

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
tese será disponibilizado somente
a partir de 30/01/2028

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS DE INDAZIFLAM E ISOXAFLUTOL,
ISOLADOS E EM MISTURA, PARA ORGANISMOS TERRESTRES E
AQUÁTICOS**

**Me. Gabriel Gomes Mendes
Engenheiro Ambiental**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS DE INDAZIFLAM E ISOXAFLUTOL,
ISOLADOS E EM MISTURA, PARA ORGANISMOS TERRESTRES E
AQUÁTICOS**

Me. Gabriel Gomes Mendes

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Bianco de Carvalho

Coorientadores: Dra. Ana Carla Coleone de Carvalho

Dr. Thandy Júnio da Silva Pinto

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
obtenção do título de Doutor em Agronomia
(Produção Vegetal)**

M538e Mendes, Gabriel Gomes

Estudos ecotoxicológicos de indaziflam e isoxaflutol, isolados e em mistura, para organismos terrestres e aquáticos / Gabriel Gomes Mendes. -- Jaboticabal, 2026

81 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: Leonardo Bianco de Carvalho

Coorientadora: Ana Carla Coleone de Carvalho

1. Herbicida. 2. Ecotoxicologia. 3. Animais aquáticos. 4. Fauna do solo. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A presente pesquisa fornece dados ecotoxicológicos dos herbicidas indaziflam e isoxaflutol sobre organismos aquáticos e edáficos não-alvo. Os resultados servirão como subsídio ao refinamento de avaliações de risco e apoio a tomada de decisões regulatórias mais assertivas. Desta forma, o trabalho alinha-se diretamente à Agenda 2030 da Organização das Nações Unidas, promovendo avanços nos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável 3 (saúde e bem-estar), 6 (água potável e saneamento), 12 (consumo e produção responsáveis) e 15 (vida terrestre). As evidências científicas aqui geradas constituem, portanto, uma ferramenta estratégica para fundamentar políticas públicas que garantam a segurança ambiental concomitante à sustentabilidade dos sistemas produtivos.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The present study provides ecotoxicological data on the herbicides indaziflam and isoxaflutol to aquatic and edaphic non-target organisms. The results will support the refinement of risk assessments and contribute to more robust regulatory decision-making. In this way, the study aligns directly with the United Nations 2030 Agenda, fostering advances in Sustainable Development Goals 3 (good health and well-being), 6 (clean water and sanitation), 12 (responsible consumption and production), and 15 (life on land). The scientific evidence generated herein therefore represents a strategic tool to inform public policies that ensure environmental safety while sustaining productive systems.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS DE INDAZIFLAM E ISOXAFLUTOL, ISOLADOS E EM MISTURA, PARA ORGANISMOS TERRESTRES E AQUÁTICOS

AUTOR: GABRIEL GOMES MENDES

ORIENTADOR: LEONARDO BIANCO DE CARVALHO

COORDINADORA: ANA CARLA COLEONE DE CARVALHO

COORDINADOR: THANDY JUNIO DA SILVA PINTO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal), pela Comissão Examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **LEONARDO BIANCO DE CARVALHO**
Data: 04/02/2026 17:12:52-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. LEONARDO BIANCO DE CARVALHO (Participação Virtual)
Departamento de Fitossanidade / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 **PAMELA CASTRO PEREIRA**
Data: 04/02/2026 18:11:11-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. PÂMELA CASTRO PEREIRA (Participação Virtual)
Centro Universitário da Fundação Educacional de Barretos (UNIFEB) / Barretos/SP

Documento assinado digitalmente
 **RAQUEL APARECIDA MOREIRA**
Data: 05/02/2026 09:05:21-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. RAQUEL APARECIDA MOREIRA (Participação Virtual)
FZEA USP / Pirassununga/SP

Documento assinado digitalmente
 **CLAUDINEI DA CRUZ**
Data: 05/02/2026 09:30:09-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. CLAUDINEI DA CRUZ (Participação Virtual)
Departamento de Agronomia / Centro Universitário Educacional de Barretos (UNIFEB) - Barretos/SP

Documento assinado digitalmente
 **PATRICIA ANDREA MONQUERO**
Data: 05/02/2026 10:32:10-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. PATRÍCIA ANDREA MONQUERO (Participação Virtual)
Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) / Araras/SP



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



Jaboticabal, 30 de janeiro de 2026.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GABRIEL GOMES MENDES – nasceu em Itapetinga, Bahia, no dia 28 de abril de 1996, filho de Virginia Bispo Gomes Alves e Janio Alves Mendes. Coursou o Ensino Médio Técnico no Instituto Federal Baiano - Câmpus Itapetinga, concluindo em 2014 o curso de Técnico em Agropecuária. Em 2014, ingressou na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), onde iniciou o curso de Engenharia Ambiental. Graduou-se em 2021 e, no mesmo ano, iniciou o Mestrado em Ciências Ambientais na Universidade do Estado de Minas Gerais (UEMG), Unidade de Frutal. Durante esse período, foi representante discente junto ao colegiado do programa por um mandato. Em 2023, defendeu a dissertação intitulada “Aplicação de agrotóxico no ambiente: da qualidade do solo em sistemas de produção à saúde do trabalhador rural”, sob orientação da Dra. Viviane Modesto Arruda e coorientação do Dr. Jhansley Ferreira da Mata, atuando também como integrante do grupo de pesquisa “Uso e Conservação de Recursos Naturais”. Paralelamente ao mestrado, cursou a especialização em Saneamento Ambiental pelo Instituto Federal do Triângulo Mineiro - Câmpus Uberaba, concluída em 2022, sob orientação da Dra. Magda Stella de Melo Martins, com o trabalho “Percepção da comunidade acadêmica do IFTM no Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba sobre os impactos ambientais ocasionados pelo descarte de pilhas e baterias”. Em março de 2023, iniciou o Doutorado em Agronomia (Produção Vegetal) na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP/FCAV), Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Leonardo Bianco de Carvalho e coorientação da Dra. Ana Carla Coleone de Carvalho e do Dr. Thandy Júnio da Silva Pinto. É membro do Laboratório de Matologia (LabMato) e integrante do grupo de pesquisa “Núcleo de Estudos Científicos em Matologia”. Durante o doutorado, atuou como representante discente no conselho do Programa de Pós-Graduação. Foi parecerista de periódicos científicos e avaliador *ad hoc* de projetos de pesquisa. Recebeu menção honrosa pelo trabalho “Avaliação da toxicidade aguda do herbicida indaziflam para *Daphnia magna*”, apresentado em formato de painel no XVII Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, resultado parcial de sua pesquisa de doutorado. Em janeiro de 2026, submeteu-se à defesa da tese para obtenção do título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal).

