UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

“O efeito de herbicidas à base de glifosato sobre a sobrevivência de insetos aquáticos”

Tássia Juliane Malacarne

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor (ª) em Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação em Entomologia.

Ribeirão Preto - SP
2019

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENTOMOLOGIA

“O efeito de herbicidas à base de glifosato sobre a sobrevivência de insetos aquáticos”

Tássia Juliane Malacarne

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor (ª) em Ciências, obtido no Programa de Pós-Graduação em Entomologia.

Orientador: Pitágoras da Conceição Bispo
Co-orientador: Ciro Cesar Zanini Branco

Ribeirão Preto - SP
2019

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Malacarne, Tássia Juliane

O efeito de herbicidas à base de glifosato sobre a sobrevivência de insetos aquáticos. Ribeirão Preto, 2019.

90 pp.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Entomologia.

Orientador: Bispo, Pitágoras da Conceição.

Co-orientador: Branco, Ciro Cesar Zanini

1. Ecotoxicologia. 2. Pesticidas. 3. Herbicidas à base de glifosato. 4. Sobrevivência 5. Insetos aquáticos.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer em primeiro lugar à Deus por me proporcionar esta oportunidade, por me encaminhar até aqui, pela vida e pelas pessoas boas que colocou em meu caminho. Agradeço a Ele principalmente pela família que me deu, ela é o meu alicerce e meu porto seguro. Agradeço pelo apoio incondicional dos meus pais Wilmo Malacarne e Sonia Rosch Malacarne, que são as pessoas mais importantes da minha vida, juntamente com meu irmão Gustavo Raí Malacarne. Quero agradecer também a minha filhinha de quatro patas que mudou a minha vida pra melhor. Eles são os responsáveis por me manterem firme, eu os amo incondicionalmente!

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Pitágoras da Conceição Bispo por aceitar me orientar mesmo sem me conhecer, por iniciar comigo um trabalho inédito no laboratório e por me proporcionar liberdade para conduzir o meu trabalho. Agradeço também por estar sempre presente e por compartilhar o seu conhecimento comigo durante esses quatro anos. Obrigada pelas horas de conversas sobre ecotoxicologia e sobre assuntos da vida!

Gostaria de agradecer também ao meu Coorientador Prof. Dr. Ciro Cesar Zanini Branco que aceitou compartilhar conosco seus conhecimentos sobre ecotoxicologia, sempre nos auxiliando em nossas dúvidas. Obrigada pelos debates e pelo auxílio durante todo esse período!

Agradeço ao Prof. Dr. Juliano Corbi e à Profa. Dra. Susana Trivinho Strixino por me cederem larvas de insetos no início do doutorado e por deixarem as portas dos seus laboratórios abertas para quando precisássemos. Agradeço também à Profa. Dra. Susana e ao Prof. Dr. Fábio Santos do Nascimento pelos valiosos comentários durante o desenvolvimento da tese.

Agradeço aos colegas que passaram pelo Laboratório de Biologia Aquática (UNESP, Assis) durante o período de doutorado. Neste período tive a oportunidade de conhecer pessoas maravilhosas, alguns que viraram amigos para a vida toda. Em especial, gostaria de agradecer à Carla por ter me convidado para coletar com ela, o que resultou na ideia de criação dos heterópteras, por dividir a mesma casa comigo durante mais de um ano em Assis e pela amizade que temos. Ao Régis por ter me ensinado tudo sobre os testes ecotoxicológicos e por ter realizado várias coletas comigo, me dando um grande suporte. À Amanda, minha aluna de iniciação

científica, pelas coletas que realizamos juntas e ao Tácio pela ajuda na formatação de alguns gráficos.

Agradeço também, ao meu namorado, amigos e pessoas especiais que passaram por mim durante os anos que desenvolvi a presente tese de doutorado.

E por fim, agradeço à USP (Universidade de São Paulo) e ao Programa de Pós-Graduação em Entomologia por todo o suporte durante o doutorado; ao Departamento de Ciências Biológicas da UNESP (Universidade Estadual Paulista) de Assis pela infraestrutura de pesquisa oferecida e por possibilitar ter contato com a docência e ao Laboratório de Biologia Aquática (UNESP, Assis) por proporcionar a infraestrutura e os recursos necessários para o desenvolvimento da tese. Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida, sem a qual, não seria possível realizar esse doutorado.

RESUMO

Avaliar os efeitos de herbicidas sobre a fauna aquática é crucial para melhorar a nossa compreensão do impacto dessas substâncias sobre a diversidade e ecologia dos ecossistemas aquáticos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos crônicos e agudos de herbicidas à base de glifosato sobre a sobrevivência de insetos que ocupam diferentes compartimentos aquáticos (*Limnogonus* spp.- pleustônico; Notonectidae sp.- nectônico e *Chironomus inquinatus* - bentônico). Além disso, foram testados os efeitos de Roundup® sobre o tempo de captura de presa em duas espécies de *Limnogonus.* Os resultados mostram que os herbicidas testados afetaram significativamente a sobrevivência dos insetos avaliados. Para os insetos pleustônicos e nectônicos o Roundup® afetou negativamente a sobrevivência. Por outro lado, o efeito do glifosato técnico não foi significativo. Estes resultados sugerem que o surfactante pode ser o responsável pelos efeitos negativos do Roundup®, uma vez que a diminuição da tensão superficial pode dificultar a sustentação e a locomoção, diminuir a efetividade dos pêlos hidrofóbicos e comprometer os espiráculos de *Limnogonus* spp. e de Notonectidae sp. Além da sobrevivência, o efeito negativo do Roundup® também foi refletido pela maior dificuldade de captura de presas de indivíduos de *Limnogonus* spp. expostos a este herbicida. No caso de *Chironomus inquinatus*, os três herbicidas (Roundup®, glifosato técnico e AMPA) afetaram negativamente a sobrevivência. Nossos resultados mostram que, apesar destes herbicidas serem direcionados ao controle de ervas daninhas, eles também causam efeitos negativos sobre a fauna de insetos aquáticos. Portanto, o monitoramento da biota aquática em áreas agrícolas sujeitas à aplicação de herbicidas é fundamental. Os dados coletados nestes monitormanetos podem fornecer subsídios para o estabelecimento de controles e regras que minimizem os impactos negativos destes herbicidas sobre os ecossistemas aquáticos.

Palavras-chave: Glifosato, toxicidade, invertebrados aquáticos, sobrevivência.

ABSTRACT

The evaluetion of the effects of herbicides on aquatic fauna is crucial to improving our understanding of the impact of these substances on the diversity and ecology of aquatic ecosystems. Thus the aim of this study was to evaluate the chronic and acute effects of herbicides based on glyphosate on the survival of insects that occupy different aquatic compartments (*Limnogonus* spp.- pleustonic, Notonectidae sp. Nectônico and *Chironomus inquinatus*-bentônico). In addition, the effects of Roundup® on prey capture time on two species of Limnogonus were tested. The results show that the tested herbicides significantly affected the survival of the evaluated insects. For the pleutonic and nectonic insects, Roundup® negatively affected the survival. On the other hand, the effect of technical glyphosate was not significant. These results sugest that the surfactant may be responsible for the negative effects of Roundup®, since the reduction of surface tension can make it difficult the support and locomotion, decrease the effectiveness of the hydrophobic hair and compromise the spiracles of Limnogonus spp. and Notonectidae sp.In addition to survival, the negative effect of Roundup® was also reflected by the greater difficulty in catching prey in *Limnogonus* spp. exposed to this herbicide. In the case of *Chironomus inquinatus*, the three herbicides (Roundup®, technical glyphosate and AMPA) negatively affected survival. Our results show that although these herbicides are directed to weed control, they also have negative effects on the fauna of aquatic insects. Therefore, monitoring aquatic biota in agricultural areas subject to herbicide application is critical. The data collected in these monitoring can provide support for establishing controls and rules that minimize the negative impacts of these herbicides on aquatic ecosystems.

Keywords: Glyphosate, toxicity, aquatic invertebrates, survival.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL 11
OBJETIVO GERAL 18
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 19
CAPÍTULO 1
Efeito de herbicidas à base de glifosato sobre a sobrevivência e o tempo de predação de duas espécies de *Limnogonus* (Heteroptera: Gerromorpha: Gerridae) 27
RESUMO 28
INTRODUÇÃO 29
OBJETIVO 32
MATERIAIS E MÉTODOS 32
Organismos teste 32
Sobrevivência: testes crônicos 32
Delineamento experimental 32
Análises estatísticas 33
Sobrevivência: testes agudos 34
Delineamento experimental 34
Análises estatísticas 34
Tempo de captura de presa 35
Delineamento experimental 35
Análises estatísticas 35
RESULTADOS 36
Sobrevivência: testes crônicos 36
Sobrevivência: testes agudos 40
Tempo de captura de presa 43
DISCUSSÃO 48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 53
CAPÍTULO 2
Efeito de herbicidas à base de glifosato sobre a sobrevivência Notonectidae sp. (Heteroptera: Nephomorpha) e *Chironomus inquinatus* (Diptera: Chironomidae) 59

RESUMO 60
INTRODUÇÃO 61
OBJETIVO 63
MATERIAIS E MÉTODOS 64
Organismos teste 64
Notonectidae sp. 64
Chironomus inquinatus 64
Sobrevivência: testes crônicos 65
Delineamento experimental 65
Notonectidae sp. 65
Chironomus inquinatus 66
Análises estatísticas 66
Sobrevivência: testes agudos 67
Delineamento experimental 67
Notonectidae sp. 67
Análises estatísticas 67
RESULTADOS 68
Sobrevivência: testes crônicos 68
Notonectidae sp. 68
Chironomus inquinatus 68
Sobrevivência: testes agudos 75
Notonectidae sp. 75
DISCUSSÃO 77
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 83
CONSIDERAÇÕES FINAIS 88

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1. Efeito de herbicidas à base de glifosato sobre a sobrevivência e o tempo de predação de duas espécies de *Limnogonus* (Heteroptera: Gerromorpha: Gerridae)

Figura 1. Curva de sobrevivência Kaplan-Meier com a porcentagem de sobrevivência da população de *Limnogonus profugos* em relação aos dias de exposição crônica ao herbicida Roundup®. 37

Figura 2. Curva de sobrevivência Kaplan-Meier com a porcentagem de sobrevivência da população de *Limnogonus profugos* em relação aos dias de exposição crônica ao herbicida glifosato técnico.....37

Figura 3. Curva de sobrevivência Kaplan-Meier com a porcentagem de sobrevivência da população de *Limnogonus aduncus* em relação aos dias de exposição crônica ao herbicida Roundup®. 38

Figura 4. Curva de sobrevivência Kaplan-Meier com a porcentagem de sobrevivência da população de *Limnogonus aduncus* em relação aos dias de exposição crônica ao herbicida glifosato técnico.....39

Figura 5. Média da mortalidade para imaturos de *Limnogonus profugos* para cada tratamento após 96 horas de exposição ao Roundup®. 41

Figura 6. Média da mortalidade para adultos de *Limnogonus profugos* para cada tratamento após 96 horas de exposição ao Roundup®. 41

Figura 7. Média da mortalidade para imaturos de *Limnogonus aduncus* para cada tratamento após 96 horas de exposição ao Roundup®. 42

Figura 8. Média da mortalidade para adultos de *Limnogonus aduncus* para cada tratamento após 96 horas de exposição ao Roundup®. 42

Figura 9. Tempo de captura de presa para *Limnogonus profugos* para cada tratamento (insetos criados desde o ovo na presença do herbicida Roundup®). 44

Figura 10. Tempo de captura de presa para *Limnogonus profugos* para cada tratamento (insetos da criação, submetidos ao efeito de Roundup® somente na hora do teste). 44

Figura 11. Tempo de captura de presa para *Limnogonus aduncus* para cada tratamento (insetos criados desde o ovo na presença do herbicida Roundup®). 46

Figura 12. Tempo de captura de presa para *Limnogonus aduncus* para cada tratamento (insetos da criação, submetidos ao efeito de Roundup® somente na hora do teste). 46

CAPÍTULO 2. Efeito de herbicidas à base de glifosato sobre a sobrevivência de Notonectidae sp. (Heteroptera: Nephomorpha) e *Chironomus inquinatus* (Diptera: Chironomidae)

Figura 1. Curva de sobrevivência Kaplan-Meier com a porcentagem de sobrevivência da população de Notonectidae sp. em relação aos dias de exposição crônica ao herbicida Roundup®. 70

Figura 2. Curva de sobrevivência Kaplan-Meier com a porcentagem de sobrevivência da população de Notonectidae sp. em relação aos dias de exposição crônica ao herbicida glifosato técnico.....70

Figura 3. Curva de sobrevivência Kaplan-Meier com a porcentagem de sobrevivência da população de Notonectidae sp. em relação aos dias de exposição crônica ao herbicida AMPA. 71

Figura 4. Curva de sobrevivência Kaplan-Meier com a porcentagem de sobrevivência da população de *Chironomus inquinatus* em relação aos dias de exposição crônica ao herbicida Roundup®. 72

Figura 5. Curva de sobrevivência Kaplan-Meier com a porcentagem de sobrevivência da população de *Chironomus inquinatus* em relação aos dias de exposição crônica ao herbicida glifosato técnico.....72

Figura 6. Curva de sobrevivência Kaplan-Meier com a porcentagem de sobrevivência da população de *Chironomus inquinatu*s em relação aos dias de exposição crônica ao herbicida AMPA. 73

Figura 7. Média da mortalidade de adultos de Notonectidae sp. para cada tratamento após 96 horas de exposição ao Roundup®. 75

Figura 8. Média da mortalidade de adultos de Notonectidae sp. para cada tratamento após 96 horas de exposição ao glifosato técnico. 76

Figura 9. Média da mortalidade de adultos de Notonectidae sp. para cada tratamento após 96 horas de exposição ao AMPA. 76

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1. Efeito de herbicidas à base de glifosato sobre a sobrevivência e o tempo de predação de duas espécies de *Limnogonus* (Heteroptera: Gerromorpha: Gerridae)

Tabela 1. Comparações Múltiplas (método Holm-Sidak) para as concentrações testadas de Roundup® para *Limnogonus profugos*. 38

Tabela 2. Comparações Múltiplas (método Holm-Sidak) para as concentrações testadas de Roundup® para *Limnogonus aduncus*.....39

Tabela 3. Comparações múltiplas para o tempo de captura de presas de *Limnogonus profugos* (Teste de Tukey) entre o controle e os tratamentos (insetos criados desde o ovo na presença do herbicida Roundup). 45

Tabela 4. Comparações múltiplas para o tempo de captura de presas de *Limnogonus profugo*s (Teste de Tukey) entre o controle e os tratamentos (insetos da criação, submetidos ao efeito de Roundup® somente na hora do teste). 45

Tabela 5. Comparações múltiplas para o tempo de captura de presas de *Limnogonus aduncus* (Teste de Tukey) entre o controle e os tratamentos (insetos criados desde o ovo na presença do herbicida Roundup®). 47

Tabela 6. Comparações múltiplas para o tempo de captura de presas de *Limnogonus aduncus* (Teste de Tukey) entre o controle e os tratamentos (insetos da criação, submetidos ao efeito de Roundup® somente na hora do teste). 47

CAPÍTULO 2. Efeito de herbicidas à base de glifosato sobre a sobrevivência de Notonectidae sp. (Heteroptera: Nephomorpha) e *Chironomus inquinatus* (Diptera: Chironomidae)

Tabela 1. Comparações Múltiplas (método Holm-Sidak) para as concentrações testadas de Roundup® para Notonectidae sp. 71

Tabela 2. Comparações Múltiplas (método Holm-Sidak) para as concentrações testadas de Roundup®. para *Chironomus inquinatus*. 73

Tabela 3. Comparações Múltiplas (método Holm-Sidak) para as concentrações testadas de glifosato técnico para Chironomus inquinatus. 74

Tabela 4. Comparações Múltiplas (método Holm-Sidak) para as concentrações testadas de AMPA para *Chironomus inquinatus*. 74

INTRODUÇÃO GERAL

Os assentamentos humanos começaram a se estabelecer entre 10 e 15 mil anos atrás. Isto foi possível com o desenvolvimento da agricultura e da criação de animais. Em geral estes assentamentos foram estabelecidos em terras férteis banhadas por ambientes aquáticos. Deste então, estes ambientes ao mesmo tempo que têm fornecido recursos para as sociedades humanas, têm sido impactados negativamente pelas atividades antrópicas. Ao longo da história da humanidade, cada passo no desenvolvimento da agricultura foi seguido do aumento nas taxas de crescimento populacional (TAIZ, 2013). Por outro lado, no final do século XVIII, o Economista e Demógrafo Britânico Thomas Robert Malthus concluiu que a taxa de crescimento da produção de alimento era menor que a taxa de crescimento da população humana. Portanto, segundo ele, a disponibilidade de alimento seria o principal fator limitante para o crescimento populacional humano. As predições de Malthus nunca foram confirmadas, pelo contrário, desde o seu livro, a população humana passou de aproximadamente 1 bilhão para mais de 7,5 bilhões de habitantes. Este crescimento tem sido possível pelo grande e contínuo desenvolvimento agrícola (TAIZ, 2013), o qual tem tido um alto custo ambiental.

A manutenção de níveis crescentes de produtividade tem passado pelo melhoramento genético, mecanização, controles químicos e ênfase na monocultura. A monocultura, apesar de aumentar a produtividade a curto prazo, é um risco para a biodiversidade e o desenvolvimento sustentável. Este tipo de agricultura homogeniza o sistema, criando um cenário favorável para o surgimento de diferentes tipos de praga. Em um cenário de grande explosão populacional humana o esforço em manter a produção de alimentos em níveis adequados inclui o combate ao ataque destas pragas nas plantações agrícolas. Este combate tem focado no controle químico, o qual tem sido feito de forma indiscriminada e sem o devido cuidado com a saúde humana e a biodiversidade. Adicionalmente, o uso indiscriminado tem aumentado a resistência das pragas (PIMENTEL, 2009), por isto, ao longo do tempo o controle tem exigido o desenvolvimento constante de novos pesticidas, além do aumento da concentração e da frequência de aplicação destes pesticidas. Assim, a aplicação de pesticidas se tornou uma das principais ferramentas para o controle de pragas e o seu uso tem crescido constantemente (JURADO *et al.*, 2011; PRICE e KELTON, 2011).

Entre as pragas, insetos e plantas daninhas têm sido aquelas que causam mais prejuízos à agricultura. No caso das ervas daninhas, ao longo do século XX vários tipos de produtos foram utilizados para o controle destas plantas. Inicialmente, para a remoção da vegetação indesejada em quintais, pátios, rodovias, linhas férreas, etc, eram usados produtos brutos, como por exemplo, sais de rocha, minério de arsênio triturado, creosoto, resíduos de óleo, ácido sulfúrico e sais de cobre (JURADO *et al*., 2011). Porém, esses produtos não atuavam de forma seletiva e acabavam excluindo todas as plantas, além de permanecerem nas áreas tratadas durante longos períodos (JURADO et al., 2011).

Para fins agrícolas, é importante que os herbicidas atuem de forma seletiva, eliminando as ervas daninhas, mas mantendo a cultura de interesse. As diferenças morfológicas (e.g. tamanho da folha; textura) e fisiológicas (e.g. capacidade ou não de metabolizar o herbicida) entre plantas daninhas e culturas de interesse possibilitaram o desenvolvimento de herbicidas seletivos, os quais atuam especificamente sobre as primeiras (JURADO *et al*., 2011).

Na década de 1940, o controle químico seletivo começou a ser utilizado com o uso do herbicida 2,4 - diclorofenoxiacético (2,4-D), o qual foi inicialmente comercializado nos EUA (JURADO *et al*., 2011; OLIVEIRA JR., 2011). Este foi um grande avanço na agricultura e revolucionou as práticas de controle de plantas daninhas, aumentando a produtividade e reduzindo a mão de obra necessária para o seu controle (PRICE e KELTON, 2011). O herbicida 2,4-D é um herbicida seletivo e as vantagens observadas com o seu uso levaram ao desenvolvimento de vários produtos para o controle químico de plantas daninhas. Como resultado, hoje há uma grande variedade de opções para esta finalidade (MARCHI *et al*., 2008; JURADO *el al*., 2011).

Um importante avanço no controle de plantas daninhas foi o desenvolvimento de cultivares transgênicos resistentes aos herbicidas (PRICE e KELTON, 2011). Antes dos transgênicos resistentes, o protocolo para o desenvolvimento de um herbicida seletivo era testar vários herbicidas sobre várias plantas, avaliando quais deles eram efetivos, quais plantas eram controladas e em qual cultura poderia ser utilizado (MONQUERO, 2005). Atualmente, um caminho efetivo é a transferência de genes que confere resistência a um determinado herbicida para as culturas de interesse, o que, na prática, tem: 1) transformado herbicidas não seletivos, como o glifosato, (MONQUERO, 2005) em seletivos; e 2) permitido a aplicação de herbicida

no período de pós-emergência (DILL *et al*., 2008; DUKE e POWLES, 2009). O desenvolvimento de cultivares transgênicos resistentes aos herbicidas, juntamente com outros fatores, tem contribuído para a expansão de culturas transgênicas pelo mundo. Por exemplo, EUA, Brasil, Argentina e Canadá estão entre os países com maiores áreas plantadas de culturas transgênicas (DILL *et al*., 2008). No Brasil, cerca de 23% de área agrícola é cultivada com culturas transgênicas (WAGNER *et al*., 2013; RODRIGUES *et al*., 2017).

Com o surgimento das culturas transgênicas houve a necessidade de aumentar a eficácia do ingrediente ativo, permitindo que ele alcance diretamente o local da planta onde o herbicida atua. Para isto, herbicidas não seletivos como o glifosato, foram comercializados juntamente com outros ingredientes, descritos como adjuvantes. As formulações comerciais dos herbicidas incluem vários adjuvantes, e o surfactante é um dos principais, pois facilita a absorção do pesticida pela planta (OLIVEIRA *et al*., 2016). A utilização de surfactantes é uma estratégia relativamente antiga, por exemplo, no final do século XIX já se usava soluções com sabão para aumentar a efetividade de formulações com arsênico no controle de ervas daninhas (HASEN, 2000).

Os herbicidas à base de glifosato estão entre os mais utilizados no Mundo (POWLES, 2008; BATTAGLIN *et al*., 2014) e também no Brasil, onde alcançaram aproximadamente 200 mil toneladas comercializadas em 2014 (IBAMA, 2016). O glifosato (N- (fosfonometil) glicina) é um herbicida não seletivo e o principal ingrediente ativo de várias formulações comercias, as quais têm sido utilizadas de forma pós-emergente no controle de plantas daninhas em áreas agrícolas, urbanas e domésticas (DUKE e POWLES, 2009; ROY *et al*., 2016; RODRIGUES *et al*., 2017). O glifosato foi inicialmente desenvolvido e comercializado pela empresa Monsanto em 1970, sendo a sua primeira formulação comercial lançada nos Estados Unidos em 1974 com o nome de Roundup® (GALLI *et al*., 2005).

