	0,055	-	1,13	0,373
Tempo x TEST x SAFLU	1,74	3,80	0,061	-	2,07	0,131
Tempo x TEST x SAFLU e GLIF	2,13	1,56	0,246	1,22	1,28	0,324
<i>Scheloribates</i> sp.(ninfas)						
TEST x GLIF	-	15,1	0,008	-	0,68	0,452
TEST x PARA	-	0,03	0,858	-	0,00	0,954
TEST x GLUF	-	32,64	0,001	-	0,33	0,863
TEST x SAFLU	-	0,55	0,484	-	2,96	0,160
TEST x SAFLU+GLIF	-	5,13	0,063	-	0,04	0,835
Tempo	2,22	24,5	<0,00	2,58	41,0	0,000
Tempo x TEST x GLIF	-	4,55	0,007	-	0,65	0,631
Tempo x TEST x PARA	-	2,67	0,056	-	4,25	0,015
Tempo x TEST x GLUF	-	16,13	0,000	-	0,33	0,851
Tempo x TEST x SAFLU	-	0,90	0,476	-	1,56	0,231
Tempo x TEST x SAFLU e GLIF	-	2,32	0,085	-	1,15	0,368

*Siglas: TEST=Testemunha (Controle), GLIF=Glifosato, PARA=Paraquat, GLUF=Glufosinato, e SAFLU=Saflufenacil.

¹Graus de liberdade do erro corrigidos pelo método de Greenhouse-Geisser.

Tabela 9 - Análise de variância por medidas repetidas da densidade dos artrópodos do solo da lavoura de soja transgênica dessecada em pré-semeadura utilizando diferentes tratamentos herbicidas. Santa Maria, RS. 2014.

Fonte de variação*	2010/11			2011/12		
	G-G ¹	F	p	G-G	F	p
Galumnidae						
TEST x GLIF	-	0,01	0,898	-	0,72	0,443
TEST x PARA	-	1,14	0,324	-	2,04	0,225
TEST x GLUF	-	7,89	0,000	-	0,81	0,417
TEST x SAFLU	-	2,37	0,174	-	1,01	0,371
TEST x SAFLU+GLIF	-	2,83	0,153	-	0,50	0,516
Tempo	2,52	15,50	0,000	2,19	9,43	0,000
Tempo x TEST x GLIF	-	0,24	0,907	1,36	1,20	0,342
Tempo x TEST x PARA	1,67	0,95	0,400	1,24	0,21	0,725
Tempo x TEST x GLUF	1,87	1,63	0,239	-	0,75	0,567
Tempo x TEST x SAFLU	-	0,67	0,617	1,26	4,79	0,075
Tempo x TEST x SAFLU e GLIF	-	0,65	0,632	-	1,75	0,188
Mesostigmata						
TEST x GLIF	-	0,79	0,406	-	0,40	0,560
TEST x PARA	-	0,658	0,448	-	0,00	0,926
TEST x GLUF	-	26,14	0,002	-	1,37	0,306
TEST x SAFLU	-	0,55	0,484	-	0,46	0,534
TEST x SAFLU+GLIF	-	0,02	0,883	-	0,18	0,688
Tempo	-	2,63	0,040	-	6,86	0,000
Tempo x TEST x GLIF	-	1,62	0,200	-	1,17	0,360
Tempo x TEST x PARA	-	4,03	0,012	-	0,77	0,554
Tempo x TEST x GLUF	-	7,49	0,000	-	0,79	0,544
Tempo x TEST x SAFLU	-	0,89	0,482	2,02	1,34	0,314
Tempo x TEST x SAFLU e GLIF	-	4,12	0,001	-	3,30	0,036

*Siglas: TEST=Testemunha (Controle), GLIF=Glifosato, PARA=Paraquat, GLUF=Glufosinato, e SAFLU=Saflufenacil.

¹Graus de liberdade do erro corrigidos pelo método de Greenhouse-Geisser.

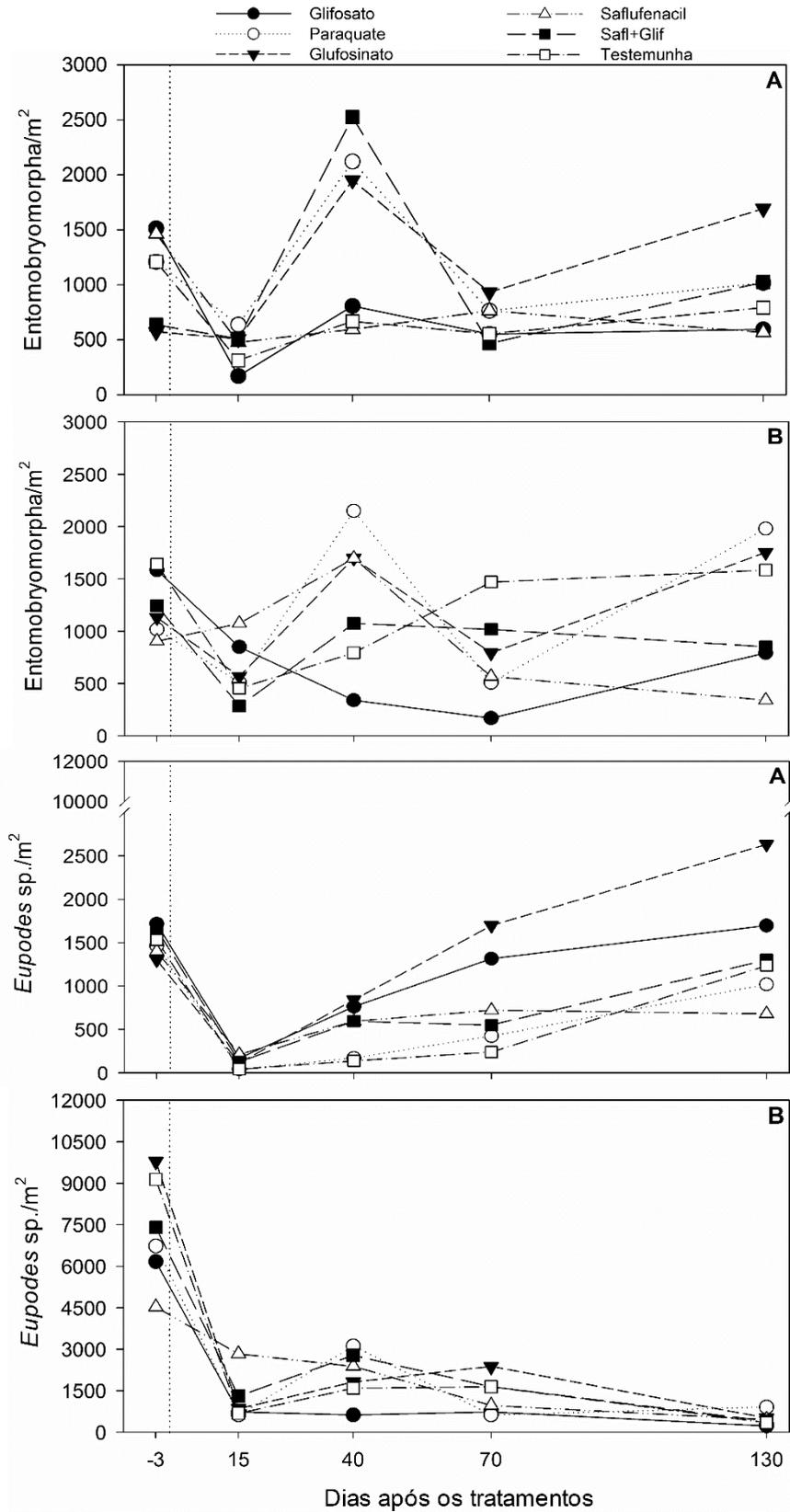


Figura 8 - Densidade média da Ordem Entomobryomorpha (Collembola) e do gênero *Eupodes* sp. (Acari) no solo de lavoura de soja tratada com diferentes herbicidas nos anos agrícolas de 2010/11 (A) e 2011/12 (B). Santa Maria, RS. 2014.

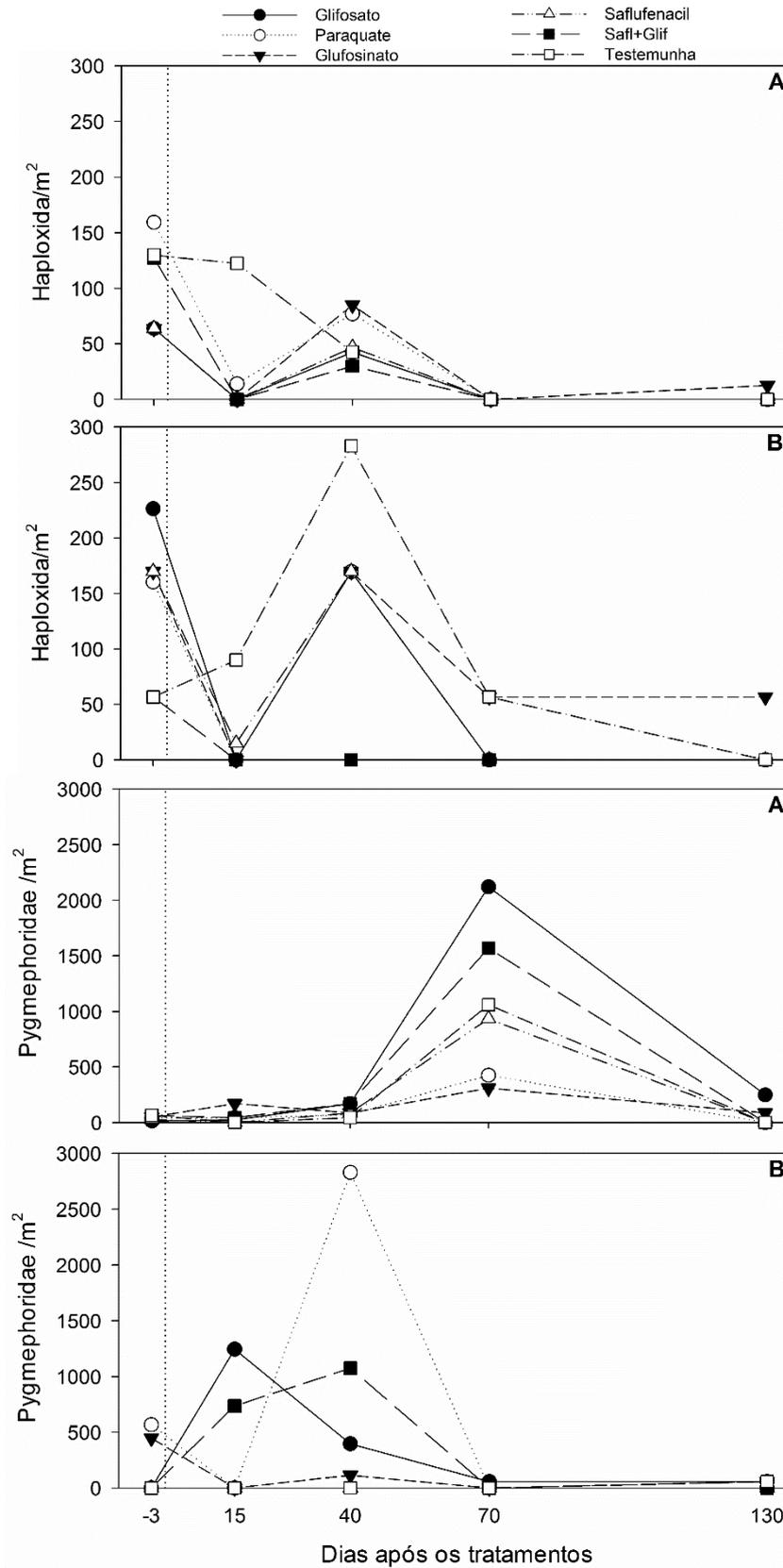


Figura 9 - Densidade média da Ordem Haploxiida e a Família Pygmephoridae (Acari) no solo de lavoura de soja tratada com diferentes herbicidas nos anos agrícolas de 2010/11 (A) e 2011/12 (B). Santa Maria, RS. 2014.