O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquentada e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem.

João Guimarães Rosa (Grande Sertão: Veredas)

Dedico essa tese aos meus pais, minhas raízes. Sem o suporte
de vocês, nenhum crescimento seria possível!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser minha fortaleza e refúgio, iluminando meus passos e concedendo-me a sabedoria e a resiliência necessárias para superar cada desafio desta longa jornada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001, pela concessão da bolsa de estudo, apoio fundamental para a dedicação exclusiva e o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos meus pais, Virginia e Janio, alicerces da minha vida. Agradeço o apoio incondicional e por sempre acreditarem em mim ao longo da minha trajetória acadêmica. Minha gratidão e amor por vocês são imensuráveis.

Às minhas irmãs, Ídila Gabriela e Izabelly, ao meu cunhado João Victor e ao meu sobrinho João Lucas, pelo carinho constante, pela confiança depositada em mim e por serem meu porto seguro.

Aos demais familiares, pelo incentivo contínuo e por compreenderem a importância do meu esforço e dedicação aos estudos durante este período.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Leonardo Bianco de Carvalho, pela oportunidade de integrar o grupo de pesquisa Laboratório de Matologia (LabMATO). Agradeço imensamente pela orientação, confiança, paciência e amizade. Sua conduta e sua dedicação ao ensino são inspirações que levarei comigo para a minha própria trajetória docente.

Aos meus coorientadores, Dra. Ana Carla Coleone de Carvalho e Dr. Thandy Junio da Silva Pinto, expresso minha profunda gratidão por me guiarem na aplicação prática da ecotoxicologia e por todo o apoio técnico e intelectual. O auxílio constante e os ensinamentos compartilhados foram pilares essenciais para o meu desenvolvimento profissional e para a minha formação como pesquisador.

À equipe do Laboratório de Matologia (LabMATO), pela colaboração e pelo apoio prestado ao longo do desenvolvimento desta tese.

Aos avaliadores das bancas de qualificação e defesa, expresso minha gratidão pela análise criteriosa do trabalho. As contribuições e apontamentos oferecidos foram essenciais para a consolidação dos resultados aqui apresentados.

Ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia (Produção Vegetal), pela oportunidade de realização deste doutorado.

Aos amigos da UNESP, Heytor Lemos, Maria Thalia, Jamile Nascimento, Nagilla Ribeiro, Felipe Souza, João Victor, Raquel Bonato, Ana Luiza e Gabriela Barbosa. Obrigado por compartilharem esta jornada comigo, a amizade e o suporte de vocês tornaram esta caminhada muito mais leve e significativa.

Aos eternos amigos Kauana Lopes, Paulo Uendel, Felipe Moreira e Augusto Rocha, que nunca duvidaram de onde eu poderia chegar. Agradeço pela torcida incansável e presença solidária que se manteve firme ao longo de toda essa jornada.

Ao professor Dr. Evaldo Espíndola, pela generosidade em abrir as portas do Laboratório de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (LEEA) da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP). Agradeço a acolhida durante os três meses em que estive, período crucial para a realização de uma das etapas experimentais deste doutorado. Estendo minha gratidão a toda a equipe do LEEA e, de forma especial, à Amanda Araújo, pelo auxílio e suporte na condução prática e logística dos experimentos.

Ao Jhansley, peça-chave nesta história por ter me apresentado à UNESP e aberto novos horizontes. Sou grato pelos ensinamentos, pelo incentivo constante e pelas palavras de conforto nos momentos necessários. Estendo minha profunda gratidão à sua esposa Elisângela, por quem tenho grande admiração e afeto. O suporte de vocês, superando qualquer distância física, foi fundamental para mim.

Ao meu 'clubinho', Gabriel Longuinhas e Katianne, parceiros desde os tempos de mestrado. Agradeço pela amizade e pelo suporte incondicional. Obrigado por dividirem comigo as angústias e as conquistas da vida acadêmica, e por serem, acima de tudo, uma fonte constante de incentivo.

O ano de 2025 apresentou-se como um grande desafio, marcado pela mudança de estado e pelo início da docência na UEMG. A essa nova fase, agradeço imensamente a Luiz Otávio, Isabela Honório, Dayane Caldeira, Caio Santos, Silvio Junior e ao querido Miguelzinho. Obrigado por me acolherem com tanto carinho nessa nova cidade e pela amizade. O apoio de vocês nesta reta final foram fundamentais para que eu concluísse o doutorado com serenidade.

