

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
AMBIENTAL

Liliana Beatriz Poerschke

**PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM *EISENIA ANDREI* APÓS
EXPOSIÇÃO A PESTICIDAS UTILIZADOS NO CULTIVO DA
SOJA EM SOLO SOB INTEGRAÇÃO LAVOURA-PECUÁRIA**

Santa Maria, RS
2023

Liliana Beatriz Poerschke

**PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM *EISENIA ANDREI* APÓS EXPOSIÇÃO A
PESTICIDAS UTILIZADOS NO CULTIVO DA SOJA EM SOLO SOB
INTEGRAÇÃO LAVOURA-PECUÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Área de Concentração em Recursos Hídricos e Tecnologias Ambientais, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Ambiental**.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Andressa de Oliveira Silveira
Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Bárbara Estevão Clasen

Santa Maria, RS
2023

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Poerschke, Liliانا Beatriz
PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM EISENIA ANDREI APÓS
EXPOSIÇÃO A PESTICIDAS UTILIZADOS NO CULTIVO DA SOJA EM
SOLO SOB INTEGRAÇÃO LAVOURA-PECUÁRIA / Liliانا Beatriz
Poerschke.- 2023.
67 p.; 30 cm

Orientadora: Andressa de Oliveira Silveira
Coorientadora: Bárbara Estevão Clasen
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Ambiental, RS, 2023

1. Agrotóxicos 2. Biomarcadores 3. Minhocas I.
Silveira, Andressa de Oliveira II. Clasen, Bárbara
Estevão III. Título.

sistema de geração automática de ficha catalográfica da USP. dados fornecidos pelo autor(s). sob supervisão da direção da divisão de processos técnicos da biblioteca central. biblioteca responsável: paula schoenfeldt patta em 10/1728.

Declaro, LILIANA BEATRIZ POERSCHKE, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Liliana Beatriz Poerschke

**PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM *EISENIA ANDREI* APÓS EXPOSIÇÃO A
PESTICIDAS UTILIZADOS NO CULTIVO DA SOJA EM SOLO SOB
INTEGRAÇÃO LAVOURA-PECUÁRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Área de Concentração em Recursos Hídricos e Tecnologias Ambientais, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Engenharia Ambiental**.

Aprovado em 08 de fevereiro de 2023:

Andressa de Oliveira Silveira, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Bárbara Estevão Clasen, Dra. (UERGS)
(Coorientadora)

Natielo Almeida Santana, Dr. (UFSM)

Tadeu Luis Tiecher, Dr. (IFRS)

Santa Maria, RS
2023

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais Paulo Poerschke e Ivanda de Lima Poerschke por sempre me incentivarem e acreditarem em mim. Por todo o apoio que me foi dado ao longo desses anos de graduação de pós-graduação, sou imensamente grata.

Ao meu namorado, Felipe, pelo amor e compreensão que teve comigo nesse período.

Às colegas do PPGEAMB, Andreli, Gabriela e Tamiris, pela ajuda no desenvolvimento do trabalho. Especialmente à Gabriela pelo auxílio no início do trabalho e pela disponibilidade em tirar dúvidas sempre que solicitada. Agradeço à Tamiris em especial pelas horas dedicadas nas análises laboratoriais e estatísticas dos resultados, teve uma participação essencial neste trabalho. Obrigada!

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) pelo ensino gratuito e de qualidade, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (PPGEAMB) e a todos os professores que contribuíram para a minha formação.

Ao Laboratório ENZITOX (UFSM) pelo empréstimo do leitor de placas.

À professora Dra. Vania Lucia Loro e ao LABTAQ (UFSM) pelo espaço para a realização das análises, pelos materiais, reagentes e instruções.

Ao professor Dr. Márlon de Castro Vasconcelos pela ajuda nas análises estatísticas.

À minha orientadora, professora Dra. Andressa de Oliveira Silveira, pela oportunidade de poder desenvolver este trabalho, agradeço pelo tempo dedicado aos ensinamentos e por todo suporte para a realização desta pesquisa.

À minha coorientadora, professora Dra. Bárbara E. Clasen, pelo apoio durante todo o período do mestrado, sua ajuda foi fundamental!

Aos membros da banca de defesa desta dissertação, professores Natielo A. Santana e Tadeu L. Tiecher, pela disponibilidade em avaliar este trabalho e pelas contribuições.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Por fim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, muito obrigada!

RESUMO

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS EM *EISENIA ANDREI* APÓS EXPOSIÇÃO A PESTICIDAS UTILIZADOS NO CULTIVO DA SOJA EM SOLO SOB INTEGRAÇÃO LAVOURA-PECUÁRIA

AUTORA: Liliانا Beatriz Poerschke
ORIENTADORA: Andressa de Oliveira Silveira
COORIENTADORA: Bárbara Estevão Clasen

Com o aumento do consumo de agrotóxicos no Brasil nos últimos anos, surge uma preocupação com o impacto que essas moléculas tem no meio ambiente. Após a aplicação, os pesticidas podem ter diversos destinos, incluindo a atmosfera, os sistemas aquáticos e, principalmente, o solo. Com essa contaminação, os pesticidas acabam afetando a fauna edáfica, animais e humanos, causando desequilíbrio no ecossistema. Uma forma de reduzir os danos causados pelos agrotóxicos é através da imobilização das moléculas nas partículas de solo e redução da biodisponibilidade das mesmas na solução de solo. O aumento do pH e dos teores de matéria orgânica no solo são formas de reduzir a disponibilidade dessas moléculas. A utilização de técnicas de cultivo conservacionistas, como o Sistema de Plantio Direto (SPD) e a Integração Lavoura-Pecuária (ILP), proporciona o aumento desses parâmetros de forma sustentável. O objetivo dessa pesquisa foi determinar o potencial toxicológico que uma área cultivada com SPD e ILP, contendo aplicação de agrotóxicos, pode ter sobre minhocas da espécie *Eisenia andrei* através da avaliação de biomarcadores de estresse e dano oxidativo. As minhocas foram dispostas em cilindros contendo solo que foi cultivado com soja por duas safras. Foram analisados oito tratamentos em triplicata, que tinham ou não a presença de pesticidas, aplicação de calcário e animais em pastejo. Foi observado aumento da atividade enzimática da AChE, CAT e GST, ocasionando estresse evidenciado pela ativação do sistema de defesa antioxidante. O tratamento que continha apenas aplicação de pesticidas foi o que apresentou maior estresse oxidativo segundo a análise IBR. Os resultados corroboram a hipótese de que a presença de animais em pastejo e a prática de calagem contribuem para uma redução do efeito adverso causado pelos pesticidas. Desta forma, foi possível compreender como as práticas de manejo podem diminuir o potencial toxicológico dos pesticidas. Os resultados encontrados são de grande importância para a avaliação do impacto causado por práticas de manejo sustentável no solo e para o estabelecimento de medidas que visem contribuir com a disseminação dessas práticas, tendo em vista o seu potencial valor de preservação ambiental.

Palavras-chave: Agrotóxicos. Biomarcadores. Minhocas.

ABSTRACT

BIOCHEMICAL PARAMETERS IN *EISENIA ANDREI* AFTER EXPOSURE TO PESTICIDES USED IN SOYBEAN YIELD IN A CROP-LIVESTOCK INTEGRATION SYSTEM

AUTHOR: Liliana Beatriz Poerschke
ADVISOR: Andressa de Oliveira Silveira
COADVISOR: Bárbara Estevão Clasen

Pesticide consumption observed in Brazil in recent years brings a concern about the impact that these molecules may have on the environment. After application, pesticides can have several destinations, including atmosphere, aquatic systems and, mainly, soil. With this contamination, pesticides end up affecting soil fauna, animals and humans, causing an imbalance in the ecosystem. One way to reduce the damage caused by pesticides is by immobilizing the molecules in soil particles and consequently reducing the bioavailability of these chemicals in the soil solution. Increasing the pH and organic matter levels in the soil are ways of controlling the availability of these molecules. The use of sustainable cultivation practices, such as No-Tillage Farming and Crop-Livestock Integration System, provides the increase in these parameters in a sustainable way. The aim of this research was to determine the toxicological potential that an area cultivated with No-Tillage Farming and Crop-Livestock Integration System can have on soil organisms (earthworms *Eisenia andreii*) through the evaluation of enzymatic biomarkers (catalase, glutathione S-transferase, thiobarbituric acid-reactive substances and acetylcholinesterase). The earthworms were exposed in cylinders containing a sample of soil that was cultivated with soybeans for two crops. Eight treatments were analyzed in triplicate. There was an increase in the enzymatic activity of AChE, CAT and GST, causing stress and oxidative damage, evidenced by the activation of the antioxidant defense system. Treatment 4 (which only contained pesticides) was the one that showed the greatest oxidative damage according to the IBR analysis. The results corroborate the hypothesis that the presence of grazing animals and the practice of liming contribute to a reduction in the adverse effect caused by pesticides. In this way, it was possible to briefly understand the pesticide-soil-organism environmental dynamics and how management practices can reduce the toxicological potential of pesticides. The results found are of great importance for assessing the impact caused by sustainable management practices on the soil and for establishing measures that aim to contribute to the dissemination of these practices, due their potential value for environmental preservation.

Keywords: Pesticides. Biomarkers. Earthworms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fluxograma que mostra o efeito dos poluentes do solo nos índices bioquímicos das minhocas	24
Figura 2 – Cultivo de soja nos cilindros com objetivo de simular uma situação de campo.....	32
Figura 3 – Aplicação de pesticidas na soja	33
Figura 4 – Amostras de solo coletado para avaliação química	34
Figura 5 – Minhocas da espécie <i>Eisenia andrei</i> expostas ao solo	35
Figura 6 – Cilindros contendo as amostras de solo onde se deu a exposição dos organismos, com as extremidades devidamente presas para evitar fugas.....	36
Figura 7 – Comparação entre os valores de pH nas amostras de solo com e sem calcário	41
Figura 8 – Teores de alumínio nas amostras de solo com e sem pastejo; com e sem calcário	42
Figura 9 – Comparação entre valores de CTC em amostras com e sem adição de agrotóxico.....	43
Figura 10 – Atividade da acetilcolinesterase (AChE) em <i>Eisenia andrei</i> expostas a diferentes tratamentos aos 7, 14 e 28 dias de exposição	44
Figura 11 – Atividade da catalase (CAT) em <i>Eisenia andrei</i> expostas a diferentes tratamentos aos 7, 14 e 28 dias de exposição	45
Figura 12 – Atividade da glutathiona-s-transferase (GST) em <i>Eisenia andrei</i> expostas a diferentes tratamentos aos 7, 14 e 28 dias de exposição	46
Figura 13 – Níveis de malondialdeído em <i>Eisenia andrei</i> expostas a diferentes tratamentos aos 7, 14 e 28 dias de exposição	47
Figura 14 – Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores (IBR) da enzima AChE depois de 7, 14 e 28 dias de exposição dos organismos....	48
Figura 15 – Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores (IBR) da enzima CAT depois de 7, 14 e 28 dias de exposição dos organismos.....	48
Figura 16 – Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores (IBR) da enzima GST depois de 7, 14 e 28 dias de exposição dos organismos.....	49

Figura 17 – Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores (IBR) da enzima TBARS depois de 7, 14 e 28 dias de exposição dos organismos .	50
Figura 18 – Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores (IBR) das enzimas AChE, CAT, GST e TBARS aos 7, 14 e 28 dias de exposição dos organismos.....	51
Figura 19 – Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores (IBR) de cada tratamento analisado aos 7, 14 e 28 dias de exposição dos organismos.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Acetilcolinesterase
CAT	Catalase
ChEs	Colinesterases
CTC	Capacidade de Troca de Cátions
EROs	Espécies Reativas de Óxigênio
GST	Glutathione S-transferase
IBR	Índice Integrado de Resposta de Biomacadores
ILP	Integração Lavoura-Pecuária
MDA	Malondialdeído
MIP	Manejo Integrado de Pragas
pH	Potencial hidrogeniônico
SOD	Superóxido dismutase
SPD	Sistema de Plantio Direto
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
T1	Tratamento 1 (agrotóxico + pastejo + calcário)
T2	Tratamento 2 (agrotóxico + pastejo)
T3	Tratamento 3 (agrotóxico + calcário)
T4	Tratamento 4 (agrotóxico)
T5	Tratamento 5 (pastejo + calcário)
T6	Tratamento 6 (pastejo)
T7	Tratamento 7 (calcário)
T8	Tratamento 8 (controle)
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1	USO DE AGROTÓXICOS	15
3.2	QUALIDADE DO SOLO	17
3.3	ACIDEZ DO SOLO	20
3.4	ECOTOXICOLOGIA	22
3.5	BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	SOLO	29
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	30
4.3	ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO	34
4.4	EXPOSIÇÃO DOS ORGANISMOS E AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES	34
4.5	ÍNDICE INTEGRADO DE RESPOSTA DE BIOMARCADORES (IBR)	37
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5	RESULTADOS	39
5.1	ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO	39
5.2	BIOMARCADORES DE TOXICIDADE EM <i>Eisenia andrei</i>	43
5.2.1	Atividade da enzima AChE em <i>Eisenia andrei</i>	43
5.2.2	Atividade da enzima CAT em <i>Eisenia andrei</i>	44
5.2.3	Atividade da enzima GST em <i>Eisenia andrei</i>	45
5.2.4	Nível de peroxidação lipídica em <i>Eisenia andrei</i>	46
5.3	ÍNDICE INTEGRADO DE RESPOSTA DE BIOMARCADORES (IBR)	47
5.3.1	Análise gráfica por biomarcador	47
5.3.2	Análise gráfica por dia de amostragem	50
5.3.3	Análise gráfica de cada tratamento individualmente	52
6	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	54
6.1	ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO	54
6.2	ATIVIDADE ENZIMÁTICA	55
6.3	ÍNDICE INTEGRADO DE RESPOSTA DE BIOMARCADORES (IBR)	57
7	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

O Brasil lidera o mercado consumidor de agrotóxicos (STORCK et al., 2022). Os dados do último boletim anual de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil, referente ao ano de 2020, mostram que a venda total desse tipo de produto ultrapassou as 685 mil toneladas, superando o ano de 2019 em 10,51% (IBAMA, 2022). Tais dados demonstram o crescente consumo de agrotóxicos no país, que segue uma curva ascendente desde o início do século (IBAMA, 2019). Por outro lado, a produtividade agrícola não cresce no mesmo ritmo. Segundo Dutra e Souza (2017), entre 2003 e 2014, o consumo de agrotóxicos mais do que dobrou no país; enquanto isso, no mesmo período, a produtividade manteve-se praticamente a mesma, apresentando um leve aumento. Este aumento no consumo de agrotóxicos tem relação, entre outras questões, com a resistência das chamadas “pragas” aos princípios ativos de alguns agrotóxicos que, assim, tem que ser utilizados em doses cada vez mais elevadas.