A formulação mais conhecida e amplamente utilizada de herbicida à base de glifosato é o Roundup®, o qual contém polioxietileno amina (POEA) como surfactante. Apesar do POEA normalmente representar menos que 15% do Roundup® (GIESY *et al*., 2000) os dados da literatura têm mostrado que a sua presença aumenta a toxicidade das formulações comerciais para organismos alvos e não alvos quando comparada com o glifosato puro (POWELL *et al*., 1991; GIESY *et al*., 2000; TSUI e CHU, 2003; ANNETT *et al*., 2014; BATTAGLIN *et al*., 2014).

A aplicação de Roundup® nas plantas é realizada através de pulverização direta nas folhas. O glifosato é assimilado pelas folhas e translocado dentro do floema (FRANZ *et al*., 1997). A absorção do herbicida na planta depende da difusão, a qual é influenciada pelas características da cutícula, que atua como uma barreira à absorção de produtos químicos; adicionalmente, outros fatores também são importantes, entre os quais o tamanho das gotículas e a concentração e o volume pulverizados. O surfactante atua de modo a quebrar a tensão superficial das gotas pulverizadas, o que aumenta a superfície de contato da planta com o herbicida, facilitando a penetração e a chegada do ingrediente ativo até o local de ação na planta (ANNETT *et al*., 2014) . O surfactante ainda confere vantagens no momento da aplicação tornando mais rápida a absorção e diminuindo as perdas ocasionadas por chuvas após a aplicação, adicionalmente, facilita a cobertura das superfícies hidrofóbicas, como folhas ou frutos com serosidades (BOLLER *et al*. 2007). O herbicida aplicado se distribui e se adere melhor, cobrindo a superfície de modo uniforme. Em alguns casos, a adição de adjuvante permitiu reduzir a dose herbicida em mais de 50%, comparativamente àquela utilizada sem adjuvante (VARGAS e ROMAN, 2006).

Na planta, o glifosato interfere na síntese de aminoácidos aromáticos pela inibição da enzima EPSPs (5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintase), bloqueando a síntese metabólica da fenilalanina, tirosina e triptofano; como resultado há uma redução da taxa fotossintética da planta (FORLANI *et al*., 2008). Alguns estudos também têm mostrado que a assimilação de Ca, Fe e Mn pode ser afetada pelo uso de glifosato (ZOBIOLE *et al*., 2012; GOMES *et al*., 2014), interferindo nos processos de translocação dentro da planta (SU *et al*., 2009; ZOBIOLE *et al*., 2012). Além disso, o glifosato reduz a formação de microtúbulos, retardando a divisão celular e formando núcleos com uma aparência lobulada, causando malformações nos cloroplastos (CAMPBELL *et al*., 1976; VAUGHN e DUKE 1986).

O glifosato apresenta pouca mobilidade no solo e na água, pois é facilmente adsorvido no solo ou no substrato e, é primariamente degradado por bactérias (GIESY *et al*., 2000). O principal produto de degradação do glifosato é o ácido aminometilfosfônico (AMPA). O AMPA é frequentemente encontrado em águas superficiais em áreas com intensa produção agrícola (COUPE *et al*., 2012) e também é considerado um herbicida, pois assim como o glifosato, atua sobre a síntese de clorofila, ampliando os efeitos indiretos do ingrediente ativo (GOMES *et*

al., 2014). O tempo de degradação do AMPA é maior do que o tempo de degradação do glifosato e resulta em água, dióxido de carbono e fosfato inorgânico. Como a degradação do AMPA é mais lenta em relação à degradação do glifosato, o AMPA é detectado com maior frequência no ambiente (SZÉKÁCS e DARVAS, 2012; BATTAGLIN *et al*., 2014; POIGER *et al*., 2017), e é considerado menos tóxico que o glifosato (BONNET *et al*., 2007).

Como o glifosato atua inibindo uma via de biossíntese de aminoácidos aromáticos de vegetais, os mecanismos de ação deste composto deveriam ser exclusivos a organismos fotossintetizantes (WILLIAMS *et al*., 2000; CERDEIRA *et al*., 2007; ROMANO *et al*., 2008; 2009). No entanto, diversos trabalhos têm demonstrado que o glifosato e suas formulações também podem ser tóxicos para diferentes espécies animais. Inicialmente, pelo fato do glifosato ser fortemente adsorvido pelo solo e rapidamente degradado por microrganismos, se acreditava que sua aplicação era segura e que o produto dificilmente atingiria plantas não alvos ou seria escoado para ambientes aquáticos (GIESY *et al*., 2000; SOLOMON e THOMPSON, 2003). No entanto, o uso intenso, o descuido na aplicação e eventos climáticos (ventos e/ou chuvas) durante e após a aplicação têm aumentado o escoamento de herbicidas à base de glifosato para os ambientes aquáticos, onde pode afetar os organismos, a diversidade e os processos ecossistêmicos (BLASIOLI *et al*., 2011; PÉREZ *et al*., 2011; BATTAGLIN *et al*., 2014; MAGBANUA *et al*., 2016).

Além do escoamento e da lixiviação, herbicidas à base de glifosato podem ser aplicados diretamente no ambiente aquático para o controle de macrófitas. Nestes ambientes, a aplicação do surfactante não é recomendada, por isso, formulações sem a presença de surfactantes (ex. Rodeo®) começaram a ser desenvolvidas e são utilizadas em países da Europa, Estados Unidos e Canadá (ANNETT *et al*., 2014; RODRIGUEZ-GIL *et al*., 2017). Por outro lado, ao contrário de outros países, a resolução CONAMA nº 467 publicada em 17 de julho de 2015, que “dispõe sobre critérios para a autorização de uso de produtos ou de agentes de processos físicos, químicos ou biológicos para o controle de organismos ou contaminantes em corpos hídricos superficiais e dá outras providências”, tornou possível a utilização de formulações comercias à base de glifosato em ambiente aquático (POMPÊO, 2017). Isto abriu um espaço ainda maior para o impacto de ecossistemas aquáticos por herbicidas à base de glifosato no Brasil.

Independentemente de ser considerado seguro ou não e da via predominante de chegada destes herbicidas ao meio aquático, o fato é que herbicidas à base de glifosato têm sido detectados em ambientes aquáticos ao redor do mundo (BATTAGLIN *et al*., 2005; PERUZZO *et al*., 2008; VILLENEUVE *et al*., 2011). Portanto, tanto processos de escoamento e lixiviação agrícola quanto aplicações diretas têm levado os herbicidas à base de glifosato aos ambientes aquáticos (OLIVEIRA *et al*., 2016). Outro fato preocupante é que o glifosato não atinge somente ambientes aquáticos adjacentes à áreas agrícolas. Herbicidas à base de glifosato são frequentemente utilizados no manejo de gramados e jardins (BATTAGLIN *et al*., 2014; ANNETT *et al*., 2016; POIGER *et al*., 2017) e por isso podem ser encontrados em córregos urbanos em concentrações semelhantes àquelas reportadas para riachos em áreas agrícolas (MAHLER *et al*., 2017).

Neste contexto, muitos estudos têm sido feitos em diferentes partes do mundo com o objetivo de detectar casos de contaminação por glifosato em ambientes aquáticos. Um estudo realizado em 51 riachos pertencentes a nove estados do centro oeste dos Estados Unidos revelou a presença de glifosato e AMPA em 36% e 69% das amostras estudadas, respectivamente (BATTAGLIN *et al*., 2005). Também foram relatadas altas concentrações de glifosato em riachos de florestas nos Estados Unidos (1,24 mg/L, NEWTON *et al*., 1994) e nos pampas argentinos (0,7 mg/L, PERUZZO *et al*., 2008). Villeneuve *et al*. (2011) em uma revisão sobre a concentração de AMPA em águas superficiais, relataram concentrações que variam de 0,04 a 66 mg/L no Canadá, 0,02 a 41 mg/L nos Estados Unidos e 2,1 a 48,1 mg/L na França. Outro estudo envolvendo riachos localizados em regiões agrícolas dos Estados Unidos mostrou que a concentração média de AMPA variou de 0,14 a 26 mg/L (COUPE *et al*., 2012).

A concentração máxima permitida de glifosato pela legislação depende de cada país. Nos EUA a concentração de glifosato permitida na água é 0,7 mg/L (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2009), enquanto na Europa a concentração máxima do herbicida é 0,0001 mg/L (CONSIL OF THE EUROPEAN UNION, 1998). No Brasil, foi estabelecido pela resolução n°357/05 do Conselho Nacional do Meio Ambiente que a concentração máxima de glifosato permitida na água doce destinada ao consumo humano corresponde a 0,065 mg/L, já a água doce destinada a irrigação e ao consumo animal corresponde a 0,28 mg/L (CONAMA, 2005). O Ministério da Saúde, na portaria nº 2914 publicada em 2011,

determina que a concentração máxima permitida de glifosato e AMPA na água potável é de 0,5 mg/L (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Os invertebrados aquáticos podem ser bons modelos para testar os efeitos de herbicidas sobre os ecossistemas aquáticos, já que habitam estes ambientes por longos períodos e conectam os recursos basais com níveis mais elevados na cadeia alimentar. Alguns estudos ecotoxicológicos utilizando invertebrados relatam baixa sensibilidade desses organismos ao glifosato. Por exemplo, os valores de CL_{50} (concentração que causa morte de metade dos indivíduos da população) obtidos em tratamentos com glifosato para espécies do zooplâncton variaram de 49,3 mg/L para o copépode marinho *Acartia tonsa* a 415 mg/L para o cladócera *Ceriodaphnia dubia* (TSUI e CHU, 2003). Por outro lado, outros dois estudos envolvendo o gastrópoda *Pseudosuccinea columella*, relataram efeitos significativos mesmo em baixas concentrações de glifosato (0,1, 1 e 10 mg/L). As concentrações de 1 mg/L aumentaram o crescimento na terceira geração de caramujos, já as concentrações de 0,1 e 10 mg/L provocaram uma inibição da eclosão de ovos, anormalidades e poliembrionia (TATE *et al*., 1997). Os mesmos autores observaram diferenças significativas no metabolismo de *Pseudosuccinea columela*, sendo que as concentrações de glifosato de 0,1 mg/L induziram aumento de cerca de 2 vezes em cinco aminoácidos livres (TATE *et al*., 2000).

Além dos efeitos negativos de herbicidas à base de glifosato observados, por exemplo, em parâmetros como sobrevivência, mobilidade, predação e abundância de espécies, são relatados também efeitos fisiológicos como alterações bioquímicas em vertebrados e invertebrados. Dentre estes, a inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), que degrada um neurotrnsmissor liberado nas fendas sinápticas, já foi observada em peixes (CATTANEO *et al*., 2011) e em anfíbios (LAJMANOVICH *et al*., 2010), e pode estar relacionada aos efeitos crônicos de herbicidas à base de glifosato observados em Chironomus xanthus pelos autores Ferreira-junior *et al*. (2017). Em um estudo que avaliou o potencial de bioacumulação do herbicida glifosato e seu produto de comercialização Roundup Ultra, Contardo-Jara *et al*. (2009) observaram efeitos fisiológicos no verme *Lumbriculus variegatus,* como o aumento significativo na atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase em concentrações de 0,05 e 0,1 mg/L de glifosato, indicando estresse oxidativo .

Um resultado comum nas avaliações do efeito de herbicidas à base de glifosato em animais é a amplificação do efeito negativo quando usadas as formulações comerciais. Estudos realizados por Tsui e Chu (2004) mostraram que o Roundup® apresentou entre 3 a 76 vezes maior toxicidade do que o glifosato técnico. Outros estudos mostraram que o surfactante (POEA) utilizado nas formulações comerciais foi ainda mais tóxico para invertebrados do que o glifosato técnico e o próprio Roundup®. Por exemplo, Folmar *et al*. (1979) relataram que a toxicidade de POEA sobre larvas de *Chironomus plumosus* foi aproximadamente 1,4 vezes maior do que a de Roundup®. Valores mais elevados foram relatados por Servizi *et al*. (1987) e Tsui e Chu (2003), os quais mostraram que o efeito tóxico do POEA foi de 3 a 5 vezes maior do que Roundup®.

Diante do exposto, consideramos fundamental testar os efeitos de herbicidas à base de glifosato sobre diferentes organismos e ecossistemas aquáticos, uma vez que o uso destes pesticidas tem aumentado a cada dia. Para isso, fizemos experimentos utilizando quatro espécies de invertebrados que ocupam diferentes compartimentos aquáticos, plêsuton (*Limnogonus* spp.), nêuston (Notonectidae sp.) e bênton (*Chironomus inquinatus*).

OBJETIVO GERAL

Considerando que herbicidas à base de glifosato podem atingir o ambiente aquático de várias formas e causar efeitos negativos na estrutura de comunidades, fisiologia e desenvolvimento dos organismos aquáticos, além de alterar a ciclagem de nutrientes e os processos ecossistêmicos, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos negativos de herbicidas à base de glifosato, por meio de testes crônicos e agudos, sobre a sobrevivência de insetos que ocupam diferentes compartimentos aquáticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANNETT, R.; HABIBI, H. R.and HONTELA, A.. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 5, p. 458-479, 2014.

BATTAGLIN, W. A. et al. Glyphosate, other herbicides, and transformation products in midwestern streams, **Journal of the American Water Resources Association**, v. 41, n. 2, p. 323-332, 2005.

BATTAGLIN, W. A. et al. Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in US soils, surface water, groundwater, and precipitation. **Journal of the American Water Resources Association**, v. 50, n. 2, p. 275-290, 2014.

BOLLER, W. and MACHRY, M. Operating pressure and spray nozzles effects on the efficiency of contact herbicide in soybeans. **Engenharia Agrícola**, v. 27, n.3, p. 722-727, 2007.

BONNET, L. J. et al. Assessment of the potential toxicity of herbicides and their degradation products to nontarget cells using two Microorganisms, the bacteriaVibrio fischeri and the ciliate Tetrahymena pyriformis. **Environmental Toxicology,** v. 22, n. 1, p. 78-91, 2007.

BLASIOLI, S.; BRASCHI, I. and GESSA, C. E. The fate of herbicides in soil. In: ANDREAS KORTEKAMP (Ed.), **Herbicides and Environment.** InTech, Rijeka, Croatia, 2011,. 175-195 p. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-and-environment/the-fate-of-herbicides-in-soil>. Acesso: 13/04/2019.

CAMPBELL, W. F.; EVANS, J. O. and REED, S. C. Effects of glyphosate on chloroplast ultrastructure of quackgrass mesophyll cells. **Weed Science**, v. 24, n. 1, p. 22-25, 1976.

CATTANEO, R. et al. Toxicological responses of Cyprinus carpio exposed to a commercial formulation containing glyphosate. **Bulletin of environmental contamination and toxicology***,* v. 87, n. 6, p. 597-602, 2011.

CONAMA. **Conselho Nacional do Meio Ambiente**.. Resolução número 357 de 17 de março de 2005. 2005

CERDEIRA, A. L. et al. Review of potential environmental impacts of transgenic glyphosate-resistant soybean in Brazil. **Journal of Environmental Science and Health, Part B,** v. 42, n. 5, p. 539-549, 2007.

CONTARDO-JARA, V. et al. Biotransformation and antioxidant enzymes of Limnoperna fortunei detect site impact in watercourses of Córdoba, Argentina. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 7, p. 1871-1880, 2009.

COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human Consumption**. Official Journal of the European Communities**, v. 330, p. 32–54, 1998.

COUPE, R. H. et al. Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins. **Pest management science**, v. 68, n. 1, p. 16-30, 2012.

DILL, G. M.; CAJACOB, C. A. and PADGETTE, S. R. Glyphosate-resistant crops: adoption, use and future considerations. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 64, n. 4, p. 326-331, 2008.

DUKE, S. O. and POWLES, S. B. Glyphosate-resistant crops and weeds: now and in the future. **AgBioForum***,* v. 12, p. 346– 357, 2009.

FERREIRA-JUNIOR, D. F. et al. Low concentrations of glyphosate-based herbicide affects the development of Chironomus xanthus. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 228, n. 10, p. 390, 2017.

FOLMAR, L. C.; SANDERS, H. O. and JULIN, A. M. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates**. Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 8, n. 3, p. 269-278, 1979.
.
FORLANI, G. et al. Biochemical bases for a widespread tolerance of cyanobacteria to the phosphonate herbicide glyphosate. **Plant and cell physiology**, v. 49, n. 3, p. 443-456, 2008.

FRANZ, J. E. et al. **Glyphosate:** a unique global herbicide. ACS Monograph 189, American Chemical Society, Washington, DC, 1997, 163-175 pp..

GALLI, A. J. B et al. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura***.* São Paulo: Monsanto do Brasil, 2005, 66pp.

GIESY, J. P.; DOBSON, S. and SOLOMON, K. R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. In: **Reviews of environmental contamination and toxicolog***,* Springer, New York, NY, v. 167, p. 35–120, 2000.

GOMES, M. P. et al. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. **Journal of experimental botany**, v. 65, n. 17, p. 4691-4703, 2014.

HAZEN, J. L. Adjuvants - terminology, classification, and chemistry. **Weed technology**, v. 14, n. 4, p. 773-784, 2000.

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 n° 4.074/2002***,* 2016. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>. Acesso: 13/04/2019.

JURADO, A. et al. Herbicides: the face and the reverse of the coin. An in vitro approach to the toxicity of herbicides in non-target organisms. In: KORTEKAMP, A. (ED.), **Herbicides and environment**.. InTech, 2011. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-and-environment/herbicides-the-face-and-thereverse-of-the-coin-an-in-vitro-approach-to-the-toxicity-of-herbicides-i>. Acesso: 13/04/2019

LAJMANOVICH, Rafael C. et al. Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on Rhinella arenarum (Anura: Bufonidae) tadpoles: B-esterases and glutathione S-transferase inhibitors. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 60, n. 4, p. 681-689, 2011.

MAGBANUA, F. S. et al. Individual and combined effects of fine sediment and glyphosate herbicide on invertebrate drift and insect emergence: a stream mesocosm experiment. **Freshwater Science**, v. 35, n. 1, p. 139-151, 2016.

MAHLER, B. J. et al. Similarities and differences in occurrence and temporal fluctuations in glyphosate and atrazine in small Midwestern streams (USA) during the 2013 growing season. **Science of the Total Environment**, v. 579, p. 149-158, 2017.

MARCHI, G.; MARCHI, E. C. S. e GUIMARÃES, T. G.. Herbicidas: mecanismos de ação e uso. **Embrapa Cerrados-Documentos,** *(INFOTECA-E),* 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria nº 2914**. 2011. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso: 13/04/2019.

MONQUERO, P. A.. Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: situação e perspectivas. **Bragantia**, v. 64, n. 4, 2005.

NEWTON, M. et al. Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in North American forests. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 42, n. 8, p. 1795-1802, 1994.

OLIVEIRA, R. de C.; VILAS BOAS, L. K. and BRANCO, C. C.Z.. Assessment of the potential toxicity of glyphosate-based herbicides on the photosynthesis of Nitella microcarpa var. wrightii (Charophyceae). **Phycologia***,* v. 55, n. 5, p. 577-584, 2016.

OLIVEIRA JR, R. S. de. Introdução ao controle químico. In OLIVEIRA JR, R. S. de, CONSTANTIM, J. e HIROKO, M. (EDS.) **Biologia e Manejo de plantas daninhas**, , Omnipax, Curitiba, PR, Brasil, 2011, 125-140 p.

PÉREZ, G. L.; VERA, M. S. and MIRANDA, L.. Effects of herbicide glyphosate and glyphosate-based formulations on aquatic ecosystems. In: **Herbicides and environment**. IntechOpen, 2011. Disponível em: http://www.intechopen.com/books/herbicides-andenvironment/effects-of-herbicide-glyphosate-and-glyphosate-based-formulations-on-aquatic-ecosystems. Acesso em 13/04/2019.

PERUZZO, P. J.; PORTA, A. A. and RONCO, A. E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. **Environmental Pollution**, v. 156, n. 1, p. 61-66, 2008.

PIMENTEL, D. Pesticides and pest control. In: **Integrated pest management: innovation-development process.** Springer, Dordrecht, 2009, 83-87 p.

POIGER, T. et al. Occurrence of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in surface waters in Switzerland determined with on-line solid phase extraction LC-MS/MS. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 2, p. 1588-1596, 2017.

POMPÊO, M.. Monitoramento e manejo de macrófitas aquáticas em reservatórios tropicais brasileiros, Pompêo, M. (Ed.), **Instituto de Biociências da USP**, São Paulo, Brasil, 2017, 138 pp..

POWELL, H. A.; KERBBY, N. W. and ROWELL, P. Natural tolerance of cyanobacteria to the herbicide glyphosate. **New Phytologist**, v. 119, n. 3, p. 421-426, 1991.

POWLES, S. B. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 64, n. 4, p. 360-365, 2008.

PRICE, A. and KELTON, J. Weed control in conservation agriculture. In: LARRAMENDY, M. (Ed.). **Herbicides, Theory and Applications.** InTech, 2011. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-theory-and-applications/weed-control-in-conservation-agriculture>. Acesso: 13/04/2019.

RODRIGUES, L. de B. et al. Ecotoxicological assessment of glyphosate-based herbicides: Effects on different organisms. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 36, n. 7, p. 1755-1763, 2017.

RODRIGUEZ-GIL, J. L. et al. Aquatic hazard assessment of MON 0818, a commercial mixture of alkylamine ethoxylates commonly used in glyphosate-containing herbicide formulations. Part 1: Species sensitivity distribution from laboratory acute exposures. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 36, n. 2, p. 501-511, 2017.

ROY, N. M.; CARNEIRO, B. and OCHS, J.. Glyphosate induces neurotoxicity in zebrafish. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 42, p. 45-54, 2016.

ROMANO, R. M. et al. A exposição ao glifosato-Roundup causa atraso no início da puberdade em ratos machos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 6, p. 481-487, 2008.

ROMANO, R.. M., ROMANO, M.. A., OLIVEIRA, C. A. Glifosato como desregulador endócrino químico. **Ambiência**, v. 5, p. 359-372, 2009.

SERVIZI, J. A., GORDON, R. W. E MARTENS, D. W. Acute toxicity of Garlon 4 and Roundup herbicides to salmon, *Daphnia* and trout**. Bulletin Environmental Contamination and Toxicology**, v. 39, p.15–22, 1987.

SOLOMON, K. and THOMPSON, D. Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 6, n. 3, p. 289-324, 2003.

SU, Y. S. et al. Turfgrass species response exposed to increasing rates of glyphosate application. **European Journal of Agronomy**, v. 31, n. 3, p. 120-125, 2009.