Concluo manifestando minha profunda gratidão a todos que, de diferentes formas, colaboraram para a realização desta tese e tornaram possível o encerramento deste ciclo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1 – Considerações gerais.....	1
1.1 Introdução	1
1.2 Revisão de literatura	3
1.2.1 Cana-de-açúcar	3
1.2.2 Herbicidas.....	5
1.2.3 Mistura de herbicidas.....	7
1.2.4 Dinâmica ambiental dos herbicidas.....	9
1.2.5 Ecotoxicologia.....	11
Referências	14
CAPÍTULO 2 - Ecotoxicidade das formulações dos herbicidas indaziflam e isoxaflutol, isoladas e em mistura para organismos terrestres não-alvo	23
Resumo	23
2.1 Introdução	24
2.2 Material e Métodos.....	26
2.2.1 Herbicidas.....	26
2.2.2 Solos de estudo	26
2.2.3 Concentrações testadas	26
2.2.4 Organismos-teste.....	28
2.2.4.1 Testes com <i>P. minuta</i>	29
2.2.4.2 Testes com <i>E. crypticus</i>	30
2.2.5 Avaliação da interação entre os agrotóxicos	31
2.2.6 Análise dos dados.....	32
2.3 Resultados	33
2.3.1 Efeitos em <i>P. minuta</i>	33
2.3.2 Efeitos em <i>E. crypticus</i>	36
2.4 Discussão.....	41
2.5 Conclusão	45
Referências	45
CAPÍTULO 3 – Impacto ecotoxicológico dos herbicidas indaziflam e isoxaflutol, em formulações isoladas e em mistura, para organismos aquáticos.....	52
Resumo	52
3.1 Introdução	53
3.2 Material e Métodos.....	55
3.2.1 Herbicidas.....	55

3.2.2 Organismos de teste e condições de cultivo	55
3.2.3 Soluções de teste	56
3.2.3 Testes de toxicidade aguda.....	57
3.2.4 Teste de toxicidade crônica	59
3.2.5 Avaliação da interação dos agrotóxicos	60
3.2.6 Análise de dados.....	61
3.3 Resultados	61
3.3.1 Variáveis abióticas dos testes de toxicidade	61
3.3.2 Testes agudos.....	62
3.3.3 Teste crônico.....	65
3.4 Discussão.....	68
3.4.1 Testes agudos.....	68
3.4.2 Testes crônicos	71
3.5 Conclusão	73
Referências	73
CAPÍTULO 4 – Considerações Finais.....	80

ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS DE INDAZIFLAM E ISOXAFLUTOL, ISOLADOS E EM MISTURA, PARA ORGANISMOS TERRESTRES E AQUÁTICOS

RESUMO – O uso intensivo de herbicidas em sistemas agrícolas tropicais tem ampliado as preocupações quanto aos riscos ecotoxicológicos associados à exposição de organismos não-alvo em compartimentos terrestres e aquáticos. O objetivo geral deste estudo foi investigar os efeitos ecotoxicológicos dos herbicidas indaziflam e isoxaflutol, aplicados como formulações isoladas e mistura em organismos terrestres e aquáticos, a fim de delimitar as implicações ambientais associados ao uso desses produtos. Foram estabelecidos dois objetivos específicos: (i) avaliar os efeitos dos herbicidas indaziflam e isoxaflutol, aplicados como formulações isoladas e mistura sobre organismos edáficos não-alvo (*Proisotoma minuta* e *Enchytraeus crypticus*) utilizando um solo natural (latossolo vermelho) e o solo artificial tropical; e (ii) investigar a toxicidade aguda e crônica dos herbicidas indaziflam e isoxaflutol, aplicados como formulações isoladas para organismos aquáticos, por meio de testes com *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii*, *Strandesia rondoniense* e *Lemna minor*, sendo os testes crônicos conduzidos exclusivamente com *C. silvestrii*. Os testes foram conduzidos em delineamento inteiramente casualizado, com exposição a múltiplas concentrações dos herbicidas, em condições controladas de laboratório e seguindo protocolos ecotoxicológicos padronizados para cada organismo-teste. A abordagem experimental permitiu comparar respostas ecotoxicológicas entre compartimentos terrestre e aquático, considerando diferentes níveis de organização biológica e tempos de exposição. O teste com a espécie nativa de colêmbolo, *P. minuta* foi conduzido por 28 dias, enquanto o teste com o enquitreídeo *E. crypticus* teve duração de 21 dias, para avaliação de sobrevivência e reprodução. No compartimento aquático abrangeram testes agudos (48-96 h) e crônicos, incluindo teste crônico de oito dias com o cladóceros *C. silvestrii*, no qual foram avaliados os parâmetros sobrevivência e reprodução, além do teste com a macrófita *L. minor*, no qual foi avaliada a inibição do crescimento, conforme protocolos normativos específicos para cada organismo-teste. Para *P. minuta*, os herbicidas isolados induziram respostas bifásicas, com estímulo populacional em baixas concentrações e efeitos adversos apenas em níveis mais elevados. As concentrações efetivas, CE_{10} variaram de 473,3 a 678,7 mg i.a. kg^{-1} para o indaziflam e de 1094,9 a 1514,4 mg i.a. kg^{-1} para o isoxaflutol. Para o isoxaflutol, a CE_{50} foi estimada em 2048,6 e 2157,4 mg i.a. kg^{-1} , enquanto a CE_{50} não pôde ser estimada para o indaziflam. Em contraste, a mistura apresentou CE_{10} entre 274,9 e 314,1 mg i.a. kg^{-1} , CE_{20} entre 334,2 e 370,1 mg i.a. kg^{-1} e CE_{50} entre 466,6 e 489,9 mg i.a. kg^{-1} , com interação sinérgica em ambos os solos. Para *E. crypticus*, os efeitos foram dependentes do solo e do parâmetro analisado, sendo observada, para a mistura, redução reprodutiva no solo artificial com CE_{10} de 456,3 mg i.a. kg^{-1} , CE_{20} de 623,2 mg i.a. kg^{-1} e CE_{50} de 1728,2 mg i.a. kg^{-1} , bem como sinergismo no solo natural. No compartimento aquático, os testes revelaram elevado contraste entre a resposta de produtores primários e de consumidores. Nos testes agudos, observou-se um gradiente consistente de sensibilidade, com *L. minor* como o organismo mais sensível, apresentando CE_{50} de 0,18 mg i.a. L^{-1} para o indaziflam e 0,72 mg i.a. L^{-1} para o isoxaflutol. Para os