Existe uma discussão acerca da dependência global dos agrotóxicos, haja vista seu mau uso, sua volatilidade, transporte de longa distância e eventual contaminação ambiental (ECOBICHON, 2001). Após a aplicação, os pesticidas podem ter diversos destinos, incluindo a atmosfera (através de desvios na aplicação e perdas por vaporização), os sistemas aquáticos (nas águas superficiais por escoamento superficial e nas águas subterrâneas por drenagem e lixiviação), e o solo (através de processos de deposição) (TIRYAKI; TEMUR, 2010). Os pesticidas acabam afetando a fauna edáfica, animais e humanos, causando desequilíbrio no ecossistema (BOUDH; SINGH, 2019).

Uma forma de reduzir os danos causados pelos agrotóxicos é com a imobilização das moléculas e consequente redução da biodisponibilidade desses químicos na solução de solo. É possível reduzir a disponibilidade dessas moléculas através do aumento do teor de matéria orgânica e pH do solo, pois isso favorece a retenção das moléculas xenobióticas nas partículas de solo (SPARK; SWIFT, 2002; ŠUDOMA et al., 2019). A utilização de técnicas conservacionistas proporciona o aumento desses parâmetros de forma sustentável (ALVARENGA; NOCE, 2005). A agricultura conservacionista inclui

práticas específicas, como o Sistema de Plantio Direto (SPD) e a Integração Lavoura-Pecuária (ILP) (ALVARENGA; NOCE, 2005; KABIR, 2005).

Nesse contexto, a proposta desse estudo foi determinar o potencial toxicológico que uma área cultivada sob SPD e ILP pode ter sobre organismos do solo (minhocas da espécie *Eisenia andrei*) através da avaliação de biomarcadores enzimáticos. Esse estudo levanta a hipótese de que a presença de animais em pastejo, através da ILP, e o aumento do pH do solo, através da aplicação de calcário, devem reduzir o potencial toxicológico que os pesticidas têm sobre minhocas da espécie *Eisenia andrei*. Com isso, buscou-se compreender como as práticas conservacionistas impactam na assimilação dos pesticidas pelas minhocas e se há uma redução na toxicidade dos pesticidas com a adoção de tais práticas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Determinar o impacto do uso de pesticidas utilizados em um cultivo de soja em biomarcadores da espécie *Eisenia andrei* em solo oriundo de sistema com integração lavoura-pecuária.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE), catalase (CAT), glutathiona-s-transferase (GST) e o nível de peroxidação lipídica em minhocas da espécie *Eisenia andrei* expostas a oito diferentes tratamentos, contendo ou não a presença de animais em pastejo, pesticidas e aplicação de calcário.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 USO DE AGROTÓXICOS

Os agrotóxicos, também denominados pesticidas, defensivos agrícolas ou agroquímicos, são quaisquer compostos destinados à agricultura e que têm como ação a prevenção ou redução dos efeitos causados por pragas, doenças, ervas daninhas, fungos, insetos, ácaros e roedores. Essas substâncias são compostos orgânicos sintéticos com baixo peso molecular, geralmente com baixa solubilidade em água e alta atividade biológica. O termo inclui todos os inseticidas, fungicidas, herbicidas, fumigantes e outros compostos orgânicos ou substâncias utilizadas como reguladores de crescimento, desfolhantes ou disseccantes (SOARES; FARIA; ROSA, 2016).

Os pesticidas têm benefícios importantes na proteção das lavouras, pois combatem uma variedade de pragas e doenças que poderiam destruí-las, aumentando o rendimento e a qualidade dos produtos colhidos. No entanto, devido ao grande uso de produtos fitossanitários, a ocorrência de resíduos de agrotóxicos nos recursos hídricos subterrâneos constitui um problema mundial. A poluição do solo e dos corpos d'água por pesticidas usados na agricultura pode representar uma ameaça importante aos ecossistemas aquáticos e aos recursos de água potável, porque as águas subterrâneas são a maior massa de água doce em muitas áreas do mundo (PÉREZ-LUCAS et al., 2019).

Nos últimos anos, tem ocorrido uma dinâmica de crescimento nos sistemas de produção agroalimentar, incluindo o uso de insumos químicos. O crescimento do desenvolvimento econômico tende a aumentar o consumo de agrotóxicos, que têm sérias consequências potenciais para a saúde humana e o meio ambiente em geral (HEDLUND; LONGO; YORK, 2020).

Segundo o mais recente boletim anual de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil (IBAMA, 2022), no ano de 2020 a venda total de produtos formulados "Químicos e Bioquímicos" totalizou 685.745,68 toneladas de ingredientes ativos, o que representa um aumento de 10,51% nas vendas internas em relação a 2019. Os agrotóxicos mais comercializados foram os formulados a base dos ingredientes ativos: Glifosato;

2,4-D; Mancozebe; Acefato; Atrazina; Clorotalonil; Dicloreto de Paraquate; Malationa; Enxofre e Corpirifós.

A exposição a agrotóxicos pode causar quadros de intoxicação leve, moderada ou grave, a depender da quantidade do produto absorvido, do tempo de absorção, da toxicidade do produto e do tempo decorrido entre a exposição e o atendimento médico (BRASIL, 2013). O Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos (BRASIL, 2018) aponta que, no período de 2007 a 2015, observou-se um crescente aumento do número de notificações por intoxicações por agrotóxicos, possivelmente em decorrência do aumento da comercialização dessas substâncias e da melhoria da atuação da vigilância e assistência à saúde para identificação, diagnóstico e notificação dos casos. Nesse período, houve acréscimo de 139% das notificações, sendo o total acumulado de 84.206 casos.

Tendo em vista essas informações, a redução do uso de agrotóxicos se faz necessária. O trabalho de Lechenet et al. (2017) demonstra que a redução no uso de pesticidas raramente diminui a produtividade e a lucratividade nas fazendas. Isso pode corresponder a uma redução média de 37, 47 e 60% do uso de herbicidas, fungicidas e inseticidas, respectivamente, sem alteração na produtividade. Tais resultados demonstram que a redução de pesticidas já está acessível aos agricultores na maioria das situações de produção.

As estratégias para redução do uso de pesticidas variam amplamente, desde a agricultura orgânica até os sistemas convencionais de agricultura, nos quais são feitas tentativas de reduzir o uso de pesticidas (NAZARKO; VAN ACKER; ENTZ, 2005). Segundo o estudo de Fuglie (1999), não há evidências de que as taxas de aplicação de herbicidas ou fertilizantes são mais altas em campos com sistemas de lavoura conservacionistas em comparação com o preparo convencional.

Uma forma de reduzir o uso de agrotóxicos, sem afetar a produtividade agrícola, é através da adoção do Manejo Integrado de Pragas (MIP). O MIP pode ser definido como uma "abordagem" ou "estratégia" holística para combater pragas de plantas usando todos os métodos disponíveis, com aplicações mínimas de pesticidas. O objetivo não é erradicar as pragas, mas manejá-las, mantendo suas populações abaixo de níveis economicamente prejudiciais. A

adoção dessa estratégia reduz a exposição dos agricultores, consumidores e do meio ambiente a compostos tóxicos (STENBERG, 2017).

Diminuir o consumo desses agrotóxicos é importante devido aos problemas ambientais que estão atrelados ao seu uso. Por exemplo, o desenvolvimento de resistência a pesticidas; problemas de polinização de culturas e mortandade de abelhas; safras e perdas de produtos agrícolas; contaminação de águas subterrâneas e superficiais; perdas de peixes, animais selvagens e microrganismos; e gastos governamentais para reduzir os custos ambientais e sociais do uso de pesticidas (PIMENTEL et al., 1992). Além de todos esses problemas, com o uso excessivo de pesticidas, seus resíduos e metabólitos podem se acumular no solo em níveis inaceitáveis (MORILLO; VILLAVERDE, 2017). Portanto, é importante entender a dinâmica desses compostos no ambiente e como eles podem alterar a qualidade do solo.

A biodisponibilidade de pesticidas depende de muitos processos e fatores ambientais como pH, temperatura, teor de umidade do solo, solubilidade do pesticida, nutrientes do solo, entre outros (ODUKKATHIL; VASUDEVAN, 2013). São muitas as variáveis que interferem na dinâmica da migração do pesticida do solo para outros compartimentos ambientais. Através da lixiviação de pesticidas pelo perfil de solo ocorre a contaminação de águas subterrâneas, que é um processo complexo e controlado por uma série de condições ambientais e propriedades do solo. As modelagens matemáticas para transporte de pesticidas incluem uma variedade de processos, como o fluxo de água no solo, transporte de soluto, transporte de calor, sorção dos pesticidas, transformação e degradação dos pesticidas, volatilização, absorção pelas plantas, escoamento superficial, conteúdo de matéria orgânica do solo, sua textura e pH (KÖHNE; KÖHNE; ŠIMŮNEK, 2009).

3.2 QUALIDADE DO SOLO

O conceito de qualidade do solo é controverso entre os cientistas do solo porque é subjetivo, além de ser dependente do uso do solo e do clima. O conceito não foi formulado em unanimidade pela comunidade científica, mas foi

institucionalizado por algumas agências governamentais, apesar da discórdia científica em torno dele (SINGER; SOJKA, 2002).

A Sociedade de Ciência do Solo da América contribuiu para o desenvolvimento do conceito de qualidade do solo quando, através de um comitê de 14 pessoas, trabalhou na definição do conceito e identificou atributos do solo e das plantas que seriam úteis para descrever e avaliar a qualidade do solo. Inicialmente foi feita uma definição simples para a qualidade do solo: "a capacidade (do solo) de funcionar" (KARLEN et al., 1997, p. 3). Uma versão expandida define a qualidade do solo como "a capacidade de um tipo específico de solo de funcionar, dentro dos limites naturais ou gerenciados do ecossistema, para sustentar a produtividade vegetal e animal, manter ou melhorar a qualidade da água e do ar e apoiar a saúde e habitação humana" (KARLEN et al., 1997, p. 3).

A qualidade do solo pode ser refletida pela medição das propriedades físicas, químicas e biológicas do solo, também conhecidas como indicadores de qualidade do solo (SHUKLA; LAL; EBINGER, 2006). Com o objetivo de avaliar a qualidade de um solo, deve-se avaliar atributos químicos, como pH, teor de matéria orgânica, fósforo, potássio, alumínio, acidez potencial, cobre, ferro, capacidade de troca de cátions (CTC), entre outros; e também os físicos, como: macro e microporosidade, densidade do solo, porosidade total e textura (FREITAS et al., 2017). Quanto aos indicadores biológicos, pode-se citar a biomassa microbiana, a respiração basal, o quociente metabólico, os processos enzimáticos, bem como a macrofauna e os processos que envolvem o ciclo do carbono e do nitrogênio (SILVA et al., 2021).

Para assegurar uma melhor qualidade de solo, pode-se fazer uso de técnicas conservacionistas. Entre as práticas conservacionistas do solo, pode-se citar o sistema de plantio direto e a integração lavoura-pecuária. Phillips et al. (1980) definem o sistema de plantio direto como aquele em que a cultura é plantada inteiramente sem preparo do solo ou com preparo apenas suficiente para permitir a colocação e cobertura da semente com solo para permitir que esta germine. Normalmente, nenhum cultivo adicional é feito antes da colheita. Ervas daninhas e outras vegetações concorrentes são controladas por herbicidas químicos. Corretivos de solo, como calcário e fertilizantes, são aplicados na superfície do solo.

Em SPD, é comum que haja a aplicação de corretores de solo, como cal e fertilizantes. O calcário moído e seus produtos, cal virgem e hidratada, são aplicados no solo para corrigir a acidez e promover o crescimento das plantas. O calcário fornece dois nutrientes importantes para os solos, cálcio e magnésio, além dos elementos traços contidos na rocha calcária. Além disso, ele também neutraliza a acidez gerada pelos fertilizantes nitrogenados, aumentando a produtividade das culturas e o conteúdo orgânico do solo (SAMPAIO; ALMEIDA, 2005).

A integração lavoura-pecuária permite sistemas de exploração em esquemas de rotação, onde se alternam períodos de pecuária com a produção de grãos. Dessa forma ocorre a interação e a complementação da agricultura com a pecuária, favorecendo aspectos do manejo, da fertilidade, da física e da biologia do solo, aumentando a renda dos produtores e trazendo progresso social ao campo. O sistema de integração lavoura-pecuária surge como alternativa muito eficiente, porém mais complexa, de manutenção da produtividade e de recuperação/renovação indireta de pastagens. Esse sistema permite uso mais racional de insumos, máquinas e mão-de-obra na propriedade agrícola, além de diversificar a produção e o fluxo de caixa dos produtores (MACEDO, 2009).

O sistema plantio direto com integração lavoura-pecuária favorece o aumento dos teores de matéria orgânica e dos teores de carbono orgânico total e de nitrogênio dos agregados, quando em comparação ao sistema de plantio direto sem integração lavoura-pecuária (LOSS et al., 2011). Mesmo com alta exportação de nutrientes e tráfego de máquinas, esse tipo de sistema é eficiente para manutenção e até melhoria da fertilidade e dos estoques de carbono do solo. Os sistemas de integração lavoura-pecuária promovem redução da compactação refletindo no incremento da macroporosidade e porosidade total e diminuição da resistência mecânica a penetração e densidade do solo, nas camadas superficiais do solo (COSTA et al., 2015).

Em sistemas SPD-ILP, o aumento de matéria orgânica no solo acaba estimulando a biomassa microbiana. A biomassa microbiana do solo representa a fração viva da matéria orgânica, responsável por processos bioquímicos e biológicos no solo e sensivelmente alterada pelas condições impostas pelo meio. Essa comunidade de microrganismos do solo é influenciada pelo clima, pela

aeração, pela disponibilidade de nutrientes minerais e pelo C orgânico do solo (SOUZA et al., 2010).

O aumento de matéria orgânica no solo promovido pela adoção de sistemas SPD-ILP pode reduzir a mobilidade de pesticidas no solo, evitando que esses sejam lixiviados e contaminem águas subterrâneas. Segundo Vieira et al. (1999), o comportamento dos pesticidas no solo é bastante complexo e é resultante de vários fatores, sendo um deles a interação com os constituintes das diferentes frações contidas no solo (ácido húmico, argila, óxidos e etc.). A adsorção é a interação do soluto (pesticida) da fase líquida com a superfície das partículas da fase sólida do solo. É um processo determinante para se entender o comportamento dos pesticidas, pois está relacionado diretamente aos processos de transporte, adsorção e bioatividade deste no solo, influenciando diretamente na disponibilidade dos produtos para as plantas. Alguns herbicidas, como o 2,4D, são adsorvidos preferencialmente na matéria orgânica. Aumentar o conteúdo de matéria orgânica do solo traz benefícios não só para a produtividade agrícola, mas também para a qualidade do solo em si.

3.3 ACIDEZ DO SOLO

A acidez do solo é determinada em grande parte pela composição do solo e pelas reações de troca iônica e hidrólise associadas aos vários componentes do solo. Quanto aos componentes inorgânicos é possível citar os silicatos, os óxido-minerais e os ácidos solúveis. Outro fator relevante na acidez dos solos é a matéria orgânica, que pode ser descrita como um arranjo polimérico condensado, aromático, ao qual estão ligadas cadeias laterais alifáticas, como peptídeos, açúcares e ácidos carboxílicos (THOMAS; HARGROVE, 1984).