SZÉKACS, A. and DARVAS, B.. Forty years with glyphosate. In: HASANEEN, M.N. (ED.), **Herbicides-properties, synthesis and control of weeds**. InTech, 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-properties-synthesis-and-control-of-weeds/forty-years-withglyphosate>. Acesso: 13/04/2019.

TAIZ, L.. Agriculture, plant physiology, and human population growth: past, present, and future. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 25, n. 3, p. 167-181, 2013.

TATE, T.; JACKSON, R. and CHRISTIAN, F. Effects of glyphosate and dalaponon total free amino acid profiles of *Pseudosuccinea columella* snails. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 64, p. 258–262, 2000.

TATE, T. M.; SPURLOCK, J. O. and CHRISTIAN, F. A. Effect of glyphosate on the development of *Pseudosuccinea columella* snails. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 33, p. 286-289, 1997.

TSUI, M. T. K. and CHU, L. M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere**, v. 52, n. 7, p. 1189-1197, 2003.

TSUI, M. T. K. and CHU, L. M. Comparative toxicity of glyphosate-based herbicides: aqueous and sediment porewater exposures. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, n. 3, p. 316-323, 2004.

VARGAS, L. and ROMAN, E. S.. *Resistência de plantas daninhas a herbicidas*: conceitos, origem e evolução. **Embrapa Trigo-Documentos** *(INFOTECA-E)*, 2006.

VAUGHN, K. C. and DUKE, S. O. Ultrastructural effects of glyphosate on Glycine max seedlings. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 26, n. 1, p. 56-65, 1986.

VILLENEUVE, A., LARROUD, E S. and HUMBERT, J.F. Herbicide contamination of freshwater ecosystems: Impacton microbial communities. In: STOYTCHEVA, M. (Ed.), *Pesticides:* **Formulations, effects, fate**. Rijeka, Croácia, 2011, 285–312 pp.

WAGNER, N. et al. Questions concerning the potential impact of glyphosate-based herbicides on amphibians. **Environmental Toxicology and Chemistry***,* v. 32, n. 8, p. 1688-1700, 2013.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R. and MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 117-165, 2000.

ZOBIOLE, L. H. S. et al. Glyphosate effects on photosynthesis, nutrient accumulation, and nodulation in glyphosate-resistant soybean. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 175, n. 2, p. 319-330, 2012.

Capítulo 1

Efeito de herbicidas à base de glifosato sobre a sobrevivência e o tempo de predação de duas espécies de *Limnogonus* (Heteroptera: Gerromorpha: Gerridae)

Tássia J. Malacarne[1,2]; Ciro César Z. Branco[2]; Pitágoras C. Bispo[2]

1. PPG em Entomologia. Departamento de Biologia. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, SP.
2. Laboratório de Biologia Aquática. Departamento de Ciências Biológicas. Faculdade de Ciências e Letras de Assis. Universidade Estadual Paulista. Assis, SP.

RESUMO

Avaliar os efeitos de herbicidas sobre a fauna aquática é crucial para melhorar a nossa compreensão do impacto dessas substâncias sobre a diversidade e ecologia dos ecossistemas aquáticos. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos crônicos e agudos de herbicidas à base de glifosato sobre a sobrevivência e o tempo de captura de presa em duas espécies de *Limnogonus* (Hteroptera: Gerromorpha: Gerridae). Os resultados mostram que o glifosato técnico não afetou negativamente de forma significativa a sobrevivência de *Limnogonus* spp. Já o Roundup® afetaou significativamente a sobrevivência das duas espécies de *Limnogonus*. Estes resultados sugerem que o surfactante pode ser o responsável pelos efeitos negativos do Roundup®, uma vez que a diminuição da tensão superficial pode dificultar a sustentação e a locomoção, diminuir a efetividade dos pelos hidrofóbicos e comprometer os espiráculos de *Limnogonus* spp. Além da sobrevivência, o efeito negativo do Roundup® também foi refletido pela maior dificuldade de captura de presas de indivíduos de *Limnogonus* spp. expostos a este herbicida. Nossos resultados mostram que, apesar destes herbicidas serem direcionados ao controle de ervas daninhas, eles também causam efeitos negativos sobre a fauna de insetos aquáticos. Portanto, o monitoramento da biota aquática em áreas agrícolas sujeitas à aplicação de herbicidas é fundamental. Os dados coletados nestes monitoramentos podem fornecer subsídios para o estabelecimento de controles e regras que minimizem os impactos negativos destes herbicidas sobre os ecossistemas aquáticos.

Palavras-chave: Pesticidas, toxicidade, invertebrados aquáticos, gerridae.

INTRODUÇÃO

Atualmente, a população humana passa de 7 bilhões de habitantes e produzir alimento para uma população deste tamanho é um grande desafio. Este desafio tem sido alcançado com um grande desenvolvimento agrícola e tem como consequência um alto custo ambiental (TAIZ, 2013). Para aumentar a produtividade, novos cultivares têm sido produzidos, novas variantes modificadas geneticamente têm sido desenvolvidas, a monocultura tem sido enfatizada, novas fronteiras agrícolas tem sido abertas e novas substâncias tóxicas têm sido produzidas. Como consequência da ênfase em monocultura, um dos principais problemas na agricultura moderna é o surgimento de pragas. Para o controle destas pragas, uma grande variedade de substâncias é aplicada nos sistemas agrícolas, principalmente para o controle de insetos e plantas daninhas (JURADO *et al*., 2011; PRICE e KELTON, 2011).

Entre as pragas, as plantas daninhas têm sido um grande problema para os agriculturores, os quais, nos últimos anos têm investido em herbicidas cada vez mais poderosos. Neste contexto, o século XX foi marcado pelo desenvolvimento de diferentes tipos de herbicidas. No início do século XX, os herbicidas eram produtos brutos, como por exemplo, sais de rocha, minério de arsênio triturado, creosoto, resíduos de óleo, ácido sulfúrico e sais de cobre (JURADO *et al*., 2011), que atuavam de maneira não seletiva. Por outro lado, o uso de herbicidas não seletivos não é vantajoso na agricultura, uma vez que, além de controlar as plantas daninhas, também afetam negativamente a cultura de interesse. Por isso, ao longo do século XX, herbicidas seletivos foram criados e novas estratégias de controle foram desenvolvidos (JURADO et al., 2011).

O primeiro herbicida seletivo foi 2,4–diclorofenoxiacético, o qual foi desenvolvido no início da década de 1940, e começou a ser comercializado nos EUA (JURADO *et al*., 2011; OLIVEIRA JR., 2011). Este foi um grande avanço na agricultura e revolucionou as práticas de controle de plantas daninhas, aumentando a produtividade e reduzindo a mão de obra necessária para o seu controle (PRICE e KELTON, 2011). O desenvolvimento do herbicida 2,4–diclorofenoxiacético foi o primeiro passo para o desenvolvimento de uma grande variedade de herbicidas e estratégias para o controle de plantas daninhas (MARCHI *et al*., 2008; JURADO *el al*., 2011).

Um outro avanço importante no controle de plantas daninhas foi o desenvolvimento de cultivares transgênicos resistentes aos herbicidas (PRICE e KELTON, 2011). Na prática, o surgimento de cultivares resistentes transformaram herbicidas não seletivos, como o glifosato, em seletivos. Entre os herbicidas mais comuns atualmente, aqueles à base de glifosato são os mais utilizados no Mundo (POWLES, 2008; BATTAGLIN *et al*., 2014) e também no Brasil, onde alcançaram aproximadamente 200 mil toneladas comercializadas em 2014 (IBAMA, 2016). O glifosato (N- (fosfonometil) glicina) é um herbicida não seletivo e o principal ingrediente ativo de várias formulações comercias, as quais têm sido utilizadas de forma pós-emergente no controle de plantas daninhas em áreas agrícolas, urbanas e domésticas (DUKE e POWLES, 2008; ROY *et al*., 2016; RODRIGUES *et al*., 2017). O glifosato foi inicialmente desenvolvido e comercializado pela empresa Monsanto em 1970, sendo a sua primeira formulação comercial lançada nos Estados Unidos em 1974 com o nome de Roundup® (GALLI *et al*., 2005).

As formulações comerciais dos herbicidas incluem vários adjuvantes, os quais têm como objetivo aumentar a eficiência do ingrediente ativo. Neste contexto, ainda hoje, a formulação mais conhecida e amplamente utilizada de herbicidas à base de glifosato é o Roundup®, que contém polioxietileno amina (POEA) como surfactante. Apesar do POEA normalmente representar menos que 15% do Roundup® (GIESY *et al*., 2000), os dados da literatura têm mostrado que a sua presença aumenta a toxicidade das formulações comerciais para organismos alvos e não alvos quando comparada com o glifosato puro (POWELL *et al*., 1991; GIESY *et al*., 2000; TSUI e CHU, 2003; ANNETT *et al*., 2014; BATTAGLIN *et al*., 2014). O surfactante atua de modo a quebrar a tensão superficial das gotas pulverizadas, o que aumenta a superfície de contato da planta com o herbicida, facilitando a penetração e a chegada do ingrediente ativo até o local de ação na planta (ANNETT *et al*., 2014).

Na planta, o glifosato atua inibindo uma via de biossíntese de aminoácidos aromáticos de vegetais, reduzindo a fotossíntese. Por isto, os mecanismos de ação deste composto deveriam ser exclusivos a organismos fotossintetizantes (WILLIAMS *et al*., 2000; CERDEIRA *et al*., 2007; ROMANO *et al*., 2008; 2009). Isto, tornaria o uso de produtos à base de glifosato seguro para os organismos aquáticos. No entanto, diversos trabalhos têm demonstrado que o glifosato e suas formulações também podem ser tóxicos para diferentes espécies animais. Este herbicida, tem chegado aos ambientes aquáticos através de escoamento, ou em alguns casos, são

aplicados diretamente nos sistemas aquáticos para o controle de macrófitas. Nestes ambientes, os herbicidas à base de glifosato podem afetar os organismos, a diversidade e os processos ecossistêmicos (BLASIOLI *et al*., 2011; PÉREZ *et al*., 2011; BATTAGLIN *et al*., 2014; MAGBANUA *et al*., 2016).

A concentração máxima permitida de glifosato pela legislação depende de cada país. Nos EUA a concentração de glifosato permitida na água é 0,7 mg/L (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2009), enquanto na Europa a concentração máxima isolada do herbicida é 0,0001 mg/L (CONSIL OF THE EUROPEAN UNION, 1998). No Brasil, foi estabelecido pela resolução n°357/05 do Conselho Nacional do Meio Ambiente que a concentração máxima de glifosato permitida na água doce destinada ao consumo humano corresponde a 0,065 mg/L, já a água doce destinada a irrigação e ao consumo animal corresponde a 0,28 mg/L (CONAMA, 2005). Já o Ministério da Saúde, na portaria nº 2914 publicada em 2011, determina que a concentração máxima permitida de glifosato e AMPA na água potável é de 0,5 mg/L (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

Invertebrados aquáticos são muito utilizados em estudos de biomonitoramento e ensaios ecotoxicológicos, pois habitam estes ambientes por longos períodos e conectam os recursos basais com níveis mais elevados na cadeia alimentar. Diante do exposto, consideramos fundamental testar os efeitos de herbicidas à base de glifosato sobre diferentes organismos e ecossistemas aquáticos, uma vez que a agricultura é uma das principais bases da economia do Brasil e o uso destes pesticidas tem aumentando a cada dia. Para isso, fizemos experimentos utilizando duas espécies de insetos pleustônicos (*Limnogonus* spp.) com o objetivo de testar as seguintes expectativas: 1) se o princípio ativo (glifosato) afetar a sobrevivência dos organismos estudados, esperamos que tanto o efeito do glifosato técnico quanto do Roundup® sejam significativos; 2) se o surfactante ampliar o efeito negativo do herbicida sobre os organismos estudados, esperamos que os efeitos do glifosato técnico sejam menores do que os efeitos do Roundup®; 3) se o Roundup® exercer maior efeito negativo, devido à presença do sufarctante, sobre os organismos estudados, esperamos que atributos importante para a sobrevivência, como a capacidade de obter alimentos, sejam afetados.

OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos de glifosato técnico e seu principal produto de comercialização, Roundup®, sobre a sobrevivência e o tepo de captura de presa em duas espécies de organismos pleustônicos (*Limnogonus profugos* e *Limnogonus aduncus*), os quais dependem da tensão superficial.

MATERIAIS E MÉTODOS

Organismos teste

Para a realização dos testes foram utilizados duas espécies de *Limnogonus.* Os efeitos de dois herbicidas foram testados nesse estudo: Roundup® e glifosato técnico. O gênero *Limnogonus* (Heteroptera: Gerromorpha: Gerridae) é encontrado em locais de águas calmas (ANDERSEN, 1982). Habitam a água superficial (pleustônicos) e se alimentam principalmente de insetos que caem na água. Estes insetos possuem movimentos rápidos de deslocamento na superfície da água. Os testes foram realizados com duas espécies do gênero: *Limnogonus profugos* e *Limnogonus aduncus*. As duas espécies foram mantidas em laboratório (em temperatura ambiente) onde se estabeleceu uma criação para os testes. A criação foi iniciada a partir de espécimes adultos de *Limnogonus profugos* coletados na região Sudoeste do Estado de Goiás (BR) e de *Limnogonus aduncus* coletados na região Oeste do Estado de São Paulo (BR).

Sobrevivência: testes crônicos

<u>Delineamento experimental</u>

Os adultos de *Limnogonus* spp. foram coletados e levados ao laboratório, onde foi estabelecida a criação. Para a realização dos testes 10 casais foram separados em recipientes plásticos contendo água para obtenção de ovos. Aproximadamente uma semana depois, todos os recipientes continham ovos. Para cada concentração testada foram feitas 10 réplicas contendo 200 ml de solução (água desclorificada e herbicida) e três ovos. Além dos tratamentos, utilizamos um

grupo controle contendo 10 réplicas (apenas água desclorificada). Os testes com glifosato técnico foram repetidos da mesma forma descrita acima, concomitantemente ao teste com Roundup®.

Para testar o efeito significativo de glifosato técnico as seguintes concentrações foram testadas 0,28, 3,5 e 6,0 mg/L. Essas concentrações foram escolhidas considerando os seguintes critérios: (1) a concentração máxima para irrigação e consumo animal permitida pela legislação brasileira (0,28 mg/L) (CONAMA, 2005); (2) a concentração recomendada para o controle de pragas (3,5 mg/L) (VERA *et al*., 2012); e (3) a maior concentração registrada em um ambiente aquático natural (6,0 mg/L) (EDWARDS *et al*., 1980). Para manter a mesma concentração de herbicida o meio foi trocado a cada dois dias até o último dia do experimento. A partir da eclosão dos ovos, a cada troca de solução os invertebrados foram alimentados com outros insetos, bem como foi realizada a contagem dos indivíduos mortos no período.

No caso de Roundup®, usamos concentrações de exposição baseadas em valores de ácido equivalente (a.e.) das concentrações testadas para o glifosato técnico, ou seja, 0,28, 3,5 e 6,0 mg a.e./L. Para isso adicionamos 1,5 µL de herbicida a 2000 ml de água para obter uma concentração inicial de 0,28 mg a.e./L; 19,4 µL para obter uma concentração inicial de 3,5 mg a.e./L e 33,3 µL para obter uma concentração inicial de 6,0 mg a.e./L.

A preparação das concentrações de exposição e os ensaios de toxicidade para os herbicidas à base de glifosato foram efetuados de acordo com as orientações da Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD/OCDE) para o ensaio de produtos químicos 221 (OECD/OCDE, 2011). Os procedimentos de exposição descritos nestas orientações, embora propostos para *Chironomus riparius* também se aplicam a outros insetos.

Análises estatísticas

Os efeitos dos diferentes tipos e concentrações dos herbicidas à base de glifosato sobre a sobrevivência foram avaliados utilizando o método de Kaplan-Meier e o teste de log-rank (LEE e WANG, 2003). Estes métodos são baseados no tempo de duração até que um ou mais eventos ocorram, como a morte de um indivíduo. Quando o efeito, segundo o teste de log-rank, foi significativo, foi usado o teste de

comparações múltiplas de Holm-Sidak. As análises foram realizadas usando o software SigmaPlot 11.0 (Systat Software).

Sobrevivência: testes agudos

Delineamento experimental

Os testes agudos foram realizados com indivíduos imaturos e adultos. Devido ao fato do glifosato técnico não ter apresentado efeito tóxico significativo para *Limnogonus* spp., no teste crônico, optamos por testar o efeito agudo somente do Roundup®. Testes preliminares, utilizando como ponto de partida as concentrações já conhecidas e utilizadas nos testes crônicos, foram realizados para determinar as concentrações utilizadas no teste agudo. Para calcular a CL_{50} foram testadas as concentrações 0,31, 0,62, 1,25, 2,5, 5, 10, 20, 40 e 80 mg a.e./L para os imaturos, e as concentrações 0,003, 0,0075, 0, 018, 0,046, 011, 0,29 e 0,73 mg a.e./L para os adultos.

Para cada tratamento, foram feitas três réplicas contendo seis insetos cada, totalizando 18 insetos por tratamento. Cada réplica continha 200 ml de solução (água desclorificada e herbicida). Ao final de 96 h a mortalidade foi estimada. Durante o período, os insetos foram alimentados a cada 24 horas para evitar a mortalidade por privação de alimento. O mesmo procedimento foi realizado para os insetos imaturos e adultos.

A preparação das concentrações de exposição utilizadas nos ensaios de toxicidade para os herbicidas à base de glifosato foi efetuada de acordo com as orientações da Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD/OCDE) para o ensaio de produtos químicos 221 (OECD/OCDE, 2011). Os procedimentos de exposição descritos nestas orientações, embora propostos para *Chironomus riparius* também se aplicam a outros insetos.

Análises estatísticas

A concentração de herbicidas à base de glifosato que provoca 50% de mortalidade (CL_{50}) em 96 horas foi avaliada para *Limnogonus* spp. A CL_{50} foi estimada utilizando uma análise Probit (FINNEY, 1952) e foi realizada no programa

Excel. Os resultados foram apresentados em gráficos de dispersão (Scatterplot) feitos no programa Statistica 7.0.

Tempo de captura de presa

Em virtude do glifosato não ter apresentado efeito tóxico para as espécies de *Limnogonus* spp. no experimento crônico, optamos por testar somente os efeitos do herbicida Roundup® no processo de captura de presa.

Delineamento experimental

Neste experimento foram testadas apenas a concentração intermediária e a concentração mais alta (3,5 e 6,0 mg a.e./L), além do grupo controle O teste foi realizado de duas formas: com insetos previamente submetidos ao efeito de Roundup® (insetos do teste crônico) e insetos que não tiveram contato prévio com Roundup® (insetos da criação controle). Primeiro nós retiramos um indivíduo imaturo de cada réplica das concentrações 3,5 e 6,0 mg a.e./L do teste crônico (10 réplicas = 10 insetos imaturos) e colocamos em recipientes contendo 200 ml de água desclorificada e a concentração a ser testada (3,5 e 6,0 mg a.e./L). Posteriormente, foi adicionada a presa (insetos recentemente mortos) e cronometrado o tempo de captura de presa, com tolerância de 3 minutos, sendo considerado o tempo máximo se não houve a captura. Este procedimento foi realizado no mesmo dia com todas as réplicas. O segundo teste de captura de presa foi realizado com os insetos que não foram previamente submetidos ao efeito de Roundup®, ou seja, insetos da criação controle. O procedimento para a realização do teste foi o mesmo descrito acima.

Análises estatísticas

Os testes de captura de presa foram avaliados considerando uma análise não paramétrica Kruskal-Wallis (COOK e WHEATER, 2005). Posteriormente, diferenças significativas entre o controle e os tratamentos foram avaliadas pelo teste de comparações múltiplas (Teste de Tukey, COOK e WHEATER, 2005).

RESULTADOS

Sobrevivência: testes crônicos

As curvas de sobrevivência (Kaplan-Meier) de *Limnogonus profugos* expostos de forma crônica aos herbicidas testados são apresentadas nas Figuras 1 (expostos ao Roundup®) e Figura 2 (expostos ao glifosato técnico). O glifosato técnico não apresentou efeito significativo sobre a sobrevivência de *Limnogonus profugos* (Teste de log-rank, $p>0,05$). Já o Roundup® apresentou efeito significativo sobre a sobrevivência (Teste de log-rank, $p<0,05$). Neste caso, o controle diferiu de todas as concentrações testadas (Teste de Holm-Sidak, $p<0,05$, Tabela 1). No entanto, não houve diferença significativa entre as concentrações testadas (Teste de Holm-Sidak, $p>0,05$, Tabela 1). Com 80 dias de experimento, praticamente todos os indivíduos já haviam morrido nos tratamentos com Roundup® (100% de mortalidade nas concentrações de 0,28 mg a.e./L e 6,0 mg a.e./L; e 99% na concentração de 3,5 mg a.e./L), por outro lado apenas 29% havia morrido no controle (Figura 1).

As curvas de sobrevivência (Kaplan-Meier) de *Limnogonus aduncus* expostos de forma crônica aos herbicidas testados são apresentadas nas Figuras 3 (expostos ao Roundup®) e Figura 4 (expostos ao glifosato técnico). Para *Limnogonus aduncus*, o glifosato técnico também não afetou significativamente a sobrevivência (Teste de log-rank, $p>0,05$). Por outro lado, o Roundup® afetou significativamente a sobrevivência da espécie (Teste de log-rank, $p<0,05$). O controle diferiu de todas as concentrações testadas (Teste de Holm-Sidak, $p<0,05$, Tabela 2), adicionalmente, a sobrevivência de *Limnogonus aduncus* expostos de forma crônica ao Roundup® diferiu entre as concentrações de 0,28 mg a.e./L e 6,0 mg a.e./L e entre 3,5 mg a.e./L e 6,0 mg a.e./L (Teste de Holm-Sidak, $p>0,05$, Tabela 2). Com 48 dias de experimento, o último indivíduo exposto ao Roundup® na concentração 0,28 mg a.e./L morreu, sendo que todos os insetos expostos às concentrações 3,5 mg a.e./L e 6,0 mg a.e./L já haviam morrido, 46 e 33 dias, respectivamente. No mesmo período, para o grupo controle a sobrevivência da população foi de 33% (Figura 3).