microcrustáceos, as CE_{50} do indaziflam variaram de 1,81 a 34,51 mg i.a. L^{-1} , enquanto para o isoxaflutol os valores foram superiores a 5 mg i.a. L^{-1} . A mistura de indaziflam + isoxaflutol apresentou toxicidade intermediária nos testes agudos, mantendo *L. minor* como o organismo mais sensível ($CE_{50} = 0,92$ mg i.a. L^{-1}). Nos testes crônicos com *C. silvestrii*, a reprodução foi reduzida em até 94% para o indaziflam, 75% para o isoxaflutol e 93% para a mistura, a qual apresentou efeito sinérgico. Os resultados evidenciam que a resposta ecotoxicológica dos herbicidas indaziflam e isoxaflutol variou em função do organismo-teste, do compartimento ambiental e do tempo de exposição, demonstrando padrões distintos de sensibilidade entre organismos terrestres e aquáticos. Para os organismos edáficos, a mistura apresentou maior toxicidade que os herbicidas isolados. Em contraste, no compartimento aquático, os herbicidas isolados apresentaram maior toxicidade nos testes agudos, enquanto a mistura promoveu os maiores efeitos nos testes crônicos, particularmente sobre os parâmetros reprodutivos. A ocorrência consistente de interações sinérgicas e os impactos expressivos sobre a reprodução reforçam a importância de incorporar dados quantitativos de toxicidade crônica e de misturas reais de uso agrícola em avaliações de risco ambiental, especialmente em ecossistemas tropicais, nos quais a extrapolação de dados de regiões temperadas pode subestimar riscos ecológicos relevantes.

Palavras-chave: Corpos d'água, Ecotoxicologia, Organismo não-alvo, Solo tropical, Sinergismo

ECOTOXICOLOGICAL STUDIES OF INDAZIFLAM AND ISOXAFLUTOL, ISOLATED AND IN MIXTURE, FOR TERRESTRIAL AND AQUATIC ORGANISMS

ABSTRACT – The intensive use of herbicides in tropical agricultural systems has increased concerns about the ecotoxicological risks associated with the exposure of non-target organisms in terrestrial and aquatic compartments. The overall objective of this study was to investigate the ecotoxicological effects of the herbicides indaziflam and isoxaflutol, applied as isolated formulations and mixtures, on terrestrial and aquatic organisms, in order to delineate the environmental implications associated with the use of these products. Two specific objectives were established: (i) to evaluate the effects of the herbicides indaziflam and isoxaflutol, applied as isolated formulations and mixtures, on non-target edaphic organisms (*Proisotoma minuta* and *Enchytraeus crypticus*) using a natural soil (red latosol) and a tropical artificial soil; (ii) to investigate the acute and chronic toxicity of the herbicides indaziflam and isoxaflutol, applied as isolated formulations to aquatic organisms, through tests with *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii*, *Strandesia rondoniensis*, and *Lemna minor*, with chronic tests conducted exclusively with *C. silvestrii*. The tests were conducted in a completely randomized design, with exposure to multiple concentrations of the herbicides, under controlled laboratory conditions and following standardized ecotoxicological protocols for each test organism. The experimental approach allowed for the comparison of ecotoxicological responses between terrestrial and aquatic compartments, considering different levels of biological organization and exposure times. The test with the native springtail species, *P. minuta*, was conducted for 28 days, while the test with the enchytraeid beetle *E. crypticus* lasted 21 days, to evaluate survival and reproduction. In the aquatic compartment, acute (48-96 h) and chronic tests were conducted, including an eight-day chronic test with the cladoceran *C. silvestrii*, in which survival and reproduction parameters were evaluated, as well as a test with the macrophyte *L. minor*, in which growth inhibition was evaluated, according to specific normative protocols for each test organism. For *P. minuta*, the isolated herbicides induced biphasic responses, with population stimulation at low concentrations and adverse effects only at higher levels. The effective concentrations, EC_{10} , ranged from 473.3 to 678.7 mg a.i. kg^{-1} for indaziflam and from 1094.9 to 1514.4 mg a.i. kg^{-1} for isoxaflutol. For isoxaflutol, the EC_{50} was estimated at 2048.6 and 2157.4 mg a.i. kg^{-1} , while the EC_{50} could not be estimated for indaziflam. In contrast, the mixture showed EC_{10} between 274.9 and 314.1 mg a.i. kg^{-1} , EC_{20} between 334.2 and 370.1 mg a.i. kg^{-1} and EC_{50} between 466.6 and 489.9 mg a.i. kg^{-1} , with synergistic interaction in both soils. For *E. crypticus*, the effects were dependent on the soil and the parameter analyzed. For the mixture, a reduction in reproduction was observed in the artificial soil with EC_{10} of 456.3 mg a.i. kg^{-1} , EC_{20} of 623.2 mg a.i. kg^{-1} , and EC_{50} of 1728.2 mg a.i. kg^{-1} , as well as synergism in the natural soil. In the aquatic compartment, the tests revealed a high contrast between the response of primary producers and consumers. In the acute tests, a consistent sensitivity gradient was observed, with *L. minor* as the most