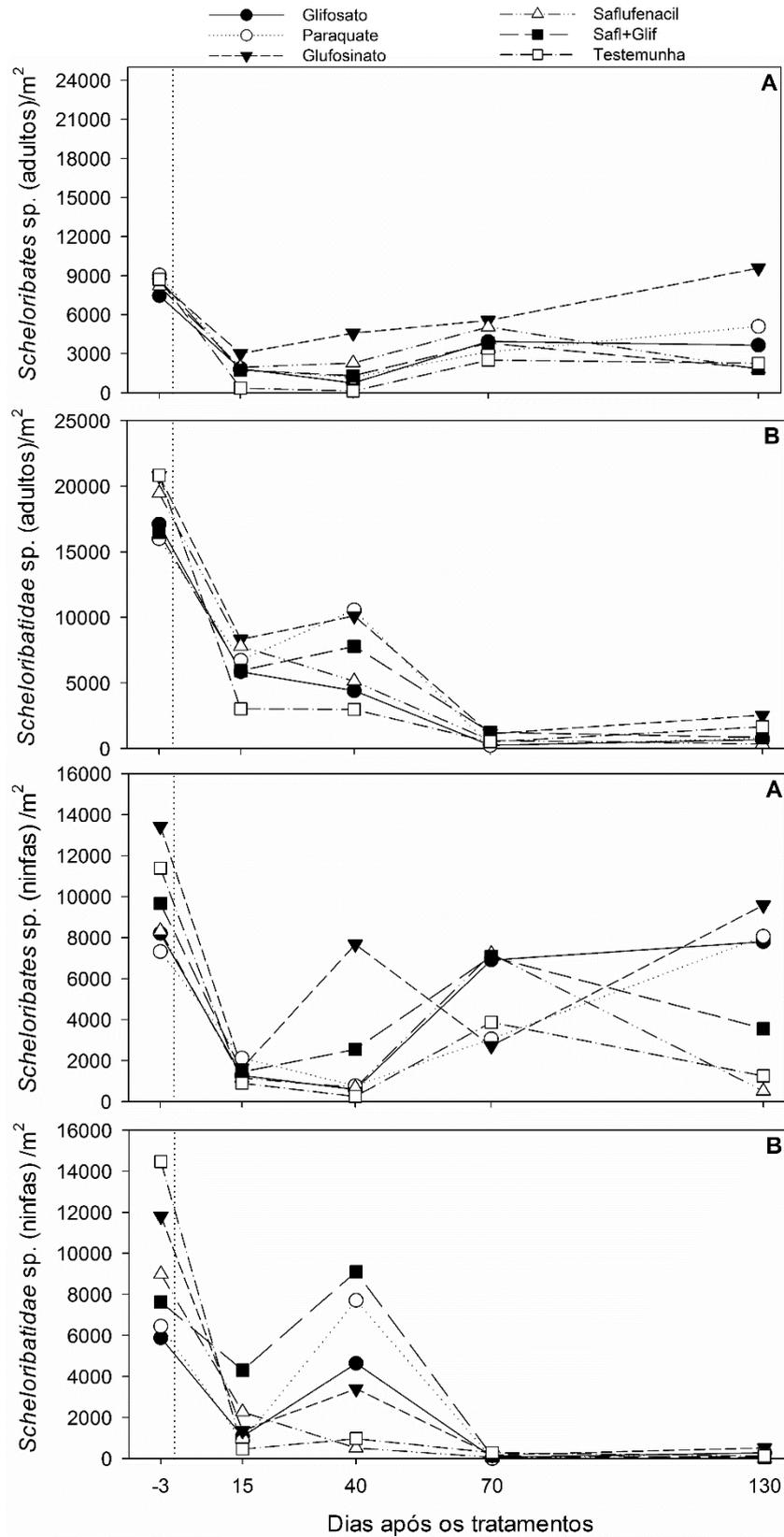


Figura 10 - Densidade média de *Schelribates* sp. adultos e ninfas no solo de lavoura de soja tratada com diferentes herbicidas nos anos agrícolas de 2010/11 (A) e 2011/12 (B). Santa Maria, RS. 2014.

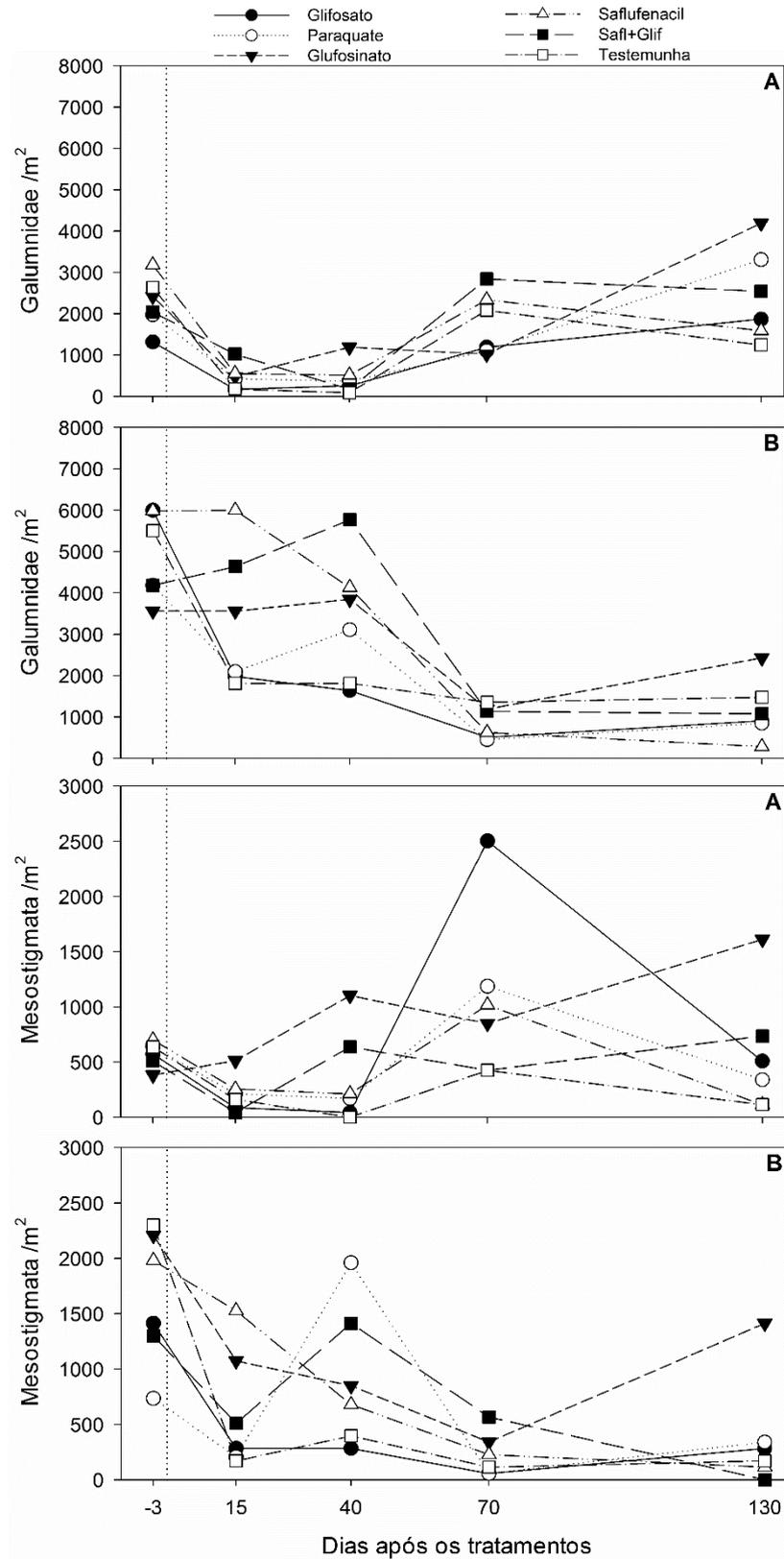


Figura 11 - Densidade média da Família Galumnidae (Acari) e da Ordem Mesostigmata (Acari) no solo de lavoura de soja tratada com diferentes herbicidas nos anos agrícolas de 2010/11 (A) e 2011/12 (B). Santa Maria, RS. 2014.

Nos tratamentos onde foi empregado o glifosato isoladamente, verificou-se um aumento significativo nas densidades dos ácaros *Eupodes* sp, Pygmephoridae, e de *Scheloribates* sp. adultos e ninfas. Nas parcelas em que foi aplicado o tratamento com herbicida paraquat proporcionou incremento da densidade dos Collembola Entomobryomorpha e os ácaros da família Pygmephoridae

O glufosinato foi o herbicida que afetou no maior número de grupos selecionados, observou-se que esse tratamento favoreceu a um aumento significativo quando comparadas a testemunha. Esse aumento se deu na população de Collembola Entomobryomorpha e dos ácaros *Eupodes* sp, *Scheloribates* sp. adultos e ninfas, Galumnidae e Mesostigmata.

Estudo em laboratório testando o efeito do glufosinato sobre ovos, juvenis e adultos da espécie de colêmbolo *Paronychiurus kimi*, mostra que efeitos sobre a sobrevivência dos ovos e adultos apenas foram observados a partir de altas concentrações de glufosinato ($314,54 \mu\text{g cm}^{-2}$) e a mortalidade apenas foi aumentou na maior dose testada ($1572,70 \mu\text{g cm}^{-2}$) (KANG et al., 2001).

O tratamento com saflufenacil mostrou maiores densidades de *Scheloribates* sp. adultos, já o tratamento onde se fez a associação do último herbicida com o glifosato, não se observa um efeito direto dos herbicidas sobre as médias, porém as densidades dos ácaros da Ordem Mesostigmata apontam um efeito significativo na interação do tratamento com as diferentes épocas de amostragem nos dois anos agrícolas, porém as densidades médias, foram numericamente superiores com este herbicida do que apresentado na testemunha.

Dentre os grupos selecionados como indicadores neste trabalho, levando em consideração efeito sobre a média das coletas (efeito do tratamento), os ácaros detritívoros *Scheloribates* sp. adultos e ninfas foram os que mostraram efeitos para o maior número dos herbicidas (três), já os ácaros predadores Galumnidae e Mesostigmata mostram efeitos significativo apenas em um herbicida.

A associação de saflufenacil e glifosato tratamento que menos afetou os organismos e mostrou não impactar diretamente a média da densidade dos grupos selecionados, quando comparados as da testemunha. Em contrapartida, com o herbicida glufosinato, a grande maioria dos grupos mostraram alteração (aumento) significativamente da sua densidade, quando comparados a testemunha.

Os resultados deste estudo mostram que, as parcelas tratadas com herbicidas, mesmo existindo diferenças na magnitude do efeito, em geral, não afetam ou levaram a um pequeno incremento nas densidades dos microartrópodes no solo, principalmente ácaros e colêmbolos quando comparados a testemunha. Esse comportamento já foi relatado em outros estudos com agrotóxicos, incluindo além de herbicidas, também inseticidas e fungicidas. Estudo realizado por Förster et al. (2006), verificando a abundância de artrópodes na serapilheira e no solo de parcelas tratadas com o fungicida carbendazim e o inseticida lambda-cialtrina, reportam não haver diferenças significativas em comparação ao controle (sem agroquímicos). Entretanto, no mesmo trabalho, esses autores observaram que o número de organismos da mesofauna geralmente foi consideravelmente mais alto nas parcelas tratadas com o inseticida lambda-cialtrina, quando comparadas ao controle.

Da mesma maneira, no atual estudo, observa-se que a Classe Entomobryomorpha de colêmbolos (Figura 8), diferiram estatisticamente da testemunha apenas nos tratamentos com o herbicida paraquat e com glufosinato. Todavia, para essa Classe, bem como para a comunidade total dos colêmbolos (Figura 5), as densidades médias também para a maioria dos demais herbicidas, mesmo não diferindo significativamente entre si, são numericamente superiores as das densidades mostradas no controle, principalmente nas primeiras duas coletas após a aplicação dos tratamentos. Esse resultado corrobora com os achados de Lins et al. (2007) que também observaram que apesar do tratamento com glifosato mostram um maior número de Collembola, embora a densidade não tenha diferido estatisticamente do controle na primeira coleta.

O comportamento encontrado neste estudo e descrito acima, corrobora com os resultados de Ferri; Eltz (1998), que mostram que a utilização de glifosato (360 e 1080 g ha⁻¹) ocorreu um aumento na população de Collembola aos 7 e 14 dias após a aplicação. Também Chang et al. (2013) mostram que no solo com o cultivo da soja tratada com o herbicida glifosato, apresentam densidades e riqueza de espécies de Collembola significativamente maiores do que no tratamento testemunha. O mesmo autor discutindo a maior população de Collembola no tratamento com herbicida, mostra que existem trabalhos que mostram que collembolas euedáficós (que vivem favoravelmente sob o solo) estão correlacionados com a biomassa de raízes de

plantas (CHANG et al., 2011; ENDLWEBER et al., 2009; STICHT et al., 2008). Desta forma, como a aplicação de herbicidas pode levar a um aumento da biomassa de raízes das plantas de soja, aliado a insuficiente toxicidade dos herbicidas, isso poderia aumentar a abundância de certos colêmbolos euedáficos.

Estudos realizados por Bohm et al. (2010), mostraram que o efeito da utilização dos herbicidas glifosato e imazetapir favorece a uma maior densidade de Collembola nesses tratamentos, quando comparados com o controle. Também, Lins et al., (2007) estudando a fauna do solo em parcelas tratadas com quatro herbicidas, encontraram na primeira coleta após a aplicação maior densidade de Collembola em comparação ao controle. Esse autor relata que o mesmo também ocorreu na terceira coleta, no tratamento com os nicosulfurom e atrazina. Estudos de Bitzer et al. (2002) apontam que o herbicida glifosato na cultura da soja transgênica, não apresenta efeito deletério sobre a população de Collembola, assim como Rebecchi et al. (2000) que sugerem que o impacto dos herbicidas da família das sulfoniluréias sobre a maioria das espécies Collembola foi insignificante no campo.