A acidez do solo é um dos maiores problemas na produção de alimentos porque pelo menos 40% – e em algumas estimativas até 70% – do solo do planeta é afetado por esse problema. Os solos se tornam ácidos durante a evolução geológica, especialmente em áreas com alta concentração de chuvas, porque as “bases” são relativamente fáceis de serem lixiviadas dos solos, os deixando “ácidos” (RENGEL, 2003).

O pH do solo pode ser considerado a medida mais informativa para determinar as características do solo. Por exemplo, a disponibilidade de nutrientes essenciais e a toxicidade de outros elementos pode ser estimada em função da sua relação com o pH (SPARKS et al., 1996).

O pH pode ser utilizado para diagnosticar o nível de acidez do solo e indicar a necessidade ou não de calagem (NICOLODI; ANGHINONI; GIANELLO, 2008). A calagem, quando necessária, é a primeira prática a ser realizada e tem como objetivos neutralizar o Al e/ou Mn trocáveis, fornecer Ca e Mg às plantas, elevar a saturação por bases, equilibrar a relação K:Ca:Mg, contribuir para o aumento da disponibilidade de N, P, K, S e Mo e melhorar a atividade microbiana do solo (BORGES et al., 2021).

A adoção de sistemas de plantio direto em substituição ao plantio convencional promove alterações na dinâmica de nutrientes e da acidez, principalmente na camada superficial do solo. Os efeitos nocivos da acidez são minimizados em solos com plantio direto, sobretudo pelo incremento de matéria orgânica (VIEIRA et al., 2013)

Quanto a acidez em sistemas de manejo que combinam o SPD e ILP, a presença de animais pode interferir na dinâmica do calcário no solo em comparação com áreas que são exclusivas para plantio de lavouras. O pisoteio animal pode causar redução da macroporosidade e da taxa de infiltração de água no solo nas camadas superficiais, o que acaba por restringir o movimento de partículas finas no perfil do solo. Por outro lado, a deposição de excrementos de origem animal promove maior atividade da meso e macrofauna do solo, o que gera um grande número de galerias (bioporos) no interior do solo pelas quais pode se dar o deslocamento de partículas finas como o calcário, favorecendo a correção da acidez do solo em subsuperfície (FLORES et al., 2008).

Sheng et al. (2005) afirmam que a sorção de alguns pesticidas no solo é maior quando o pH é mais elevado. Essa hipótese é corroborada por Spadotto e Hornsby (2003), que afirmam que a matéria orgânica se torna mais acessível para sorção de solutos em pH elevado devido às mudanças conformacionais da estrutura molecular. Portanto, a acessibilidade dos grupos funcionais da matéria orgânica capazes de interagir com os agrotóxicos pode explicar a maior sorção de alguns pesticidas ao solo em pH mais elevado, tornando-os menos biodisponíveis.

3.4 ECOTOXICOLOGIA

O termo ecotoxicologia foi introduzido por Truhaut em 1969 e é derivado das palavras “ecologia” e “toxicologia”. A introdução desse novo termo refletiu uma crescente preocupação sobre os efeitos de produtos químicos ambientais em espécies além da humana. A toxicologia ambiental focava principalmente nos efeitos nocivos de químicos ambientais em seres humanos. No entanto, a toxicologia ambiental em seu sentido mais amplo abrange os efeitos de químicos nos ecossistemas também. Pode-se dizer que a ecotoxicologia compreende uma área de estudo preocupada com os efeitos nocivos de químicos (toxicologia) dentro do contexto de ecologia (WALKER et al., 2012).

É necessário melhorar a previsão dos efeitos de contaminantes no meio ambiente e monitorar os organismos que podem sofrer esse impacto. Para prever os efeitos, é necessário avaliar as quantidades e vias dos poluentes no meio ambiente, o modo de ação dos poluentes em organismos individuais, o grau de efeito para uma determinada exposição e o consequente efeito nas populações (MORIARTY, 1988).

As principais áreas de aplicação da ecotoxicologia são o biomonitoramento de poluição ambiental (incluindo o uso de bioensaios e biomarcadores), a investigação dos problemas da poluição, a condução de ensaios de campo (principalmente de pesticidas), o estudo do desenvolvimento de resistência e, por fim, avaliação de riscos de produtos químicos ambientais (WALKER et al., 2012).

O monitoramento biológico, ou biomonitoramento, pode ser definido como o uso sistemático de respostas biológicas para avaliar mudanças no meio ambiente com a intenção de usar essas informações em um programa de controle de qualidade. Essas mudanças geralmente são devidas a fontes antropogênicas e podem ser causadas por uma variedade de estresses, como compostos tóxicos, efluentes térmicos e enriquecimento de nutrientes (MATTHEWS et al., 1982).

Bioindicadores são os organismos capazes de dar informações sobre a qualidade (de uma parte) de seu ambiente. O biomonitoramento é a observação contínua de uma área com o auxílio de bioindicadores. Com a ajuda dos

organismos, as tendências no tempo e no espaço em relação à distribuição e aos efeitos ecológicos dos produtos químicos ambientais podem ser observadas por meio de uma avaliação semiquantitativa dos resultados (MARKERT; BREURE; ZECHMEISTER, 2003).

Já os biomarcadores são definidos como qualquer resposta a um contaminante ambiental a nível individual, medidos no organismo ou matriz biológica, indicando um desvio do estado normal que não pode ser detectado no organismo intacto. Uma definição típica é: “medições de fluidos corporais, células ou tecidos que indicam em termos bioquímicos ou celulares a presença de contaminantes ou a magnitude da resposta do organismo alvo” (LIVINGSTONE, 2007, p. 3).

Muitas abordagens de biomonitoramento e métodos de análises de laboratório foram propostos para as avaliações ecotoxicológicas de produtos químicos em organismos vivos (ABDUL RIDA; BOUCHÉ, 1997). Várias espécies de minhocas (por exemplo, *Eisenia fetida* e *E. andreii*) ocupam um lugar importante nos testes de toxicidade, tendo como objetivos principais a avaliação da toxicidade potencial de novos produtos químicos a serem introduzidos no meio ambiente e a avaliação de risco para efeitos tóxicos de solos historicamente contaminados (SANCHEZ-HERNANDEZ, 2006).

As minhocas são tradicionalmente consideradas indicadores convenientes do uso da terra e da fertilidade do solo. Seu tamanho relativamente grande, variando de 1 a 80 cm ou maior, rapidez limitada no deslocamento do solo e recolonização lenta são características que tornam as minhocas fáceis de capturar e classificar e as tornam atraentes como bioindicadores. Além dos efeitos diretos dos pesticidas, deve-se considerar a toxicidade dos muitos produtos de degradação dos pesticidas que penetram no solo; além disso, os possíveis efeitos sinérgicos dos coquetéis de pesticidas não são bem estudados ou compreendidos. Os pesticidas podem apresentar toxicidade direta contra as minhocas e produzir efeitos latentes em seu crescimento e fertilidade, além de respostas moleculares e celulares, como biomarcadores de exposição a poluentes (PAOLETTI, 1999).

O papel das minhocas na decomposição da matéria orgânica e subsequente ciclagem de nutrientes aumentou o interesse de seu uso como organismo indicador do impacto biológico de poluentes do solo. Além disso, a

manipulação de minhocas é relativamente simples, isso facilita a mensuração de diferentes parâmetros do ciclo de vida, por exemplo, crescimento e reprodução, assim como acumulação e excreção de poluentes, e respostas bioquímicas. Portanto, minhocas são organismos adequados para pesquisa de ecotoxicologia do solo (SORIANO, 2012). A Figura 1 apresenta um fluxograma dos efeitos de poluentes do solo nos índices bioquímicos das minhocas.

Figura 1 – Fluxograma que mostra o efeito dos poluentes do solo nos índices bioquímicos das minhocas



Fonte: Adaptado de Tiwari et al. (2016).

Uwizeyimana et al. (2017) destacam que as misturas de pesticidas e metais pesados afetam negativamente as minhocas. A contaminação gerada por misturas de pesticidas e íons metálicos pode induzir danos ao DNA, interrupção nas atividades enzimáticas, redução na sobrevivência individual, taxa de produção e crescimento, mudança no comportamento individual, como taxa de alimentação e diminuição na biomassa de minhocas.

Hattab et al. (2020) avaliaram o impacto do cultivo intensivo através da análise de biomarcadores de minhocas da espécie *Eisenia andrei*. Os resultados demonstraram que a agricultura intensiva pode causar uma hiperacumulação de metais pesados nos solos e, conseqüentemente, nas minhocas. Isso leva a um

severo estresse oxidativo e, portanto, à ativação de mecanismos de proteção nas minhocas. À vista disso, os biomarcadores podem ser considerados uma boa forma de avaliar o efeito de um contaminante ambiental em minhocas.

3.5 BIOMARCADORES ENZIMÁTICOS

Biomarcadores são medições em nível molecular, bioquímico ou celular em populações de habitats contaminados ou em organismos experimentalmente expostos a poluentes que indicam que o organismo foi exposto a produtos químicos tóxicos e a magnitude da resposta dos organismos ao contaminante (MCCARTHY; SHUGART, 1990). Nos últimos anos há um interesse crescente em aumentar o conhecimento sobre as respostas moleculares e celulares de minhocas a poluentes, como biomarcadores de exposição a poluentes, para ser usado no monitoramento de solo e em programas de avaliação do solo. A abordagem por biomarcadores pode oferecer mais informação sobre a resposta ao estresse do organismo à mistura de contaminantes e a produtos tóxicos individuais (SORIANO, 2012).

Uma das principais funções dos biomarcadores é fornecer um sinal de alerta precoce de efeitos biológicos significativos, afinal as respostas moleculares, bioquímicas e fisiológicas precedem aquelas que ocorrem em níveis mais elevados de organização biológica. Portanto, os biomarcadores podem ser usados para prever o que pode acontecer quando algum produto tóxico entra em contato com um ambiente específico, ou o que acontecerá se a exposição continuar a ocorrer, que são os principais objetivos de uma avaliação de risco prospectiva (LAM, 2009).

O estudo de biomarcadores de minhocas é necessário para determinar se um solo pode ter uma variedade de efeitos em diferentes níveis sobre esses organismos (especificamente molecular, celular, bioquímico e fisiológico). Como as respostas de biomarcadores únicos ao estresse ambiental nem sempre são confiáveis, o índice integrado de resposta de biomarcadores (IBR) é calculado para obter uma avaliação objetiva (pontuada) da síndrome do estresse induzido. Se o IBR for positivo, é provável que o solo esteja contaminado. Quando combinado com outros dados, como a presença ou ausência de uma fonte de

poluição, pode-se determinar se é necessário um estudo químico para apurar os fatores de risco (KUMAR et al., 2022).

O estudo de biomarcadores de minhocas é necessário para determinar se um solo pode ter uma variedade de efeitos em diferentes níveis sobre esses organismos (especificamente molecular, celular, bioquímico e fisiológico). Como as respostas de biomarcadores únicos ao estresse ambiental nem sempre são confiáveis, o índice integrado de resposta de biomarcadores (IBR) é calculado para obter uma avaliação objetiva (pontuada) da síndrome do estresse induzido. Se o IBR for positivo, é provável que o solo esteja contaminado. Quando combinado com outros dados, como a presença ou ausência de uma fonte de poluição, pode-se determinar se é necessário um estudo químico para apurar os fatores de risco (KUMAR et al., 2022).

Este índice pode ser particularmente útil para biomonitoramento nas áreas geográficas onde os valores de referência não estão disponíveis e para aqueles biomarcadores sem valores de referência bem estabelecidos, bem como quando biomarcadores em níveis complexos de organização biológica não estão disponíveis. Além disso, fornece indicação dos mecanismos biológicos envolvidos nas respostas específicas do local a perturbações ambientais (ASENSIO et al., 2013).

Quando a produção anormal de radicais livres induzida por xenobióticos supera a proteção endógena proporcionada por enzimas degradativas específicas, vitaminas antioxidantes e outros eliminadores de radicais, o dano resultante aos constituintes celulares é conhecido como estresse oxidativo (OAKES; VAN DER KRAAK, 2003).

Os principais antioxidantes enzimáticos em resposta ao estresse oxidativo são: superóxido dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase. Para prevenir o dano oxidativo, a SOD metaboliza o ânion superóxido (O_2^-) em oxigênio molecular e H_2O_2 , que é então desativado pela catalase. (TIWARI et al., 2016). A seguir serão descritas informações sobre os biomarcadores que serão avaliados neste estudo.

As colinesterases (ChEs) constituem um grupo de hidrolases altamente sensíveis aos pesticidas organofosforados e carbamatos. A acetilcolinesterase (AChE) é considerada a principal colinesterase nas minhocas (RAULT; MAZZIA;

CAPOWIEZ, 2007). É uma enzima significativa que desempenha papel crucial no mecanismo de transmissão do sistema nervoso (SOREQ, 2012).

Foi relatado que a concentração da atividade da AChE era mais alta na parte pré-clitelar da minhoca e tem papel importante no funcionamento do cérebro dorsal presente próximo ao prostômio (CALISI; LIONETTO; SCHETTINO, 2011). A exposição de *Eisenia fetida* ao pesticida carbamato, metiocarbe, demonstrou causar forte inibição da atividade da AChE (CALISI; LIONETTO; SCHETTINO, 2009).

A catalase é uma enzima presente em quase todas as células animais e vegetais (LÜCK, 1965). A catalase tem uma função dupla, porque catalisa as seguintes reações: (1) decomposição de H_2O_2 para H_2O e O_2 ; (2) oxidação de H doadores, por exemplo, metanol, etanol, ácido fórmico, fenóis, com o consumo de 1 mol de peróxido (AEBI, 1974). O estudo de Mkhinini et al. (2020) avaliou como minhocas da espécie *Eisenia andrei* podem sofrer estresse oxidativo quando expostas à esgoto tratado. A atividade da CAT diminuiu crucialmente, o que pode estar relacionado ao estresse metálico causado pelo esgoto tratado. A CAT é uma enzima chave na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas em resposta a um estresse abiótico. Assim, a redução significativa de sua atividade pode estar relacionada à alta produção de substratos para manter o nível celular de peróxido de hidrogênio.

A glutathione-S-transferase (GST), uma enzima citosólica, desempenha um papel crucial na desintoxicação e biotransformação de uma série de compostos eletrofílicos pelo consumo de glutathione. A exposição a agrotóxicos pode levar a alterações nas atividades enzimáticas que refletem os distúrbios metabólicos e danos celulares em tecidos específicos (TIWARI et al., 2016).

A peroxidação lipídica em minhocas, medida pelo teor de TBARS, tem sido frequentemente utilizada como marcador de estresse oxidativo (EČIMOVIĆ et al., 2018). O MDA é o produto da peroxidação lipídica, amplamente utilizado para medir o nível de estresse oxidativo nos organismos. Quando expostas a diversos contaminantes, e quando SOD, catalase, GPx e/ou GST não são capazes de controlar a produção de EROS, as minhocas são afetadas pelo estresse oxidativo decorrente da peroxidação das caudas lipídicas na estrutura da membrana, devido ao seu alto teor de ácidos graxos poli-insaturados. (MARKAD et al., 2015).