sensitive organism, presenting EC_{50} of 0.18 mg a.i. L^{-1} for indaziflam and 0.72 mg a.i. L^{-1} for isoxaflutol. For microcrustaceans, the EC_{50} values of indaziflam ranged from 1.81 to 34.51 mg a.i. L^{-1} , while for isoxaflutol the values were greater than 5 mg a.i. L^{-1} . The mixture of indaziflam and isoxaflutol showed intermediate toxicity in acute tests, with *L. minor* remaining the most sensitive organism ($EC_{50} = 0.92$ mg a.i. L^{-1}). In chronic tests with *C. silvestrii*, reproduction was reduced by up to 94% for indaziflam, 75% for isoxaflutol, and 93% for the mixture, which showed a synergistic effect. The results show that the ecotoxicological response of the herbicides indaziflam and isoxaflutol varied depending on the test organism, the environmental compartment, and the exposure time, demonstrating distinct patterns of sensitivity between terrestrial and aquatic organisms. For edaphic organisms, the mixture showed greater toxicity than the herbicides alone. In contrast, in the aquatic compartment, isolated herbicides showed greater toxicity in acute tests, while the mixture promoted the greatest effects in chronic tests, particularly on reproductive parameters. The consistent occurrence of synergistic interactions and the significant impacts on reproduction reinforce the importance of incorporating quantitative data on chronic toxicity and real-world agricultural mixtures in environmental risk assessments, especially in tropical ecosystems, where extrapolation of data from temperate regions may underestimate relevant ecological risks.

Keywords: Water bodies, Ecotoxicology, Non-target organism, Tropical soil, Synergism

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1.1 Introdução

A agricultura moderna vai além da produção de alimentos, contribuindo de forma decisiva para a segurança alimentar e para a sustentação de sistemas econômicos em diferentes regiões do mundo (OECD/FAO, 2025). Nesse cenário, o Brasil ocupa posição de destaque no sistema agroalimentar e, em particular, no complexo sucroenergético, com relevância na produção de açúcar, etanol e bioenergia. Entre as culturas que sustentam essa posição, a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) se sobressai pela versatilidade e importância histórica, estruturando uma cadeia produtiva de elevada complexidade e impacto socioeconômico (CONAB, 2025; UNICA, 2025).

No entanto, a manutenção de elevados níveis de rendimento impõe um desafio agrônomo constante: a competição com plantas daninhas, a qual pode comprometer o desenvolvimento da cultura e a qualidade da matéria-prima (Reis *et al.*, 2019). Para mitigar essas perdas e assegurar a viabilidade econômica da cultura, o modelo produtivo apoia-se na utilização intensiva de insumos agrícolas, com destaque para o controle químico (Ma *et al.*, 2023). Os herbicidas tornaram-se ferramentas indispensáveis no manejo da cana-de-açúcar, aplicados em larga escala para garantir que a cultura expresse adequadamente seu potencial produtivo (Gongka *et al.*, 2025). Contudo, essa dependência química está associada a externalidades ambientais relevantes, particularmente relacionadas ao destino ambiental dessas moléculas. Além disso, no contexto real de uso agrícola, os herbicidas frequentemente alcançam o ambiente na forma de misturas, seja pela aplicação conjunta, seja pela sobreposição temporal de aplicações ao longo do ciclo da cultura (Nkwatoh *et al.*, 2015; Carriquiry *et al.*, 2024).

A aplicação recorrente de herbicidas, muitas vezes realizada de forma sistemática e preventiva, contribui para a formação de um passivo ambiental de difícil detecção imediata. Uma vez introduzidos no ambiente, esses compostos não permanecem restritos à área-alvo de aplicação. Processos de transporte, como a deriva, lixiviação e escoamento superficial, favorecem a mobilização de resíduos

químicos para além das fronteiras agrícolas, atingindo compartimentos ambientais sensíveis (Parven *et al.*, 2025). O solo, frequentemente descrito como um compartimento de retenção e transformação de contaminantes, pode atuar como reservatório desses compostos, resultando em alterações na microbiota edáfica e nos ciclos biogeoquímicos essenciais para a sustentabilidade dos sistemas produtivos (Mendes *et al.*, 2022).

Ainda mais preocupante é o transporte desses contaminantes em direção aos ecossistemas aquáticos. Rios e lagos nas proximidades, bem como águas subterrâneas (lençóis freáticos) no interior e no entorno das áreas de cultivo de cana-de-açúcar podem atuar como receptores finais dessas moléculas, expondo organismos não-alvo a riscos ecotoxicológicos de elevada complexidade. A presença de herbicidas em ambientes aquáticos compromete não apenas a biodiversidade, afetando desde a produtividade primária de espécies fotossintetizantes até a fisiologia de peixes e anfíbios, mas também a qualidade dos recursos hídricos destinados ao abastecimento humano e animal (Maranho *et al.*, 2022).

Diante desse panorama, torna-se necessário avaliar os impactos ecotoxicológicos dos herbicidas indaziflam e isoxaflutol, tanto individualmente quanto em mistura, especialmente em razão de sua crescente utilização no manejo de plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar. O indaziflam destaca-se por sua elevada persistência no solo e potencial efeito residual, enquanto o isoxaflutol apresenta relevante mobilidade ambiental e formação de metabólitos biologicamente ativos, características que podem ampliar o risco de exposição de organismos não-alvo em compartimentos terrestres e aquáticos. Além disso, embora esses herbicidas sejam utilizados em programas de manejo de plantas daninhas, ainda existem lacunas quanto aos seus efeitos ecotoxicológicos, especialmente em ecossistemas tropicais e em cenários envolvendo misturas comerciais. Nesse sentido, é fundamental direcionar estudos para espécies representativas desses compartimentos ambientais, com vistas a subsidiar avaliações de risco ambiental e aprimorar a segurança das recomendações e aplicações desses produtos em sistemas agrícolas. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos ecotoxicológicos do indaziflam e isoxaflutol, aplicados como formulações comerciais isoladas e em mistura, em

organismos terrestres e aquáticos, a fim de delimitar as implicações ambientais associadas ao uso desses produtos em áreas tropicais.