A baixa toxicidade de herbicidas sobre organismos não alvos no solo como microartrópodes, não pode explicar a causa de certas mudanças na população destes organismos como o estímulo a reprodução dos mesmos. Não existem estudos que mostrem as reais causas deste estímulo, mas existem discussões e relatos da existência de efeitos indiretos que acarretam mudanças na cadeia alimentar de organismos da mesofauna. Os ácaros oribatídeos, além de detritívoros, tem a preferência alimentar sobre várias espécies de fungos (MITCHELL; PARKINSON, 1976; KANEKO et al. 1995) assim como também os Collembola se alimentam basicamente de hifas de fungos e bactérias (FILSER, 2002). E essa interação entre microartrópodes e fungos é chave central em muitos processos no solo, tais como decomposição e ciclagem de nutrientes (BONKOWSKI et al. 2000; CORTET et al. 2003). E devido ao efeito de regulação retroativo da cadeia alimentar de decompositores do solo, qualquer efeito na população microbiana (fungos e bactérias) pode afetar e/ou beneficiar indiretamente a fauna do solo (ácaros e colêmbolos) (SALMINEN et al., 2002).

Diversos estudos mostram que alguns herbicidas afetam a microfauna do solo como fungos, microrrizas e bactérias. Um exemplo são os estudos que mostram que com o uso de herbicidas como o glifosato, existe um estímulo de parâmetros de

atividade como enzimas, respiração e mineralização de nitrogênio e da população microbiana, principalmente em fungos, que utilizam o glifosato como fonte de carbono, nitrogênio e fósforo (BUSSE et al., 2001; HANEY et al., 2002; ARAÚJO et al., 2003). Trabalho de Nicholson e Hirsch (1998) estudando o comportamento de glifosato e benomil, não observaram impacto negativo sobre a microbiota quando comparado ao controle (sem adição de pesticida). Wardle e Parkinson (1990) sugeriram que a produção de CO₂ está relacionada com a decomposição do glifosato no solo. Desta forma, segundo Haney et al., (2000), a aplicação de glifosato pode vir a estimular a atividade dos microrganismos do solo.

Os ácaros predadores Mesostigmata, que também mostraram densidades um pouco mais elevadas em alguns herbicidas. A maioria dos Mesostigmata possuem alta taxa de reprodução (BEHAN-PELLETIER, 1999), além disso, estes podem ter sido influenciados pelo aumento na abundância de nematoides bacteriófagos, como observado por Hu; Cao (2008). Nematoides são a fonte de alimento preferencial da maioria das espécies de predadores Mesostigmata (HYVÖNEN; PERSSON, 1996; KOEHLER, 1999). Aparentemente, a presença dos herbicidas no solo, por efeito diversos descritos acima, estimulou a população de microrganismos como fungos e bactérias, assim aumentando a abundância de microartrópodes no solo, especialmente os bacteriófagos e fungívoros, como os Collembola e Acari.

Rodrigues e Almeida (1998) indicam que se o herbicida for aplicado ao solo, a população de Ácaros e Collembola são potencialmente capazes de utilizá-los, aumentando sua densidade populacional até que a decomposição das substancia ocorra. Após a redução desse recurso (resíduos de herbicidas), a população retorna ao normal.

Haploxida, foi o único grupo que no geral, apresentou nos dois no ano agrícola, densidades mais baixas na primeira coleta depois da aplicação em todos os tratamentos com herbicidas em relação a testemunha, porém apenas no primeiro ano agrícola houve efeito de interação com tempo (Tabela 7 e Figura 9).

Para os organismos da mesofauna aqui encontrados, mesmo quando se observou um efeito significativo de alguns herbicidas sobre a densidade nas coletas, ao final do estudo (130 dias após o tratamento) as densidades retornaram ao nível encontrado na testemunha. Após uma inicial mudança em número em resposta a aplicação de agrotóxico, a densidades de ácaros Oribatida e Mesostigmata retornam

a níveis semelhantes aos sem o tratamento com agrotóxico (MOORE et al., 1984; TSONEV; FURNADZHIEVA, 1984; DOLES et al., 2001).

3.4 Conclusões

Glufosinato favorece o aumento de colêmbolos (Entomobryomorpha) e ácaros (detritívoros *Eupodes* sp. e *Scheloribates* sp e os predadores Galumnidae e Mesostigmata).

Paraquat favorece o aumento de colêmbolos (Entomobryomorpha) e ácaros (Pygmephoridae, *Scheloribates* sp e Mesostigmata).

A população dos ácaros (Pygmephoridae e *Scheloribates* sp) aumenta com a aplicação do glifosato; e os ácaros (*Scheloribates* sp.) com a aplicação de saflufenacil; enquanto que na associação de glifosato com saflufenacil há aumento da densidade de colêmbolos (Entomobryomorpha).

A Ordem Haplotaxida apresentou maior sensibilidade aos herbicidas glufosinato, paraquat e saflufenacil.

3.5 Referências bibliográficas

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R.; ABARKELI, R. B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. **Chemosphere**, v. 52, p. 799–804, 2003.

BEHAN-PELLETIER, V. M. Oribatid mite biodiversity in agroecosystems: role for bioindication. **Agriculture Ecosystems & Environment**, v. 74, n. 1-3, p. 411-423, 1999.

BELDEN, J. B.; LYDY, M. J. Impact of atrazine on organophosphate insecticide toxicity. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 9, p. 2266-2274, 2000.

BELLINGER, P. F.; CHRISTIANSEN, K. A.; JANSSENS, F. **Checklist of the Collembola of the world**. Disponível em: <<http://www.collembola.org>>. Acesso em: 06 jan. 2014

BITZER, R. J.; BUCKELEW, L. D.; PEDIGO, L. P. Effects of transgenic herbicide-resistant soybean varieties and systems on surface-active springtails (Entognatha : collembola). **Environmental Entomology**, v. 31, n. 3, p. 449-461, 2002.

BOHM, G. B.; CASTILHOS, D.; ROMBALDI, C. V. Manejo de soja transgênica com glifosato e imazetapir: efeito sobre a mesofauna e microbiota do solo. **Revista Thema**, v. 7, n.2, p. 1-12, 2010.

BONGERS, T.; FERRIS, H. Nematode community structure as a bioindicator in environmental monitoring. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 14, n. 6, p. 224-228, 1999.

BONKOWSKI, M. et al. Microbial–faunal interactions in the rhizosphere and effects on plant growth. *European Journal of Soil Biology*, v. 36, p. 135–147, 2000.

BRUCE, L. J. et al. The effects of cadmium and zinc-rich sewage sludge on epigeic Collembola populations. **Pedobiologia**, v. 41, n. 1-3, p. 167-172, 1997.

BUSSE, M. D., et al. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 33, p. 1777–1789, 2001.

CHANG, L. et al. Effect of tillage and farming management on Collembola in marsh soils. **Applied Soil Ecology**, v. 64, p. 112-117, 2013.

CHANG, L.; LIU, X. H.; GE, F. Effect of elevated O₃ associated with Bt cotton on the abundance, diversity and community structure of soil Collembola. **Applied Soil Ecology**, v. 47, p. 45–50, 2011.

CHAUVAT, M.; PONGE, J. F. Colonization of heavy metal-polluted soils by collembola: preliminary experiments in compartmented boxes. **Applied Soil Ecology**, v. 21, n. 2, p. 91-106, 2002.

CORREIA, M. E. F.; OLIVEIRA, L. C. M. **Importância da fauna para a ciclagem de nutrientes**. In: AQUINO, A. M.; ASSIS, R. L. (Ed.). *Processos biológicos no sistema solo-planta: ferramentas para a agricultura sustentável*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, p. 18-29, 2005.

CORTET, J. et al. Increasing species and trophic diversity of mesofauna affects fungal biomass, mesofauna community structure and organic matter decomposition processes. **Biology and Fertility of Soils**, v. 37, p. 302 –312, 2003.

DIXON, W. J. **BMDP statistical software manual: To accompany the 7.0 software release**. University of California Press; Berkeley, CA, 1992.

DOLES, J. L.; ZIMMERMAN, R. J.; MOORE, J. C. Soil micro-arthropod community structure and dynamics in organic and conventionally managed apple orchards in Western Colorado, USA. **Applied Soil Ecology**, v. 18, p. 83–96, 2001.

EDWARDS, C. A. Impact of herbicides on soil ecosystems. **Critical Review in Plant Science**, v. 8, p. 221-257, 1989.

EDWARDS, C. A.; STAFFORD, C. J. Interaction between herbicides and soil fauna. **Annual of Applied Biology**, v. 91, p. 132 -137, 1979.

EIJSACKERS, H.; BUND, C. F. van de. **Effects on soil fauna** In: HANCE, R.J. (Ed.) Interactions between herbicides and the soil. London: Academic Press, 1980. p. 255-305.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema brasileiro de classificação de solos. 3.ed. Brasília, Embrapa, 2013. 353p.

ENDLWEBER, K.; RUESS, L.; SCHEU, S. Collembola switch diet in presence of plant roots thereby functioning as herbivores. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 41, p. 1151–1154, 2009.

FERRI, M. V. W.; ELTZ, F. L. F. Influência do Glifosate, Isolado ou Misturado com 2,4-D Éster sobre a Mesofauna em Semeadura Direta de Soja em Campo Nativo. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**. v. 4, p. 131-138, 1998.

FILSER, J. The role of Collembola in carbon and nitrogen cycling in soil. **Pedobiologia** v. 46, p. 234–245, 2002.

FINNAMORE, A. T.; WINCHESTER N. N.; BEHAN-PELLETIER, V. M. **Protocols for measuring biodiversity: arthropod monitoring in terrestrial ecosystems**. 2008. Disponível em: <<http://www.eman-rese.ca/eman/ecotools/protocols/terrestrial/arthropods/soil-litt.html>>. Acesso em: 29 jan. 2012.

FORSTER, B. et al. Effects of carbendazim and lambda-cyhalothrin on soil invertebrates and leaf litter decomposition in semi-field and field tests under tropical

conditions (Amazonia, Brazil). **European Journal of Soil Biology**, v. 42, p. 171-179, 2006.

FOX, C. J .B. The effects of five herbicides on the number of certain invertebrate animals in grassland soil. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 44, p. 405–409, 1964.

GILLET, S.; PONGE, J. F. Changes in species assemblages and diets of Collembola along a gradient of metal pollution. **Applied Soil Ecology**, v. 22, n. 2, p. 127-138, 2003.

GORMSEN, D.; HEDLUND, K.; HUIFU, W. Diversity of soil mite communities when managing plant communities on set-aside arable land. **Applied Soil Ecology**. v. 31, p. 147–158, 2006.

HANEY, R. L. et al., Soil carbon and nitrogen mineralization as affected by atrazine and glyphosate. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, p. 35–40, 2002.

HANEY, R. L.; SENSEMAN, A. S.; HONS, E. M. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. **Weed Science**, v.48, n.1, p. 89-93, 2000.

HAQUE, A.; DAS GUPTA, R.; CHAKRAVORTY, P. P. Effect of Two Herbicides on *Xenylla Welchi* (Hexapoda:Collembola) Under Laboratory Conditions. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 86, n. 6, p. 583–586, 2011.

HEAL, O. W.; DIGHTON, J. **Resource quality and trophic structure in the soil system**. In: Fitter, A. H., et al. Ed. Ecological interactions in soil. n. 4: p. 339–354, 1985.

HU, C.; CAO, Z. P. Nematode Community Structure under Compost and Chemical Fertilizer Management Practice, in the North China Plain. **Experimental Agriculture**, v. 44, n. 4, p. 485-496, 2008.

HYVÖNEN, R.; PERSSON, T. Effects of fungivorous and predatory arthropods on nematodes and tardigrades in microcosms with coniferous forest soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 21, n. 1-2, p. 121-127, 1996.

KANEKO, N.; MCLEAN, M.A.; PARKINSON, D., Grazing preference of, *Onychyurus subtenuis* (Collembola) and , *Opiella nova* (Oribatei) for fungal species inoculated on pine needles. **Pedobiologia**, v. 39, p. 538 – 546, 1995.

KANG, S. et al. Demography of *Paronychiurus kimi* (Lee) (Collembola: Onychiuridae) under the influence of glufosinate-ammonium on plaster charcoal substrate and in artificial soil. **Applied Soil Ecology**, v. 18, p. 39-45, 2001.

KRANTZ, G. W. **A manual of acarology**. Oregon: O.S.U. Book Stores, 1970, 335p.

KEDWARDS, T. J.; MAUND, S. J.; CHAPMAN, P. F. Community level analysis of ecotoxicological field studies. I. biological monitoring. **Environmental Toxicology and Chemistry**, n. 18, p. 149-157. 1999.