A detecção do estresse oxidativo tem se baseado amplamente na quantificação de compostos como o malondialdeído (MDA), que são formados pela degradação dos produtos iniciais do ataque dos radicais livres. A reação do MDA com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) é um dos estimadores de estresse oxidativo mais amplamente usados (Liu et al., 1997).

No estudo de Zhang et al. (2020), minhocas da espécie *Eisenia fetida* foram expostas a várias concentrações do inseticida sulfoxaflor. Com o aumento da concentração de sulfoxaflor, o teor de TBARS também aumentou gradualmente do dia 7 ao dia 28. Esse estudo mostra que o conteúdo aumentado de TBARS pode ser um biomarcador indireto de dano oxidativo induzido por poluentes. Portanto, pode-se deduzir que o sulfoxaflor pode causar citotoxicidade em minhocas.

Bouraoui et al. (2009) avaliaram o efeito que a exposição ao cobre causa em minhocas da espécie *Eisenia andrei*. Além do aumento da atividade de enzimas antioxidantes como a catalase, ocorreu um aumento no nível de peroxidação lipídica, sugerindo uma defesa antioxidante insuficiente. O acúmulo de MDA seguiu uma tendência crescente, sendo sempre significativamente diferente do controle.

Hattab et al. (2015) também observaram um aumento pronunciado no acúmulo de MDA em minhocas expostas a um pesticida, demonstrando ser esse um marcador de estresse oxidativo. Esses estudos mostram que o aumento do teor de TBARS pode ser um biomarcador indireto de dano oxidativo induzido por poluentes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SOLO

O solo utilizado no estudo foi coletado em um experimento localizado na Estação Experimental Agronômica (EEA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), no município de Eldorado do Sul, RS, Brasil (latitude 30°05'22"S, longitude 51°39'08"O), com altitude média de 46 metros acima do nível do mar. O experimento possui parcelamento em blocos, totalizando quatro parcelas. No período do verão o solo é semeado com soja (*Glycine max*), enquanto no período do inverno a área é utilizada para cultivo de azevém (*Lolium multiflorum*), com ou sem a presença de animal em pastejo. Nas parcelas ainda há a subdivisão com ou sem a aplicação de calcário, e com e sem aplicação de agrotóxicos.

O solo classifica-se como Plintossolo Argilúvico Distrófico típico, de acordo com o Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (EMBRAPA, 2013). A caracterização química do solo antes do experimento é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização química do solo antes da instalação do experimento na Estação Experimental Agrônômica (EEA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Camada	pH	COT	Cátions trocáveis				Nutrientes disponíveis		Saturação	
			Ca	Mg	Al	H + Al	P	K	Bases	Al
cm		g.kg ⁻¹	cmol.cdm ⁻³				mg.dm ⁻³		%	
0 – 5	3,9	16,7	1,3	0,7	1,4	10,2	94,8	84,2	17,9	40,4
5 – 10	3,8	8,8	0,8	0,4	1,7	10,2	93,6	69,1	12,0	56,6
10 – 20	4,0	6,4	0,9	0,4	1,6	8,9	45,8	68,5	14,5	53,1
20 – 30	4,2	5,9	1,4	0,6	1,6	8,7	16,7	66,4	20,2	42,5
30 – 40	4,3	5,8	1,4	0,7	1,5	8,7	12,5	65,5	21,3	40,8

pH em água (relação 1:1); cálcio (Ca), magnésio (Mg) e alumínio (Al) extraídos com KCl 1 mol L⁻¹

H+Al: determinado indiretamente com solução SMP; fósforo (P) e potássio (K) extraídos com solução Mehlich 1.

Fonte: Informação cedida por Lucas Aquino Alves, Engenheiro Agrônomo responsável pela realização da análise dos atributos químicos da área experimental, novembro de 2019.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O local de estudo é dividido em quatro parcelas, havendo dois tratamentos diferentes em cada uma das parcelas. Nas parcelas ainda há uma subdivisão com ou sem a aplicação de calcário, de modo que todas as possibilidades possam ser satisfeitas (Quadro 1). Visando obter repetições foram colocados três cilindros por tratamento.

Quadro 1 – Combinações de manejos e práticas que compõem os diferentes tratamentos do experimento localizado na Estação Experimental Agronômica (EEA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), no município de Eldorado do Sul, RS, Brasil

Parcela	Tratamentos	Agrotóxico	Pastejo	Calcário
Parcela 1	Tratamento 1	X	X	X
	Tratamento 2	X	X	
Parcela 2	Tratamento 3	X		X
	Tratamento 4	X		
Parcela 3	Tratamento 5		X	X
	Tratamento 6		X	
Parcela 4	Tratamento 7			X
	Tratamento 8			

Fonte: Autora (2023).

O solo foi retirado do local com o auxílio de cilindros de PVC com 20 cm de diâmetro e 15 cm de altura. Em cada uma das quatro unidades experimentais iniciais foram alocados dois tipos de tratamentos diferentes, totalizando oito tratamentos (Quadro 1). Visando obter repetições, foram coletados três cilindros por tratamento, totalizando 24 cilindros. Os cilindros coletados foram transportados até um local isolado e sem cobertura onde ocorreu o cultivo de soja, com o objetivo de simular uma situação de campo (Figura 2).

Figura 2 – Cultivo de soja nos cilindros com objetivo de simular uma situação de campo



Fonte: Autora (2023).

Nos tratamentos que receberam pesticidas no campo também foi feita a aplicação destes produtos no solo cultivado nos cilindros (Figura 3). Os agrotóxicos utilizados nesse experimento simulam a condição real de aplicação de pesticidas realizada em áreas de cultivo de soja transgênica, de acordo com a dosagem recomendada pelo fabricante (Quadro 2). O cálculo para diluição dos pesticidas a fim de obter a dosagem correta foi feito com base na área do cilindro (diâmetro de 20 cm). Após o fim dessa safra, as plantas foram retiradas dos cilindros, fazendo com que as amostras de solo se tornassem deformadas. Os cilindros foram acondicionados em local coberto, onde se deu a exposição dos organismos.

Figura 3 – Aplicação de pesticidas na soja



Fonte: Autora (2023).

Quadro 2 – Esquema de aplicação e dosagem dos pesticidas utilizados no experimento conduzido nos cilindros

Atividade	Produto utilizado	Data	Dosagem
Aplicação de herbicida	Glifosato	16/12/2020	4000 mL/ha
Plantio da soja	--	30/12/2020	--
Aplicação de herbicida	Glifosato	15/01/2021	4000 mL/ha
Aplicação de fungicida e inseticida	Fox e Prêmio	25/01/2021	Fox: 400 mL/ha Prêmio: 50 mL/ha
Aplicação de fungicida e inseticida	Monaris, Engeo Pleno e Prêmio	15/02/2021	Monaris: 300 mL/ha Engeo Pleno: 200 mL/ha Prêmio: 50 mL/ha
Aplicação de fungicida e inseticida	Fox e Prêmio	08/03/2021	Fox: 400 mL/ha Prêmio: 50 mL/ha

Fonte: Autora (2023).

4.3 ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO

Antes da exposição dos organismos e após a aplicação dos pesticidas no solo, amostras de solo foram retiradas e encaminhadas para análise química de cada um dos tipos de tratamento. Cerca de 100 gramas de solo foram coletados de cada cilindro e acondicionados em um recipiente aberto para que secassem ao ar livre (Figura 4a). Após alguns dias, o solo seco foi acondicionado em sacos plásticos etiquetados (Figura 4b) e encaminhado para análise química no Laboratório de Análise de Solos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Ao total, foram mensurados 15 parâmetros químicos do solo.

Figura 4 – Amostras de solo coletado para avaliação química



(a) amostras secando ao ar livre

(b) amostras acondicionadas e etiquetadas

Fonte: Autora (2023).

4.4 EXPOSIÇÃO DOS ORGANISMOS E AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES

Durante todo o período de exposição dos organismos ao solo, os cilindros foram deixados em uma área coberta. A umidade foi controlada diariamente, mantendo-se sempre a umidade ideal para os organismos, de 70% da capacidade de campo do solo. As minhocas foram alimentadas semanalmente com esterco bovino (Figura 5).

Figura 5 – Minhocas da espécie *Eisenia andrei* expostas ao solo



Fonte: Autora (2023).

As minhocas utilizadas nesse estudo foram indivíduos adultos clitelados oriundos do Laboratório de Engenharia de Meio Ambiente da Universidade Federal de Santa Maria, campus sede. A espécie *Eisenia andrei* foi exposta ao solo em cilindros de PVC, com 20 cm de diâmetro e 15 cm de altura. Cada cilindro continha 10 indivíduos. Para que o sistema fosse isolado, aeróbio e com drenagem adequada, foi utilizado tecido-não-tecido (TNT) e tela de nylon na extremidade inferior dos cilindros e tecido de algodão na extremidade superior, ambos presos com elástico de borracha para que não houvesse qualquer possibilidade de fuga dos organismos (Figura 6).

Figura 6 – Cilindros contendo as amostras de solo onde se deu a exposição dos organismos, com as extremidades devidamente presas para evitar fugas



Fonte: Autora (2023).

O tempo de exposição das minhocas foi de 7, 14 e 28 dias, havendo coleta de 3, 3 e 4 indivíduos em cada etapa, respectivamente. O Quadro 3 apresenta o cronograma de exposição e coleta das minhocas.

Quadro 3 – Cronograma de exposição e coleta dos organismos

Atividade	Data
Exposição dos organismos	01/04/2021
Coleta 7 dias	08/04/2021
Coleta 14 dias	15/04/2021
Coleta 28 dias	29/04/2021

Fonte: Autora (2023).

O procedimento de coleta dos organismos consistiu em retirar o número de indivíduos desejado do cilindro, lavá-los com água corrente e armazená-los em microtubos Eppendorf de 1,5 ml. Os microtubos foram mantidos na temperatura constante de -20 °C em um freezer até a realização das análises

dos biomarcadores. As análises de tecidos biológicos foram realizadas preferencialmente com a porção central das minhocas, homogeneizados com tampão Tris-HCl [50 mM] pH 7,5 e centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado para todas as análises. As metodologias utilizadas para avaliação dos biomarcadores estão representadas nos Quadro 4 e todas foram modificadas para microplaca, exceto a catalase.

Quadro 4 – Análises e metodologias propostas para avaliação de biomarcadores da espécie *Eisenia andrei*

Análise	Metodologia
Atividade da Catalase (CAT)	Aebi (1984)
Atividade da Glutathione S-transferase (GST)	Habig, Pabst e Jakoby (1974)
Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)	Ellman et al. (1961)
Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	Draper e Hadley (1990)
Determinação de proteína	Bradford (1976)

Fonte: Autora (2023).

4.5 ÍNDICE INTEGRADO DE RESPOSTA DE BIOMARCADORES (IBR)

As respostas dos biomarcadores foram submetidas ao “Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores” versão 2 (IBRv2), descrito por Beliaeff e Burgeot (2002) e modificado por Sanchez, Burgeot e Porcher (2013). Esta versão do IBR é baseada no princípio do desvio de referência entre estado perturbado e não perturbado. O IBR pode ser calculado sem software específico e combina um valor matemático e um resultado gráfico para obter a resposta específica dos biomarcadores investigados. Os parâmetros calculados para cada tratamento foram expostos em um gráfico de radar para representar o desvio de referência (em relação ao controle) de cada biomarcador estudado. A área acima de 0 representou a indução da atividade enzimática e a área abaixo de 0 indicou sua inibição. O tratamento que apresentou a maior soma absoluta dos valores

calculados para o conjunto de biomarcadores avaliados indicou a maior interferência ambiental nos parâmetros bioquímicos analisados.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística dos parâmetros químicos do solo, foi verificada a presença de *outliers* nos dados, a normalidade dos dados e a homogeneidade das variâncias. Foi realizado o teste *t* não pareado para verificar se havia diferença significativa entre as médias nos tratamentos. Foi realizada uma ANOVA fatorial de três vias, tendo em vista os três fatores do estudo que interagem entre si (pastejo, calcário e agrotóxico), com pós-teste de Tukey.

Para testar o efeito dos tratamentos e dos dias sobre os biomarcadores analisados foi realizada uma Análise de Variância – ANOVA – de dois fatores. Quando os dados não possuíram distribuição normal e ou homogeneidade de variâncias, foi realizada uma transformação logarítmica sobre a variável resposta usando a função \log_{10} . O teste de Tukey foi utilizado *a posteriori* para avaliar as comparações par-a-par em caso de o modelo da ANOVA ser significativo. Foi considerado em todas essas análises um $\alpha = 0,05$ para rejeição da hipótese nula. Foi utilizado o pacote *rstatix* (KASSAMBARA, 2021). As análises dos dados foram realizadas no ambiente R v.4.2. (R CORE TEAM, 2022).

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO

Foram mensurados 15 parâmetros químicos do solo, cujos resultados são apresentados no Quadro 5.

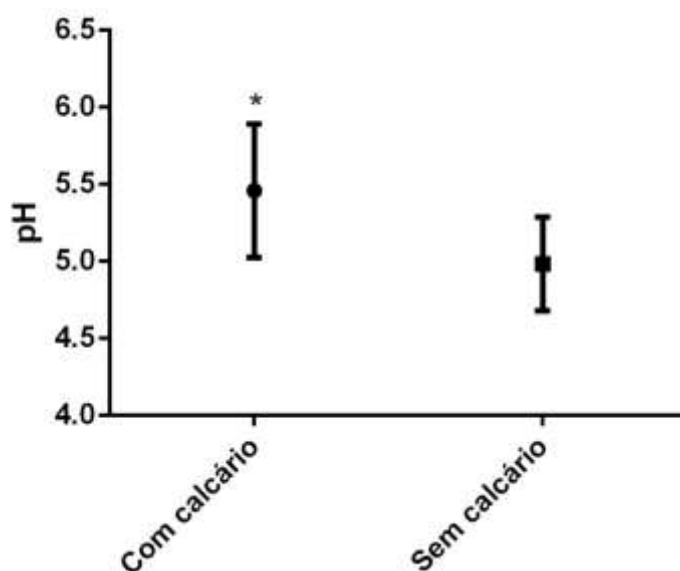
Quadro 5 – Parâmetros químicos avaliados nas amostras de solo

	pH ± DP	H+Al ± DP	P-Mehlich ± DP	K-Mehlich ± DP	Mn-Mehlich ± DP	Ca ± DP	Mg ± DP	Al ± DP	CTC ± DP	Saturação por Al ± DP	Saturação por bases ± DP
T1	5,72 ± 0,21	2,94 ± 0,29	81,11 ± 11,57	92,67 ± 12,66	110,13 ± 11,49	3,3 ± 0,49	1,32 ± 0,18	0 ± 0	7,8 ± 0,43	0 ± 0	62,13 ± 5,74
T2	4,84 ± 0,04	4,59 ± 0,28	96,72 ± 5,97	79 ± 2	85 ± 4,71	1,99 ± 0,06	0,65 ± 0,05	0,19 ± 0,03	7,43 ± 0,32	6,16 ± 0,98	38,27 ± 1,62
T3	5,51 ± 0,25	3,1 ± 0,57	92,45 ± 8,62	79,33 ± 5,69	92,97 ± 9,85	3,13 ± 0,44	1,24 ± 0,24	0,04 ± 0,01	7,68 ± 0,25	0,99 ± 0,26	59,56 ± 7,86
T4	5,14 ± 0,09	3,49 ± 0,63	84,95 ± 4,54	76 ± 11,36	101,17 ± 5,69	2,65 ± 0,26	0,94 ± 0,1	0,06 ± 0,03	7,27 ± 0,33	1,71 ± 0,96	52,15 ± 7,01
T5	5,78 ± 0,08	2,63 ± 0,16	84,22 ± 13,4	122,67 ± 7,09	92,8 ± 6,24	3,88 ± 0,23	1,38 ± 0,1	0,03 ± 0	8,2 ± 0,26	0,57 ± 0,04	67,85 ± 2,41
T6	4,61 ± 0,19	6,41 ± 0,59	101,68 ± 5,11	89,67 ± 16,5	48,4 ± 12,3	1,52 ± 1,47	0,42 ± 0,4	0,19 ± 0,22	8,58 ± 1,32	6,52 ± 8,55	23,28 ± 19,11
T7	4,82 ± 0,26	5,02 ± 0,48	92,73 ± 19,8	77,67 ± 2,89	44,67 ± 3,95	1,98 ± 0,31	0,67 ± 0,13	0,25 ± 0,13	7,88 ± 0,42	8,25 ± 4,31	36,25 ± 5,03
T8	5,33 ± 0,03	3,89 ± 0,04	88,75 ± 6,06	65,67 ± 3,06	38,67 ± 3,62	2,98 ± 0,29	1,11 ± 0,09	0,07 ± 0,02	8,15 ± 0,35	1,65 ± 0,43	52,23 ± 2,28

DP: desvio padrão. T1: agrotóxico + pastejo + calcário. T2: agrotóxico + pastejo. T3: agrotóxico + calcário. T4: agrotóxico. T5: pastejo + calcário. T6: pastejo. T7: calcário. T8: controle. Fonte: Autora (2023).