A organização desta tese compreende quatro etapas: (i) considerações gerais e revisão de literatura; (ii) estudo da ecotoxicidade de indaziflam e isoxaflutol (isolados e em mistura) em organismos terrestres não-alvo; (iii) avaliação do impacto ecotoxicológico destes compostos em organismos aquáticos; e (iv) considerações finais.

O capítulo um apresenta as considerações gerais e a revisão de literatura, contextualizando o trabalho e discutindo os principais conceitos que fundamentam os capítulos subsequentes. No capítulo dois, são avaliados os efeitos ecotoxicológicos do indaziflam, e do isoxaflutol, aplicados como formulações comerciais isoladas e em mistura, sobre as espécies *Proisotoma minuta* e *Enchytraeus crypticus*. O Capítulo três contempla a avaliação da toxicidade aguda e crônica desses herbicidas, aplicados como formulações comerciais isoladas e em mistura, para organismos aquáticos representativos de diferentes níveis tróficos: *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii*, *Strandesia rondoniensis* e *Lemna minor*. Por fim, o capítulo quatro apresenta as considerações finais da tese em relação ao conteúdo mostrado nos capítulos anteriores.

3.5 Conclusão

Este estudo demonstrou que a toxicidade dos herbicidas indaziflam e isoxaflutol para organismos aquáticos é dependente do grupo biológico, do tipo de exposição e da forma de aplicação. Nos ensaios agudos, *L. minor* foi a espécie mais sensível, enquanto os microcrustáceos apresentaram efeitos apenas em concentrações mais elevadas.

Em contraste, nos ensaios crônicos, *C. silvestrii* mostrou elevada sensibilidade reprodutiva, evidenciando a maior relevância de desfechos subletais. A mistura de indaziflam + isoxaflutol intensificou os efeitos crônicos, caracterizando interação sinérgica e indicando maior risco ecológico em cenários de exposição combinada.

Esses resultados evidenciam a importância de incorporar espécies tropicais, testes crônicos e avaliação de misturas em análises de risco ambiental, visando uma estimativa mais realista dos impactos de herbicidas em ecossistemas aquáticos.

Referências

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas (2022a) **ABNT NBR 12713:** Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda — Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). ABNT, Rio de Janeiro.

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas (2022b) **ABNT NBR 13373:** Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica — Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera). ABNT, Rio de Janeiro.

Alexandre DS, Costa VB, Gomes DF, Dias MA, Montagner CC, Espíndola ELG, Pinto TJS (2025) Ecological risks of imidacloprid and tebuconazole in tropical freshwater invertebrates: single and mixture implications. **Aquatic Toxicology** 289:107606.

Alletto L, Benoit P, Bergheaud V, Coquet Y (2012) Variability of retention process of isoxaflutole and its diketonitrile metabolite in soil under conventional and conservation tillage. **Pest Management Science** 68(4):610-617.

Arco A del, Guerrero F, Jiménez-Gómez F, Parra G (2019) Plankton community responses to environmentally relevant agrochemical mixtures. **Annales de Limnologie – International Journal of Limnology** 55:5.

Baćmaga M, Wyszowska J, Kucharski J (2024) Environmental Implication of Herbicide use. **Molecules** 29(24):5965.

Belden JB, Gilliom RJ, Lydy MJ (2007) How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life? **Integrated Environmental Assessment and Management** 3(3):364-372.

Brabham C, Lei L, Gu Y, Stork J, Barrett M, DeBolt S (2014) Indaziflam herbicidal action: a potent cellulose biosynthesis inhibitor. **Plant physiology** 166(3):1177-1185.

Brasil. Conselho Nacional de Meio Ambiente (2005) **Resolução nº 357 de 17 de março de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União: Brasília, DF. Disponível em: https://conama.mma.gov.br/?id=450&option=com_sisconama&task=arquivo.download. Acesso em 06 dez. 2025.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (2025) **AGROFIT**: Sistemas de agrotóxicos fitossanitários. Brasília, DF: MAPA. Disponível em: https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 04 nov. 2025.

Casali-Pereira MP, Daam MA, Resende JC, Vasconcelos AM, Espíndola ELG, Botta CMR (2015) Toxicity of Vertimec® 18 EC (active ingredient abamectin) to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Chemosphere** 139:558-564.

Cedergreen N (2014) Quantifying synergy: a systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. **PLoS ONE** 404(1):e96580.

Chen J, Cheng H, Yan Y, Zhu J, Zhang M, Xie S, Xu Jun, Wang H (2025) Primary producers in freshwater ecosystem respond differently to multiple environmental stressors: A mesocosm study. **Environmental Research** 272:121145.

Daam MA, Van den Brink PJ (2010) Implications of differences between temperate and tropical freshwater ecosystems for the ecological risk assessment of pesticides. **Ecotoxicology** 19(1), 24-37.

EFSA – European Food Safety Authority (2016) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance isoxaflutole. **EFSA Journal** 14(3):4416. 115 p.

Freitas EC, Rocha O (2011) Acute toxicity tests with the tropical cladoceran *Pseudosida ramosa*: the importance of using native species as test organisms. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology** 60(2), 241-249.

Gomes DF, Brito HP, Vale JG, Silva TJS, Moreira RA, Rocha O (2024a) Toxicity of isolated and mixed metals to a native Amazonian ostracod and ecological risk assessment. **Ecotoxicology** 33(9):1074-1085.