KOEHLER, H. H. Predatory mites (Gamasina, Mesostigmata). **Agriculture and Ecosystem Environmental**, v. 74, p. 395–410, 1999.

LAVELLE, P.; SPAIN, A. V. **Soil Ecology**. Kluwer Academic Publisher, Dordrecht. 2001.

LAVELLE, P. Soil as a habitat. In. Soil Ecology and Environmental Services. Ed. Wall, D. H. p. 7-12. Oxford: Oxford University Press.

LAVELLE, P. et al. **The relationship between soil macrofauna and tropical soil fertility**. In The Biological Management of Tropical Soil (eds. M.J. Swift and P. Wooster), John Wiley & Sons, New York, p. 137-169, 1994.

LINS, V. S.; SANTOS, H.; GONCALVES, M. C. The effect of the glyphosate, 2,4-D, atrazine e nicosulfuron herbicides upon the edaphic collembola (Arthropoda: Ellipura) in a no tillage system. **Neotropical Entomology**, v. 36, n. 2, p. 261–267, 2007.

MACFADYEN, A. Improved Funnel-Type Extractors for Soil Arthropods. **Journal of Animal Ecology**, v. 30, n. 1, p. 171-184, 1961.

MARJORIE, A. H. **Soil mites**. In John L. Capinera. Encyclopedia of Entomology, v. 1, ed. 2. Springer. p. 3463–3466. 2008.

MITCHELL, M. W.; PARKINSON, D. Fungal feeding of oribatid mites (Acari: Cryptostigmata) in an aspen woodland soil. **Ecology**, v. 57, p. 302–312, 1976.

MOORE, J. C.; SNIDER, R. J.; ROBERTSON, L. S. Effects of different tillage practices on Collembola and Acarina in corn production systems. 1. The effects of no-tillage and Atrazine. **Pedobiologia**, v. 26, p. 143–152, 1984.

MORENO, J. A. **Clima do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, Secretaria da Agricultura, 42p, 1961.

NEHER, D. A. **Nematode communities as ecological indicators of agroecosystem health**. In: Gliessman, S.R. (Ed.), *Agroecosystem Sustainability: Developing Practical Strategies*. CRC Press, Boca Raton, FL, p. 105–120, 2001.

NICHOLSON, P. S.; HIRSCH, P. R. The effects of pesticides on the diversity of culturable soil bacteria. **Journal Applied Microbiology**, v. 84, p. 551-558, 1998.

PAOLETTI, M. G.; BRESSAN, M. Soil invertebrates as bioindicators of human disturbance. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 15, n. 1, p. 21-62, 1996.

PAOLO, A. G. et al. Assessment of soil-quality index based on microarthropods in corn cultivation in Northern Italy. **Ecological Indicators**, v. 10, n. 2, p. 129-135, 2010.

PONGE, J. F. et al. Collembolan communities as bioindicators of land use intensification. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 35, n. 6, p. 813-826, 2003.

POPOVICI, I. et al. The influence of atrazine on soil fauna. **Pedobiologia**, v. 7, p.209-215, 1977.

REBECCHI, L. et al. Effects of a sulfonylurea herbicide on soil microarthropods. **Biology and Fertility of Soils**, v. 30, p. 312–317, 2000.

RENAUD, A. et al. Influence of four soil maintenance practices on Collembola communities in a Mediterranean vineyard. **Pedobiologia**, v. 48, p. 623-630, 2004.

REUNIÃO DE PESQUISA DE SOJA DA REGIÃO SUL, 38, 2010, Cruz Alta. **Indicações técnicas para a cultura da soja no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina 2010/2011 e 2011/2012**. Cruz Alta: Fundacep Fecotrig, 2010. 168p.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**, 4.ed. Londrina: 1998. 647p.

RUF, A. A maturity index for predatory soil mites (Mesostigmata: Gamasina) as an indicator of environmental impacts of pollution on forest soils. **Applied Soil Ecology**, v. 9, n. 1-3, p. 447-452, 1998.

SABATINI, M. A. et al. Side effects of the herbicide triasulfuron on collembola under laboratory conditions. **Chemosphere**, v. 37, p. 2963–2973. 1998.

SALMINEN, J.; LIIRI, M.; HAIMI, J. Responses of microbial activity and decomposer organisms to contamination in microcosms containing coniferous forest soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 53, p. 93–103, 2002.

SAS Institute. **SAS 9.1.3 service pack3**. Cary, NC, 2003.

SIEPEL, H. Applications of microarthropod life-history tactics in nature management and ecotoxicology. **Biology and Fertility of Soils**, v. 19, p. 75–83, 1995.

SINGH, J.; PILLAI, K. S. A study of soil microarthropod communities in some fields. **Revue d'Ecologie et Biologie du Sol**, v. 12, n. 3, p. 579-590, 1975.

STICHT, C. et al. Atmospheric CO₂ enrichment induces life strategy- and species-specific responses of collembolans in the rhizosphere of sugar beet and winter wheat. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 1432–1445, 2008.

SUBAGJA, J.; SNIDER, R. J. The side effects of the herbicides atrazine and paraquat upon *Folsomia candida* and *Tullbergia granulata* (Insecta, Collembola). **Pedobiologia**, v. 22, n. 3, p. 141-152, 1981.

TSONEV, I.; FURNADZHIEVA, N. An effect of the herbicide combination of lenacil and etofumezat on oribatid community structure (Oribatei, Acari) in agroecosystems. **Godishnik na Sofiiskiya Universitet Kliment Okhridski Biologicheski Fakultet**, v. 75, p. 44–52, 1984.

VAN GESTEL, C. A. M.; DOORNEKAMP, A. **Tests on the Oribatid Mite *Platynothrus peltifer***. In: Løkke, H.; C. A. M. Van Gestel (eds): Handbook of soil invertebrate toxicity tests. J. Wiley & Sons, Chichester, UK: 113–130, 1998.

VAN STRAALLEN, N. Evaluation of bioindicator systems derived from soil arthropod communities. **Applied Soil Ecology**, v. 24, p. 1673-1675, 1998.

VEREIJKEN, P. From conventional to integrated agriculture. **Netherlands Journal of Agricultural Science**, v. 34, p. 387–393, 1986.

WALTER, D. E.; H. C. PROCTOR. **Mites: ecology, evolution, and behaviour**. CABI Publishing, Wallingford, UK: 322 p. 1999.

WARDLE, D. A.; PARKINSON, D. Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. **Plant and Soil**, v.122, p.21-28, 1990.

WURST, S.; De DEVN, B.; ORWIN, K. Soil biodiversity and functions. In. *Soil Ecology and Environmental Services*. Ed. Wall, D. H. p. 28-41. Oxford: Oxford University Press.

4 CAPÍTULO II: CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE HERBICIDAS DESSECANTES USANDO BIOENSAIOS COM *Allium cepa* L.

RESUMO

O presente estudo avaliou o potencial citotóxico e genotoxicológico dos herbicidas glifosato, glufosinato, paraquat e saflufenacil usando o teste de *Allium cepa* L. Foram testados a formulação comercial e produto técnico nas seguintes concentrações: glifosato (5,10 e 26ppm), glufosinato (4, 7 e 18ppm), paraquat (2, 4 e 11ppm) e saflufenacil (0,25, 0,50 e 1,25ppm) além do controle positivo usando o metil metano sulfonato (10, 20 e 50ppm) e negativo (água destilada). Características microscópicas como: fases mitóticas, índice mitótico, taxa e tipos de aberrações cromossômicas foram avaliadas. Os resultados mostraram que a formulação comercial e o padrão analítico do glifosato não apresentaram efeito citotóxico nas concentrações de 5, 10 ou 26ppm em células de *A. cepa*; e apenas a formulação comercial apresentou ação genotóxica. Glufosinato não apresentou ação citotóxica, porém em células da planta teste se evidenciou pouca ação genotóxica. A formulação comercial de paraquat reduziu a divisão celular nas concentrações testadas (2, 4 e 11ppm), sem evidências de ação genotóxica. Saflufenacil não afetou a divisão celular e apresentou fraca ação genotóxica na concentração de 0,25ppm em células da planta teste.

Palavras-chave: Glifosato. Glufosinato. Paraquat. Saflufenacil. Índice mitótico.

ABSTRACT

The cytotoxic and genotoxicological potency of glyphosate, ammonium-gluphosinate, paraquat and saflufenacil herbicides was screened using *Allium cepa* L. test. Both commercial formulation and analytic standards using following

concentrations: glyphosate (5, 10 and 26ppm), ammonium-gluphosinate (4, 7 and 18ppm), paraquat (2, 4 and 11ppm) and saflufenacil (0.25, 0.50 and 1.25ppm) besides a positive control using methyl methanesulphonate (10, 20 and 50ppm) and negative control (distilled water). Each treatment was made of three repetitions with four replicates. Some microscopic characteristics as mitotic and phase indexes and chromosomal aberration rate and types were evaluated. Results showed that the glyphosate commercial formulation and analytical standard did not show cytotoxic effect at 5, 10 or 26ppm concentrations over the *A. cepa* cells; and only commercial formulation presented genotoxic. The gluphosinate shows no cytotoxic action, but on test plant cells were evidenced weak genotoxic. Paraquat commercial formulation reduced cell division at the test concentrations (2, 4 and 11ppm) without genotoxic evidence. Saflufenacil did not affect cell division and express a weak genotoxicity using 0,25ppm concentration in plant cells test.

Keywords: Glyphosate. Ammonium-gluphosinate. Paraquat. Saflufenacil. Mitotic index.

4.1 Introdução

O uso de herbicidas, pode ser considerado como uma ferramenta altamente sofisticada e eficiente no controle de plantas daninhas. Desde 2007, herbicidas assumiram o primeiro posto entre três das maiores categorias de agrotóxicos (inseticidas, fungicidas/bactericidas e herbicidas) (ZHANG et al., 2011). Hoje, os herbicidas são as substâncias químicas mais usadas no mundo (HE et al., 2012).

O emprego dos herbicidas para controlar plantas daninhas, tem sido uma prática comum na agricultura global, sempre com o objetivo de aumento na produtividade das culturas. Entretanto, quando essas substâncias são empregadas descontroladamente, podem causar impacto em organismos não-alvos, como os que vivem no ambiente, incluindo os seres humanos (NWANI et al., 2011).

Devido a toxicidade inerente e persistência na natureza, pesticidas tem contribuído para degradar ecossistemas (JOY et al., 2005). Esse uso, pode levar também a presença de resíduos na cadeia alimentar e consumidores podem ser exposto a baixos níveis dessas substância química (GRAILLOT et a., 2012). Muitos estudos epidemiológicos publicados durante as últimas duas décadas sugerem um efeito prejudicial dos pesticidas para saúde humana, incluindo a possível relação entre uso de pesticidas e a geração de efeitos transmissíveis de longo prazo, pois recentes estudos tem demonstrado que alguns deles podem interferir com o metabolismo do DNA (MINEAU, 2005) e serem relacionados a canceres tais como linfoma, leucemia e vários outros tipos dos tumores. E muitos desses efeitos tem sido relatado em exposição profissional (MERHI et al., 2007 e WEICHENTHAL et al., 2010). Porém, de acordo com CHEVREUIL et al. (1996), KIM; FEAGLEY (1998) e ABDEL-RAMHAM et al., (1999) a maioria dos efeitos tóxicos dos herbicidas em animais e vegetais foi insuficientemente investigado.

Um dos possíveis efeitos dos herbicidas é mutagenicidade que, pode resultar de várias reações com os organismos, como um efeito direto do composto no DNA nuclear, incorporação no DNA durante a replicação e interferência na atividade de divisão mitótica, resultando na incorreta divisão da célula (TIMBRELL, 1999).

A análise da genotoxicidade dos agrotóxicos é importante para acessar o risco genético não somente dos seres humanos expostos, mas de toda a biota nativa de

determinado local. Desta maneira, a detecção e o entendimento das propriedades desses agentes permitem avaliar os efeitos hereditários deletérios, ou mesmo letais, para os organismos (DALLEGRAVE, 2006).

Houve um grande interesse em desenvolver teste de genotoxicidade que fossem rápidos e simples, para identificar substâncias com atividade genotóxica (OBE, 2004). Nos últimos anos, o uso de plantas no biomonitoramento da presença de agentes genotóxicos no meio ambiente tem fortemente aumentado, devido ao fato de eles apresentarem boa indicação dos efeitos citogenéticos e mutagênicos de muitos poluentes ambientais; plantas como *Allium cepa* L., *Arabidopsis thaliana* L., *Hordeum vulgare* L. e *Vicia faba* L. tem sido considerado como plantas modelo de testes de genotoxicidade (CABRERA e RODRIGUEZ 1999; ABDEL MIGID et al. 2007). Ma et al., (1995) citam que *A. cepa* L. e *Vicia faba* L. são eficientes sistemas teste para micronúcleos e aberrações cromossômicas.