De acordo com o desenho experimental do estudo, existem três fatores que interagem entre si. São eles: presença de animais em pastejo, adição de calcário e aplicação de agrotóxicos. A ANOVA fatorial de três vias objetivou identificar de que forma esses fatores interferem uns nos outros, pela análise dos dados de parâmetros químicos do solo. A Figura 7 apresenta os resultados obtidos com relação ao pH do solo. Os tratamentos que tiveram aplicação de calcário (T1, T3, T5 e T7) apresentaram valores de pH significativamente maiores em relação aos que não tiveram aplicação de calcário. A presença de calcário eleva os valores de pH no solo.

Figura 7 – Comparação entre os valores de pH nas amostras de solo com e sem calcário

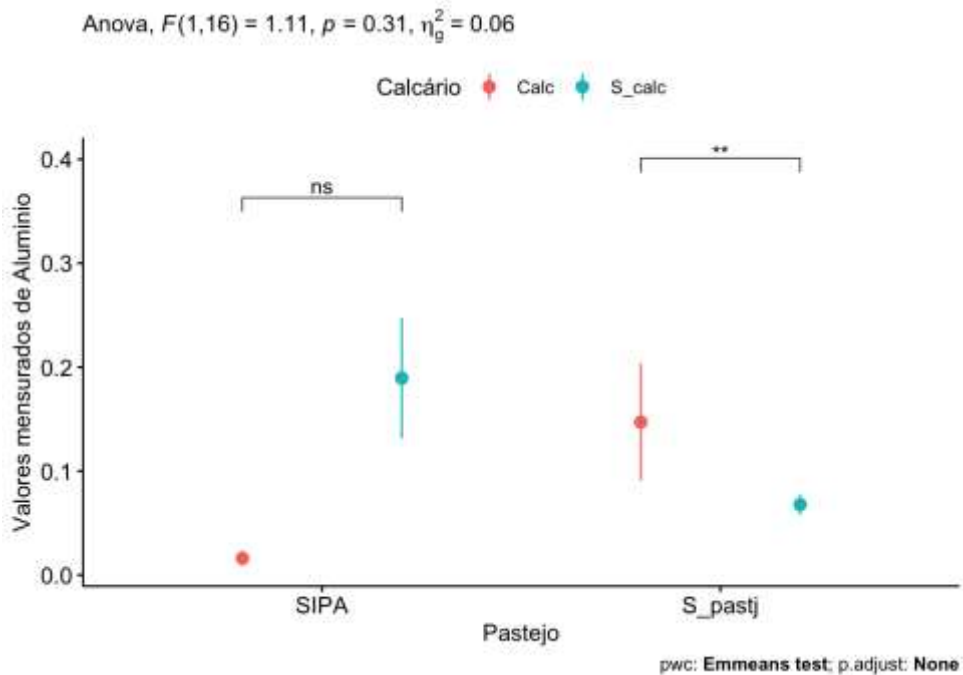


Fonte: Autora (2023).

Quanto ao teor de alumínio, a presença ou não de agrotóxico não influencia as concentrações de alumínio no solo. O que de fato influencia é a interação entre a presença de pastejo e a presença de calcário, conforme mostra a Figura 8. É possível constatar que a presença de calcário tem relação direta com o teor de alumínio nas áreas sem pastejo, mas não tem influência nas áreas

pastejadas. Os tratamentos 6 e 7 apresentaram teores de alumínio maiores que os demais.

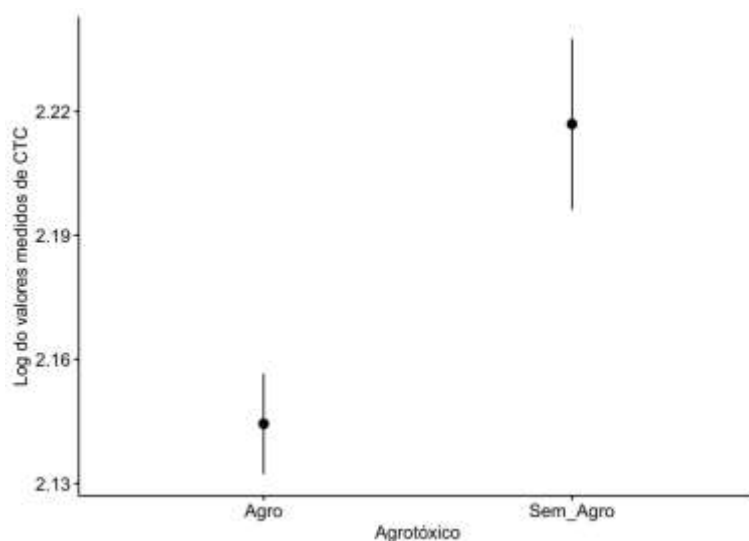
Figura 8 – Teores de alumínio nas amostras de solo com e sem pastejo; com e sem calcário



Fonte: Autora (2023).

Quanto à CTC, é possível observar que somente para agrotóxico há efeito significativo. Ou seja, tanto faz a área ser ou não pastejada e adicionarmos ou não calcário. A única variável que afeta o CTC é a presença ou não do agrotóxico (Figura 9). Os valores de CTC foram significativamente maiores nos tratamentos que não possuíam a aplicação de agrotóxicos. O tratamento 4 (apenas agrotóxicos) apresentou o menor valor absoluto nesse parâmetro.

Figura 9 – Comparação entre valores de CTC em amostras com e sem adição de agrotóxico



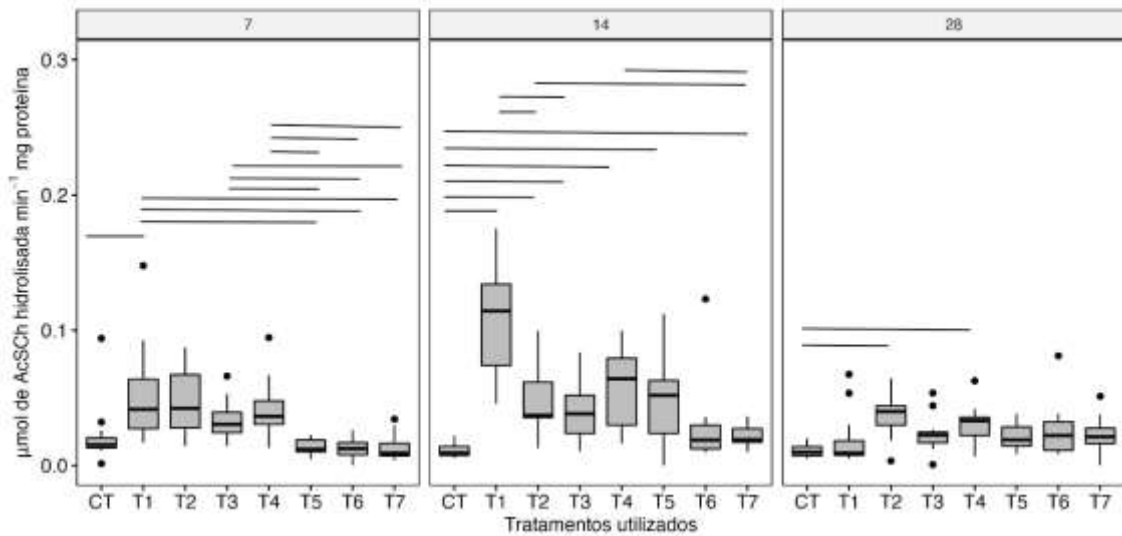
Fonte: Autora (2023).

5.2 BIOMARCADORES DE TOXICIDADE EM *Eisenia andrei*

5.2.1 Atividade da enzima AChE em *Eisenia andrei*

É possível observar que a atividade da acetilcolinesterase foi maior nos tratamentos com aplicação de agrotóxicos (1 ao 4), sendo maior no tratamento 1 em todos os períodos de exposição analisados, o qual também possui aplicação de calcário e presença de animais em pastejo (Figura 10). Aos 7 dias houve diferença significativa entre o tratamento 1 e todos os demais tratamentos, tendo esse tratamento os maiores valores absolutos aos 7 e 14 dias. Já aos 28 dias, houve diferença significativa apenas entre os tratamentos 2 e 4 e o tratamento controle.

Figura 10 – Atividade da acetilcolinesterase (AChE) em *Eisenia andrei* expostas a diferentes tratamentos aos 7, 14 e 28 dias de exposição

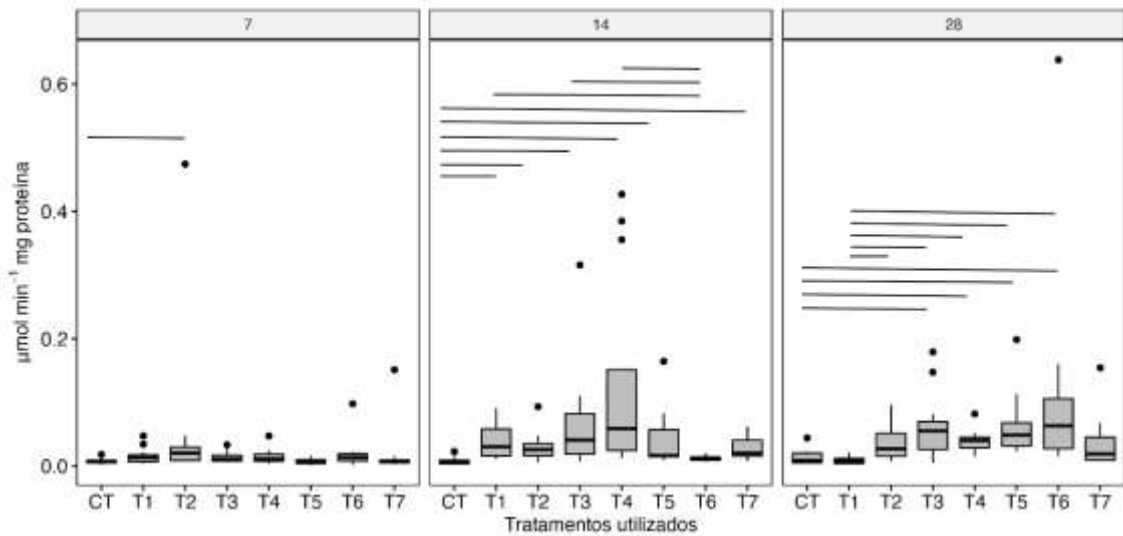


CT: Controle. T1: agrotóxico + pastejo + calcário. T2: agrotóxico + pastejo. T3: agrotóxico + calcário. T4: agrotóxico. T5: pastejo + calcário. T6: pastejo. T7: calcário. Fonte: Autora (2023).

5.2.2 Atividade da enzima CAT em *Eisenia andrei*

No sétimo dia de exposição, houve diferença significativa na atividade da catalase entre o controle e o tratamento 2. Aos 14 dias, a atividade da enzima catalase aumentou e houve diferença significativa entre o tratamento 4 e todos os demais tratamentos. Aos 28 dias de exposição, o controle e o tratamento 1 apresentaram as menores atividades de catalase, diferindo dos demais tratamentos (Figura 11).

Figura 11 – Atividade da catalase (CAT) em *Eisenia andrei* expostas a diferentes tratamentos aos 7, 14 e 28 dias de exposição

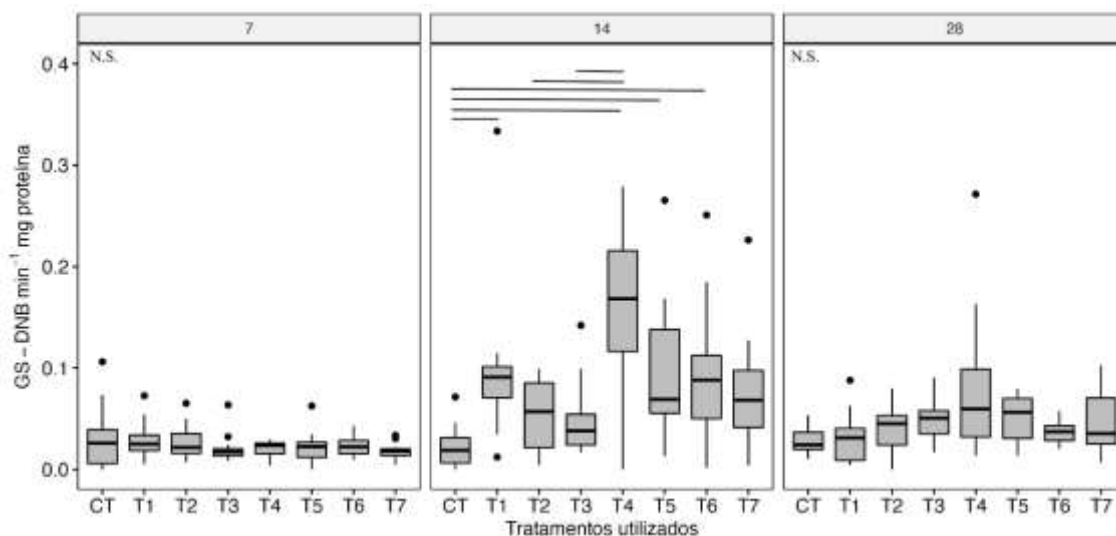


CT: Controle. T1: agrotóxico + pastejo + calcário. T2: agrotóxico + pastejo. T3: agrotóxico + calcário. T4: agrotóxico. T5: pastejo + calcário. T6: pastejo. T7: calcário. Fonte: Autora (2023).