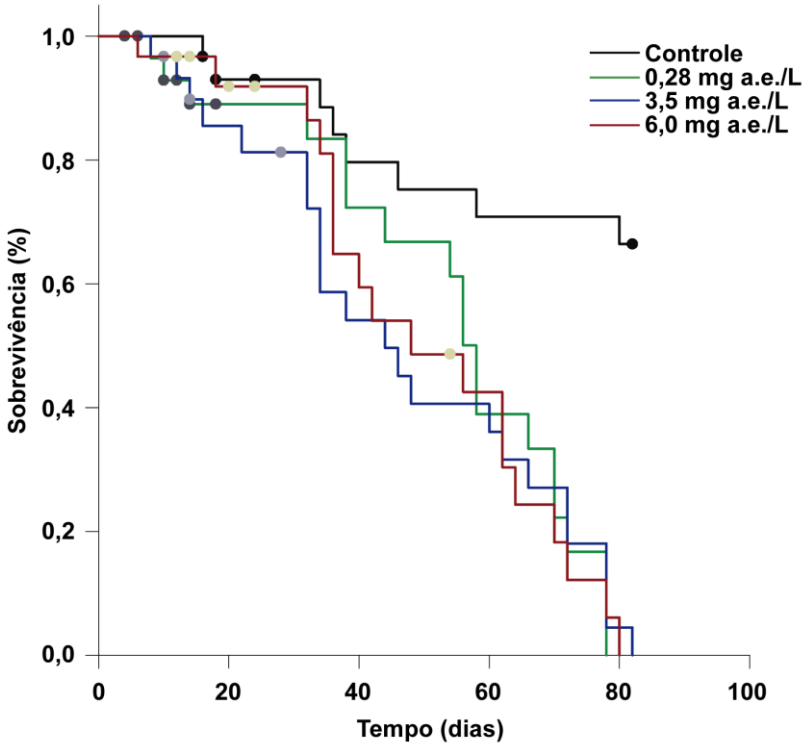

Figura 1. Curva de sobrevivência Kaplan-Meier com a porcentagem de sobrevivência da população de *Limnogonus profugos* em relação aos dias de exposição crônica ao herbicida Roundup®.

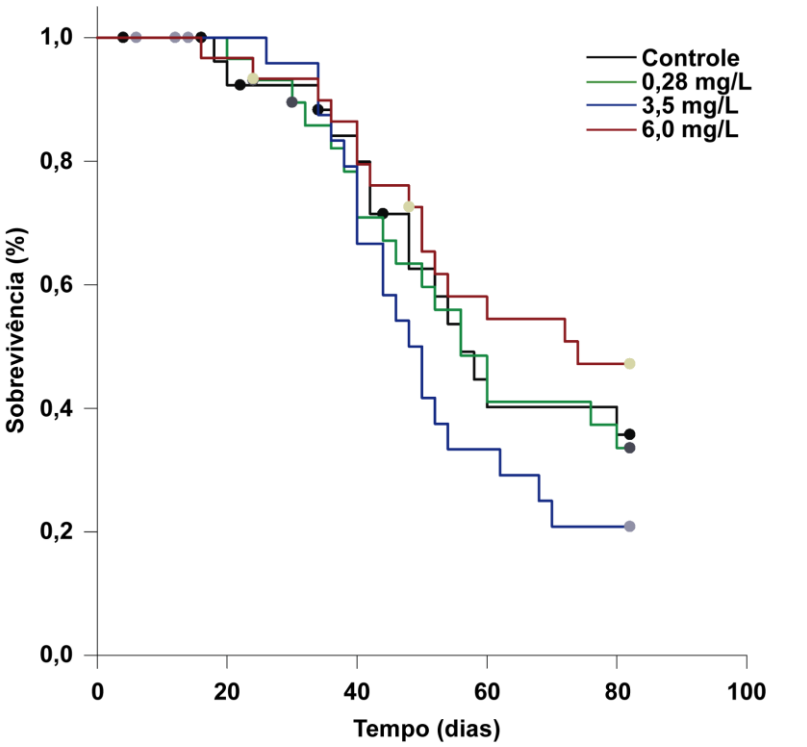

Figura 2. Curva de sobrevivência Kaplan-Meier com a porcentagem de sobrevivência da população de *Limnogonus profugos* em relação aos dias de exposição crônica ao herbicida glifosato técnico.

Tabela 1. Comparações Múltiplas (método Holm-Sidak) para as concentrações testadas de Roundup® para *Limnogonus profugos*.

Comparações	*Valor de p*
Controle x 0,28 mg a.e./L	*p < 0,001*
Controle x 3,5 mg a.e./L	*p < 0,001*
Controle x 6,0 mg a.e./L	*p < 0,001*
0,28 mg a.e./L x 3,5 mg a.e./L	*p = 0,818*
0,28 mg a.e./L x 6,0 mg a.e./L	*p = 0,823*
3,5 mg a.e./L x 6,0 mg a.e./L	*p = 0,934*

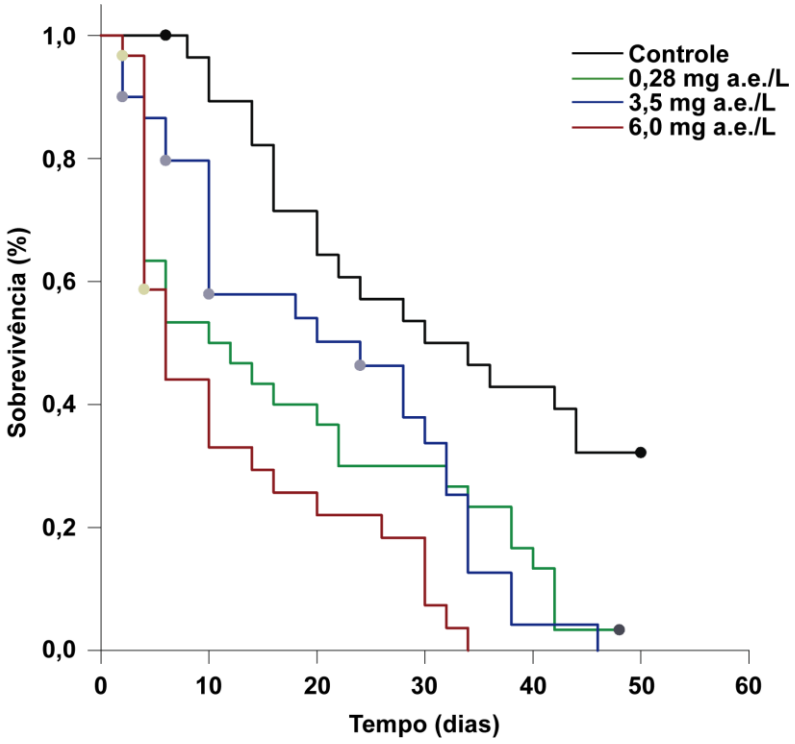

Figura 3. Curva de sobrevivência Kaplan-Meier com a porcentagem de sobrevivência da população de *Limnogonus aduncus* em relação aos dias de exposição crônica ao herbicida Roundup®.

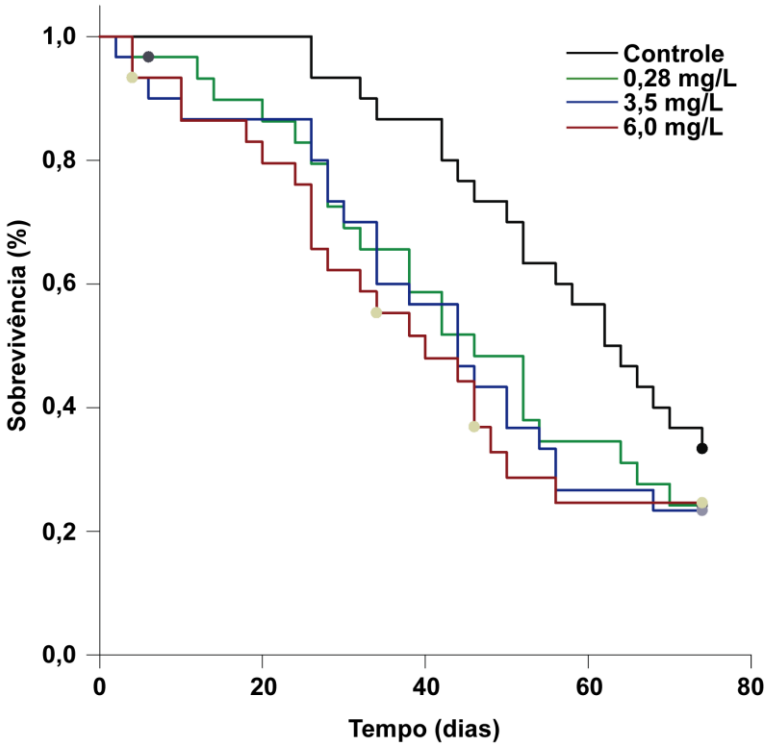

Figura 4. Curva de sobrevivência Kaplan-Meier com a porcentagem de sobrevivência da população de *Limnogonus aduncus* em relação aos dias de exposição crônica ao herbicida glifosato técnico.

Tabela 2. Comparações Múltiplas (método Holm-Sidak) para as concentrações testadas de Roundup® para *Limnogonus aduncus*.

Comparações	*Valor de p*
Controle x 0,28 mg a.e./L	*p < 0,001*
Controle x 3,5 mg a.e./L	*p = 0,002*
Controle x 6,0 mg a.e./L	*p < 0,001*
0,28 mg a.e./L x 3,5 mg a.e./L	*p = 0,965*
0,28 mg a.e./L x 6,0 mg a.e./L	*p = 0,038*
3,5 mg a.e./L x 6,0 mg a.e./L	*p = 0,004*

Sobrevivência: testes agudos

Os adultos mostraram ser mais sensíveis à aplicação de Roundup® do que os imaturos, uma vez que, concentrações muito menores do que as testadas em imaturos provocou mortalidade dos adultos. O valor de CL_{50} para os imaturos de *Limnogonus profugos* foi de 21,37 mg a.e./L e para os adultos foi de 0,0057 mg a.e./L. A menor concentração testada para os imaturos (0,31 mg a.e./L) provocou mortalidade de 16% da população, já as concentrações acima de 20 mg/L (20, 40 e 80 mg a.e./L) provocaram mortalidade de mais de 50% da população (Figura 5). Para os adultos as concentrações mais baixas testadas (0,003 e 0,0075 mg a.e./L) causaram mortalidade de mais de 60% da população após 96 h, já as maiores concentrações utilizadas (0,11, 0,29 e 0,73 mg a.e./L) provocaram mortalidade de 100% dos indivíduos (Figura 6).

No caso de *Limnogonus aduncu*s, a CL_{50} dos imaturos foi de 1,33 mg a.e./L e dos adultos 0,0023 mg a.e./L. A menor concentração testada para os imaturos (0,31 mg a.e./L) provocou mortalidade de 38,8% da população, já as maiores concentrações (20, 40 e 80 mg a.e./L) provocaram mortalidade de mais de 50% da população (Figura 7). Para os adultos, as menores concentrações testadas (0,003 e 0,0075 mg a.e./L) provocaram mortalidade de mais de 60% da população e as maiores concentrações (0,11, 0,29 e 0,73 mg a.e./L) provocaram mortalidade de 100% da população (Figura 8).

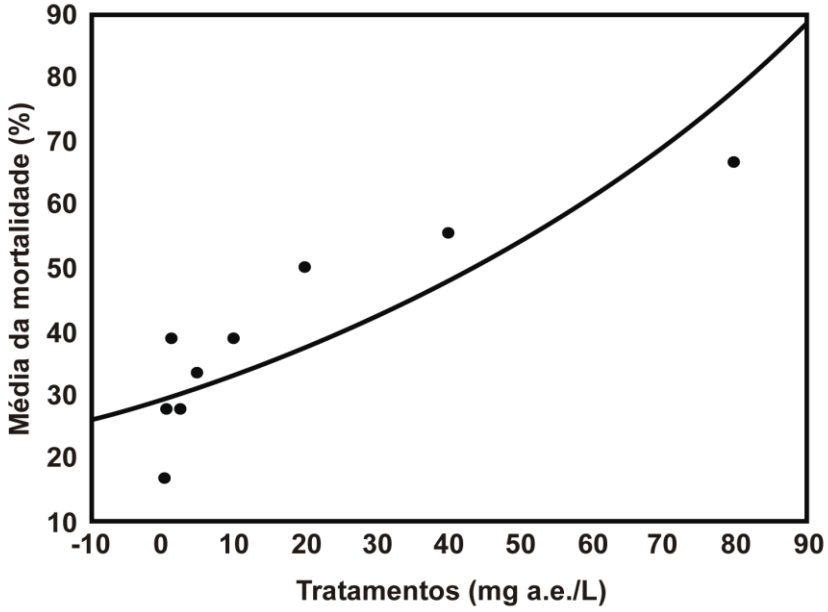

Figura 5. Média da mortalidade para imaturos de *Limnogonus profugos* para cada tratamento após 96 horas de exposição ao Roundup®.

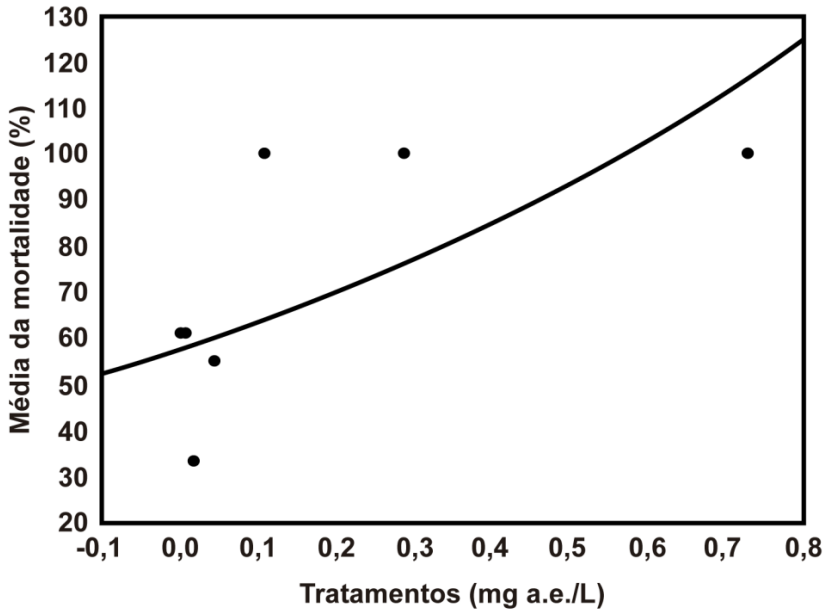

Figura 6. Média da mortalidade para adultos de *Limnogonus profugos* para cada tratamento após 96 horas de exposição ao Roundup®.

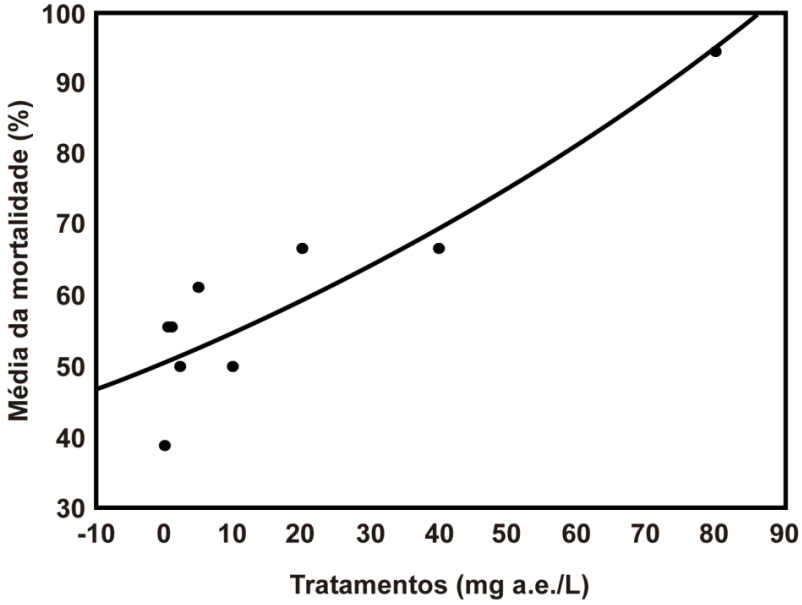

Figura 7. Média da mortalidade para imaturos de *Limnogonus aduncus* para cada tratamento após 96 horas de exposição ao Roundup®.

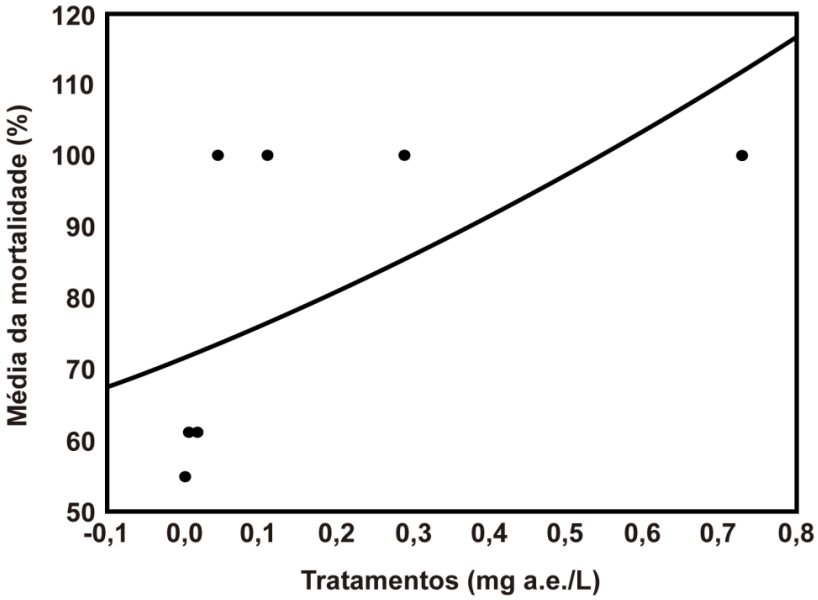

Figura 8. Média da mortalidade para adultos de *Limnogonus aduncus* para cada tratamento após 96 horas de exposição ao Roundup®.

Tempo de captura de presa

O Roundup® afetou significativamente o tempo de a captura de presa em *Limnogonus profugos* (Kruskal-Wallis, $p<0,05$), tanto para indivíduos criados desde o ovo na presença deste herbicida (Figura 9) quanto para aqueles criados em condições controle (Figura 10). No caso dos indivíduos criados na presença de Roundup® desde o ovo, o controle diferiu das concentrações (Tukey, $p<0,05$, Tabela 3). Por outro lado, as concentrações não foram significativamente diferentes entre si (Tukey, $p>0,05$, Tabela 3). No caso dos indivíduos criados em condições controle antes do experimento, o tempo de captura de presa do controle foi similar àquele observado na concentração de 3,5 mg a.e./L de Roundup® (Tukey, $p>0,05$, Tabela 4) e diferente daquele observado na concentração de 6,0 mg a.e./L (Tukey, $p<0,05$, Tabela 4).

O Roundup® também afetou significativamente o tempo de captura de presa em *Limnogonus aduncus* (Kruskal-Wallis, $p<0,05$), mas apenas para aqueles indivíduos criados desde o ovo na presença deste herbicida (Figura11). Neste caso, o tempo de captura em um cenário sem o Roundup® foi menor do que em um cenário com a concentração de 6,0 mg a.e./L (Tukey, $p<0,05$, Tabela 5). No caso dos indivíduos criados em condições controle (Figura 12) o herbicida não afetou significativamente o tempo de captura de presa (Kruskal-Wallis, $p>0,05$; Tabela 6) (Figura 12).

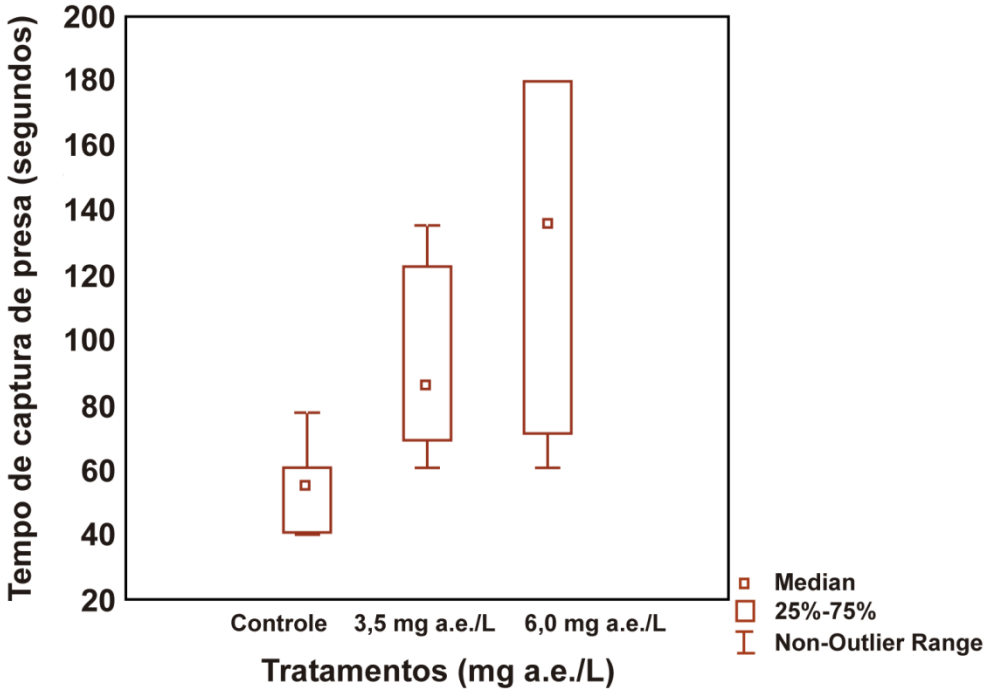

Figura 9. Tempo de captura de presa para *Limnogonus profugos* para cada tratamento (insetos criados desde o ovo na presença do herbicida Roundup®).

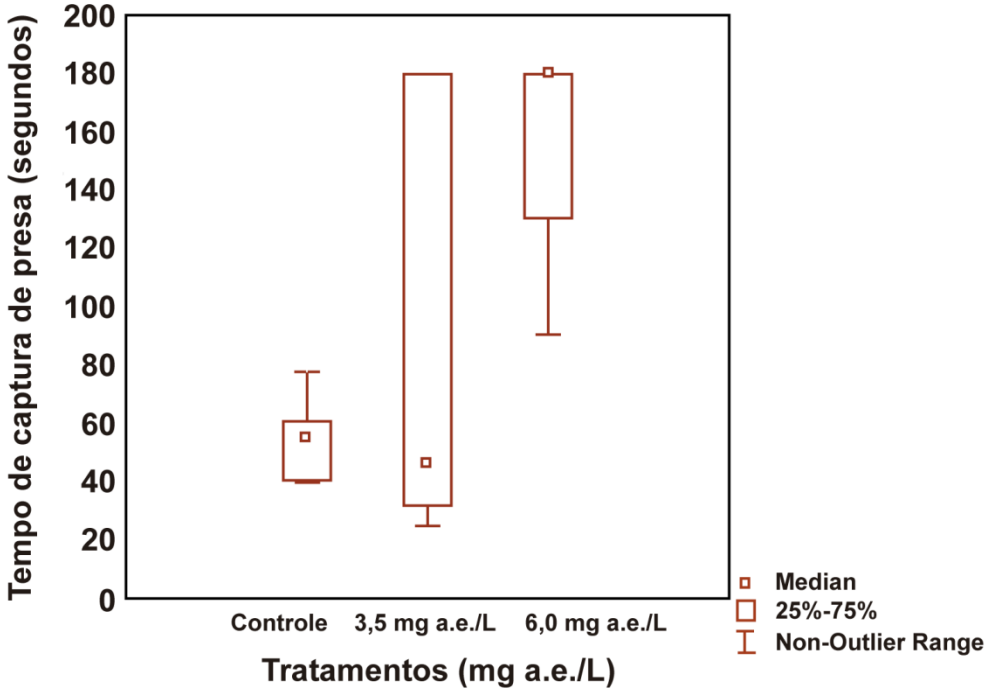

Figura 10. Tempo de captura de presa para *Limnogonus profugos* para cada tratamento (insetos da criação, submetidos ao efeito de Roundup® somente na hora do teste).