Entre todos os modelos citados acima, o teste com *A. cepa* L., é um dos melhores estabelecidos sistemas de teste usados para determinar a toxicidade em laboratório (LIMAN et al., 2010, YILDIZ et al., 2009, KONUK et al., 2007). Além do mais, este sistema é bem correlacionado com dados obtidos usando sistemas eucarióticos e procariotos (MATSUMOTO et al., 2006; CHAUHAN, et al., 1999 e GRANT, 1994). Estudos mostram uma concordância entre o teste em sistemas vegetais e em sistemas mamíferos de 75 a 91,5% (GROVER et al., 1990; GRANT, 1982). Utilizando-se de células meristemáticas de *A. cepa* L., Chauhan et al. (1999), estudaram o potencial genotóxico dos inseticidas cipermetrina e fenvalerato, sendo que os resultados obtidos tiveram boa correlação com o sistema teste de mamíferos, indicando o uso do teste de *A. cepa* como uma alternativa para o monitoramento do potencial genotóxico de vários compostos químicos. A partir desse contexto, torna-se importante que o conhecimento sobre a toxicidade e a genotoxicidade de alguns dos herbicidas atualmente utilizados no cultivo da soja.

O objetivo do presente estudo foi de avaliar o potencial citotóxico e genotóxico de glifosato, glufosinato, paraquat e saflufenacil utilizando bioensaio com *A. cepa* L.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Condições Experimentais

O experimento foi conduzido no Laboratório de Citogenética Vegetal e Genotoxicidade do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria - RS.

As células meristemáticas das radículas de *A. cepa* L. (cultivar Baia Periforme) foram utilizadas como sistema teste para avaliar as alterações celulares e alterações cromossômicas estruturais. Foram usados bulbos de cebola, limpos e saudáveis (livre de infecções fúngicas ou bacterianas) ou livres de quaisquer outras alterações visuais. Estes bulbos, após passarem por uma limpeza onde fez-se a remoção das raízes velhas, foram postos para enraizar em água destilada mantendo apenas a parte basal submersa e mantidos a temperatura ambiente no laboratório durante três dias, até as raízes novas atingirem no mínimo 1cm de comprimento. A água destilada era diariamente renovada.

4.2.2 Tratamentos

Os tratamentos que foram utilizados no experimento foram compostos pelos mesmos quatro herbicidas testados no capítulo I, e são descritos a seguir. Tratamento de glifosato (N-(fosfonometil)glicina) sal de isopropilamina, usando a formulação comercial Roundup Original[®] (360gL⁻¹ de equivalente ácido de glifosato) (Monsanto[®]) e o padrão de glifosato de 99,9% de pureza; glufosinato de amônio (4-hidroxi(metil) fosfinol-DL-holoalanina sal de amônio), formulação comercial Finale[®] (200gL⁻¹ de equivalente glufosinato sal de amônio) (Bayer[®]) e o padrão glufosinato de 99,2% de pureza; paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto), formulação comercial Gramoxone[®] (200gL⁻¹ de paraquat) (Syngenta[®]) e o padrão de dicloreto de paraquat de 99,9% de pureza e saflufenacil N'-(2-chloro-4-fluoro-5-[1,2,3,6-

tetrahydro-3-methyl-2,6-dioxo-4-(trifluoromethyl) pyrimidin-1-yl]benzoyl}N-iso-propyl-N-methylsulfamide), formulação comercial Heat[®] (700g kg⁻¹ de saflufenacil) (BASF[®]) e o padrão de saflufenacil de 99,9% de pureza.

Todos herbicidas na formulação comercial foram adquiridos em revenda autorizada local e os padrões foram adquiridos junto a Sigma Aldrich Co. (St. Louis, Mo, USA). Além dos tratamentos com herbicidas, também foram usados dois tratamentos controle negativo e um positivo, para negativo, foi apenas água destilada. Como controle positivo, como recomendado pelo International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (TICE et al., 2000) foi usado o agente mutagênico alquilante, metil metano sulfonato (MMS – 98% pureza).

Para ambos, produtos comerciais e padrões, foram testados três concentrações, baseadas em estimativas teóricas (Tabela 1). A obtenção destas concentrações foi baseada em cálculo teórico, no qual levou-se em consideração a dose usual recomendada para os herbicidas por hectare e o volume de solo por hectare. Para isso considerou-se que a dose recomendada dilua-se numa área que compreenda 10.000,00m² de superfície por 0,01m de profundidade, totalizando um volume de 100.000L de solo ou 140.000Kg de solo (densidade de 1,40g cm⁻³). A partir da concentração base (1X), foram testadas outras duas concentrações, 2X e 5X a concentração base.

Os bulbos permaneceram em água destilada por três dias, após atingirem o comprimento de suas raízes com pelo menos 1cm. Após, foram expostos aos 28 tratamentos (Tabela 1), por 24 horas. Cada tratamento foi composto por três repetições (três bulbos) escolhidos aleatoriamente. Para o tratamento controle negativo, fez-se a renovação da água destilada, empregando a mesma água usada nas soluções estoque dos tratamentos químicos. Transcorridos 24 horas, as raízes foram cortadas do bulbo e imediatamente fixadas em solução fixadora Carnoy (etanol 99%: ácido acético glacial), na proporção de 3:1 v/v durante 24 horas. Em seguida, foram armazenadas em etanol 70% e mantidas sob refrigeração ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) até a confecção das lâminas histológicas de acordo com metodologia descrita por Fiskejő (1985).

Tabela 1 - Tratamentos e concentrações testadas e as suas equivalências em doses do produto comercial. Santa Maria, RS. 2014.

Tratamentos	Concentrações (ppm)	Doses equivalentes ¹	
		g (e.a. ou i.a) ha ⁻¹	L ou g do p.c. ha ⁻¹
Herbicidas			
Glifosato	5,1	720	2,0
	10,3	1440	4,0
	25,7	3600	10
Glufosinato	3,6	500	2,5
	7,1	1000	5,0
	17,9	2500	12,5
Paraquat	2,1	300	1,5
	4,3	600	3,0
	10,7	1500	7,5
Saflufenacil	0,25	35	50
	0,50	70	100
	1,25	175	250
Controle positivo			
MMS ²	10	-	-
	20	-	-
	50	-	-
Controle negativo			
Água destilada	-	-	-

¹e.a. ou i.a =gramas de equivalente ácido ou ingrediente ativo por hectare; p.c.= litros ou gramas do produto comercial por hectare

²Metil metano sulfonato

4.2.3 Análise do ciclo celular de *Allium cepa* L.

Cada tratamento foi composto por três repetições (três bulbos de cebola), sendo que cada bulbo teve quatro raízes avaliadas. Com aproximadamente 1cm, as raízes foram lavadas em água destilada e hidrolisadas em HCl 1N por 5 minutos. Após, foram lavados em água destilada. Com auxílio de uma pinça de ponta fina e lâmina de bisturi foi removida a região meristemática da raiz, desprezando-se a coifa, e logo em seguida o material foi corado comorceína acética 2% (GUERRA; SOUZA, 2002). O tecido meristemático juntamente com o corante foi esmagado com

auxílio de um bastão de vidro e sobre o material colocou-se a lamínula. Para cada raiz foi preparada uma lâmina e em cada uma delas, 500 células foram contadas, totalizando 2000 células por bulbo e 6000 para cada um dos tratamentos.

As contagens e avaliações foram realizadas com auxílio de um microscópio óptico com uma objetiva de 40X, sendo observada em cada célula a ocorrência de divisão celular e de alterações cromossômicas estruturais.

4.2.4 Análise de dados

O percentual de índice mitótico (IM), foi calculado pela fórmula de Pires et al., (2001):

$$IM(\%) = \frac{NTCD}{NTC} \times 100$$

onde,

NTCD= Número total de células em divisão contadas.

NTC= Número total de células contadas.

Os valores do IM foram testados para a hipótese de normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk a 5% de probabilidade de erro. A análise estatística para comparação dos valores do IM foi realizada através da análise de variância (ANOVA) e a comparação entre as médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

4.3 Resultados e discussão

O efeito do glifosato no índice mitótico nas células meristemáticas das raízes de *A. cepa* expostas por 24h, estão apresentados na Tabela 2. Não houve diferença

significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações de glifosato testadas e o controle, entre o uso da formulação comercial ou apenas o ingrediente ativo. Mesmo não sendo significativas ($p < 0,05$), nas duas maiores concentrações da formulação comercial e na maior do ingrediente ativo o índice mitótico foi numericamente mais baixo, quando comparado as demais concentrações e controles (positivos e negativos) (Tabela 2). Uma redução do índice mitótico de células de *A. cepa* também foi encontrada por Rank et al., (1993) na maior concentração de glifosato (2,8ppm) usando a formulação comercial do mesmo. A inibição do índice mitótico pode ser atribuída a um efeito do composto testado sobre o DNA/síntese de proteína (LOCKARD et al., 1982).

Tabela 2 - Número total, em interfase, divisão e índice mitótico de células meristemáticas de pontas de raízes de *A. cepa* L., tratadas com diferentes concentrações do herbicida glifosato na sua formulação comercial e equivalente ácido. Santa Maria, RS. 2014.

Concentrações (ppm) ¹	Células			Índice Mitótico (%)
	Total	Interfase	Divisão	
Controle	6000	5745 ± 6	255 ± 6	4,24 ± 0,30 ab*
Glifosato (PC)				
5	6000	5719 ± 8	281 ± 8	4,68 ± 0,38 ab
10	6000	5799 ± 10	201 ± 10	3,35 ± 0,50 ab
26	6000	5853 ± 12	147 ± 12	2,44 ± 0,61 ab
Glifosato (EA)				
5	6000	5711 ± 26	289 ± 26	4,8 ± 1 ab
10	6000	5711 ± 19	289 ± 19	4,8 ± 0,96 ab
26	6000	5907 ± 9	93 ± 9	1,6 ± 0,46 b
MMS ²				
10	6000	5734 ± 5	266 ± 5	4,43 ± 0,26 ab
20	6000	5698 ± 15	302 ± 15	5,03 ± 0,76 a
50	6000	5724 ± 4	276 ± 3	4,61 ± 0,19 ab

Dados expressos como média ± erro padrão, $n=3$ lâminas/tratamento.

*Significância estatística para o índice mitótico (ANOVA) $p < 0,05$, teste de Tukey.

¹PC=produto comercial, EA=equivalente ácido, MMS=metil metano sulfonato.

Esses resultados revelam que o efeito da formulação comercial do glifosato no índice mitótico de células de raízes de *A. cepa* depende da sua dose. Não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as concentrações de glifosato testadas e o controle, independentemente entre o uso da formulação comercial ou apenas o ingrediente ativo. Mesmo não sendo significativas ($p < 0,05$), nas duas maiores concentrações da formulação comercial e na maior do ingrediente ativo o índice mitótico foi numericamente mais baixo, quando comparado as demais concentrações e controles (positivos e negativos) (Tabela 2).

Resultados dos efeitos na aberrações cromossômicas e formação de micronúcleos com glifosato são mostrados na Tabela 3. A formulação comercial do glifosato causou a presença de aberrações cromossômicas em todas as concentrações testadas, e um aumento na frequência com o aumento na concentração. Já com o uso do ingrediente ativo isolado, não foram encontradas aberrações nas células expostas. Nove tipos de aberrações foram observados: pontes, anomalias de fuso, desorganizadas, cromossomos aderentes, cromossomos perdidos, quebras, binucleadas e cromossomos atrasados (APÊNDICE A). A presença de pontes durante anáfase foi a anormalidade mais comum com o glifosato na formulação comercial. As pontes anafásicas, bem como o aparecimento de cromossomos atrasados ou retardatário, também presentes na maior dose (26ppm), segundo Saxena et al., (2010), são defeitos de segregação do cromossomo, o qual pode ser ligado a atividade mutagênica deste herbicida, já reportados em estudos anteriores (LI; LONG, 1988; LIOI et al., 1998; KAYA et al., 2000; MONROY et al., 2005;). A formação de pontes anafásicas ocorre provavelmente devido a excessiva aderência dos cromossomos durante o estágio de metáfase causando anáfases anormais, ou pode ser o resultado da translocação desigual ou inversão dos segmentos cromossômicos (SAXENA et al., 2010). Esse fato também pode ser observado no presente estudo, pela presença de cromossomos aderentes durante a fase de metáfase, o qual poderia estar induzindo a ocorrência de pontes anafásicas. A aderência dos cromossomos preveni a separação dos cromossomos irmãos e assim, eles permanecem unidos pelas pontes (KABAR-ITY et al. 1974; BADR et al. 1992).

Tabela 3 - Aberrações cromossômicas e mitóticas em células meristemáticas das pontas de raízes de *A. cepa* L., tratadas com diferentes concentrações do herbicida glifosato na sua formulação comercial e ingrediente ativo. Santa Maria, RS. 2014.