Gomes DF, Pereira JS, Pinto RL, Moreira RA, Rocha O (2024b) On a new species of ostracod from the Brazilian Amazon and its potential for experimental studies in laboratory culture. **Limnologica** 108:126197.

Ghirardello GA, Araújo LDS, Baccin LC, Dotta MA, Souza RO, Silva AFM, da Silva GS, Victoria-Filho R (2021) Selectivity index of indaziflam to sugarcane cv. IACSP95-5000 in two soil textures. **Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín** 74(2)

Hasenbein S, Lawler SP, Geist J, Connon RE (2016) A long-term assessment of pesticide mixture effects on aquatic invertebrate communities. **Environmental Toxicology and Chemistry** 35(1):218-232.

Holmstrup M, Bindesbøl AM, Oostingh GJ, Duschl A, Scheil V, Köhler HR, Loureiro S, Soares AMVM, Ferreira ALG, Kienle C (2010) Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: a review. **Science of the Total Environment** 408(18):3746-3762.

Klátyik S, Simon G, Oláh M, Takács E, Mesnage R, Antoniou MN, Zaller JG, Székács A (2024) Aquatic ecotoxicity of glyphosate, its formulations, and co-formulants: evidence from 2010 to 2023. **Environmental Sciences Europe** 36(22).

Kuehl AM, Espíndola ELG, Mantovano T, Deosti S, Lansac-Tôha FA (2022) Testes tóxicos mostram a sensibilidade de *Daphnia similis* (Crustacea, Cladocera) e *Pseudokirchneriella subcapitata* (Chlorophyceae) a pesticidas comerciais. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 94(4):e20201234.

Kwok KW, Leung KM, Lui GSG, Chu VKH, Lam PKS, Morritt D, Maltby L, Brock TCM, Brink PJ van den, Warne MSJ (2007) Comparison of tropical and temperate freshwater animal species' acute sensitivities to chemicals: implications for deriving safe extrapolation factors. **Integrated Environmental Assessment and Management** 3(1):49-67.

Lewis KA, Tzilivakis J, Warner D, Green A (2016) An international database for pesticide risk assessments and management. **Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal** 22(4):1050-1064.

Mansano AS, Moreira RA, Dornfeld HC, Diniz LGR, Vieira EM, Daam MA, Rocha O, Seleglim MHR (2018) Acute and chronic toxicity of diuron and carbofuran to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Environmental Science and Pollution Research** 25(14):13335-13346.

Merotto Jr A, Gazziero DLP, Oliveira MC, Scursoni J, Garcia MA, Figueroa R, Turra GM (2022) Herbicide use history and perspective in South America. **Advances in Weed Science** 40:e020220050.

Mesnage R, Antoniou MN (2018) Ignoring adjuvant toxicity falsifies the safety profile of commercial pesticides. **Frontiers in Public Health** 5:361.

Mikó Z, Hettyey A (2023) Toxicity of POEA-containing glyphosate-based herbicides to amphibians is mainly due to the surfactant, not to the active ingredient. **Ecotoxicology** 32(2):150-159.

Moreira RA, Mansano AS, Silva LC, Rocha O (2014) A comparative study of the acute toxicity of the herbicide atrazine to cladocerans *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii* and *Macrothrix flabelligera*. **Acta Limnologica Brasiliensia** 26(1):1-8.

Moruzzi BCC, Silva LCM, Gebara RC, Montagner CC, Longo E, Espíndola ELG, Moreira RA (2025) Feeding responses of cladocerans exposed to pesticides: comparison between *Ceriodaphnia silvestrii* and *Ceriodaphnia dubia*. **Chemistry and Ecology** 41(6):747-761.

Nascimento LC, Naval LP (2019) Toxicity determined by the use of agrochemicals in organisms indicators of water quality. **Revista Brasileira de Ciências Ambientais** (53):69-80.

Nagy K, Duca RC, Lovas S, Creta M, Scheepers PTJ, Godderis L, Ádám B (2020) Systematic review of comparative studies assessing the toxicity of pesticide active ingredients and their product formulations. **Environmental Research** 181:e108926.

NCBI - National Center for Biotechnology Information (2025a) **PubChem Compound Summary for CID 44146693, Indaziflam**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Indaziflam>. Acesso em: 17 out. 2025.

NCBI - National Center for Biotechnology Information (2025b) **PubChem Compound Summary for CID 84098, Isoxaflutole**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Isoxaflutole>. Acesso em: 17 out. 2025.

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development (2006) **Test No. 221: *Lemna* sp. growth inhibition test**. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD, Paris.

Olker JH, Elonen CM, Pilli A, Anderson A, Kinziger B, Erickson S, Skopinski M, Pomplun A, LaLone CA, Russom CL, Hoff D (2022) The ECOTOXicology Knowledgebase: a curated database of ecologically relevant toxicity tests to support

environmental research and risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry** 41(6).

Parameswari E, Davamani V, Kalaiarasi R, Ilakiya T, Arulmani S (2020) Utilization of ostracods (Crustacea) as bioindicator for environmental pollutants. **International Research Journal of Pure and Applied Chemistry** 21(7):73-93.

Pinto TJS, Rocha GS, Moreira RA, Silva LCM, Yoshii MPC, Goulart BV, Montagner CC, Daam MA, Espíndola ELG (2022) Chronic environmentally relevant levels of pesticides disrupt energy reserves, feeding rates, and life-cycle responses in the amphipod *Hyalella meinerti*. **Aquatic Toxicology** 245:106117.

Qin F, Zhao N, Yin G, Luo Y, Gan T (2025) Toxicity response and swimming speed regularity in *Daphnia Magna* after short-term exposure to diuron. **Toxics** 13(5):395.