Tabela 3. Comparações múltiplas para o tempo de captura de presas de *Limnogonus profugos* (Teste de Tukey) entre o controle e os tratamentos (insetos criados desde o ovo na presença do herbicida Roundup).

Comparações	*Valor de p*
Controle x 3,5 mg a.e./L	*p = 0,044*
Controle x 6,0 mg a.e./L	*p = 0,002*
3,5 mg a.e./L x 6,0 mg a.e./L	*p = 1,000*

Tabela 4. Comparações múltiplas para o tempo de captura de presas de *Limnogonus profugos* (Teste de Tukey) entre o controle e os tratamentos (insetos da criação, submetidos ao efeito de Roundup® somente na hora do teste).

Comparações	*Valor de p*
Controle x 3,5 mg a.e./L	*p = 1,000*
Controle x 6,0 mg a.e./L	*p = 0,018*
3,5 mg a.e./L x 6,0 mg a.e./L	*p = 0,032*

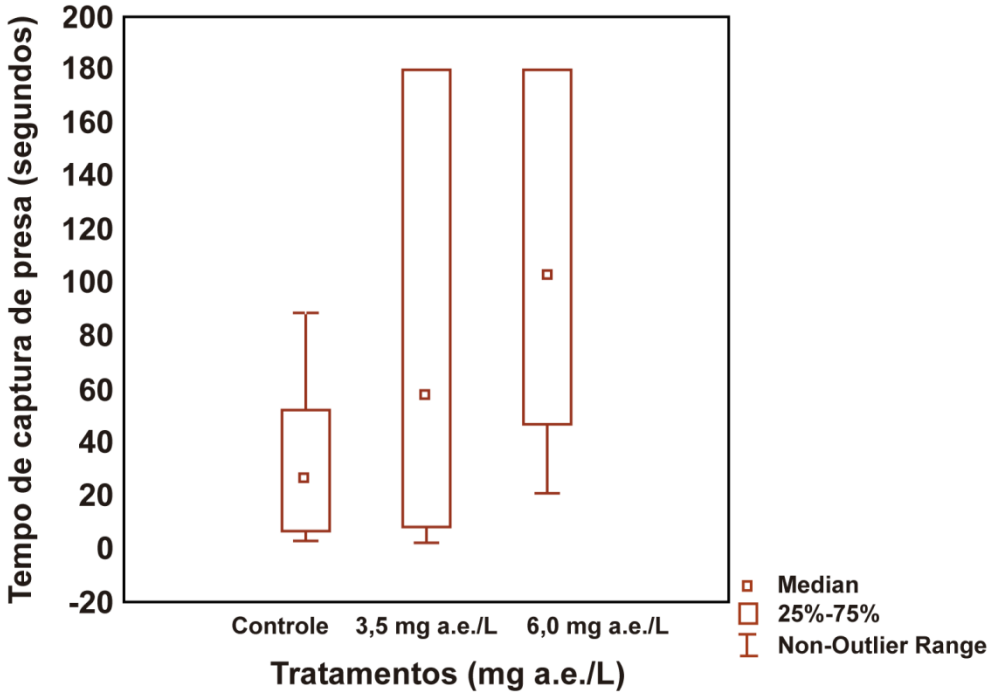

Figura 11. Tempo de captura de presa para *Limnogonus aduncus* para cada tratamento (insetos criados desde o ovo na presença do herbicida Roundup®).

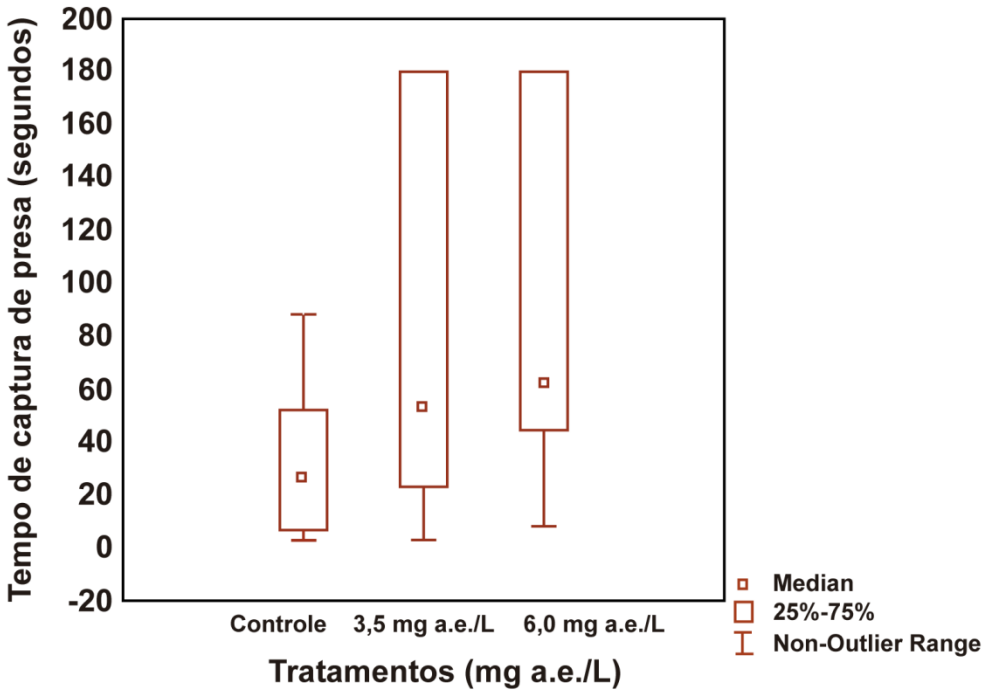

Figura 12. . Tempo de captura de presa para *Limnogonus aduncus* para cada tratamento (insetos da criação, submetidos ao efeito de Roundup® somente na hora do teste).

Tabela 5. Comparações múltiplas para o tempo de captura de presas de *Limnogonus aduncus* (Teste de Tukey) entre o controle e os tratamentos (insetos criados desde o ovo na presença do herbicida Roundup®).

Comparações	*Valor de p*
Controle x 3,5 mg a.e./L	*p = 0,727*
Controle x 6,0 mg a.e./L	*p = 0,047*
3,5 mg a.e./L x 6,0 mg a.e./L	*p = 0,640*

Tabela 6. Comparações múltiplas para o tempo de captura de presas de *Limnogonus aduncus* (Teste de Tukey) entre o controle e os tratamentos (insetos da criação, submetidos ao efeito de Roundup® somente na hora do teste).

Comparações	*Valor de p*
Controle x 3,5 mg a.e./L	*p = 0,475*
Controle x 6,0 mg a.e./L	*p = 0,142*
3,5 mg a.e./L x 6,0 mg a.e./L	*p = 1,000*

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que herbicidas à base de glifosato causam efeitos negativos sobre as espécies estudadas e, a intensidade destes efeitos está diretamente relacionada ao tipo de herbicida. Aqui, o glifosato não afetou significativamente a sobrevivência de *Limnogonus* spp. Por outro lado, o Roundup® apresentou efeito significativo sobre a sobrevivência e sobre o tempo de predação. Na maioria dos casos a toxidade do glifosato técnico sobre os animais aquáticos é menor do que a toxicidade das formulações comerciais (ANNETT et al., 2014). De fato, os nossos resultados também mostraram que as espécies estudadas apresentaram baixa sensibilidade ao glifosato técnico quando comparado ao Roundup®.

Apesar de muitos trabalhos sugerirem que o glifosato é ambientalmente seguro, vários estudos mostram que as formulações comerciais (ex. Roundup®, Faena®) podem ser muito prejudiciais para os animais aquáticos (ANNETT *et al*, 2014). Além do glifosato, a maioria destas formulações também contém adjuvantes para aumentar a eficácia do produto. A maior parte dos adjuvantes são surfactantes adicionados ao ingrediente ativo para facilitar a absorção do herbicida nos tecidos da planta (PÉREZ *et al*., 2011). Além de otimizar a absorção do glifosato, o surfactante é apontado como responsável pelo aumento da toxicidade da formulação comercial (POWELL *et al*., 1991; GIESY *et al*., 2000; TSUI e CHU, 2003; SZÉKÁCS e DARVAS, 2012; BATTAGLIN *et al*., 2014). Efetivamente, a toxicidade relativamente baixa do princípio ativo contribui pouco para a toxicidade total do produto de comercialização. Consequentemente, em alguns casos, o produto formulado é mais tóxico do que o ingrediente ativo, particularmente para organismos aquáticos (TSUI e CHU 2003).

O principal surfactante usado nestas formulações é o polioxietileno amina (POEA), o qual é considerado ainda mais tóxico que o próprio Roundup® para as espécies aquáticas (BRADBERRY *et al*., 2004; PÉREZ *et al*, 2011; NAVARRO e MARTINEZ, 2014). Formar *et al*. (1979) foram os primeiros a demonstrar os efeitos negativos do surfactante POEA sobre a fauna de organismos aquáticos. Adicionalmente, eles relataram que o surfactante presente na formulação comercial Roundup® não apenas aumentou a atividade biológica do glifosato, como também foi o agente tóxico primário nos experimentos com Roundup®. Nesse contexto, um

estudo com o crustáceo *Ceriodaphnia dubia* encontrou valores de concentração letal (CL_{50}) de 5,39 mg a.e./L para Roundup® e 1,15 mg/L para o surfactante POEA (TSUI e CHU, 2003). Os autores ainda avaliaram a CL_{50} para outro crustáceo, *Arcatia tonsa*, e encontraram valores ainda menores, sendo 1,77 mg a.e./L para Roundup® e 0,57 mg/L para POEA. Outro estudo onde os autores avaliaram a toxicidade letal de três tipos do surfactante POEA em *Daphnia magma* encontrou valores extremamente tóxicos, CL_{50} 0,85, 0,18 e 0,097 mg/L (BRAUSCH *et al*., 2007). Eles ainda relataram que o surfactante foi responsável por inibir o crescimento do crustáceo, colocando em risco a capacidade de reprodução da espécie.

Em sua revisão sobre os efeitos de herbicidas à base de glifosato Geisy *et al.* (2000) reporta valores de CL_{50} para o peixe Bluegill (*Lepomis macrochirus)* variando entre 5,8 a 16,1 mg a.e./L de Roundup®, 24 a 120 mg/L para o glifosato e 1,3 a 3,0 mg/L para o POEA. Já para o salmão (*Oncorhynchus tshawytscha)* valores de CL_{50} variam de 20 a 27 mg a.e./L para o Roundup®, 30 mg/L para o glifosato e 2,8 mg/L para o POEA. Os nossos resultados também vão nesta direção, mostrando claramente que o efeito negativo do Roundup® sobre as espécies estudadas é muito maior do que o efeito do glifosato técnico, o qual não afetou significativamente a sobrevivência dos organismos estudados. Portanto, os efeitos do Roundup® observados aqui e em outros trabalhos (TSUI e CHU, 2004; RELYEA, 2005; LANGIANO e MARTINEZ, 2008; PÉREZ *et al*., 2011) são provavelmente em função do surfactante adicionado a esta formulação.

Aqui, mesmo a concentração mais baixa testada de Roundup® (0,28 mg a.e./L) apresentou efeito significativo sobre a sobrevivência de *Limnogonus* spp. A concentração de 0,28 mg a.e./L é a máxima permitida para este herbicida pela legislação brasileira em água utilizada para irrigação e consumo animal (CONAMA, 2005). Este resultado é bastante preocupante, uma vez que somos um país agrícola e que o Roundup® é um dos herbicidas mais utilizados. Nesse sentido, nossos resultados ressaltam a importância de um monitoramento permanente das comunidades aquáticas em regiões agrícolas e próximas a elas, as quais estão sujeitas à aplicação de herbicidas à base de glifosato. Embora muitos estudos estejam sendo feitos em relação aos efeitos de herbicidas à base de glifosato em organismos aquáticos, os resultados do nosso trabalho reforçam a necessidade de estudos futuros que avaliem os efeitos dos surfactantes presentes nas formulações

comerciais, uma vez que como mostramos aqui, o surfactante pode ser o responsável pelos efeitos negativos destas formulações. Este é um passo necessário para que possamos entender os impactos destes herbicidas em condições naturais.

No nosso estudo, os testes crônicos para as duas espécies de insetos pleustônicos (*Limnogonus profugos* e *Limnogonus aduncus,* Heteroptera: Gerromorpha: Gerridae) mostraram resultados de sobrevivência similares. A única diferença foi que em *Limnogonus profugos* o efeito negativo do Roundup® foi independente da concentração; por outro lado, em *Limnogonus aduncus* o efeito negativo foi amplificado em concentrações maiores, indicando que esta espécie é ainda mais sensível.

Os gerrídeos são insetos semiaquáticos, vivem na superfície da água e muitos deles se alimentam de insetos terrestres, portanto, estes insetos não vivem mergulhados na água e provavelmente não absorvem continuamente o Roundup® pelo tegumento. Nesse contexto, há a possibilidade que os efeitos negativos sobre a sobrevivência sejam mais em função de modificações físicas na tensão superficial devido à presença de surfactante do que efeitos tóxicos sobre a fisiologia. Estes insetos possuem cutícula coberta por pelos hidrofóbicos, a qual é fortemente impermeabilizada (GOODWYN *et al*., 2008) e tarsos especialmente adaptados para se manterem sobre a tensão superficial da água (GAO e JIANG, 2004). Diante disso, a diminuição da tensão superficial proporcionada pelo surfactante poderia ocasionar importantes problemas para estas espécies, uma vez que poderia diminuir a efetividade dos pelos hidrofóbicos, comprometendo as atividades básicas diárias destes insetos (ex.: respiração, uma vez que os espiráculos são protegidos por estes pelos; sustentação e mobilidade, uma vez que pelos especiais nos tarsos otimizam essas habilidades sob a tensão superficial; e aumento da permeabilidade, uma vez que a quebra da tensão superficial permitirá maior contato das superfícies).

As nossas observações em laboratório mostram que na presença de Roundup® as duas espécies apresentam dificuldade de sustentação e mobilidade na superfície da água. Diante disso, partindo do pressuposto que o Roundup® afeta a tensão superficial e que parte da diminuição da sobrevivência está relacionada à diminuição da sustentação na superfície da água, é esperado que indivíduos maiores tenham maior dificuldade de sobrevivência e mobilidade do que indivíduos menores. Os nossos dados adicionam evidência a esta expectativa, uma vez que

nos testes agudos, tanto para *Limnogonus profugos* quanto para *Limnogonus aduncus*, os indivíduos adultos (maior tamanho) apresentaram concentração letal (CL_{50}) muito menor do que aquela observada para indivíduos imaturos (menor tamanho). Portanto, os nossos dados mostram que os indivíduos adultos são mais sensíveis à presença de Roundup® que os indivíduos imaturos.

A dificuldade de locomoção e de mobilidade observada para *Limnogonus* spp. na presença de Roundup® nos levou a questionar o impacto disso na biologia da espécie. Estes insetos ajustaram morfologicamente os seus tarsos ao longo do processo evolutivo de forma a otimizar a sua sustentação e mobilidade sob a tensão superficial da água. Portanto, cada espécie possui tarsos ajustados fisicamente com a tensão supeficial (HU *et al*., 2003; KOH *et al*., 2015; YANG *et al*., 2016). Mudanças na tensão superficial podem desajustar a interação tarso-água, dificultando atividades fundamentais como a obtenção de alimento. Além disso, a redução da tensão superficial também poderia comprometer a localização da presa, uma vez que os pelos hidrofóbicos funcionam como um órgão sensorial, permitindo que estes insetos localizem a presa pela vibração da água (GOODWYN *et al.*, 2009). Os nossos resultados confirmam a nossa expectativa que a presença de Roundup® dificulta o processo de predação, uma vez que na maior parte dos casos o tempo de captura da presa foi maior nos tratamentos do que no controle.

Outra questão levantada em relação ao efeito do Roundup® sobre a predação foi se a experiência prévia em um meio com este herbicida diminuiria o efeito negativo sobre este processo. A nossa expectativa era que insetos criados desde o ovo em um meio com Roundup® lidassem melhor com o processo de captura de presa nesse meio do que aqueles indivíduos que foram criados em condições controle. Os nossos dados não confirmaram essa expectativa, sugerindo que não há ajustes fisiológicos e comportamentais prévios que diminuam o impacto da presença do Roundup® sobre o processo de predação. Pelo contrário, os indivíduos submetidos ao Roundup® somente no momento do teste foram menos prejudicados no que se refere ao processo de predação Por exemplo, o efeito negativo de Roundup® sobre o tempo de captura de presa para *L. profugos* criados previamente em contato com o herbicida foi significativo para as concentrações 3,5 e 6,0 mg a.e./L; enquanto que para aqueles sem contato prévio foi significativo apenas para a concentração 6,0 mg a.e./L. Para *L. aduncus* criados previamente em contato com o herbicida o efeito negativo sobre a captura de presa foi significativo apenas para a

concentração 6,0 mg/L; enquanto que para aqueles sem contato prévio, o efeito não foi significativo para nenhuma concentração. Esses resultados trazem evidências que o efeito acumulativo da presença do herbicida ao longo do tempo aumentou o impacto negativo sobre o processo de predação dos gerrídeos. Isso é preocupante, uma vez que em regiões com grande atividade agrícola é provável que exposições crônicas aos herbicidas sejam muito frequentes.

Em resumo, os nossos dados confirmam a hipótese de que os herbicidas à base de glifosato afetam a sobrevivência dos organismos estudados. Aqui as sobrevivências de *Limnogonus* spp. foram afetadas apenas pelo Roundup®. Estes resultados suportam a hipótese que a formulação comercial, a qual possui surfactante, amplifica os efeitos negativos do herbicida, principalmente porque estes organismos dependem da tensão superficial. A diminuição da mobilidade e o maior tempo de predação observados em *Limnogonus* spp. expostos ao Roundup®, reforçam a hipótese de que o surfactante presente na formulação comercial pode ser o principal fator negativo para este grupo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSEN, E. A. **The semiaquatic bugs (Hemiptera, Gerromorpha)***:* phylogeny, adaptations, biogeography and classification. BRILL, 1982.

ANNETT, R.; HABIBI, H. R.and HONTELA, A.. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 5, p. 458-479, 2014.

BATTAGLIN, W. A. et al. Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in US soils, surface water, groundwater, and precipitation. **Journal of the American Water Resources Association**, v. 50, n. 2, p. 275-290, 2014.

BLASIOLI, S.; BRASCHI, I. and GESSA, C. E. The fate of herbicides in soil. In: ANDREAS KORTEKAMP (Ed.), **Herbicides and Environment.** InTech, Rijeka, Croatia, 2011,. 175-195 p. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-and-environment/the-fate-of-herbicides-in-soil>. Acesso: 13/04/2019.

BRADBERRY, S. M.; PROUDFOOT, A. T. and VALE, J. A.. Glyphosate poisoning. **Toxicological reviews**, v. 23, n. 3, p. 159-167, 2004.

BRAUSCH, J. M.; BEALL, B. and SMITH, P. N. Acute and sub-lethal toxicity of three POEA surfactant formulations to Daphnia magna. **Bulletin of environmental contamination and toxicology***,* v. 78, n. 6, p. 510-514, 2007.

CONAMA. **Conselho Nacional do Meio Ambiente**.. Resolução número 357 de 17 de março de 2005. 2005

CERDEIRA, A. L. et al. Review of potential environmental impacts of transgenic glyphosate-resistant soybean in Brazil. **Journal of Environmental Science and Health, Part B,** v. 42, n. 5, p. 539-549, 2007.

COOK, P. A. and WHEATER, P. **Using statistics to understand the environment**. Routledge, 2005.

COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human Consumption**. Official Journal of the European Communities**, v. 330, p. 32–54, 1998.

DUKE, S. O. and POWLES, S. B. Glyphosate-resistant crops and weeds: now and in the future. **AgBioForum***,* v. 12, p. 346– 357, 2009.

EDWARDS, W.M., TRIPLETT, G.B. and KRAMER, R.M. A watershed study of glyphosate transport in runoff. **Journal Environmental Quality**, v. 9, p. 661–665, 1980.

FINNEY, D. J. and TATTERSFIELD, F. **Probit analysis.** Cambridge University Press; Cambridge, 1952.

FOLMAR, L. C.; SANDERS, H. O. and JULIN, A. M. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates**. Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 8, n. 3, p. 269-278, 1979.
.
GALLI, A. J. B et al. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura***.* São Paulo: Monsanto do Brasil, 2005, 66pp.

GAO, X. and JIANG, L.. Biophysics: water-repellent legs of water striders. **Nature**, v. 432, n. 7013, p. 36, 2004

GIESY, J. P.; DOBSON, S. and SOLOMON, K. R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. In: **Reviews of environmental contamination and toxicolog***,* Springer, New York, NY, v. 167, p. 35–120, 2000.

GOODWYN, P. P.; KATSUMATA-WADA, A. and OKADA, K.. Morphology and neurophysiology of tarsal vibration receptors in the water strider Aquarius paludum

(Heteroptera: Gerridae). **Journal of insect physiology**, v. 55, n. 9, p. 855-861, 2009.

GOODWYN, P. P. et al. Moulding technique demonstrates the contribution of surface geometry to the super-hydrophobic properties of the surface of a water strider. **Acta biomaterialia**, v. 4, n. 3, p. 766-770, 2008.

HU, D. L.; CHAN, B. and BUSH, J. W. M. The hydrodynamics of water strider locomotion. **Nature**, v. 424, n. 6949, p. 663, 2003.

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 n° 4.074/2002***,* 2016. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>. Acesso: 13/04/2019.