Concentrações (ppm)	Aberrações ¹								MICR	FREQ (%)
	PONT	A.FUS	DESO	ADER	PERD	QUEB	BINU	ATRA		
Controle	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glifosato (PC)										
5	8	7	1	1	1	-	-	-	-	6,41
10	5	-	-	4	1	2	-	-	9	10,45
26	9	4	-	4	-	-	1	4	22	29,93
Glifosato (EA)										
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MMS										
10	9	8	-	12	-	2	20	-	1	19,55
20	14	2	1	16	-	2	3	-	7	14,90
50	12	9	-	2	-	1	6	-	2	11,96

¹Dados expressão número de aberrações de 6000 células por tratamento.

PONT=pontes, A.FUS=anomalias de fuso, DESO=desorganizada, ADER=cromossomos aderentes, PERD=cromossomo perdido, QUEB=quebra, BINU=célula binucleada, ATRA=cromossomo atrasado, MICR=micronúcleos e FREQ (%)=frequência de aberrações em relação as células em divisão.

²PC=produto comercial, EA=equivalente ácido, MMS=metil metano sulfonato.

O herbicida glifosato, também causou algumas quebras, bem como cromossomos perdidos. De acordo com Yildiz et al., (2008) e Luo et al., (2004), as quebras e fusões dos cromossomos e cromátides, podem formar pontes cromossômicas. Verifica-se que na maior dose do glifosato, houve presença de cromossomos atrasados durante a fase de anáfase.

A ocorrência de cromossomos atrasados durante a anáfase é causada devido a falha dos cromossomos ou fragmentos de cromossomos acêntricos em mover-se para um dos polos (SAXENA et al., 2010). Outros estudos com células vegetais expostas a herbicidas tem demonstrado similar aparecimento de pontes anafásicas (SAXENA et al., 2004; CHAUHAH et al., 2001). Rank; Nielsen (1997), reportam que pontes cromossômicas e fragmentos levam a mudanças na estrutura em cromossomos de plantas cultivadas e em outros organismos no meio ambiente.

Também foi observada a presença de micronúcleos (APÊNDICE A) nas células em interfase nas duas maiores concentrações de glifosato, com maior número, na concentração mais alta (26ppm). O número de micronúcleos foi superior aos apresentados pelo controle positivo (MMS) (Tabela 3). É conhecido que o aparecimento de micronúcleos está relacionado a perda de fragmentos de cromossomos devido à quebra de cromossomos (HEDDLE et al., 1991). Esses resultados corroboram com os resultados mostrados por Cavusoglu et al., (2011), que observaram a presença de micronúcleos em células de *A. cepa*, e a frequência de micronúcleos aumentou com incremento da dose do glifosato. Piesova (2005), investigou a frequência de micronúcleos em linfócitos de bovinos após a exposição ao glifosato *in vitro*, reporta que este herbicida induziu a formação de micronúcleos. Estudos também mostram que células de rato expostas ao herbicida glifosato, promoveram um aumento na frequência de micronúcleos (MAÑAS et al., 2009; PRASAD et al., 2009). Bolognesi et al., (2009), investigaram o efeito na saúde associado a exposição ao glifosato, em programas de aplicação aérea em cinco regiões na Colômbia em comparação com a exposição a mistura de pesticidas. Os resultados mostraram que em regiões em que foi realizado a aplicação o glifosato células de sangue dos trabalhadores mostraram um aumento significativo na frequência de micronúcleos, após a aplicação do glifosato.

O estudo empregando apenas o glifosato puro, nas mesmas concentrações equivalentes a formulação, não mostram aberrações cromossômicas no presente

estudo. Existe uma ampla variação no potencial genotóxico do glifosato puro e suas diversas formulações. A diferença na resposta de organismos teste ao ingrediente ativo glifosato e a formulação comercial mais conhecida (Roundup[®]), podem ser devido a toxicidade de diferentes adjuvantes e surfactantes presentes no produto formulado (DIMITROV et al. 2006). De acordo com alguns estudos, o estudo em paralelo comparando o glifosato isolado e suas formulações, mostram claramente que apenas as formulações são genotóxicas (BOLOGNESI et al., 1997; LI; LONG 1998; GRISOLIA 2002). O uso da formulação Roundup[®] aumentou a frequência de aberrações cromossômicas em células de raízes de *A. cepa*, enquanto que não foi encontrado aumento usando apenas o glifosato puro (RANK et al. 1993).

A percentagem do total de aberrações aumentou com o aumento da concentração de exposição. Este resultado mostra que o índice mitótico não foi bloqueado pelo efeito do herbicida mesmo na maior concentração (26ppm). Caso a concentração fosse também tóxica, ela iria causar morte celular, o qual pode interferir com o número de aberrações causadas pelo herbicida. Desta forma, o número de aberrações não foi diminuído. Entre as aberrações, as pontes, foram as mais frequentes aberrações observadas durante a mitose.

Esses resultados mostram que o glifosato na formulação comercial possui atividade tóxica, o qual inclui a indução de micronúcleos nas células das pontas de raízes de *A. cepa*. Piesova (2005) investigando a frequência de micronúcleos em linfócitos bovinos após exposição ao glifosato na forma de glifosato-sal de isopropilamina *in vitro*, reportou que glifosato induziu a formação de micronúcleo. Em outro estudo, Mañas et al., (2009) investigando a genotoxicidade de glifosato na sua forma analítica pura, reportou um aumento na frequência de micronúcleos em células de ratos, nas três concentrações aplicadas.

Os resultados do índice mitótico para o herbicida glufosinato (Tabela 4). Mesmo que quando comparado com o controle, o índice mitótico não diferiu significativamente. Entretanto, pode-se verificar um índice mitótico inferior na maior concentração, independentemente, se for a formulação comercial ou o ingrediente ativo. Resultados publicados sobre genotoxicidade de glufosinato são escassos. O glufosinato, foi introduzido em 1984, sua importância está sendo crescentemente aumentando devido ao aumento do uso de plantas geneticamente modificadas resistentes a este herbicida. Gebel et al., 1997, estudando o efeito do glufosinato de

amônia puro (apenas o ingrediente ativo), usando como célula teste, eritrócitos de ratos, não observaram aumento significativo na formação de micronúcleos.

As células expostas a formulação comercial contendo glufosinato, mostraram aberrações cromossômicas em duas concentrações (4 e 7ppm), com a maior frequência observada na concentração de 7ppm (Tabela 5).

Tabela 4 - Número total, em interfase, divisão e índice mitótico de células meristemáticas de pontas de raízes de *A. cepa* L., tratadas com diferentes concentrações do herbicida glufosinato na sua formulação comercial e ingrediente ativo. Santa Maria, RS. 2014.

Concentrações (ppm) ²	Células			Índice Mitótico (%)
	Total	Interfase	Divisão	
Controle	6000	5745 ± 6	255 ± 6	4,24 ± 0,30 abc*
Glufosinato (PC ¹)				
4	6000	5591 ± 20	409 ± 19	6,8 ± 0,98 a
7	6000	5616 ± 10	384 ± 10	6,4 ± 0,50 ab
18	6000	5806 ± 14	194 ± 14	3,2 ± 0,72 b c
Glufosinato (IA)				
4	6000	5658 ± 23	342 ± 23	5,7 ± 1,16 ab
7	6000	5636 ± 4	364 ± 4,4	6,1 ± 0,22 ab
18	6000	5936 ± 17	66 ± 17	1,1 ± 0,86 c
MMS ²				
10	6000	5735 ± 5	266 ± 5	4,43 ± 0,26 abc
20	6000	5698 ± 15	302 ± 15	5,03 ± 0,76 ab
50	6000	5724 ± 4	276 ± 3	4,61 ± 0,19 ab

Dados expressos como média ± erro padrão, n=3 lâminas/tratamento.

*Significância estatística para o índice mitótico (ANOVA), p<0,05, teste de Tukey.

¹PC=produto comercial, IA=ingrediente ativo

²Metil metano sulfonato.

Não foi encontrado uma relação positiva simples entre frequência de aberrações e concentração testada, com a ausência de aberrações presente na maior concentração da formulação comercial do glufosinato (18ppm) quando comparado a concentração de 7 e 4ppm. Isso pode ser devido ao efeito tóxico da formulação comercial do glufosinato, exibido pela redução numérica do índice mitótico na maior concentração do herbicida (Tabela 5).

Tabela 5 - Aberrações cromossômicas e mitóticas em células meristemáticas das pontas de raízes de *A. cepa* L., tratadas com diferentes concentrações do herbicida glufosinato na sua formulação comercial e ingrediente ativo. Santa Maria, RS. 2014.

Concentrações (ppm) ²	Aberrações ¹						MICR	FREQ (%)
	PONT	A.FUS	DESO	ADER	QUEB	BINU		
Controle	-	-	-	-	-	-	-	-
Glufosinato (PC)								
4	6	4	-	-	-	-	-	2,24
7	11	5	-	-	-	-	-	8,33
18	-	-	-	-	-	-	-	-
Glufosinato (IA)								
4	-	-	-	-	-	-	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-
MMS								
10	9	8	-	12	2	20	1	19,55
20	14	2	1	16	2	3	7	14,90
50	12	9	-	2	1	6	2	11,96

¹Dados expressão número de aberrações de 6000 células por tratamento. PONT=pontes, A.FUS=anomalias de fuso, DESO=desorganizada, ADER=cromossomos aderentes, QUEB=quebra, BINU=célula binucleada, MICR=micronúcleos e FREQ (%)=frequência de aberrações em relação as células em divisão.

²PC=produto comercial, IA=ingrediente ativo, MMS=metil metano sulfonato.

Células expostas ao herbicida paraquat (formulação comercial) mostram um índice de divisão mitótica significativamente inferior ao do controle negativo (água) assim como do controle positivo (MMS), e mostra uma correlação positiva entre o aumento da concentração e diminuição do índice mitótico (Tabela 6).

Tabela 6 - Número total, em interfase, divisão e índice mitótico de células meristemáticas de pontas de raízes de *A. cepa* L., tratadas com diferentes concentrações do herbicida paraquat na sua formulação comercial e ingrediente ativo. Santa Maria, RS. 2014.

Concentrações (ppm) ¹	Células			Índice Mitótico (%)
	Total	Interfase	Divisão	
Controle	6000	5745 ± 6	255 ± 6	4,24 ± 0,30 bc*
Paraquat (PC)				
2	6000	5872 ± 5	128 ± 4,7	2,1 ± 0,23 cd
4	6000	5902 ± 6	98 ± 5,9	1,6 ± 0,30 d
11	6000	5932 ± 4	68 ± 3,5	1,1 ± 0,18 d
Paraquat (IA)				
2	6000	5664 ± 23	336 ± 23	5,6 ± 1,14 ab
4	6000	5696 ± 9	304 ± 9,3	5,1 ± 0,47 ab
11	6000	5560 ± 6	440 ± 5,8	7,3 ± 0,29 a
MMS				
10	6000	5735 ± 5	266 ± 5	4,43 ± 0,26 bc
20	6000	5698 ± 15	302 ± 15	5,03 ± 0,76 ab
50	6000	5724 ± 4	276 ± 3	4,61 ± 0,19 bc

Dados expressos como média ± erro padrão, $n=3$ lâminas/tratamento.

*Significância estatística para o índice mitótico (ANOVA), $p<0,05$, teste de Tukey.

¹PC=produto comercial, IA=ingrediente ativo, MMS=metil metano sulfonato.

De acordo com Matkovics et al., (1979), efeitos in vivo de paraquat são muito dependentes da sua concentração. Essa atividade não foi verificada quando se

testou as mesmas concentrações com o uso do padrão analítico do paraquate. Pode-se descrever que o paraquat (formulação comercial) se mostrou como um agente mitostático (reduz a atividade da mitose).

A redução na atividade mitótica deste herbicida sobre as células teste no presente estudo, está de acordo com resultados descritos com diversos organismos teste, *Vicia faba* (NJAGI; GOPALAN,1981) e em células de medula óssea de ratos (RIOS et al., 1995). Igualmente, estudos de Salam, et al., (1993), também reportam uma redução no índice mitótico de células de *A. cepa* com o aumento da dose de paraquat usando a formulação comercial.

Nenhuma das concentrações dos tratamentos com paraquat favoreceu o aparecimento de aberrações as células teste do presente estudo (Tabela 7).

O efeito genotóxico do paraquat em células de linfócitos humanos foi testado por Ribas et al., (1998), no qual não foram observados micronúcleos nem aberrações cromossômicas. Os resultados aqui obtidos, também diferem dos resultados descritos por Salam et al., (1993), onde foram observadas inúmeras aberrações durante os estágios da mitose em células de *A. cepa*, sendo as aderências e quebras dos cromossomos, pontes e micronúcleos as mais frequentes aberrações mitóticas observadas, as quais aumentaram com o aumento da concentração teste. Entretanto vale ressaltar que o autor do trabalho citado, utilizou concentrações do paraquat que variaram de 3700 a 15000ppm, e quando comparado com o presente trabalho, verifica-se que a menor concentração testada pelo trabalho (3700ppm), equivale a 1850 vezes a maior concentração testada no presente trabalho (11ppm).