Radić S, Stipaničev D, Cvjetko P, Rajčić M, Marijanović M, Širac S, Pevalek-Kozlina B, Pavlica M (2011) Duckweed Lemna minor as a tool for testing toxicity and genotoxicity of surface waters. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 74(2):182-187.

Relyea RA (2005) The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. **Ecological Applications** 15(2) :618-627.

Ribeiro ER, Simionatto HH, Valério TS, Frias YA, Cruz VH, Prado HFA, Rosa AH, Moraes EB, Vasconcelos LG, Lopes PRM (2025) The unexplored challenge of indaziflam in agroecosystems. **Discover Soil** 2(78):1-17.

Rico A, Waichman AV, Geber-Corrêa R, van den Brink PJ (2011) Effects of malathion and carbendazim on Amazonian freshwater organisms: comparison of tropical and temperate species sensitivity distributions. **Ecotoxicology** 20(4), 625-634.

Rico A, van den Brink PJ, Gylstra R, Focks A, Brock TCM (2015) Developing ecological scenarios for the prospective aquatic risk assessment of pesticides. **Integrated Environmental Assessment and Management** 12(3):510-521.

Rodrigues BN, Almeida FS (2018) **Guia de herbicidas**. 7. ed. Edição dos autores, Londrina. 764 p.

Rumschlag SL, Mahon MB, Hoverman JT, Raffel TR, Carrick HJ, Hudson PJ, Rohr JR (2020) Consistent effects of pesticides on community structure and ecosystem function in freshwater systems. **Nature Communications** 11:1-9.

Saha R, Dutta SM (2024) Pesticides' mode of action on aquatic life. **Toxicology Reports** 13:101780.

Santos EA, Correia NM, Silva JRM, Velini ED, Passos ABRJ, Durigan JC (2015) Herbicide detection in groundwater in Córrego Rico-SP watershed. **Planta Daninha** 33(1):147-155.

Santos GS, Hamer M, Tscheschke A, Bruns E, Murakami L, Dohmen GP (2023) Are standard aquatic test species and methods adequate surrogates for use in environmental risk assessment of pesticides in tropical environments? **Integrated Environmental Assessment and Management** 19(1):202-212.

Schedenffeldt BF, Siqueira BBR, Silva, RO, Monquero PA (2025) Evaluation of herbicide toxicity to *Lemna minor* L. and *Azolla caroliniana* Willd. **Ecotoxicology** 34:258-265.

Sebastian DJ, Fleming MB, Patterson EL, Sebastian JR, Nissen SJ (2017) Indaziflam: a new cellulose-biosynthesis-inhibiting herbicide provides long-term control of invasive winter annual grasses. **Pest Management Science** 73(10): 2149-2162.

Silva LCM, Moreira RA, Pinto TJS, Ogura AP, Yoshii, MPC, Lopes LFP, Montagner CC, Goulart BV, Daam MA, Espíndola ELG (2020) Acute and chronic toxicity of 2,4-D and fipronil formulations (individually and in mixture) to the Neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Ecotoxicology** 29:1462-1475.

Silva PV, Viana HRM, Monquero PA, Ribeiro NM, Pereira Neto W, Inacio EM, Christoffoleti PJ, Dias RC (2021) Influence of sugarcane straw on weed germination control. **Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias Uncuyo** 53(1):220-233.

Silva LR, Silva LCM, Pinto TJS, Espíndola ELG, Ogura AP (2025) The use of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Crustacea, Cladocera) as a test organism in ecotoxicological studies in neotropical environments. **Ecotoxicology** 34(9):1932-1945.

Stillway ME, Teh SJ (2020) The effect of herbicide formulations and herbicide–adjuvant mixtures on aquatic food web species of the Sacramento–San Joaquin Delta, California, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry** 39(7):1375-1381.

Tang HMF, Manfred L, McBratney A, Magg F (2021) Risk of pesticide pollution at the global scale. **Nature Geoscience** 14:206-210.

Takács E, Klátyik S, Mörtl M, Rácz G, Kovács K, Darvas B, Székács A (2017) Effects of neonicotinoid insecticide formulations and their components on *Daphnia magna* – the role of active ingredients and co-formulants. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry** 97(9):885-900.

United States Environmental Protection Agency - USEPA (2010) **Environmental Fate and Ecological Risk Assessment for the Registration of Indaziflam (Pesticide Fact Sheet)**. USEPA, Washington, DC, USA.

USEPA – United States Environmental Protection Agency (2016) **Guidance for selecting input parameters for the pesticide in flooded applications model (PFAM)**: conceptual model and parameter selection for simulation of pesticide exposures. Office of Pesticide Programs, Environmental Fate and Effects Division. U.S. EPA, Washington, DC. Disponível em:

<https://www.epa.gov/sites/default/files/2016-10/documents/pfam-input-parameter-guidance.pdf>. Acesso em: 27 dez. 2025.

United States Environmental Protection Agency – USEPA (2026) **Technical overview of ecological risk assessment – analysis phase: ecological effects characterization**. EPA. Disponível em: <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/technical-overview-ecological-risk-assessment-0>. Acesso em: 01 maio 2026.

Vidal T, Abrantes N, Gonçalves AMM, Gonçalves F (2012) Acute and chronic toxicity of Betanal® Expert and its active ingredients on nontarget aquatic organisms from different trophic levels. **Environmental Toxicology** 27(9):537-548.

Volk JA, Kraak MHS (2020) Herbicide exposure and toxicity to aquatic primary producers. In: **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology** 250:119-171.

Wang Z, Kwok KWH, Leung KMY (2019) Comparison of temperate and tropical freshwater species' acute sensitivities to chemicals: an update. **Integrated Environmental Assessment and Management** 15(3):352-363.