JURADO, A. et al. Herbicides: the face and the reverse of the coin. An in vitro approach to the toxicity of herbicides in non-target organisms. In: KORTEKAMP, A. (ED.), **Herbicides and environment**.. InTech, 2011. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-and-environment/herbicides-the-face-and-thereverse-of-the-coin-an-in-vitro-approach-to-the-toxicity-of-herbicides-i>. Acesso: 13/04/2019

KOH, J.S. et al. Jumping on water: Surface tension–dominated jumping of water striders and robotic insects. **Science**, v. 349, n. 6247, p. 517-521, 2015.

LANGIANO, V. do C. and MARTINEZ, C. B. R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish Prochilodus lineatus. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 147, n. 2, p. 222-231, 2008.

LEE, E. T. and WANG, J. **Statistical methods for survival data analysis**. John Wiley & Sons, 2003.

MAGBANUA, F. S. et al. Individual and combined effects of fine sediment and glyphosate herbicide on invertebrate drift and insect emergence: a stream mesocosm experiment. **Freshwater Science**, v. 35, n. 1, p. 139-151, 2016.

MARCHI, G.; MARCHI, E. C. S. e GUIMARÃES, T. G.. Herbicidas: mecanismos de ação e uso. **Embrapa Cerrados-Documentos,** *(INFOTECA-E),* 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria nº 2914**. 2011. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html>. Acesso: 13/04/2019.

NAVARRO, C. D. C. and MARTINEZ, C. B. R. Effects of the surfactant polyoxyethylene amine (POEA) on genotoxic, biochemical and physiological parameters of the freshwater teleost Prochilodus lineatus. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 165, p. 83-90, 2014.

OLIVEIRA JR, R. S. de. Introdução ao controle químico. In OLIVEIRA JR, R. S. de, CONSTANTIM, J. e HIROKO, M. (EDS.) **Biologia e Manejo de plantas daninhas**, , Omnipax, Curitiba, PR, Brasil, 2011, 125-140 p..

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Guideline 221,** OECD, Paris, 2011.

PÉREZ, G. L.; VERA, M. S. and MIRANDA, L.. Effects of herbicide glyphosate and glyphosate-based formulations on aquatic ecosystems. In: **Herbicides and environment**. IntechOpen, 2011. Disponível em: http://www.intechopen.com/books/herbicides-andenvironment/effects-of-herbicide-glyphosate-and-glyphosate-based-formulations-on-aquatic-ecosystems. Acesso em 13/04/2019.

POWELL, H. A.; KERBBY, N. W. and ROWELL, P. Natural tolerance of cyanobacteria to the herbicide glyphosate. **New Phytologist**, v. 119, n. 3, p. 421-426, 1991.

POWLES, S. B. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 64, n. 4, p. 360-365, 2008.

PRICE, A. and KELTON, J. Weed control in conservation agriculture. In: LARRAMENDY, M. (Ed.). **Herbicides, Theory and Applications.** InTech, 2011. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-theory-and-applications/weed-control-in-conservation-agriculture>. Acesso: 13/04/2019.

RELYEA, R. A. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. **Ecological applications**, v. 15, n. 2, p. 618-627, 2005.

RODRIGUES, L. de B. et al. Ecotoxicological assessment of glyphosate-based herbicides: Effects on different organisms. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 36, n. 7, p. 1755-1763, 2017.

ROY, N. M.; CARNEIRO, B. and OCHS, J.. Glyphosate induces neurotoxicity in zebrafish. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 42, p. 45-54, 2016.

ROMANO, R. M. et al. A exposição ao glifosato-Roundup causa atraso no início da puberdade em ratos machos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 6, p. 481-487, 2008.

ROMANO, R.. M., ROMANO, M.. A., OLIVEIRA, C. A. Glifosato como desregulador endócrino químico. **Ambiência**, v. 5, p. 359-372, 2009.

SZÉKACS, A. and DARVAS, B.. Forty years with glyphosate. In: HASANEEN, M.N. (ED.), **Herbicides-properties, synthesis and control of weeds**. InTech, 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-properties-synthesis-and-control-of-weeds/forty-years-withglyphosate>. Acesso: 13/04/2019.

TAIZ, L.. Agriculture, plant physiology, and human population growth: past, present, and future. **Theoretical and Experimental Plant Physiology**, v. 25, n. 3, p. 167-181, 2013.

TSUI, M. T. K. and CHU, L. M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere**, v. 52, n. 7, p. 1189-1197, 2003.

TSUI, M. T. K. and CHU, L. M. Comparative toxicity of glyphosate-based herbicides: aqueous and sediment porewater exposures. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, n. 3, p. 316-323, 2004.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Drinking Water Contaminants**, 2009. Disponível em: <http://water.epa.gov/drink/contaminants/index.cfm#List>. Acesso: 13/04/2019

VERA, M. S. et al. Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor® on freshwater microbial communities. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 7, p. 1805-1816, 2012.

YANG, E. et al. Water striders adjust leg movement speed to optimize takeoff velocity for their morphology. **Nature communications**, v. 7, p. 13698, 2016.

WILLIAMS, G. M.; KROES, R. and MUNRO, I. C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 31, n. 2, p. 117-165, 2000.

Capítulo 2

Efeito de herbicidas à base de glifosato sobre a sobrevivência de Notonectidae sp. (Heteroptera: Nephomorpha) e *Chironomus inquinatus* (Diptera: Chironomidae)

Tássia J. Malacarne[1,2]; Ciro César Z. Branco[2]; Pitágoras C. Bispo[2]

1. PPG em Entomologia. Departamento de Biologia. Faculdade de Ciências e Letras de Ribeirão Preto. Ribeirão Preto, SP.
2. Laboratório de Biologia Aquática. Departamento de Ciências Biológicas. Faculdade de Ciências e Letras de Assis. Universidade Estadual Paulista. Assis, SP.

RESUMO

Testar os efeitos de herbicidas à base de glifosato em organismos aquáticos é um importante passo para que possamos compreender os impactos desses herbicidas em ambientes naturais. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos crônicos e agudos de herbicidas à base de glifosato sobre a sobrevivência de insetos que ocupam diferentes compartimentos aquáticos. Para isso testamos os efeitos de três herbicidas à base de glifosato (Roundup®, glifosato técnico e AMPA) em Notonectidae sp (nectônico) e *Chironomus inquinatus* (bentônico). Os resultados mostram que os herbicidas testados afetam significativamente a sobrevivência dos insetos avaliados. Para Notonectidae sp., o glifosato exposto de forma crônica não afetou a sobrevivência, porém o Roundup® afetou negativamente a sobrevivência. Este resultado sugere que o surfactante pode ser o responsável pelos efeitos negativos do Roundup® sobre Notonectidae sp., uma vez que a diminuição da tensão superficial pode diminuir a efetividade dos pelos hidrofóbicos e comprometer a respiração desta espécie. Para *Chironomus inquinatus*, os três herbicidas afetaram negativamente a sobrevivência. Este resultado sugere que o tegumento permeável de *Chironomus inquinatus* e o acúmulo de herbicidas no sedimento podem tornar estes insetos mais sujeitos aos efeitos negativos dos herbicidas. Nossos resultados mostram que, apesar destes herbicidas serem direcionados ao controle de ervas daninhas, eles também afetam negativamente a fauna de insetos aquáticos.

Palavras-chave: Pesticidas, toxicidade, invertebrados aquáticos.

INTRODUÇÃO

A agricultura mundial tem evoluído a cada ano e tem mantido níveis crescentes de produtividade. O problema é que esta evolução tem sido desconectada da preocupação com o meio ambiente. Neste contexto, o desenvolvimento da agricultura tem sido acompanhado da introdução de agroquímicos e, consequentemente, da degradação do habitat e redução da biodiversidade. Entre os principais pesticidas estão aqueles utilizados para o controle de insetos e de plantas daninhas. Para controlar estas pragas, diferentes herbicidas são desenvolvidos frequentemente, os quais são aplicados de forma indiscriminada, o que pode afetar negativamente a saúde humana e a biodiversidade.

Os herbicidas à base de glifosato são os mais utilizados no Mundo (POWLES, 2008; BATTAGLIN *et al*., 2014). O glifosato (N- (fosfonometil) glicina) é um herbicida não seletivo e é o ingrediente ativo de várias formulações comerciais, entre as quais o Roundup®, o qual foi desenvolvido e comercializado pela empresa Monsanto a partir de 1974, (GALLI *et al*., 2005), com o intuito de melhorar a eficácia do glifosato. Além do glifosato, este herbicida contém surfactante, o polioxietileno amina (POEA), que pode ser muito tóxico para organismos alvos e não alvos. (POWELL *et al*., 1991; GIESY *et al*., 2000; TSUI e CHU, 2003; ANNETT *et al*., 2014; BATTAGLIN *et al*., 2014).

O glifosato pode ser facilmente adsorvido no solo ou no substtrato, pois apresenta pouca mobilidade no solo e na água. Ele é primariamente degradado por bactérias (GIESY *et al*., 2000) e o principal produto de degradação do glifosato é o ácido aminometilfosfônico (AMPA). O AMPA é frequentemente encontrado em águas superficiais em áreas com intensa produção agrícola (COUPE *et al*., 2012) e também é considerado um herbicida, pois assim como o glifosato, atua sobre a síntese de clorofila, ampliando os efeitos indiretos do ingrediente ativo (GOMES *et al*., 2014). O tempo de degradação do AMPA é maior do que o tempo de degradação do glifosato e resulta em água, dióxido de carbono e fosfato inorgânico. Como a degradação do AMPA é mais lenta em relação à degradação do glifosato, o AMPA é detectado com maior frequência no ambiente (SZÉKÁCS e DARVAS, 2012; BATTAGLIN *et al*., 2014; POIGER *et al*., 2017) e é considerado menos tóxico que o glifosato (BONNET *et al*., 2007).

Herbicidas à base de glifosato são principalmente aplicados no controle de ervas daninhas terrestres e afetam negativamente o processo fotossintético. Apesar disto, quantidades significativas de glifosato têm sido detectadas em ambientes aquáticos e efeitos negativos destes herbicidas têm sido observados para diferentes animais. Portanto, o fato do glifosato ser fortemente adsorvido pelo solo e rapidamente degradado por microrganismos não tem impedido a sua chegada aos ambientes aquáticos (BATTAGLIN *et al*., 2005), onde podem afetar diferentes organismos (incluindo animais), a diversidade e os processos ecossistêmicos (BLASIOLI *et al*., 2011; PÉREZ *et al*., 2011; ANNETT *et al*., 2014; BATTAGLIN *et al*., 2014; MAGBANUA *et al*., 2016).

Os invertebrados aquáticos podem ser bons modelos para testar os efeitos de herbicidas sobre os ecossistemas aquáticos, já que habitam estes ambientes por longos períodos e conectam os recursos basais com níveis mais elevados na cadeia alimentar. Alguns estudos ecotoxicológicos utilizando invertebrados relatam baixa sensibilidade desses organismos ao glifosato. Por exemplo, os valores de CL_{50} (concentração que causa morte de metade dos indivíduos da população) obtidos em tratamentos com glifosato para espécies do zooplâncton variaram de 49,3 mg/L para o copépode marinho *Acartia tonsa* a 415 mg/L para o cladócera *Ceriodaphnia dubia* (TSUI e CHU, 2003). Por outro lado, outros dois estudos envolvendo o gastrópoda *Pseudosuccinea columella*, relataram efeitos significativos mesmo em baixas concentrações de glifosato (0,1, 1 e 10 mg/L). As concentrações de 1 mg/L aumentaram o crescimento na terceira geração de caramujos, já as concentrações de 0,1 e 10 mg/L provocaram uma inibição da eclosão de ovos, anormalidades e poliembrionia (TATE *et al*., 1997). Os mesmos autores observaram diferenças significativas no metabolismo de *Pseudosuccinea columela*, sendo que as concentrações de glifosato de 0,1 mg/L induziram aumento de cerca de 2 vezes em cinco aminoácidos livres (TATE *et al*., 2000).

Além dos efeitos negativos de herbicidas à base de glifosato observados, por exemplo, em parâmetros como sobrevivência, mobilidade, predação e abundância de espécies, são relatados também efeitos fisiológicos como alterações bioquímicas em vertebrados e invertebrados. Dentre estes, a inibição da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), que degrada um neurotransmissor liberado nas fendas sinápticas, já foi observada em peixes (CATTANEO *et al*., 2011) e em anfíbios (LAJMANOVICH *et al*., 2010), e pode estar relacionada aos efeitos crônicos de

herbicidas à base de glifosato observados em *Chironomus xanthus* pelos autores Ferreira-junior *et al*. (2017). Em um estudo que avaliou o potencial de bioacumulação do herbicida glifosato e seu produto de comercialização Roundup Ultra, Contardo-Jara *et al*. (2009) observaram efeitos fisiológicos no verme *Lumbriculus variegatus,* como o aumento significativo na atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase em concentrações de 0,05 e 0,1 mg/L de glifosato, indicando estresse oxidativo.

A maior parte dos dados da literatura tem mostrado uma amplificação dos efeitos de herbicidas à base de glifosato quando usadas as formulações comerciais ou o sufactante. Estudos realizados por Tsui e Chu (2004) mostraram que o Roundup® apresentou entre 3 a 76 vezes maior toxicidade do que o glifosato técnico. Outros estudos mostraram que o surfactante (POEA) utilizado nas formulações comerciais foi ainda mais tóxico para invertebrados do que o glifosato técnico e o próprio Roundup®. Por exemplo, Folmar *et al*. (1979) relataram que a toxicidade de POEA sobre larvas de *Chironomus plumosus* foi aproximadamente 1,4 vezes maior do que a de Roundup®. Valores mais elevados foram relatados por Servizi *et al*. (1987) e Tsui e Chu (2003), os quais mostraram que o efeito tóxico do POEA foi de 3 a 5 vezes maior do que Roundup®.

Diante do exposto, consideramos fundamental testar os efeitos de herbicidas à base de glifosato sobre diferentes organismos aquáticos. Neste contexto, no presente trabalho fizemos experimentos utilizando insetos que ocupam dois compartimentos aquáticos, Notonectidae sp. (nêuston) e *Chironomus inquinatus* (bentos). Aqui, testamos as seguintes hipóteses: 1) o Roundup® tem um efeito negativo maior do que o glifosato técnico sobre as sobrevivências das espécies estudadas e 2) a sobrevivência de *Chironomus inquinatus* é mais afetada do que a de Notonectidae sp., uma vez que o primeiro vive associado ao substrato, onde se espera que os herbicidas fiquem acumulados.

OBJETIVO

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito crônico e agudo de três herbicidas à base de glifosato (Roundup®, glifosato técnico e AMPA) na sobrevivência de

organismos que ocupam diferentes compartimentos aquáticos, Notonectidae (nectônico) e *Chironomus inquinatus* (bentônico).

MATERIAIS E MÉTODOS

Organismos teste

Notonectidae sp.

Notonectidae sp. (Heteroptera: Nepomorpha: Notonectidae) são insetos nectônicos, excelentes nadadores (conhecidos como “backswimmers” por nadarem de costas). Alimentam-se de outros insetos, pequenos peixes e anfíbios imaturos. Os adultos utilizados nesse estudo foram coletados em um lago localizado na região Oeste do Estado de São Paulo (BR). No laboratório, os espécimes foram mantidos em aquários em temperatura ambiente, porém não foi possível estabelecer a criação desses insetos. Dessa forma, as coletas foram realizadas, os adultos aclimatados durante 24 horas. Depois disso, os efeitos da exposição (crônica e aguda) aos herbicidas Roundup®, glifosato técnico e AMPA foram avaliados.

Chironomus inquinatus

Chironomus inquinatus (Diptera: Chironomidae) é uma espécie típica de riachos poluídos, influenciados por atividades de agricultura e efluentes domésticos (CORREIA *et al*, 2006). Para os experimentos, as larvas foram coletadas em riachos localizados na região Oeste do Estado de São Paulo (BR). No laboratório, as larvas foram mantidas em bandejas com substrato arenoso em condições controladas (25ºC e fotoperíodo de 12 horas). Para a realização dos experimentos foram utilizadas somente larvas do quarto ínstar de desenvolvimento. Devido à dificuldade de manter esses insetos em laboratório, não foi possível estabelecer uma criação. Por isso, antes dos experimentos, as coletas foram realizadas e as larvas aclimatadas durante 24 horas. Depois disso, os efeitos da exposição (crônica e aguda) aos herbicidas Roundup®, glifosato técnico e AMPA foram avaliados.

Sobrevivência: testes crônicos

Delineamento experimental

Notonectidae sp.

Para cada concentração testada de Roundup® foram feitas cinco réplicas contendo 200 ml de solução (água desclorificada e herbicida) e 10 insetos adultos, além do grupo controle com o mesmo número de réplicas e adultos. A mortalidade foi avaliada a cada dois dias, período também em que o meio foi trocado e os insetos foram alimentados. O procediento para os testes com glifosato e AMPA foi o mesmo descrito acima, porém com as concentrações nominais.

Para testar o efeito significativo de glifosato técnico as seguintes concentrações foram testadas 0,28, 3,5 e 6,0 mg/L. Essas concentrações foram escolhidas considerando os seguintes critérios: (1) a concentração máxima para irrigação e consumo animal permitida pela legislação brasileira (0,28 mg/L) (CONAMA, 2005); (2) a concentração recomendada para o controle de pragas (3,5 mg/L) (VERA *et al*., 2012); e (3) a maior concentração registrada em um ambiente aquático natural (6,0 mg/L) (EDWARDS *et al*., 1980). Para testar o efeito do herbicida AMPA, utilizou-se uma concentração de 0,03 mg/L, que é o valor mediano relatado para ambientes lóticos (VILLENEUVE *et al*., 2011, COUPE *et al*., 2012), e 0,06 mg/L que é a concentração máxima de glifosato permitida em água potável (CONAMA, 2005).

No caso de Roundup®, usamos concentrações de exposição baseadas em valores de ácido equivalente (a.e.) das concentrações testadas para o glifosato técnico, ou seja, 0,28, 3,5 e 6,0 mg a.e./L. Para isso adicionamos 0,77 µL de Roundup® a 1000 ml de água para obter uma concentração inicial de 0,28 mg a.e./L; 9,7 µL para obter uma concentração inicial de 3,5 mg a.e./L e 16,6 µL para obter uma concentração inicial de 6,0 mg a.e./L de glifosato.

A preparação das concentrações de exposição e os ensaios de toxicidade para os herbicidas à base de glifosato foram efetuados de acordo com as orientações da Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD/OCDE) para o ensaio de produtos químicos 221 (OECD/OCDE, 2011). Os

procedimentos de exposição descritos nestas orientações, embora propostos para *Chironomus riparius* também se aplicam a outros insetos.

Chironomus inquinatus

Para cada concentração testada de Roundup® foram feitas quatro réplicas contendo 200 ml de solução (água desclorificada e herbicida) e 10 larvas de quarto ínstar, além do grupo controle com o mesmo número de réplicas e larvas. A mortalidade foi avaliada a cada dois dias, período também em que o meio foi trocado e os insetos foram alimentados com ração de peixe (Tetramin). O procedimento para os testes com glifosato técnico e AMPA foi o mesmo descrito acima.

As concentrações de glifosato técnico, Roundup® e AMPA foram as mesmas testadas para Notonectidae sp. Os cálculos para o teste com Roundup® foram baseados na equivalência de ácido (360g/L). Para isso adicionamos 0,62 µL de Roundup® a 800 ml de água para obter uma concentração inicial de 0,28 mg a.e./L, 7,7 µL de Roundup® para obter uma concentração inicial de 3,5 mg a.e./L e 13,3 µL para obter uma concentração inicial de 6,0 mg a.e./L. Os tratamentos de glifosato técnico e AMPA foram realizados utilizando as concentrações nominais.

Análises estatísticas

Os efeitos dos diferentes tipos e concentrações dos herbicidas à base de glifosato sobre a sobrevivência de Notonectidae e *Chironomus inquinatus* foram avaliados utilizando o método de Kaplan-Meier e o teste de log-rank (LEE e WANG, 2003). Estes métodos são baseados no tempo de duração até que um ou mais eventos ocorram, como a morte de um indivíduo. Quando o efeito, segundo o o teste de log-rank, foi significativo, foi usado o teste de múltiplas comparações de Holm-Sidak. As análises foram realizadas usando o software SigmaPlot 11.0 (Systat Software).

Sobrevivência: testes agudos

Devido à dificuldade de obtermos um grande número de larvas de *Chironomus inquinatus*, os testes agudos de sobrevivência não foram realizados para esta espécie.

Delineamento experimental

Notonectidae sp.

Os testes agudos foram realizados somente com adultos, pois não foi possível estabelecer uma criação para esta espécie. Para este teste foram utilizadas as concentrações 0,003, 0,0075, 0, 018, 0,046, 011, 0,29 e 0,73 mg a.e./L de Roundup®. Para cada concentração foram utilizadas três réplicas contendo 10 adultos cada, totalizando 30 insetos adultos por tratamento. O mesmo procedimento foi feito para os herbicidas Roundup®, glifosato ténico e AMPA.

A preparação das concentrações de exposição utilizadas nos ensaios de toxicidade para os herbicidas à base de glifosato foi efetuada de acordo com as orientações da Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD/OCDE) para o ensaio de produtos químicos 221 (OECD/OCDE, 2011). Os procedimentos de exposição descritos nestas orientações, embora propostos para *Chironomus riparius* também se aplicam a outros insetos.

Análises estatísticas

A concentração de herbicidas à base de glifosato que provoca 50% de mortalidade (CL_{50}) em 96 horas foi avaliada Notonectidae sp. A CL_{50} foi estimada utilizando uma análise Probit (FINNEY, 1952) e foi realizada no programa Excel. Os resultados foram apresentados em gráficos de dispersão (Scatterplot) feitos no programa Statistica 7.0.

RESULTADOS

Sobrevivência: testes crônicos

Notonectidae sp.

As curvas de sobrevivência (Kaplan-Meier) de Notonectidae sp. expostos de forma crônica aos herbicidas testados são apresentadas nas Figuras 1 (expostos ao Roundup®), Figura 2 (expostos ao glifosato técnico) e Figura 3 (expostos ao AMPA). O glifosato técnico e o AMPA não apresentaram efeitos significativo sobre a sobrevivência de Notonectidae sp. (Teste de log-rank, $p>0,05$). Por outro lado, o Roundup® afetou significativamente a sobrevivência da espécie (Teste de log-rank, $p<0,05$). Aqui, o controle diferiu de todas as concentrações testadas, assim como todas as concentrações foram significativamente diferentes entre si (Teste de Holm-Sidak, $p<0,05$, Tabela 1). O experimento teve duração de 14 dias, quando todos os insetos expostos à concentração 0,28 mg a.e./L morreram, restando somente o grupo controle com sobrevivência de 60% da população. Todos os insetos criados nas concentrações 3,5 mg a.e./L e 6,0 mg a.e./L já haviam morrido, 12 e 8 dias, respectivamente (Figura 1).