Tabela 7 - Aberrações cromossômicas e mitóticas em células meristemáticas das pontas de raízes de *A. cepa* L., tratadas com diferentes concentrações do herbicida paraquat na sua formulação comercial e ingrediente ativo. Santa Maria, RS. 2014.

Concentrações (ppm) ²	Aberrações ¹						MICR	FREQ (%)
	PONT	A.FUS	DESO	ADER	QUEB	BINU		
Controle	-	-	-	-	-	-	-	-
Paraquat (PC)								
2	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-
Paraquat (IA)								
2	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-
MMS								
10	9	8	-	12	2	20	1	19,55
20	14	2	1	16	2	3	7	14,90
50	12	9	-	2	1	6	2	11,96

¹Dados expressão número de aberrações de 6000 células por tratamento. PONT=pontes, A.FUS=anomalias de fuso, DESO=desorganizada, ADER=cromossomos aderentes, QUEB=quebra, BINU=célula binucleada, MICR=micronúcleos e FREQ (%)=frequência de aberrações em relação as células em divisão.

²PC=produto comercial, IA=ingrediente ativo, MMS=metil metano sulfonato.

Na Tabela 8, são apresentados os resultados do índice mitótico de células expostas ao saflufenacil. Observa-se que os valores do índice mitótico foram numericamente maiores em todas as concentrações dos herbicidas, independente da forma de herbicida, quando comparado aos controles positivo (MMS) e negativo (água).

Tabela 8 - Número total, em interfase, divisão e índice mitótico de células meristemáticas de pontas de raízes de *A cepa* L., tratadas com diferentes concentrações do herbicida saflufenacil na sua formulação comercial e ingrediente ativo. Santa Maria, RS. 2014.

Concentrações (ppm)	Células			Índice Mitótico (%)
	Total	Interfase	Divisão	
Controle	6000	5745 ± 6	255 ± 6	4,24 ± 0,30 b*
Saflufenacil (PC)				
0,25	6000	5452 ± 36	548 ± 36	9,1 ± 1,79 a
0,50	6000	5692 ± 12	308 ± 12	5,1 ± 0,58 ab
1,25	6000	5664 ± 16	336 ± 16	5,6 ± 0,81 ab
Saflufenacil (IA)				
0,25	6000	5652 ± 13	348 ± 13	5,8 ± 0,64 ab
0,50	6000	5500 ± 22	500 ± 22	8,3 ± 1,9 ab
1,25	6000	5652 ± 16	348 ± 16	5,8 ± 1,4 ab
MMS				
10	6000	5735 ± 5	266 ± 5	4,43 ± 0,26 b
20	6000	5698 ± 15	302 ± 15	5,03 ± 0,76 ab
50	6000	5724 ± 4	276 ± 3	4,61 ± 0,19 b

Dados expressos como média ± erro padrão, $n=3$ lâminas/tratamento.

*Significância estatística para o índice mitótico (ANOVA), $p<0,05$, teste de Tukey.

²PC=produto comercial, IA=ingrediente ativo, MMS=metil metano sulfonato.

As aberrações cromossômicas e mitóticas estiveram presentes nas células expostas a menor concentração do herbicida na formulação comercial, porém em muito baixa frequência (Tabela 9).

Tabela 9 - Aberrações cromossômicas e mitóticas em células meristemáticas das pontas de raízes de *A. cepa* L., tratadas com diferentes concentrações do herbicida saflufenacil na sua formulação comercial e ingrediente ativo. Santa Maria, RS. 2014.

Concentrações (ppm) ²	Aberrações ¹						MICR	FREQ (%)
	PONT	A.FUS	DESO	ADER	QUEB	BINU		
Controle	-	-	-	-	-	-	-	-
Saflufenacil (PC)								
0,25	4	4	3	-	-	-	-	1,82
0,50	-	-	-	-	-	-	-	-
1,25	-	-	-	-	-	-	-	-
Saflufenacil (IA)								
0,25	-	-	-	-	-	-	-	-
0,50	-	-	-	-	-	-	-	-
1,25	-	-	-	-	-	-	-	-
MMS								
10	9	8	-	12	2	20	1	19,55
20	14	2	1	16	2	3	7	14,90
50	12	9	-	2	1	6	2	11,96

¹Dados expressão número de aberrações de 6000 células por tratamento.

PONT=pontes, A.FUS=anomalias de fuso, DESO=desorganizada, ADER=cromossomos aderentes, QUEB=quebra, BINU=célula binucleada, MICR=micronúcleos e FREQ (%)=frequência de aberrações em relação as células em divisão.

²PC=produto comercial, IA=ingrediente ativo, MMS=metil metano sulfonato.

Esse herbicida é de uso relativamente recente no mundo, com registro para uso no Brasil em 2013. Não existem resultados publicados a respeito do efeito genotóxico desta molécula. Estudos para registro (não publicados) citam que o ingrediente ativo saflufenacil foi negativo, com exceção a um teste clastogênico in vitro com células de mamíferos. Nesse estudo, a exposição por 4h ao saflufenacil na presença de metabólitos do mesmo, acarretou a um aumento significativo no número de aberrações cromossômicas estrutural (ENGELHARDT; LEIBOLD, 2005).

4.4 Conclusões

O glifosato na formula comercial e o padrão analítico não tem ação citotóxica até a concentração de 26ppm em células de *A. cepa*. A fórmula comercial do mesmo tem ação genotóxica.

O glufosinato não apresentou ação citotóxica, porém em células da planta teste se evidenciou baixa ação genotóxica deste herbicida.

A formulação comercial de paraquat reduziu a divisão celular nas concentrações testadas (2, 4 e 11ppm), sem evidências de ação genotóxica em células da planta teste.

Saflufenacil não afeta a divisão celular e apresentou baixa ação genotóxica na concentração de 0,25ppm em células da planta teste.

4.5 Referências bibliográficas

ABDEL-MIGID, H. M. ; AZAB, Y. A.; IBRAHIM, W. M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 66, p. 57-64, 2007.

ABDEL-RAHMAN, A. R. et al. Runoff and leaching of atrazine and alachlor on a sandy soil as affected by application in sprinkler irrigation. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 34, n. 3, p. 381-96, 1999.

BADR, A.; GASSIM, A. Chromosomal studies on some plants in the flora of Madinah region. **KAU Journal of Science Research**, v. 4; p. 23-35, 1992.

BOLOGNESI, C. et al. Biomonitoring of genotoxic risk in agricultural workers from five Colombian regions: association to occupational exposure to glyphosate. **Journal of Toxicology and Environmental Health A**, n. 72, p. 986–997, 2009.

BOLOGNESI, C. et al. Genotoxic activity of glyphosate and its technical formulation Roundup. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, n. 45, p. 1957–1962, 1997.

CABRERA, G. L.; RODRIGUEZ, D. M. G. Genotoxicity of leachates from a landfill using three bioassays. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 426, n. 2, p. 207-210, 1999.

CAVUSOGLU, K. et al. Investigation of Toxic Effects of the Glyphosate on *Allium cepa*. **Tarim Bilimleri Dergisi - Journal of Agricultural Sciences**, v. 17, n. 2, p. 131-142, 2011.

CHAUHAN, L. K. S.; SAXENA P. N.; GUPTA, S. K. Evaluation of cytogenetic effects of isoproturon on the root meristem cells of *Allium sativum*. **Biomedical and Environmental Science**, n. 14, p. 214–219, 2001.

CHAUHAN, L. K. S.; SAXENA, P. N.; GUPTA, S. K. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environmental and Experimental Botany**, v. 42, n. 3, p. 181-189, 1999.

CHEVREUIL, M. et al. Occurrence of organochlorines (PCBs, pesticides) and herbicides (triazines, phenylureas) in the atmosphere and in the fallout from urban and rural stations of the Paris area. **Science of the Total Environment**, v. 182, n. 1-3, p. 25-37, 1996.

DALLEGRAVE, E. **Toxicologia Clínica: Aspectos Teórico Práticos**. Porto Alegre: UFRGS, p. 44 – 61, 2006.

DIMITROV, B. D. et al. Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems. **Mutagenesis**, v. 21, n. 6, p. 375-382, 2006.

ENGELHARDT, G.; LEIBOLD, E. **In vitro chromosome aberration assay with BAS 800 H in V79 cells**. Ludwig-shafen/Rhein, Germany, BASF AG. Unpublished report No. 2005/1023788. Submitted to WHO by BASF Corporation, Research Triangle Park, NC, USA. 2005.

FISKEJÖ, G. **The Allium test as a Standard in Environmental Monitoring**. Hereditas, New York, v. 102, p.99 – 112, Sep. 1985.

GEBEL, T. et al. In vivo genotoxicity of selected herbicides in the mouse bone-marrow micronucleus test. **Archives of Toxicology**, v. 71, n. 3, p. 193-197, 1997.

GRAILLOT, V. et al. Genotoxicity of pesticide mixtures present in the diet of the French population. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 53, n. 3, p. 173-184, 2012.

GRANT, W. F. Chromosome aberrations assay in a report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Programme. **Mutation Research**, v. 99, p. 273-291, 1982.

GRANT, W. F. The Present Status of Higher-Plant Bioassays for the Detection of Environmental Mutagens. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 310, n. 2, p. 175-185, 1994.

GRISOLIA, C. K. A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides. **Mutation Research**, n. 518, v. 145-150, 2002.

GROVER, I. S. et al. Genotoxicity of Pesticides and Plant-Systems. **Mutation and the Environment, Part E**, v. 340, p. 91-106, 1990.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002. 191 p.

HE, H. Z. et al. Acute toxicity of butachlor and atrazine to freshwater green alga *Scenedesmus obliquus* and cladoceran *Daphnia carinata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 80, p. 91-96, 2012.

HEDDLE, J. A. et al. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 18, n. 4, p. 277-291, 1991.

JOY, V. C.; PRAMANIK, R.; SARKAR, K. Biomonitoring insecticide pollution using non-target soil microarthropods. **Journal of Environmental Biology**, v. 26, n. 3, p. 571-577, 2005.

KABARITY, A.; EL -BAYOUMI, A. S.; HABIB, A. Effect of morphine sulphate on mitosis of *Allium cepa* L. root tips. **Biology Plant**, v. 16, p. 275-282, 1974.

KAYA, B. et al. Genotoxicity testing of five herbicides in the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Research**, v. 465, n. 1-2, p. 77-84, 2000.

KIM, J. H.; FEAGLEY, S. E. Adsorption and leaching of trifluralin, metolachlor, and metribuzin in a commerce soil. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 33, n. 5, p. 529-46, 1998.

KONUJ, M.; LIMAN, R.; CIGERCI, I. H. Determination of genotoxic effect of boron on *Allium cepa* root meristematic cells. **Pakistan Journal of Botany**, v. 39, n. 1, p. 73-79, 2007.

LI, A. P.; LONG, T. J. An evaluation of the genotoxic potential of glyphosate. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 10, n. 3, p. 537–546, 1988.

LI, A. P.; LONG, T. J. An evaluation of the genotoxic potential of glyphosate. **Fundamental Applied Toxicology**, v. 10, p. 537–546. 1988.

LIMAN, R. et al. Testing of the mutagenicity and genotoxicity of metolcarb by using both Ames/Salmonella and Allium test. **Chemosphere**, v. 80, n. 9, p. 1056-1061, 2010.

LIOI M. B. et al., Cytogenetic damage and induction of pro-oxidant state in human lymphocytes exposed in vitro to glyphosate, vinclozolin, atrazine, and DPX-E9636. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 32, n. 1, p. 39–46, 1998.

LOCKARD, J. M.; SCHUETTE, B. P.; SABHARWAL, P. S. Inhibition by Carbaryl of DNA, RNA and Protein-Synthesis in Cultured Rat Lung-Cells. **Experientia**, v. 38, n. 6, p. 686-687, 1982.

LUO L. Z. et al. Cigarette smoke induces anaphase bridges and genomic imbalances in normal cells. **Mutation Research**, v. 554, p. 375–385, 2004.

MA, T. H. et al. The Improved Allium Vicia Root-Tip Micronucleus Assay for Clastogenicity of Environmental-Pollutants. **Mutation Research-Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 334, n. 2, p. 185-195, 1995.

MAÑAS, F. et al. Genotoxicity of glyphosate assessed by the comet assay and cytogenetic tests. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, n. 28, p. 37-41, 2009.

MATKOVICS, G. et al. In vitro effects of Paraquat on some oxidative enzymes of mice. **General Pharmacology**, v. 11, p. 267-270, 1979.

MATSUMOTO, S. T. et al. Assessment of the genotoxic and mutagenic effect of chromium residues present in tannery effluents using the micronucleus and comet assay in *Oreochromis niloticus* and chromosomes aberrations in of *Allium cepa*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 148–158. 2006.

MERHI, M. et al. Occupational exposure to pesticides and risk of hematopoietic cancers: meta-analysis of case-control studies. **Cancer Causes & Control**, v. 18, n. 10, p. 1209-1226, 2007.