5.2.3 Atividade da enzima GST em *Eisenia andrei*

Tanto no sétimo quanto no vigésimo oitavo dia de exposição não houve diferença significativa na atividade da enzima GST entre os tratamentos. Aos 14 dias de exposição, o controle diferiu significativamente dos tratamentos 1, 4, 5 e 7. O tratamento 4 apresentou os maiores valores de atividade de GST. Ele possui apenas a aplicação de agrotóxicos, não tendo aplicação de calcário nem presença de animais em pastejo (Figura 12).

Figura 12 – Atividade da glutiona-s-transferase (GST) em *Eisenia andrei* expostas a diferentes tratamentos aos 7, 14 e 28 dias de exposição

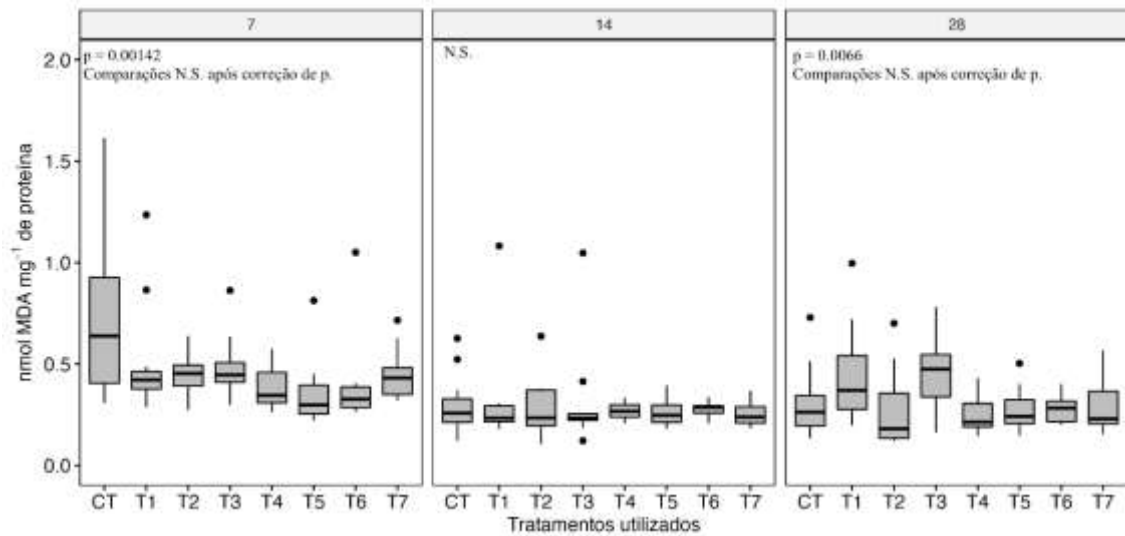


CT: Controle. T1: agrotóxico + pastejo + calcário. T2: agrotóxico + pastejo. T3: agrotóxico + calcário. T4: agrotóxico. T5: pastejo + calcário. T6: pastejo. T7: calcário. Fonte: Autora (2023).

5.2.4 Nível de peroxidação lipídica em *Eisenia andrei*

O efeito dos tratamentos sobre a peroxidação lipídica foi determinado pela avaliação do teor de MDA em minhocas *Eisenia andrei*. Essa avaliação apresentou um grande número de “outliers”, ou seja, valores atípicos que fogem da média. Para tanto, a análise estatística utilizada para manter a confiabilidade dos dados foi uma mais conservadora, sendo o valor significativo de p corrigido por Bonferroni. Nesse tipo de análise, as diferenças significativas são mais difíceis de serem encontradas e, por esse motivo, não houve diferença significativa na avaliação do TBARS em nenhum dos dias do estudo (Figura 13).

Figura 13 – Níveis de malondialdeído em *Eisenia andrei* expostas a diferentes tratamentos aos 7, 14 e 28 dias de exposição



CT: Controle. T1: agrotóxico + pastejo + calcário. T2: agrotóxico + pastejo. T3: agrotóxico + calcário. T4: agrotóxico. T5: pastejo + calcário. T6: pastejo. T7: calcário. Fonte: Autora (2023).

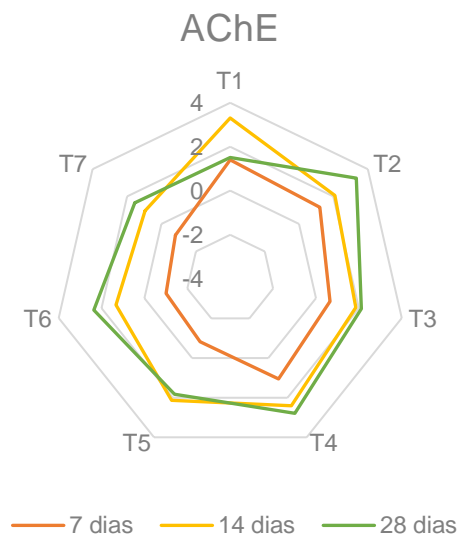
5.3 ÍNDICE INTEGRADO DE RESPOSTA DE BIOMARCADORES (IBR)

O índice IBR consegue identificar flutuações temporais e espaciais no estado de saúde do ecossistema e sua magnitude, e produz resultados consistentes, independentemente da combinação de biomarcadores usados como conjunto para seus cálculos (BROEG; LEHTONEN, 2006). A seguir, serão apresentados gráficos baseados no índice IBR contendo análises por tipo de biomarcador, por dia de amostragem e de cada tratamento individualmente.

5.3.1 Análise gráfica por biomarcador

Com base na abordagem IBR, gráficos do tipo radar foram gerados com os resultados obtidos. Nessa primeira seção os gráficos serão apresentados por biomarcador. A atividade da acetilcolinesterase (Figura 14) teve tendência de crescimento com o passar dos dias, sendo mais intensa nos tratamentos 1, 2 e 4, nos quais havia aplicação de agrotóxicos.

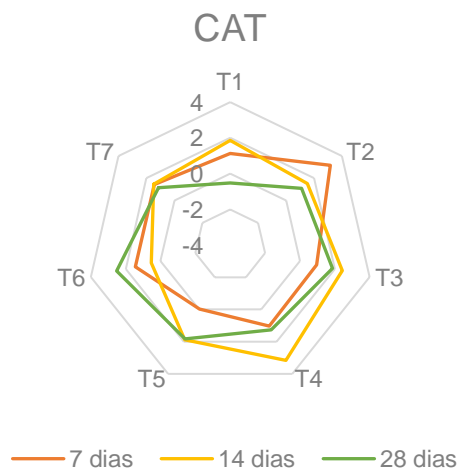
Figura 14 – Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores (IBR) da enzima AChE depois de 7, 14 e 28 dias de exposição dos organismos



T1: agrotóxico + pastejo + calcário. T2: agrotóxico + pastejo. T3: agrotóxico + calcário. T4: agrotóxico. T5: pastejo + calcário. T6: pastejo. T7: calcário. Fonte: Autora (2023).

A atividade da enzima catalase (Figura 15) foi maior nos tratamentos 2, 3 e 4 (nos quais havia aplicação de agrotóxicos). Houve um aumento na atividade da CAT com o passar dos dias, o que indica uma indução de sua atividade.

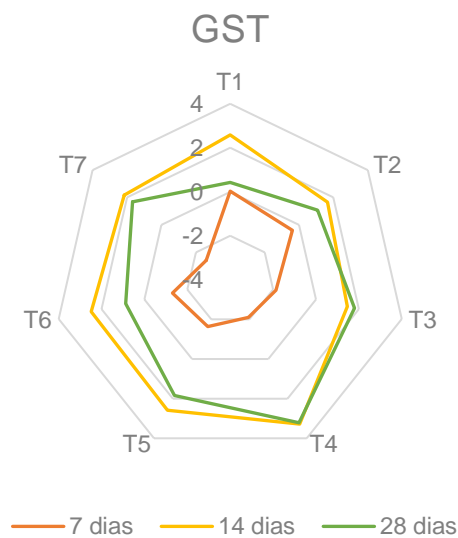
Figura 15 – Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores (IBR) da enzima CAT depois de 7, 14 e 28 dias de exposição dos organismos



T1: agrotóxico + pastejo + calcário. T2: agrotóxico + pastejo. T3: agrotóxico + calcário. T4: agrotóxico. T5: pastejo + calcário. T6: pastejo. T7: calcário. Fonte: Autora (2023).

A atividade da enzima GST (Figura 16) foi maior aos 14 dias de exposição, sendo mais intensa nos tratamentos 4, 5 e 6.

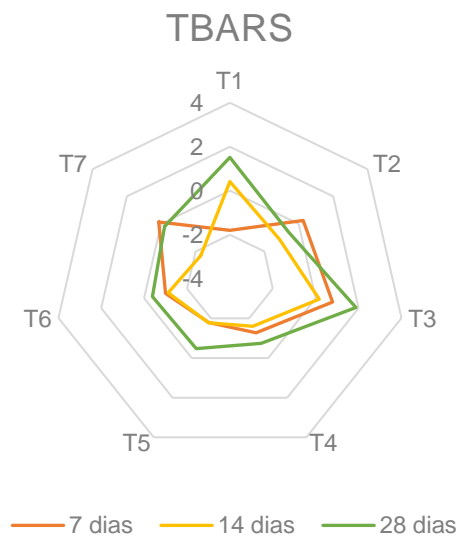
Figura 16 – Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores (IBR) da enzima GST depois de 7, 14 e 28 dias de exposição dos organismos



T1: agrotóxico + pastejo + calcário. T2: agrotóxico + pastejo. T3: agrotóxico + calcário. T4: agrotóxico. T5: pastejo + calcário. T6: pastejo. T7: calcário. Fonte: Autora (2023).

A atividade do TBARS não apresentou diferença significativa na análise estatística. Apesar disso, é possível observar no gráfico IBR (Figura 17) que seguiu uma tendência semelhante aos demais biomarcadores, tendo uma atividade mais intensa nos tratamentos 1 e 3 (que possuem aplicação de agrotóxicos).

Figura 17 – Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores (IBR) da enzima TBARS depois de 7, 14 e 28 dias de exposição dos organismos

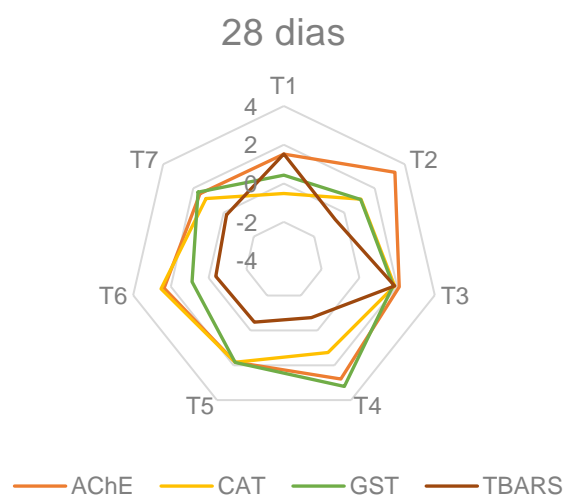
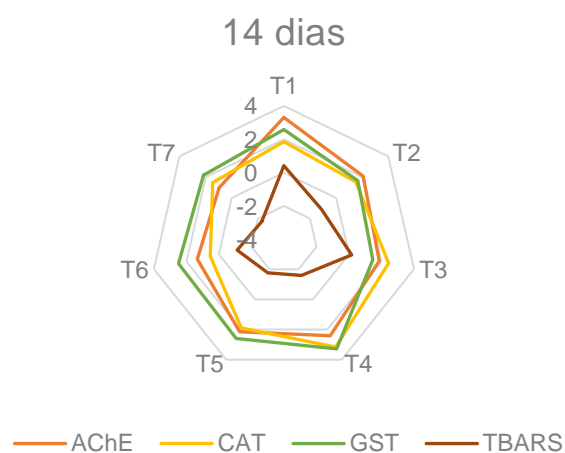
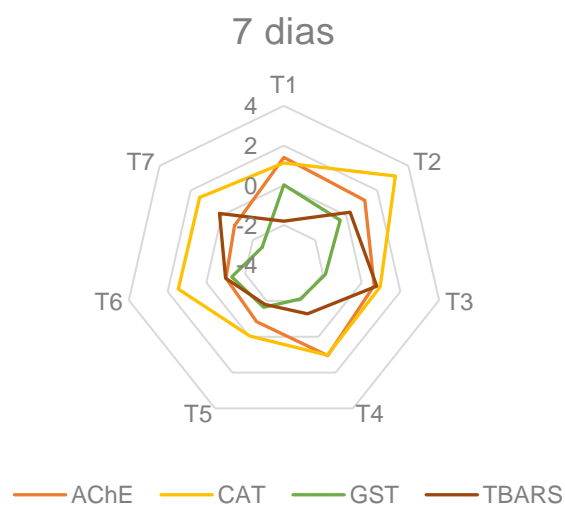


T1: agrotóxico + pastejo + calcário. T2: agrotóxico + pastejo. T3: agrotóxico + calcário. T4: agrotóxico. T5: pastejo + calcário. T6: pastejo. T7: calcário. Fonte: Autora (2023).

5.3.2 Análise gráfica por dia de amostragem

A Figura 18 apresenta a abordagem gráfica IBR por dia de amostragem separadamente, sendo possível observar o comportamento de cada biomarcador com o passar do tempo.

Figura 18 – Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores (IBR) das enzimas AChE, CAT, GST e TBARS aos 7, 14 e 28 dias de exposição dos organismos



T1: agrotóxico + pastejo + calcário. T2: agrotóxico + pastejo. T3: agrotóxico + calcário. T4: agrotóxico. T5: pastejo + calcário. T6: pastejo. T7: calcário. Fonte: Autora (2023).

É possível notar que houve indução de atividade com o passar dos dias em todas os parâmetros avaliados. No sétimo dia de exposição a atividade tende a ser menor em todos os tratamentos. Tratamentos que tiveram destaque em outras análises, como o T4, apresentam os maiores valores de atividade enzimática. O tratamento 7 tende a se manter mais perto do ponto 0 em todos os dias e em todas as enzimas analisadas.

5.3.3 Análise gráfica de cada tratamento individualmente

Na Figura 19 são apresentadas análises gráficas de cada tratamento individualmente. Na análise da soma dos valores absolutos pela metodologia IBR, o tratamento 4 (apenas agrotóxico) foi o que apresentou maior atividade enzimática em todos os períodos analisados. O tratamento 1 apresentou o menor valor na soma dos números absolutos em dois dos três dias analisados.

Figura 19 – Índice Integrado de Resposta de Biomarcadores (IBR) de cada tratamento analisado aos 7, 14 e 28 dias de exposição dos organismos



T1: agrotóxico + pastejo + calcário. T2: agrotóxico + pastejo. T3: agrotóxico + calcário. T4: agrotóxico. T5: pastejo + calcário. T6: pastejo. T7: calcário. Fonte: Autora (2023).