Chironomus inquinatus

As curvas de sobrevivência (Kaplan-Meier) de *Chironomus inquinatus* expostos de forma crônica aos herbicidas testados são apresentadas na Figura 4 (expostos ao Roundup®), Figura 5 (expostos ao glifosato técnico) e Figura 6 (expostos ao AMPA). O Roundup® afetou significativamente a sobrevivência de *Chironomus inquinatus* (Teste de log-rank, $p<0,05$). Os resultados mostram que o controle e todas as concentrações testadas diferiram entre si, bem como a concentração 0,28 mg a.e./L diferiu da concentração 6,0 mg a.e./L (Teste de Holm-Sidak, $p<0,05$, Tabela 2). O experimento teve duração de 12 dias, quando houve morte de todos os insetos do grupo controle. Todos os insetos expostos às concentrações 0,28, 3,5 e 6,0 mg a.e./L já haviam morrido em 10 dias de experimento, quando ainda havia 35% da população do grupo controle (Figura 4).

O glifosato técnico também afetou significativamente a sobrevivência de

Chironomus inquinatus (Teste de log-rank, $p<0,05$). Os resultados mostraram que o controle e todas as concentrações testadas diferiram entre si, bem como a concentração 0,28 mg/L diferiu da concentração 3,5 mg/L (Teste de Holm-Sidak, $p<0,05$, Tabela 3). O experimento com glifosato técnico teve duração de oito dias, quando houve morte de todos os insetos das concentrações e do grupo controle. Em quatro dias de experimento houve uma queda de 48% de sobrevivência dos insetos expostos à concentração 3,5 mg/L, restando somente 17% da população. Neste mesmo período, a sobrevvivência da população do grupo controle foi de 78%. Em seis dias de experimento houve uma queda de 50% na sobrevivência dos insetos expostos à concentração 0,28 mg/L, restando 25% da população. Neste mesmo período a sobrevivência dos insetos expostos à concentração 3,5 mg/L foi de 17% e da população controle foi de 67% (Figura 5).

O AMPA afetou significativamente a sobrevivência de *Chironomus inquinatus* (Teste de log-rank, $p<0,05$). Os resultados mostraram também que o controle difere de todas as concentrações testadas, porém as concentrações não diferem entre si. (Teste de Holm-Sidak, $p<0,05$, Tabela 4). O experimento com AMPA teve duração de 12 dias quando houve morte de todos os insetos das concentrações e do grupo controle. Em oito dias de experimento, a sobrevivência das populações expostas às concentrações 0,28 mg/L e 3,5 mg/L foi de 23% e 21% , respectivamente. Neste mesmo período a sobrevivência dos insetos do grupo controle foi de 51% (Figura 6).

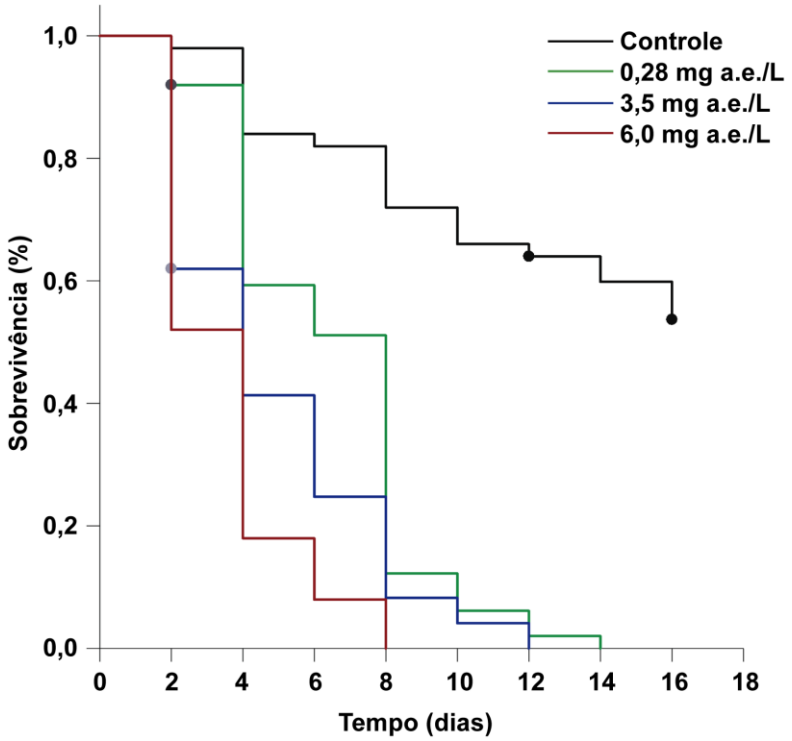

Figura 1. Curva de sobrevivência Kaplan-Meier com a porcentagem de sobrevivência da população de Notonectidae sp. em relação aos dias de exposição crônica ao herbicida Roundup®.

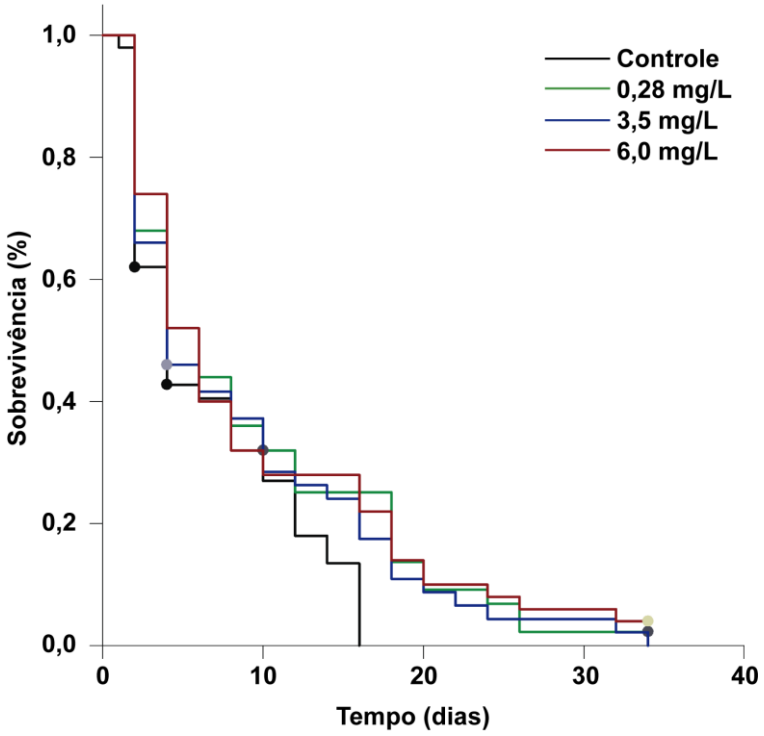

Figura 2. Curva de sobrevivência Kaplan-Meier com a porcentagem de sobrevivência da população de Notonectidae sp. em relação aos dias de exposição crônica ao herbicida glifosato técnico.

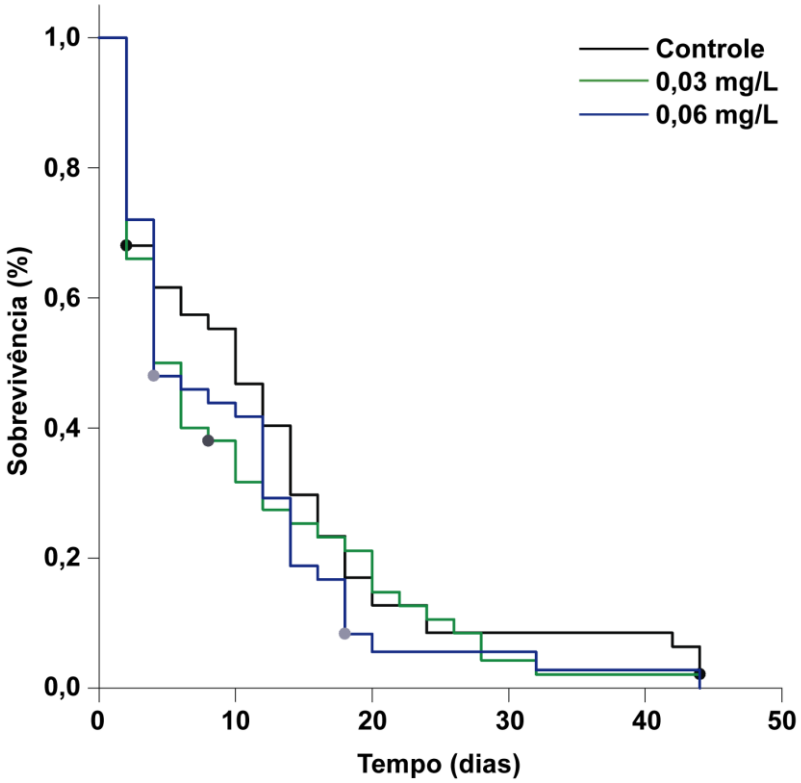

Figura 3. Curva de sobrevivência Kaplan-Meier com a porcentagem de sobrevivência da população de Notonectidae sp. em relação aos dias de exposição crônica ao herbicida AMPA.

Tabela 1. Comparações Múltiplas (método Holm-Sidak) para as concentrações testadas de Roundup® para Notonectidae sp.

Comparações	Valor de p
Controle x 0,28 mg a.e./L	*p < 0,001*
Controle x 3,5 mg a.e./L	*p < 0,001*
Controle x 6,0 mg a.e./L[1]	*p < 0,001*
0,28 mg a.e./L x 3,5 mg a.e./L	*p = 0,007*
0,28 mg a.e./L x 6,0 mg a.e./L	*p < 0,001*
3,5 mg a.e./L x 6,0 mg a.e./L	*p = 0,009*

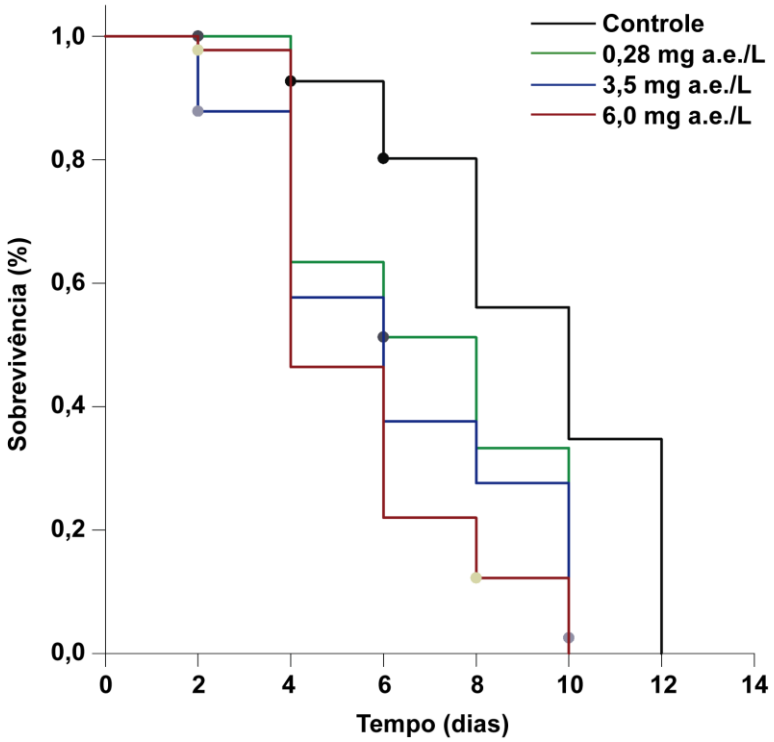

Figura 4. Curva de sobrevivência Kaplan-Meier com a porcentagem de sobrevivência da população de *Chironomus inquinatus* em relação aos dias de exposição crônica ao herbicida Roundup®.

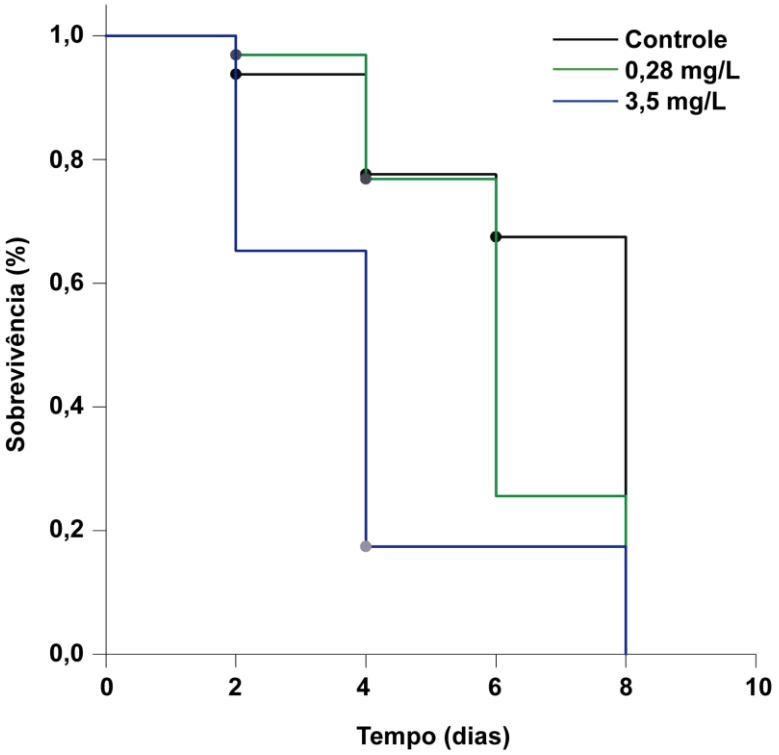

Figura 5. Curva de sobrevivência Kaplan-Meier com a porcentagem de sobrevivência da população de *Chironomus inquinatus* em relação aos dias de exposição crônica ao herbicida glifosato técnico.

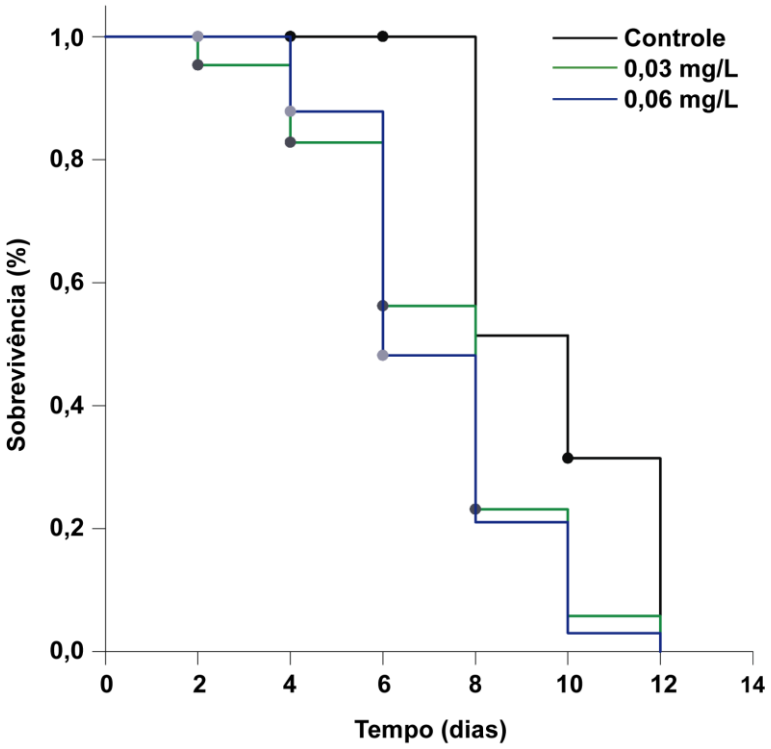

Figura 6. Curva de sobrevivência Kaplan-Meier com a porcentagem de sobrevivência da população de *Chironomus inquinatus* em relação aos dias de exposição crônica ao herbicida AMPA.

Tabela 2. Comparações Múltiplas (método Holm-Sidak) para as concentrações testadas de Roundup®. para *Chironomus inquinatus*.

Comparações	*Valor de p*
Controle x 0,28 mg a.e./L	*p < 0,001*
Controle x 3,5 mg a.e./L	*p < 0,001*
Controle x 6,0 mg a.e./L	*p < 0,001*
0,28 mg a.e./L x 3,5 mg a.e./L	*p = 0,375*
0,28 mg a.e./L x 6,0 mg a.e./L	*p = 0,009*
3,5 mg a.e./L x 6,0 mg/L	*p = 0,166*

Tabela 3. Comparações Múltiplas (método Holm-Sidak) para as concentrações testadas de glifosato técnico para *Chironomus inquinatus*.

Comparações	***Valor de p***
Controle x 0,28 mg/L	*p = 0,031*
Controle x 3,5 mg/L	*p < 0,001*
0,28 mg/L x 3,5 mg/L	*p < 0,001*

Tabela 4. Comparações Múltiplas (método Holm-Sidak) para as concentrações testadas de AMPA para *Chironomus inquinatus*.

Comparações	***Valor de p***
Controle x 0,28 mg/L	*p < 0,001*
Controle x 3,5 mg/L	*p < 0,001*
0,28 mg/L x 3,5 mg/L	*p = 0,796*

Sobrevivência: testes agudos

Notonectidae sp.

A CL_{50} do Roundup® para Notonectidae sp. foi de 0,04 mg a.e./L, para glifosato técnico foi de 0,005 mg/L e para AMPA foi de 0,14 mg/L. Embora o glifosato técnico tenha apresentado CL_{50} menor que o Roundup®, a maior concentração testada de Roundup® provocou mortalidade de 100% dos adultos de Notonectidae sp. após 96 h de teste, sendo que para o glifosato técnico e para o AMPA a mortalidade foi de 50% e 66,6%, respectivamente (Figura 7, 8 e 9).

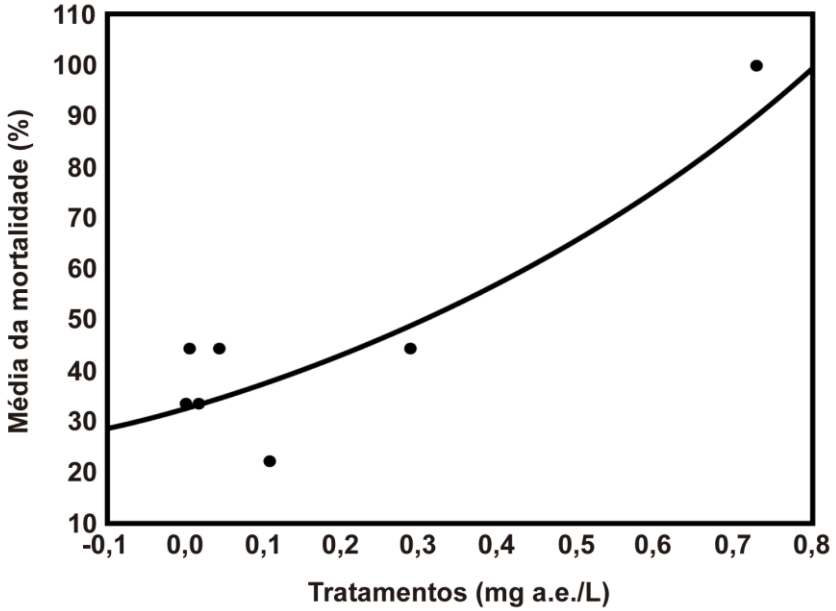

Figura 7. Média da mortalidade de adultos de Notonectidae sp. para cada tratamento após 96 horas de exposição ao Roundup®.

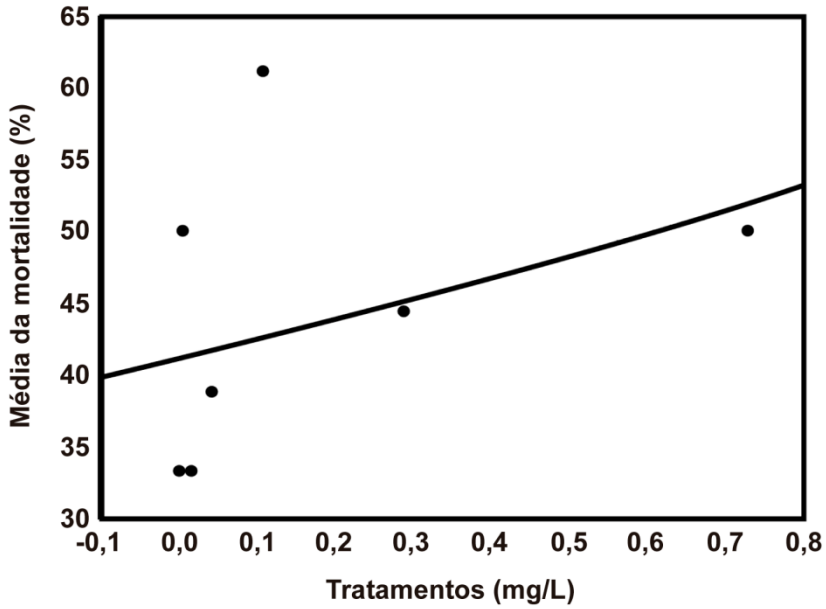

Figura 8. . Média da mortalidade de adultos de Notonectidae sp. para cada tratamento após 96 horas de exposição ao glifosato técnico.

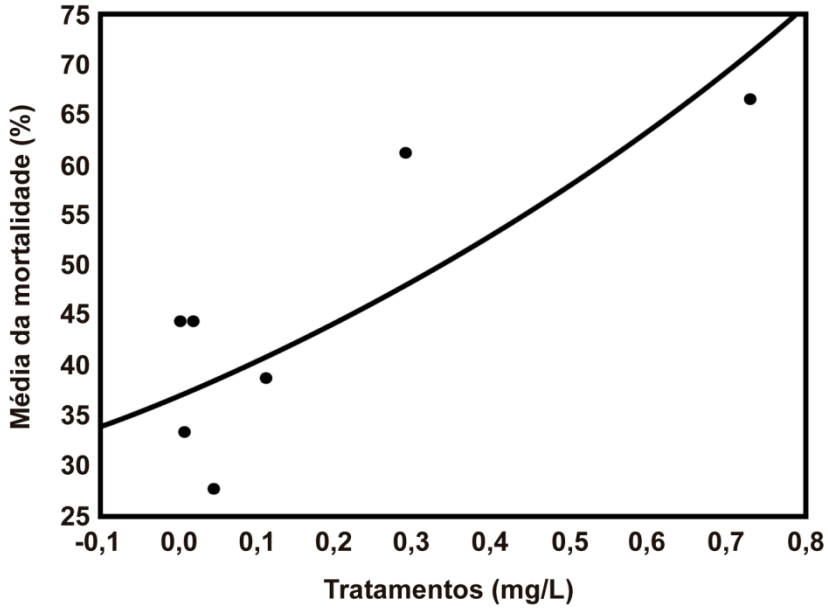

Figura 9. Média da mortalidade de adultos de Notonectidae sp. para cada tratamento após 96 horas de exposição ao AMPA.