MINEAU, P. A review and analysis of study endpoints relevant to the assessment of "long term" pesticide toxicity in avian and mammalian wildlife. **Ecotoxicology**, v. 14, n. 8, p. 775-799, 2005.

MONROY, C. M. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of human cells exposed in vitro to glyphosate. **Biomédica**, v. 25, n. 3, p. 335–345, 2005.

NJAGI, G. D. E.; GOPALAN, H. N. B. Mutagenicity testing of herbicides, fungicides and insecticides. I. Chromosome aberrations in *Vicia faba*. **Cytologia**, v. 46, p. 169-172, 1981.

NWANI, C. D., et al. Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 31, p. 314-322, 2011.

OBE, G. et al. Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. **Mutation Research**, v. 504, n.5, p. 17-36,. 2004.

PIESOVA, E. The effect of glyphosate on the frequency of micronuclei in bovine lymphocytes in vitro. **Acta Veterinaria-Beograd**, v. 55, n. 2-3, p. 101-109, 2005.

PIRES, N. M. et al. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 13, n. 1, p. 55-65, 2001.

PRASAD, S. et al. Clastogenic effects of glyphosate in bone marrow cells of swiss albino mice. **Journal of Toxicology**, v. 2009, p. 308-985, 2009.

RANK, J. et al. Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus

test, Salmonella mutagenicity test, and *Allium cepa* anaphase–telophase test. **Mutation Research**, n. 300, p. 29–36, 1993.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. *Allium cepa* anaphase-telo-phase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methansulfonate. **Mutation Research**, v. 390, p.121-127. 1997.

RIBAS, G. et al. Genotoxic evaluation of the herbicide Paraquat in culture human lymphocytes. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, v. 17, p. 339-347, 1998.

RIOS, A. C. C. et al. The action of the herbicide Paraquat on somatic and germ cells of mice. **Mutation Research**, v. 328, p.113-118, 1995.

SALAM, A. Z. EL-Abidin, et al. The mutagenicity of Gramoxone (Paraquat) on different eukaryotic systems. **Mutation Research**, v. 319, p. 89-101, 1993.

SAXENA, P. N. et al. Genotoxic effects of diuron contaminated soil on the root meristem cells of *Allium sativum*: a possible mechanism of chromosome damage, **Toxicology Mechanism and Methods**, n. 14, p. 281–286, 2004.

SAXENA, P. N.; GUPTA, S. K.; MURTHY, R. C. Carbofuran induced cytogenetic effects in root meristem cells of *Allium cepa* and *Allium sativum*: A spectroscopic approach for chromosome damage. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 96, n. 2, p. 93-100, 2010.

TICE, R. R. et al. The single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TIMBRELL, J. A. **Introduction to Toxicology**. 2.ed. Estados Unidos: Taylor & Francis, 1999. 167p.

WEICHENTHAL, S.; MOASE, C.; CHAN, P. A review of pesticide exposure and cancer incidence in the Agricultural Health Study cohort. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, p. 1117–1125, 2010.

YILDIZ, M. et al. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. **Chemosphere**, v. 75, n. 7, p. 934-938, 2009.

YILDIZ, M.; EVRIM, S. A. Genotoxicity testing of quizalofop-P-ethyl herbicide using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay, **Caryology**, v. 61, n. 1, p. 45–52, 2008.

ZHANG, W.; JIANG, F.; OU, J. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. **Proceedings of the International Academy of Ecology and Environmental Science**, v. 1, p. 125–144, 2011.

5 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Nos dois anos agrícolas, durante o período do cultivo da soja, os herbicidas glifosato (1080g ha^{-1}), paraquat (400g ha^{-1}), glufosinato (500g ha^{-1}), saflufenacil ($0,140\text{g ha}^{-1}$) e associação de glifosato com saflufenacil (1080 e $0,140\text{g ha}^{-1}$) todos aplicados em pré-semeadura da soja (6 dias), não alteraram a composição na população da mesofauna edáfica.

Em geral, houve predominância dos ácaros (87%) seguido de colêmbolos (6%). Os ácaros foram os mais responsivos aos herbicidas. As diferenças nas populações da mesofauna foram pontuais, estabilizando-se a partir de 70 dias após a aplicação.

No tratamento com glufosinato houve incremento de colêmbolos Entomobryomorpha e dos ácaros detritívoros (*Eupodes* sp. e *Scheloribates* sp.) e dos predadores (Galumnidae e Mesostigmata), exceto minhocas (Haploxida), com redução da população.

A aplicação de paraquat favoreceu os colêmbolos Entomobryomorpha, ácaros detritívoros (Pygmephoridae, ninfas de *Scheloribates* sp.) e ácaros predadores Mesostigmata, porém reduziu a população de Haploxida; enquanto glifosato reduziu a população de ácaros detritívoros (Pygmephoridae e *Scheloribates* sp.) Com saflufenacil, houve aumento do *Scheloribates* sp. e redução de Haploxida. Houve aumento na população de colêmbolos Entomobryomorpha com a associação de glifosato com saflufenacil.

O herbicida glifosato (produto técnico e formulado), nas concentrações de 5, 10 ou 26ppm do equivalente-ácido (e.a) não causaram efeitos citotóxicos em células meristemáticas de raízes de *A. cepa*. Porém, a formulação comercial (Roundup Original[®]) promoveu ação genotóxica com aumento da frequência de aberrações estruturais variando com a concentração de glifosato.

Nas concentrações testadas, (4, 7 e 18ppm), glufosinato-de-amônio (produto técnico e formulado) ocorreram reduções no índice mitótico das células expostas na maior concentração, independentemente de ser “produto técnico” ou “formulado” (Finale[®]). Ocorreram aberrações cromossômicas estruturais em baixa frequência nas células da planta teste com o produto formulado, sendo representadas por pontes anafásicas e a presença de anormalidades nos fusos cromáticos.

Para paraquat, não se constatou ação genotóxica nas concentrações testadas (2, 4, 11ppm) independente ser o produto técnico ou formulado. Por outro lado, o produto formulado (Gramoxone®) promoveu redução do índice mitótico das células da planta teste, diferindo do controle positivo metil metano sulfonato (MMS).

Houve baixa ação genotóxicas de saflufenacil com a formulação comercial (Heat®) na concentração de 0,25ppm, onde células apresentaram pontes durante a anáfase, anormalidades nos fusos cromáticos bem como desorganização cromossômica.

6 SUGESTÕES DE NOVOS TEMAS DE PESQUISAS

Para estudos futuros, sugere-se que sejam realizados trabalhos abrangendo mais concentrações de herbicidas (acima das concentrações de registro), e que também, estudos sejam ampliados para outros herbicidas com ou sem residual (no solo) e aplicados após a semeadura/emergência da cultura em solos com características físico/químicas diferentes. É importante também, que sejam realizados estudos a campo, visando avaliar efeitos da aplicação de herbicidas na relação entre os microorganismos (micorrizas, actinomicetes, fungos e bactérias) e microartrópodes nativos do solo.

Visando estudar os reais impactos dos ingredientes ativos de agrotóxicos sobre organismos não- alvos no meio ambiente da lavoura, sejam eles, herbicidas, inseticidas, acaricidas e ou fungicidas, sugere-se que estudos com estes produtos químicos sejam feitos conjuntamente empregando o ingrediente ativo na sua formulação comercial (usual na agricultura) assim como, a sua forma analítica pura.

Na ausência de informações a respeito de ação citotóxica e genotóxica de herbicidas e outros agrotóxicos com expectativa de uso agrícola na soja ou de novas moléculas registradas ou não no Brasil, novas pesquisas devem ser estimuladas e incentivadas com foco nesse tema.

REFERÊNCIAS GERAIS

BASARAN, N.; UNDEGER, Ü. Effects of pesticides on human peripheral lymphocytes in vitro: Induction of DNA damage. *Archives Environ. Toxicology and Water Quality*, n.79, p. 169-176, 2005.

CORTET, J. et al. Effects of pesticides on organic matter recycling and microarthropods in a maize field: use and discussion of the litterbag methodology. ***European Journal of Soil Biology***, v. 38, p. 261-265, 2002.

DIMITROV, B. D. et al. Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems. ***Mutagenesis***, v. 21, p. 375-382, 2006.

FAO. Food and Agriculture of the United Nations. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em 28 de setembro de 2013.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*. ***Mutation Research***, v. 99, n. 3, p. 273 -279, 1999.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Levantamento Sistemático da Produção Agrícola. Disponível em:<http://ibge.gov.br/home/estatistical/indicadores/agropecuaria/lspa/lspa_2011.pdf>. Acesso em 30 de maio de 2012.

JORDAN, D. L, et al. Influence of application variables on efficacy of glyphosate. ***Weed Technology***, v. 11, p. 354-362, 1997.

LANGELLOTTO, G. A.; DENNO, R. F. Responses of invertebrate natural enemies to complex-structured habitats: a meta-analytical synthesis. ***Oecologia***, v. 139, n. 1, p. 1-10. 2004.

MA, T. H. et al. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. ***Mutation Research***, v. 334, p. 185-195, 1995.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Xenobióticos no solo. In: ***Microbiologia e bioquímica do solo***. Lavras; Ed. UFLA, cap. 6, p. 243-284, 2002.

NITHYAMEENAKSHI, S.; JEYARAMRAJA, P. R.; MANIAN, S. Evaluation of azoxystrobin and difenoconazole against certain crop diseases. **International Journal of Agricultural Research**. v. 1, p. 420-431. 2006.

NORSWORTHY, J. K., BURGOS, N. R., OLIVER, L. R. Differences in weed tolerance to glyphosate involve different mechanisms, *Weed Technology*. n. 15, p. 725-731, 2001.

PAOLETTI, M. G. et. al. Detritivores as indicators of landscape stress and soil degradation. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 47, n. 4, p. 412-423. 2007.

RANK, J. et al. Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, salmonella mutagenicity test, and *Allium* anaphase-telophase test. **Mutation Research**, v. 300, n. 5, p. 29-36, 1997.

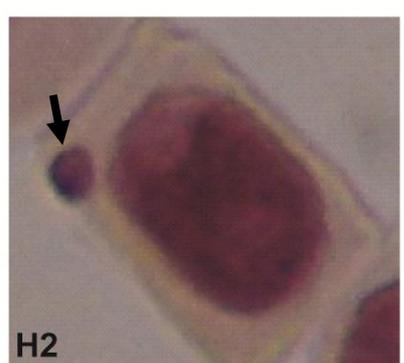
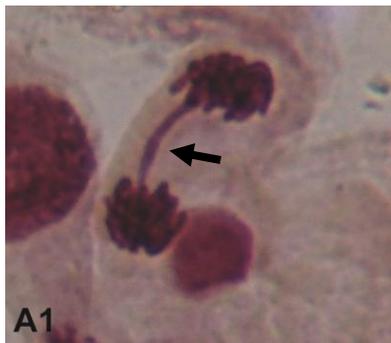
STARKE, R. J.; OLIVER, L. R. Interaction of glyphosate with chlorimuron, fomesafen, imazethapyr, and sulfentrazone. **Weed Science**, v. 46, p. 652-660, 1998.

THOMAZINI, M. J.; THOMAZIN, A. P. B. W. **Levantamento de insetos e análise entomofaunística em floresta, capoeira e pastagem no sudeste acreano**. Rio Branco, Acre. 2002.

ZABALOY, M. C.; GARLAND; J. L.; GÓMEZ, M. A. An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2,4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina. **Applied Soil Ecology**, v. 40, n. 1, p. 1-12, 2008.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* L. A1 e A2) Anáfase com ponte; A3) Interfase com micronúcleos e ponte; B1) Prófase com quebra cromossômica; C1) Anáfase com cromossomo solto; D) Multipolaridade; E) Anomalia dos fusos; F) Célula binucleada; G1 e G2) Cromossomos aderidos; H1) Célula em Interfase com quatro micronúcleos e H2) Célula em Interfase com um micronúcleo. Santa Maria, RS. 2014.



**APÊNDICE B - Caracterização química e física do solo da área do experimento.
Santa Maria, RS. 2014.**

pH água	K*	P	S	Ca	Mg	Al	H+Al	CTC efetiva	MO (%)	Argila (%)
1:1	-----mg/dm ³ -----			-----cmol _c /dm ³ -----				-----m/v-----		
4,9	93	20,7	9,6	7,8	2,7	1,5	10,9	11,0	2,8	24,0

* K (potássio); P (fósforo); S (enxofre); Ca (cálcio); Mg (magnésio); Al (alumínio); CTC (capacidade de troca de cátions); MO (matéria orgânica).

APÊNDICE D - Precipitação pluvial e temperatura compensada média, durante o cultivo no ano agrícola 2011/12. Os dados foram obtidos junto a Estação Climatológica Principal da UFSM, pertencente ao 8º DISME/INMET/MA. Flechas indicam o dia em que foi realizado coleta de amostras de solo. Santa Maria, RS. 2014.