6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

6.1 ANÁLISE QUÍMICA DO SOLO

Os tratamentos que tiveram aplicação de calcário apresentaram valores de pH significativamente maiores em relação aos que não tiveram aplicação de calcário. O pH afeta a disponibilidade de nutrientes, modifica o equilíbrio da fase sólida do solo e controla a diversidade da comunidade microbiana (GARCÍA-GÓMEZ et al., 2018). García-Gómez et al. (2018) encontraram em seus estudos que as atividades enzimáticas de biomarcadores do solo foram afetadas negativamente por um poluente em solo ácido quando comparado com um solo alcalino. Tal resultado indica que o pH mais elevado do solo pode reduzir a disponibilidade de componentes tóxicos para os organismos. Em um solo com pH mais elevado, predominam cargas negativas. Como tal, espera-se que o pH do solo influencie a adsorção de pesticidas, em particular quando os pesticidas se dissociam ou protonam dentro da faixa de pH normalmente observada em solos, visto que moléculas carregadas positivamente tendem a ser atraídas por moléculas carregadas negativamente (SHENG et al., 2005).

Quanto ao teor de alumínio, na análise da ANOVA de três vias foi possível constatar que a presença de calcário tem relação direta com o teor de alumínio nas áreas sem pastejo, mas não tem influência nas áreas pastejadas. Li et al. (2014) analisaram a exposição de minhocas da espécie *Eisenia andrei* a um solo contaminado com alumínio, onde concluíram que o excesso de Al em solos pode causar estresse oxidativo e danos celulares em minhocas, através do aumento da atividade das enzimas catalase e superoxidodismutase (SOD). Assim, a acumulação de Al no ambiente pode apresentar um perigo ecológico através da supressão das importantes funções das minhocas nos ecossistemas do solo.

Com relação à CTC, a análise estatística demonstrou que a única variável que teve influência significativa sobre os valores de CTC foi a presença ou não de agrotóxico. A presença de pesticidas pode ter alterado alguma característica do solo que tenha influência direta sobre a CTC, como o pH do solo ou concentração de cátions trocáveis na solução do solo. Duan et al. (2016) avaliaram 15 tipos de solo e chegaram à conclusão de que a CTC e o teor de

matéria orgânica do solo são os principais fatores que controlam a toxicidade de poluentes nos solos avaliados.

6.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Entre os ensaios enzimáticos, a medição da atividade da acetilcolinesterase (AChE) é fundamental para avaliar os efeitos da exposição a compostos neurotóxicos. O aumento da atividade da AChE representa uma superestimulação dos receptores neuromusculares causando inúmeros sinais de intoxicação. Embora ocorra com bastante frequência, esse aumento na atividade da AChE raramente é explicado. O aumento da AChE está ligado ao dano oxidativo e ionomostase intracelular, geração de espécies reativas e defesa antioxidante (RAMIRES et al., 2020).

Gambi, Pasteris e Fabbri (2007) avaliaram a resposta enzimática da exposição de minhocas a um solo contaminado com o pesticida carbaril. Ao contrário do estudo anterior, nesse houve uma inibição da atividade da AChE, tendo o efeito máximo ocorrido em 3 dias. A inibição da atividade da AChE pode ser um indicador de contaminação por pesticidas, porém deve-se ressaltar que tem efeitos diferentes em função do tempo de exposição e da dosagem de produto aplicada.

Hackenberger et al. (2018) estudaram o efeito do inseticida clorantropilprole sobre minhocas expostas ao solo contaminado. Embora a inibição da atividade da AChE seja um biomarcador de exposição comumente utilizado, neste experimento a atividade da AChE aumentou após o contato com contaminante. O aumento da atividade da AChE parece estar ligado ao estresse oxidativo e às alternâncias na homeostase iônica intracelular (MRDAKOVIĆ et al., 2016).

Uma atividade aumentada da AChE também foi descrita como um marcador de exposição a substâncias indutoras de apoptose, ou seja, uma resposta de células em apoptose, e pode ser devido a um fenômeno de supercompensação, ou pode estar correlacionado com a inflamação do tecido (GAMBARDELLA et al., 2014).

Desta forma, é possível notar que um aumento na atividade da AChE pode ser considerado um indicador de estresse oxidativo, devido aos estudos apresentados que corroboram tal hipótese (HACKENBERGER et al., 2018; MRDAKOVIĆ et al., 2016; RAMIRES et al., 2020).

Hackenberger et al. (2012) demonstraram um aumento na atividade da catalase em minhocas da espécie *Eisenia andrei* quando expostas a contaminantes, sendo que o efeito varia em função do tempo de exposição e da concentração do contaminante, o que indica a ocorrência de estresse oxidativo.

Velki et al. (2019) examinaram a reação da resposta enzimática de minhocas da espécie *Eisenia andrei* expostas a uma série de pesticidas. A exposição resultou em aumento significativo na atividade de CAT, SOD e GST. Aumentos na expressão dessas enzimas sugerem um envolvimento do estresse oxidativo no mecanismo de toxicidade dos agrotóxicos investigados. Os resultados obtidos nesse estudo mostraram que os agrotóxicos podem exercer alta toxicidade para as minhocas mesmo não tendo como alvo organismos do solo. Isso indica que pesticidas de todas as classes podem representar risco para organismos não-alvo do solo.

Autores como Li et al. (2020) e Pereira et al. (2020) também avaliaram o efeito de pesticidas em minhocas da espécie *Eisenia andrei* e observaram um aumento significativo na atividade da enzima catalase. Embora os pesticidas sejam aplicados em baixas concentrações no solo, onde processos de adsorção tornam os compostos menos biodisponíveis, eles causam alterações celulares em organismos expostos.

A toxicidade dos pesticidas pode estar relacionada ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), consequentemente levando a danos oxidativos. As EROs podem ser detoxificadas por sistemas de defesa celular enzimáticos e não enzimáticos. As defesas contra EROS incluem enzimas como glutathione (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione transferase (GST) (ORUÇ, 2010; STOREY, 1997).

A glutathione S-transferase (GST) é uma enzima crucial de desintoxicação da fase II, catalisando a reação da glutathione reduzida com intermediários eletrofílicos para produzir substâncias solúveis em água e que são mais prontamente excretadas. Também pode proteger as células do estresse

oxidativo, removendo peróxidos e minimizando seu impacto nas biomacromoléculas. A GST atua na transformação de xenobióticos em compostos mais solúveis em água, facilitando sua eliminação do organismo e auxilia na desintoxicação celular de organismos expostos a xenobióticos. (CARLETTI et al., 2008; MKHININI et al., 2019; PEREIRA et al., 2020; SALES JUNIOR et al., 2020).

Hattab et al. (2015) investigaram a resposta de estresse oxidativo em minhocas expostas ao pesticida 2,4-D. A exposição ao pesticida causou um aumento significativo na atividade da enzima antioxidante GST em todos os tempos de exposição avaliados, demonstrando que essa enzima pode ser um valioso e sensível biomarcador de estresse oxidativo.

Lackmann et al. (2018) estudaram o efeito de herbicidas sobre minhocas da espécie *Eisenia andrei*, constatando que o nível de expressão gênica de superóxido dismutase (SOD) e glutathione S-transferase (GST) após exposição aos herbicidas apresentou um aumento significativo. Os resultados obtidos mostram que ambos os herbicidas investigados afetam significativamente as minhocas em diferentes níveis de organização biológica.

Boughattas et al. (2022) estudaram o efeito combinado de microplásticos e do herbicida 2-4-D sobre minhocas, visto que estes podem estar presentes simultaneamente no solo. A análise bioquímica revelou alterações oxidativas em minhocas expostas a todos os tratamentos; sendo muito pronunciada nas minhocas expostas à mistura em termos de aumento da acumulação de glutathione-S-transferase (GST), catalase (CAT) e malondialdeídos (MDA).

Numerosos estudos já demonstraram que a GST é ativada quando os organismos são expostos a compostos orgânicos, oligoelementos e pesticidas. Esta ativação é dependente do número de poluentes, suas formas químicas e concentrações (BOUGHATTAS et al., 2022; LACKMANN et al., 2018; VELKI et al., 2019).

6.3 ÍNDICE INTEGRADO DE RESPOSTA DE BIOMARCADORES (IBR)

Em geral, a inibição da atividade da enzima AChE é um alerta precoce de efeitos adversos de pesticidas sobre minhocas e consistentemente incluída entre

as baterias de biomarcadores empregados para avaliações iniciais do impacto de poluentes na vida selvagem (GAMBI; PASTERIS; FABBRI, 2007). Entretanto, existem casos na literatura em que houve indução na atividade da AChE quando minhocas foram expostas a contaminantes ambientais, incluindo pesticidas (HACKENBERGER et al., 2018; MRDAKOVIĆ et al., 2016; RAMIRES et al., 2020).

A atividade da CAT é uma adaptação metabólica à exposição contínua ao solo contaminado, bem como uma resposta de defesa ao estresse oxidativo. O aumento de atividade da CAT pode ser considerado indicador de estresse oxidativo gerado por contaminantes ambientais, conforme diversos trabalhos publicados (HACKENBERGER et al., 2012; LI et al., 2020; PEREIRA et al., 2020; VELKI et al., 2019).

A indução da enzima GST é considerada biomarcador de estresse ambiental (BOUGHATTAS et al., 2022; HATTAB et al., 2015; LACKMANN et al., 2018).

O tratamento 1 (agrotóxico + pastejo + calcário) apresentou a menor soma dos valores absolutos aos 7 e 28 dias, indicando que a presença de pastejo e aplicação de calcário pode contribuir para uma menor interferência dos pesticidas nos organismos avaliados. O tratamento 7 (calcário) foi o que apresentou menor soma dos valores absolutos aos 14 dias de exposição. O tratamento 7 não possuía aplicação de pesticidas, mas pela análise química apresentou um teor de alumínio superior aos demais. Ainda assim, foi um dos tratamentos que menos teve impacto nos biomarcadores analisados, o que indica que o pH mais elevado proporcionado pela calagem contribuiu com uma menor toxicidade desse elemento aos organismos.

7 CONCLUSÃO

A análise química do solo atestou que os tratamentos que possuíam aplicação de calcário tiveram valores maiores de pH. A aplicação de calcário tem relação direta com o teor de alumínio nas áreas sem pastejo. A única variável que teve influência significativa sobre os valores de CTC foi a presença ou não de agrotóxico.

Os resultados das análises de biomarcadores demonstram que a exposição a solos com aplicação de pesticidas tem efeitos adversos em todos os biomarcadores analisados, sendo significativamente diferente em AChE, CAT e GST. O aumento na atividade dessas enzimas evidencia o mecanismo de defesa das minhocas em resposta ao estresse oxidativo causado pelos contaminantes.

O tratamento 4 era composto apenas pela aplicação de pesticidas, não possuindo a presença de animais nem a aplicação de calcário. A análise IBR demonstrou que o tratamento 4 foi o que mais sofreu impacto nas análises dos biomarcadores, sendo significativamente diferente dos outros tratamentos que possuíam a aplicação de pesticidas (T1, T2 e T3). Tal resultado demonstra a capacidade que a presença de animais em pastejo e a calagem do solo tem em diminuir a biodisponibilidade destas moléculas xenobióticas, diminuindo os efeitos adversos que elas podem causar na fauna edáfica do solo.

Em conclusão, as alterações observadas nos biomarcadores da espécie *Eisenia andrei* estão relacionadas com a contaminação do solo por pesticidas aplicados em lavouras de soja. A presença de animais em pastejo e a prática de calagem podem contribuir para diminuir o efeito adverso causado por estas moléculas sobre os organismos. Os resultados encontrados são de grande importância para a avaliação do impacto causado por práticas de manejo sustentável no solo.

Para estudos futuros, sugere-se a avaliação da atividade enzimática do solo nessas mesmas condições, a fim de se obter mais informações que corroborem com as encontradas aqui. Além disso, seria importante compreender melhor a atividade enzimática de minhocas nessas condições em diferentes tipos de solo e culturas. Isso pode levar a uma melhor compreensão do impacto ambiental causado por pesticidas em campos de produção agrícola.

REFERÊNCIAS

ABDUL RIDA, A. M. M.; BOUCHÉ, M. B. Earthworm toxicology: From acute to chronic tests. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 3–4, p. 699–703, mar. 1997.

AEBI, H. Catalase. Em: **Methods of Enzymatic Analysis**. [s.l.] Elsevier, 1974. p. 673–684.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol**, v. 105, p. 121–126, 1984.

ALVARENGA, R. C.; NOCE, M. A. Integração Lavoura-Pecuária. **Embrapa Milho e Sorgo**, p. 14, 2005.

ASENSIO, V. et al. Towards an integrative soil health assessment strategy: A three tier (integrative biomarker response) approach with *Eisenia fetida* applied to soils subjected to chronic metal pollution. **Science of The Total Environment**, v. 442, p. 344–365, jan. 2013.

BELIAEFF, B.; BURGEOT, T. Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 6, p. 1316–1322, jun. 2002.

BORGES, A. L. et al. Sistema Orgânico de Produção de Manga para a Região da Chapada Diamantina, Bahia. p. 15, 11 mar. 2021.

BOUDH, S.; SINGH, J. S. Pesticide Contamination: Environmental Problems and Remediation Strategies. Em: BHARAGAVA, R. N.; CHOWDHARY, P. (Eds.). **Emerging and Eco-Friendly Approaches for Waste Management**. Singapore: Springer, 2019. p. 245–269.

BOUGHATTAS, I. et al. Interactive effects of environmental microplastics and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) on the earthworm *Eisenia andrei*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 424, p. 127578, 15 fev. 2022.

BOURAOUI, Z. et al. Evaluation of enzymatic biomarkers and lipoperoxidation level in *Hediste diversicolor* exposed to copper and benzo[a]pyrene. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 7, p. 1893–1898, out. 2009.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, 7 maio 1976.

BRASIL. **Instrutivo operacional de vigilância em saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2013.

BRASIL. **Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2018.

- BROEG, K.; LEHTONEN, K. K. Indices for the assessment of environmental pollution of the Baltic Sea coasts: Integrated assessment of a multi-biomarker approach. **Marine Pollution Bulletin**, v. 53, n. 8–9, p. 508–522, jan. 2006.
- CALISI, A.; LIONETTO, M. G.; SCHETTINO, T. Pollutant-induced alterations of granulocyte morphology in the earthworm *Eisenia foetida*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 5, p. 1369–1377, jul. 2009.
- CALISI, A.; LIONETTO, M. G.; SCHETTINO, T. Biomarker response in the earthworm *Lumbricus terrestris* exposed to chemical pollutants. **Science of The Total Environment**, v. 409, n. 20, p. 4456–4464, set. 2011.
- CARLETTI, E. et al. Glutathione transferases from *Anguilla anguilla* liver: Identification, cloning and functional characterization. **Aquatic Toxicology**, v. 90, n. 1, p. 48–57, 20 out. 2008.
- DRAPER, H. H.; HADLEY, M. [43] Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. Em: **Methods in Enzymology**. Oxygen Radicals in Biological Systems Part B: Oxygen Radicals and Antioxidants. [s.l.] Academic Press, 1990. v. 186p. 421–431.
- DUAN, X. et al. Effects of soil properties on copper toxicity to earthworm *Eisenia fetida* in 15 Chinese soils. **Chemosphere**, v. 145, p. 185–192, fev. 2016.
- DUTRA, R. M. S.; SOUZA, M. M. O. DE. CERRADO, REVOLUÇÃO VERDE E EVOLUÇÃO DO CONSUMO DE AGROTÓXICOS. **Sociedade & Natureza**, v. 29, p. 473–488, 29 set. 2017.
- EČIMOVIĆ, S. et al. Acute toxicity of selenate and selenite and their impacts on oxidative status, efflux pump activity, cellular and genetic parameters in earthworm *Eisenia andrei*. **Chemosphere**, v. 212, p. 307–318, dez. 2018.
- ECOBICHON, D. J. Pesticide use in developing countries. **Toxicology**, v. 160, n. 1, p. 27–33, 7 mar. 2001.
- ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88–95, 1 jul. 1961.
- EMBRAPA. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. EMBRAPA, , 2013.
- FLORES, J. P. C. et al. Atributos químicos do solo em função da aplicação superficial de calcário em sistema de integração lavoura-pecuária submetido a pressões de pastejo em plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 6, p. 2385–2396, dez. 2008.
- FREITAS, L. DE et al. INDICADORES DA QUALIDADE QUÍMICA E FÍSICA DO SOLO SOB DIFERENTES SISTEMAS DE MANEJO. **Revista Unimar Ciências**, v. 26, n. 1–2, 5 dez. 2017.

FUGLIE, K. O. Conservation tillage and pesticide use in the Cornbelt. 1999.

GAMBARDELLA, C. et al. Effects of selected metal oxide nanoparticles on *Artemia salina* larvae: evaluation of mortality and behavioural and biochemical responses. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 186, n. 7, p. 4249–4259, jul. 2014.

GAMBI, N.; PASTERIS, A.; FABBRI, E. Acetylcholinesterase activity in the earthworm *Eisenia andrei* at different conditions of carbaryl exposure. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 145, n. 4, p. 678–685, maio 2007.

GARCÍA-GÓMEZ, C. et al. Soil pH effects on the toxicity of zinc oxide nanoparticles to soil microbial community. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 28, p. 28140–28152, out. 2018.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases: THE FIRST ENZYMATIC STEP IN MERCAPTURIC ACID FORMATION. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130–7139, 25 nov. 1974.

HACKENBERGER, B. K. et al. The effect of formalin on acetylcholinesterase and catalase activities, and on the concentration of oximes, in the earthworm species *Eisenia andrei*. **European Journal of Soil Biology**, v. 50, p. 137–143, maio 2012.

HACKENBERGER, D. K. et al. Influence of soil temperature and moisture on biochemical biomarkers in earthworm and microbial activity after exposure to propiconazole and chlorantraniliprole. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, p. 480–489, fev. 2018.

HATTAB, S. et al. Transcriptional expression levels and biochemical markers of oxidative stress in the earthworm *Eisenia andrei* after exposure to 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 122, p. 76–82, dez. 2015.

HATTAB, S. et al. Impact of Intensive Farming on Soil Heavy Metal Accumulation and Biomarkers Responses of Earthworms *Eisenia andrei*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 105, n. 4, p. 559–564, 1 out. 2020.

HEDLUND, J.; LONGO, S. B.; YORK, R. Agriculture, Pesticide Use, and Economic Development: A Global Examination (1990–2014). **Rural Sociology**, v. 85, n. 2, p. 519–544, jun. 2020.

IBAMA, (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS). **Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme art. 41 do Decreto nº 4.074/2002**. IBAMA, , 2019. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/phocadownload/qualidadeambiental/relatorios/2018/g>

rafico%20-%20Consumo%20agrototoxicos%202000-2018.pdf>. Acesso em: 24 abr. 2021

IBAMA, (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS). **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/agrototoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrototoxicos>>. Acesso em: 6 nov. 2022.

KABIR, Z. Tillage or no-tillage: Impact on mycorrhizae. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 85, n. 1, p. 23–29, 1 jan. 2005.

KARLEN, D. L. et al. Soil Quality: A Concept, Definition, and Framework for Evaluation (A Guest Editorial). **Soil Science Society of America Journal**, v. 61, n. 1, p. 4–10, jan. 1997.

KASSAMBARA, A. **_rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests_**. : R package version 0.7.0., 2021. Disponível em: <<<https://CRAN.R-project.org/package=rstatix>>.>

KÖHNE, J. M.; KÖHNE, S.; ŠIMŮNEK, J. A review of model applications for structured soils: b) Pesticide transport. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 104, n. 1–4, p. 36–60, fev. 2009.

KUMAR, P. et al. Earthworms Bio Markers in Soil Pollution Assessment. Em: **Agricultural Biotechnology**. [s.l: s.n.]. v. 75p. 111–136.

LACKMANN, C. et al. Herbicides diuron and fluazifop-p-butyl affect avoidance response and multixenobiotic resistance activity in earthworm *Eisenia andrei*. **Chemosphere**, v. 210, p. 110–119, nov. 2018.

LAM, P. K. S. Use of biomarkers in environmental monitoring. **Ocean & Coastal Management**, v. 52, n. 7, p. 348–354, jul. 2009.

LECHENET, M. et al. Reducing pesticide use while preserving crop productivity and profitability on arable farms. **Nature Plants**, v. 3, n. 3, p. 17008, mar. 2017.

LI, X. et al. Evaluation of joint toxicity of heavy metals and herbicide mixtures in soils to earthworms (*Eisenia fetida*). **Journal of Environmental Sciences**, v. 94, p. 137–146, ago. 2020.

LI, Y. et al. Responses of the earthworm *Eisenia andrei* exposed to sublethal aluminium levels in an artificial soil substrate. **Chemistry and Ecology**, v. 30, n. 7, p. 611–621, 3 out. 2014.

LIVINGSTONE, D. R. Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 57, n. 3, p. 195–211, 24 abr. 2007.

LÜCK, H. Catalase. Em: **Methods of Enzymatic Analysis**. [s.l.] Elsevier, 1965. p. 885–894.

- MACEDO, M. C. M. Integração lavoura e pecuária: o estado da arte e inovações tecnológicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. spe, p. 133–146, jul. 2009.
- MARKAD, V. L. et al. Biomarker responses in the earthworm, *Dichogaster curgensis* exposed to fly ash polluted soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 118, p. 62–70, ago. 2015.
- MARKERT, B. A.; BREURE, A. M.; ZECHMEISTER, H. G. **Bioindicators and Biomonitoring**. [s.l.] Elsevier, 2003.
- MATTHEWS, R. A. et al. Biological monitoring. **Water Research**, v. 16, n. 2, p. 129–139, jan. 1982.
- MCCARTHY, J. F.; SHUGART, L. R. Biomarkers of environmental contamination. 1 jan. 1990.
- MKHININI, M. et al. Effect of treated wastewater irrigation in East Central region of Tunisia (Monastir governorate) on the biochemical and transcriptomic response of earthworms *Eisenia andrei*. **Science of The Total Environment**, v. 647, p. 1245–1255, jan. 2019.
- MKHININI, M. et al. Earthworm *Eisenia andrei* modulates oxidative stress in bean plants *Vicia faba* irrigated with treated wastewater. **Ecotoxicology**, v. 29, n. 7, p. 1003–1016, set. 2020.
- MORIARTY, F. Ecotoxicology. **Human Toxicology**, v. 7, n. 5, p. 437–441, set. 1988.
- MORILLO, E.; VILLAVARDE, J. Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils. **Science of The Total Environment**, v. 586, p. 576–597, maio 2017.
- MRDAKOVIĆ, M. et al. Acetylcholinesterase (AChE) and heat shock proteins (Hsp70) of gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) larvae in response to long-term fluoranthene exposure. **Chemosphere**, v. 159, p. 565–569, set. 2016.
- NAZARKO, O. M.; VAN ACKER, R. C.; ENTZ, M. H. Strategies and tactics for herbicide use reduction in field crops in Canada: A review. **Canadian Journal of Plant Science**, v. 85, n. 2, p. 457–479, 1 abr. 2005.
- NICOLODI, M.; ANGHINONI, I.; GIANELLO, C. Indicadores da acidez do solo para recomendação de calagem no sistema plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 1, p. 237–247, fev. 2008.
- OAKES, K. D.; VAN DER KRAAK, G. J. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. **Aquatic Toxicology**, v. 63, n. 4, p. 447–463, maio 2003.

ORUÇ, E. Ö. Oxidative stress, steroid hormone concentrations and acetylcholinesterase activity in *Oreochromis niloticus* exposed to chlorpyrifos. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 96, n. 3, p. 160–166, mar. 2010.

PAOLETTI, M. G. The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 74, n. 1–3, p. 137–155, jun. 1999.

PEREIRA, P. C. G. et al. Sub-lethal effects of the pesticide imazalil on the earthworm *Eisenia andrei*: reproduction, cytotoxicity, and oxidative stress. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 27, p. 33474–33485, 1 set. 2020.

PÉREZ-LUCAS, G. et al. Environmental Risk of Groundwater Pollution by Pesticide Leaching through the Soil Profile. Em: LARRAMENDY, M.; SOLONESKI, S. (Eds.). **Pesticides - Use and Misuse and Their Impact in the Environment**. [s.l.] IntechOpen, 2019.

PHILLIPS, R. E. et al. No-Tillage Agriculture. **Science**, v. 208, n. 4448, p. 1108–1113, 6 jun. 1980.

PIMENTEL, D. et al. Environmental and Economic Costs of Pesticide Use. **BioScience**, v. 42, n. 10, p. 750–760, nov. 1992.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. : R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, 2022. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>>

RAMIRES, M. F. et al. Enzyme assays and toxicity of pig abattoir waste in *Eisenia andrei*. **Environmental Pollution**, v. 260, p. 113928, maio 2020.

RAULT, M.; MAZZIA, C.; CAPOWIEZ, Y. Tissue distribution and characterization of cholinesterase activity in six earthworm species. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 147, n. 2, p. 340–346, jun. 2007.

RENGEL, Z. **Handbook of Soil Acidity**. [s.l.] CRC Press, 2003.

SALES JUNIOR, S. F. et al. Triclocarban affects earthworms during long-term exposure: Behavior, cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity assessments. **Environmental Pollution**, v. 267, p. 115570, dez. 2020.

SAMPAIO, J. A.; ALMEIDA, S. L. M. Calcário e Dolomito. Em: **Rochas e Minerais Industriais**. [s.l.] CETEM/MCT, 2005. p. 24.

SANCHEZ, W.; BURGEOT, T.; PORCHER, J.-M. A novel “Integrated Biomarker Response” calculation based on reference deviation concept. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, n. 5, p. 2721–2725, maio 2013.

SANCHEZ-HERNANDEZ, J. C. Earthworm Biomarkers in Ecological Risk Assessment. Em: WARE, G. W. et al. (Eds.). **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Continuation of Residue Reviews**. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology. New York, NY: Springer, 2006. p. 85–126.

SHENG, G. et al. Influence of pH on pesticide sorption by soil containing wheat residue-derived char. **Environmental Pollution**, v. 134, n. 3, p. 457–463, 1 abr. 2005.

SHUKLA, M. K.; LAL, R.; EBINGER, M. Determining soil quality indicators by factor analysis. **Soil and Tillage Research**, v. 87, n. 2, p. 194–204, jun. 2006.
SILVA, M. DE O. et al. Qualidade do solo: indicadores biológicos para um manejo sustentável / Soil quality: biological indicators for sustainable management. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 1, p. 6853–6875, 20 jan. 2021.

SINGER, M. J.; SOJKA, R. E. **Soil quality**. , 2002. Disponível em: <<https://eprints.nwisrl.ars.usda.gov/id/eprint/812/1/1058.pdf>>. Acesso em: 19 jan. 2021

SOARES, D. F.; FARIA, A. M.; ROSA, A. H. Análise de risco de contaminação de águas subterrâneas por resíduos de agrotóxicos no município de Campo Novo do Parecis (MT), Brasil. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 22, n. 2, p. 277–284, 27 out. 2016.

SOREQ, H. **Human Cholinesterases and Anticholinesterases**. [s.l.] Academic Press, 2012.

SORIANO, M. C. H. **Soil Health and Land Use Management**. [s.l.] BoD – Books on Demand, 2012.

SPADOTTO, C. A.; HORNSBY, A. G. Soil Sorption of Acidic Pesticides. **Journal of Environmental Quality**, v. 32, n. 3, p. 949–956, 2003.

SPARK, K.; SWIFT, R. Effect of soil composition and dissolved organic matter on pesticide sorption. **The Science of The Total Environment**, v. 298, n. 1–3, p. 147–161, 21 out. 2002.

SPARKS, D. L. et al. **Methods of Soil Analysis, Part 3: Chemical Methods**. [s.l.] John Wiley & Sons, 1996.

STENBERG, J. A. A Conceptual Framework for Integrated Pest Management. **Trends in Plant Science**, v. 22, n. 9, p. 759–769, set. 2017.

STORCK, T. R. et al. Biomarkers' Responses in Neotropical Freshwater Fish Living in Southern Brazil: Agricultural Activity or Seasonal Interference? **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 233, n. 11, p. 476, 16 nov. 2022.

STOREY, K. Oxidative Stress: Animal Adaptations in Nature. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 29, p. 1715–33, 1 jan. 1997.

ŠUDOMA, M. et al. Fate and bioavailability of four conazole fungicides in twelve different arable soils – Effects of soil and pesticide properties. **Chemosphere**, v. 230, p. 347–359, set. 2019.

THOMAS, G. W.; HARGROVE, W. L. The Chemistry of Soil Acidity. Em: ADAMS, F. (Ed.). **Agronomy Monographs**. Madison, WI, USA: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, 1984. p. 3–56.

TIRYAKI, O.; TEMUR, C. The Fate of Pesticide in the Environment. **J. BIOL. ENVIRON. SCI.**, p. 10, 2010.

TIWARI, R. K. et al. Enzymes of Earthworm as Indicators of Pesticide Pollution in Soil. **Advances in Enzyme Research**, v. 04, n. 04, p. 113–124, 2016.

UWIZEYIMANA, H. et al. The eco-toxic effects of pesticide and heavy metal mixtures towards earthworms in soil. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 55, p. 20–29, 1 out. 2017.

VELKI, M. et al. Acute toxicities and effects on multixenobiotic resistance activity of eight pesticides to the earthworm *Eisenia andrei*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 5, p. 4821–4832, 1 fev. 2019.

VIEIRA, R. C. B. et al. Critérios de calagem e teores críticos de fósforo e potássio em latossolos sob plantio direto no centro-sul do Paraná. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 37, n. 1, p. 188–198, fev. 2013.

WALKER, C. H. et al. **Principles of Ecotoxicology, Fourth Edition**. [s.l.] CRC Press, 2012.

ZHANG, X. et al. The Toxic Effects of Sulfoxaflor Induced in Earthworms (*Eisenia fetida*) under Effective Concentrations. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 5, p. 1740, 7 mar. 2020.