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho mostram que herbicidas à base de glifosato afetam negativamente a sobrevivência de Notonectidae sp. e *Chironomus inquinatus.* Estes resultados mostram que apesar dos herbicidas à base de glifosato atuarem especificamente sobre a fotossíntese, eles podem afetar negativamente os animais aquáticos. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS, 1994) a toxicidade aguda do glifosato técnico para animais é considerada baixa. Adicionalmente, a Agência de Proteção Ambiental Americana (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, USEPA) considera as formulações comerciais de glifosato com baixa ou moderada toxicidade para mamíferos, aves e organismos aquáticos (ANNETT *et al*., 2014). Por outro lado, vários estudos, incluindo o nosso, têm reportado efeitos negativos de formulações com glifosato sobre animais aquáticos (ANNETT *et al*., 2014).

A literaruta tem mostrado que os efeitos de herbicidas à base de glifosato podem ser variáveis, diretos e indiretos e podem ser detectados em diferentes níveis biológicos. Por exemplo, no nível de comunidades, LINZ *et al*. (1999) observaram a variação da abundância de alguns organismos aquáticos em resposta à diminuição de macrófitas em áreas tratadas com glifosato após 1 e 2 anos de tratamento. Os autores não encontraram diferenças significativas na densidade de Crustacea, Hydracarina, Oligochaeta, Copepoda, Ostracoda e Cladocera entre áreas tratadas e não tratadas. Por outro lado, houve um aumento da abundância de Gastropoda e alguns insetos aquáticos, como Corixidae e Chironomidae, sugerindo que as populações de alguns invertebrados aquáticos podem aumentar com a diminuição de macrófitas causada pela aplicação de herbicidas à base de glifosato. Adicionalmente, Rzymski *et al*. (2013) observaram que o número de táxons de macroinvertebrados bentônicos em uma zona balnear tratada com herbicidas à base de glifosato não apresentou redução em relação ao controle, porém a abundância de organismos teve uma redução de cerca de 40% em áreas tratadas. Os mesmos autores mostraram que os quironomídeos encontrados na área tratada possuíam menor tamanho corpóreo do que aqueles da área não tratada. Estes trabalhos mostram que na natureza, os efeitos detectados em laboratório podem ser amplificados, uma vez que além de alterar a fisiologia e aumentar a mortalidade dos

organismos aquáticos, estes herbicidas podem também afetar o habitat e os recursos disponíveis (e.g. macrófitas).

Estudos de desenvolvimento e fisiológicos também têm mostrado efeitos negativos de herbicidas à base de glifosato em animais. Por exemplo, Tate *et al*. (1997), estudando o efeito destes herbicidas em uma espécie de Gatropoda, relataram que o herbicida afetou o desenvolvimento e a sobrevivência da primeira e segunda geração da espécie em concentrações subletais. Por outro lado, eles observaram que quando a terceira geração foi exposta ao glifosato, os indivíduos se desenvolveram mais rapidamente do que aqueles expostos ao controle (TATE *et al*, 1997). Domniguéz-Cortinas *et al* (2008) avaliaram o efeito subletal do glifosato e do formulante Faena® na inibição enzimática em um rotífero e observaram que o glifosato puro foi muito mais tóxico que o formulante. Os autores ainda sugeriram que os ingredientes presentes no formulante tiveram pouco efeito sobre a inibição da enzina esterase, sendo o ingrediente ativo (glifosato) o principal responsável por afetar a atividade desta enzima.

Os dados da literatura mostram que mesmo baixas concentrações de herbicidas à base de glifosato podem causar efeitos negativos em organismos aquáticos, especialmente em microorganismos e insetos bentônicos (BONNET *et al*., 2007; RZYMSKI *et al*., 2013; FERREIRA-JUNIOR *et al.* 2017). Por outro lado, na maioria dos casos a toxidade do glifosato técnico sobre os animais aquáticos é menor do que a toxicidade das formulações comerciais (ANNETT et al., 2014). De fato, os nossos resultados também mostraram que em exposições crônicas o glifosato não teve efeito para a espécie de Notonectidae sp. Por outro lado, o glifosato técnico afetou negativamente de forma significativa a sobrevivência do inseto bentônico *Chironomus inquinatus.* Este herbicida é altamante solúvel e, portanto, quase não tem mobilidade na água, por isso pode ser rapidamente removido para sedimentos e partículas em suspensão (SOLOMON e THOMPSON, 2003). Neste contexto, aqui, apesar dos nossos testes terem sido experimentais, é possível que o glifosato técnico possa ter sido adsorvido no substrato arenoso onde as larvas de *Chironomus inquinatus* foram criadas e na matéria orgânica disponível. Isso também é suportado pelo fato do AMPA, um subproduto do glifosato, também ter afetado negativamente e de forma significativa a sobrevivência de *Chironomus inquinatus*. O fato do glifosato técnico e do AMPA não terem afetado

significativamente Notonecttidae sp., os quais não vivem no compartimento bentônico, também reforçam esta possibilidade.

Efetivamente, a sobrevivência de *Chironomus inquinatus* foi afetada pela exposição crônica aos três tipos de herbicidas testados (Roundup®, glifosato técnico e AMPA). Este resultado difere das espécies de heterópteros aquáticos (presente trabalho e primeiro capítulo), para as quais, a sobrevivência foi afetada de forma significativa apenas pelo Roundup®. Ao contrário dos heterópteros aquáticos, *Chironomus inquinatus* possuem tegumento permeável, se alimentam de sedimento e estão em contato direto com o substrato. Assim, em *Chironomus inquinatus* a absorção dos herbicidas poderia potencialmente se dar por um maior número de vias do que em Heteroptera, o que teoricamente poderia aumentar a exposição aos pesticidas. Como a absorção cutânea e ingestão junto com o alimento parecem prováveis, sugerimos que estes fatores podem ser responsáveis pelos efeitos negativos de glifosato técnico e Ampa, além do Roundup®, sobre *Chironomus inquinatus.*

Avaliando os efeitos de herbicidas à base de glifosato no desenvolvimento de *Chironomus xanthus,* uma espécie bentônica, Ferreira-Junior *et al*. (2017) encontraram efeitos negativos desses pesticidas. Os autores observaram reduções no crescimento larval de *C. xanthus* expostos ao herbicida e mostraram a possibilidade de potenciais efeitos deletérios, mesmo considerando concentrações ambientais realistas de glifosato em águas doces tropicais. Eles sugeriram ainda, que estes efeitos crônicos observados em *C. xanthus* podem estar relacionados com a inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE). A inibição da enzima AChE por organofosforados, como herbicidas à base de glifosato, pode causar disfunção em parâmetros comportamentais resultando em menores taxas de alimentação e, consequentemente, afetar o desenvolvimento dos organismos (FERREIRA-JUNIOR *et. al*., 2017).

Na natureza, o problema pode ser ainda maior, já que o herbicida pode acumular nos tecidos dos organismos que vivem no fundo. Por exemplo, Contardo-Jara *et al*. (2009) relataram que tanto o glifosato puro quanto o formulado Roundup Ultra foram registrados nos tecidos de um organismo bentônico, *Lumbriculus variegatus.* A formulação Roundup Ultra foi registrada em maiores quantidades do que o glifosato, sugerindo que o surfactante presente no formulado aumenta a permeabilidade dos tecidos (CONTARDO-JARA *et al*., 2009). Aqui, apesar de se

tratar de um organismo pertencente a um grupo totalmente distinto, como as espécies de *Chironomus inquinatus t*ambém são bentônicas e se alimentam do sedimento, há a possibilidade de haver acúmulo de herbicidas nos tecidos destes organismos quando expostos à sedimentos de ambientes aquáticos contaminados.

Apesar de muitos trabalhos sugerirem que o glifosato é ambientalmente seguro, vários estudos mostram que as formulações comerciais (ex. Roundup®, Faena®) podem ser muito prejudiciais para os animais aquáticos (ANNETT *et al*, 2014). As formulações comerciais possuem, além do glifosato, surfactante, que pode ser altamente tóxico para os organismos aquáticos (ANNETT *et al*, 2014). Os nossos resultados também vão nesta direção, uma vez que o Roundup® afetou as duas espécies estudadas.

Apesar de Notonectidae sp e *Limnogonus* spp (primeiro caítulo) ocuparem compartimentos aquáticos diferentes, nectônico e pleustônico, respectivamente, os nossos resultados revelaram que os efeitos do glifosato técnico e do Roundup® sobre a sobrevivência destes organismos foram similares. Por outro lado, o efeito do Roundup® sobre a sobrevivência de Notonectidae sp. foi amplificado em concentrações maiores, concordando com os resultados obtidos para *Limnogonus aduncus* (primeiro capítulo) e discordando com os dados de *Limnogonus profugos* (primeiro capítulo). Assim como os gerrídeos, os notonectídeos possuem cutícula impermeabilizada e espiráculos protegidos por pelos hidrofóbicos, portanto, o surfactante presente no Roundup® poderia comprometer essa proteção. Além disso, os notonectídeos coletam o oxigênio da atmosfera na superfície da água e mergulham, transportando o oxigênio dentro de bolhas de ar na superfície ventral do corpo (brânquias físicas). Além da respiração, estas bolhas também permitem que este inseto controle a posição na coluna de água (NIESER e MELO, 1997). Neste sentido, os efeitos dos herbicidas à base de glifosato nestes organismos devem estar mais relacionados ao fato de que o surfactante presente na formulação comercial diminui a tensão superficial. Esta diminuição pode reduzir a proteção dos espiráculos por pelos hidrofóbicos e comprometer as bolhas de ar, isto pode impactar negativamente o mecanismo de respiração, consequentemente, aumentando a mortalidade de Notonectidae sp.

Como Notonectidae sp. é um inseto nectônico, ou seja, vive na coluna de água, nós esperávamos que esta espécie fosse mais sensível à exposição aguda do Roundup® do que as espécies que vivem na superfície da água como *Limnogonus*

spp (primeiro capítulo). Os nossos dados não confirmaram esta expectativa, uma vez que, a sensibilidade à exposição aguda dos adultos de Notonectidae sp. (CL_{50} = 0,04 mg a.e./L) ao Roundup® foi menor do que aquela de adultos de *Limnogonus* spp. (CL_{50} = 0,0023-0,0057 mg a.e./L). No caso de Notonectidae sp., além do Roundup® foram testados também a exposição aguda de glifosato técnico e AMPA. Ao contrário do esperado, esta espécie foi mais sensível à exposição aguda ao glifosato técnico (CL_{50} = 0,005 mg/L) do que ao Roundup® (CL_{50}= 0,04 mg a.e./L). Por outro lado, a espécie teve uma menor sensibilidade à exposição ao AMPA (CL_{50} = 0,14 mg/L). Os resultados de CL_{50} obtidos aqui foram menores do que aqueles observados para glifosato técnico e Roundup® em outros trabalhos (Tabela 5). Portanto, os efeitos negativos à exposição aguda de Roundup® sobre Notonectidae observados aqui podem ser considerados altos.

Em resumo, os nossos dados confirmam a hipótese de que os herbicidas à base de glifosato afetam a sobrevivência das espécies estudadas. O Roundup®, o glifosato técnico e o AMPA afetaram simultaneamente a sobrevivência de *C. inquinatus,* sugerindo que o princípio ativo, mesmo que isolado, afeta negativamente a espécie. Este resultado também confirma a hipótese de que o acúmulo no sedimento pode ser especialmente importante para os insetos bentônicos. Por outro lado, a sobrevivência de Notonectidae sp. foi mais afetada pelo Roundup®. Estes resultados suportam a hipótese que a formulação comercial, a qual possui surfactante, amplifica os efeitos negativos do herbicida.

Tabela 5. Toxicidade aguda de glifosato técnico e Roundup® em organismos aquáticos.

Espécies	Duração do teste	CL_{50} /CE_{50}	Fonte
Glifosato técnico			
Insetos			
Chironomus plumosus	48h	CE_{50} = 55 mg/L	Folmar *et* al., 1979
Crustáceo			
Daphnia magna	48h	CL_{50} = 146 mg L	Dominguéz-Cortinas *et al*., 2008
Ceriodaphnia dubia	48h	CL_{50} = 147 mg/L	Tsui e Chu, 2003
Arcati tonsa	48h	CL_{50} = 35,3 mg/L	Tsui e Chu, 2003
Rotífera			
Lecane quadridenata	48h	CL_{50} = 150 mg L^{-1}	Dominguéz-Cortinas *et al*., 2008
Peixes			
Salmo gairdneri	96h	CL_{50} = 140 mg/L	Folmar *et al*., 1979
Ictalurus punctatus	96h	CL_{50} = 130 mg/L	Folmar *et al*., 1979
Roundup®			
Inseto			
Chironomus plumosus	48h	CE_{50} = 18 mg/L	Folmar *et al*., 1979
Crustáceo			
Daphnia magna	48h	CE_{50} = 3,0 mg L	Folmar *et al*., 1979
Daphnia pulex	96h	CE50 = 25,5 mg/L	Servizi *et al*., 1987
Hyalella asteca	48h	CL_{50} = 1,5 mg L^{-1}	Tsui e Chu, 2004
Ceriodaphnia dúbia	48h	CL_{50} = 5,7 mg L^{-1}	Tsui e Chu, 2004
Arcatia tonsa	48h	CL_{50} = 1,77 mg/L	Tsui e Chu, 2003
Peixes			
Salmo gairdneri	96h	CL_{50} = 8,3 mg/L	Folmar *et al*., 1979
Ictalurus punctatus	96h	CL_{50} = 13 mg/L	Folmar *et al*., 1979

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANNETT, R.; HABIBI, H. R.and HONTELA, A.. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 5, p. 458-479, 2014.

BATTAGLIN, W. A. et al. Glyphosate, other herbicides, and transformation products in midwestern streams, **Journal of the American Water Resources Association**, v. 41, n. 2, p. 323-332, 2005.

BATTAGLIN, W. A. et al. Glyphosate and its degradation product AMPA occur frequently and widely in US soils, surface water, groundwater, and precipitation. **Journal of the American Water Resources Association**, v. 50, n. 2, p. 275-290, 2014.

BONNET, L. J. et al. Assessment of the potential toxicity of herbicides and their degradation products to nontarget cells using two Microorganisms, the bacteriaVibrio fischeri and the ciliate Tetrahymena pyriformis. **Environmental Toxicology,** v. 22, n. 1, p. 78-91, 2007.

BLASIOLI, S.; BRASCHI, I. and GESSA, C. E. The fate of herbicides in soil. In: ANDREAS KORTEKAMP (Ed.), **Herbicides and Environment.** InTech, Rijeka, Croatia, 2011,. 175-195 p. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-and-environment/the-fate-of-herbicides-in-soil>. Acesso: 13/04/2019.

CATTANEO, R. et al. Toxicological responses of Cyprinus carpio exposed to a commercial formulation containing glyphosate. **Bulletin of environmental contamination and toxicology***,* v. 87, n. 6, p. 597-602, 2011.

CONAMA. **Conselho Nacional do Meio Ambiente**.. Resolução número 357 de 17 de março de 2005. 2005

CONTARDO-JARA, V. et al. Biotransformation and antioxidant enzymes of Limnoperna fortunei detect site impact in watercourses of Córdoba, Argentina. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 72, n. 7, p. 1871-1880, 2009.

CORREIA, L. C. S; TRIVINHO-STRIXINO, S. and MICHAILOVA, P.. A new species of Chironomus Meigen (Diptera: Chironomidae: Chironominae) from polluted streams of southeastern Brazil. **Zootaxa**, v. 1130, n. 1, p. 57-68, 2006.

COUPE, R. H. et al. Fate and transport of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters of agricultural basins. **Pest management science**, v. 68, n. 1, p. 16-30, 2012.

DOMINGUEZ-CORTINAS, G. et al. Analysis of the toxicity of glyphosate and Faena® using the freshwater invertebrates Daphnia magna and Lecane quadridentata. **Toxicological and Environ Chemistry**, v. 90, n. 2, p. 377-384, 2008.

EDWARDS, W.M., TRIPLETT, G.B. and KRAMER, R.M. A watershed study of glyphosate transport in runoff. **Journal Environmental Quality**, v. 9, p. 661–665, 1980.

FERREIRA-JUNIOR, D. F. et al. Low concentrations of glyphosate-based herbicide affects the development of Chironomus xanthus. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 228, n. 10, p. 390, 2017.

FINNEY, D. J. and TATTERSFIELD, F. **Probit analysis.** Cambridge University Press; Cambridge, 1952.

GALLI, A. J. B et al. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura**. São Paulo: Monsanto do Brasil, 2005, 66pp.

GIESY, J. P.; DOBSON, S. and SOLOMON, K. R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. In: **Reviews of environmental contamination and toxicolog**, Springer, New York, NY, v. 167, p. 35–120, 2000.

GOMES, M. P. et al. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview**. Journal of experimental botany**, v. 65, n. 17, p. 4691-4703, 2014.

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 n° 4.074/2002***,* 2016. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>. Acesso: 13/04/2019.

LAJMANOVICH, Rafael C. et al. Toxicity of four herbicide formulations with glyphosate on Rhinella arenarum (Anura: Bufonidae) tadpoles: B-esterases and glutathione S-transferase inhibitors. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 60, n. 4, p. 681-689, 2011.

LEE, E. T. and WANG, J. **Statistical methods for survival data analysis**. John Wiley & Sons, 2003.

LINZ, G. M. et al. Response of invertebrates to glyphosate-induced habitat alterations in wetlands. **Wetlands**, v. 19, n. 1, p. 220-227, 1999.

MAGBANUA, F. S. et al. Individual and combined effects of fine sediment and glyphosate herbicide on invertebrate drift and insect emergence: a stream mesocosm experiment. **Freshwater Science**, v. 35, n. 1, p. 139-151, 2016.

NIESER, N. e MELO, A.. L. **Os heterópteros aquáticos de Minas Gerais**. Guia introdutório com chave de identificação para as espécies de Nepomorpha e Gerromorpha. Belo Horizonte: Ed. UFMG, 1997,180p.

ORGANISATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. **Guideline 221,** OECD, Paris, 2011.

PÉREZ, G. L.; VERA, M. S. and MIRANDA, L.. Effects of herbicide glyphosate and glyphosate-based formulations on aquatic ecosystems. In: **Herbicides and**

environment. IntechOpen, 2011. Disponível em: http://www.intechopen.com/books/herbicides-andenvironment/effects-of-herbicide-glyphosate-and-glyphosate-based-formulations-on-aquatic-ecosystems. Acesso em 13/04/2019.

POIGER, T. et al. Occurrence of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in surface waters in Switzerland determined with on-line solid phase extraction LC-MS/MS. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 2, p. 1588-1596, 2017.

POWELL, H. A.; KERBBY, N. W. and ROWELL, P. Natural tolerance of cyanobacteria to the herbicide glyphosate. **New Phytologist**, v. 119, n. 3, p. 421-426, 1991.

POWLES, S. B. Evolved glyphosate-resistant weeds around the world: lessons to be learnt. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 64, n. 4, p. 360-365, 2008.

SERVIZI, J. A., GORDON, R. W. E MARTENS, D. W. Acute toxicity of Garlon 4 and Roundup herbicides to salmon, *Daphnia* and trout**. Bulletin Environmental Contamination and Toxicology**, v. 39, p.15–22, 1987.

SOLOMON, K. and THOMPSON, D. Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 6, n. 3, p. 289-324, 2003.

SZÉKACS, A. and DARVAS, B.. Forty years with glyphosate. In: HASANEEN, M.N. (ED.), **Herbicides-properties, synthesis and control of weeds**. InTech, 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/herbicides-properties-synthesis-and-control-of-weeds/forty-years-withglyphosate>. Acesso: 13/04/2019.

TATE, T.; JACKSON, R. and CHRISTIAN, F. Effects of glyphosate and dalaponon total free amino acid profiles of *Pseudosuccinea columella* snails. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 64, p. 258–262, 2000.

TATE, T. M.; SPURLOCK, J. O. and CHRISTIAN, F. A. Effect of glyphosate on the development of *Pseudosuccinea columella* snails. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 33, p. 286-289, 1997.

TSUI, M. T. K. and CHU, L. M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere**, v. 52, n. 7, p. 1189-1197, 2003.

TSUI, M. T. K. and CHU, L. M. Comparative toxicity of glyphosate-based herbicides: aqueous and sediment porewater exposures. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, n. 3, p. 316-323, 2004.

VERA, M. S. et al. Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor® on freshwater microbial communities. **Ecotoxicology**, v. 21, n. 7, p. 1805-1816, 2012.

VILLENEUVE, A., LARROUD, E S. and HUMBERT, J.F. Herbicide contamination of freshwater ecosystems: Impacton microbial communities. In: STOYTCHEVA, M. (Ed.), *Pesticides:* **Formulations, effects, fate**. Rijeka, Croácia, 2011, 285–312 pp.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A agricultura no Brasil passou por uma grande transformação nos últimos 40 anos. Neste período, o Brasil passou de uma agricultura rudimentar para uma agricultura moderna e industrial, a qual tem aumentado a sua produtividade ano após ano. Neste processo, novos cultivares (incluindo transgênicos) foram introduzidos, técnicas de correção do solo para ambientes tropicais foram desenvolvidas, a mecanização industrial foi inserida e novas fronteiras agrícolas foram exploradas. Como consequência, áreas foram desmatadas e os pesticidas passaram a ser usados de forma indiscriminada. O problema é que, além de ser um dos principais produtores mundiais, o Brasil é o país que detém a maior biodiversidade do planeta. Por isso, é fundamental buscar estratégias para conciliar a produção agrícola com a preservação da biodiversidade, buscando um desenvolvimento mais sustentável. Certamente, o primeiro passo é tentar entender os potenciais efeitos das atividades agrícolas sobre a biodiversidade.

O surgimento de cultivares trangênicos permitiu que várias culturas tornassem-se tolerantes ao glifosato, o que obrigou os fabricantes a melhorar a eficácia do ingrediente ativo. Para isso, várias formulações comerciais foram desenvolvidas, as quais possuem, além do ingrediente ativo, surfactante, que possibilita que o glifosato seja rapidamente absorvido pela cutícula da planta e alcance diretamente o local exato onde ele atua. Assim, o glifosato tornou-se o herbicida mais utilizado em todo o mundo. Consequentemente, a probabilidade de contaminação do ambiente aquático e a exposição de espécies não alvos aumentou.

Os herbicidas à base de glifosato têm sido constantemente detectados nos ambientes aquáticos e, aqui, demonstramos que estes herbicidas podem ser altamente negativos para os animais aquáticos. Portanto, o uso de herbicidas deveria ser baseado em critérios bem definidos e acompanhados de um monitoramento constante.

Um resultado muito comum quando avaliados os efeitos de herbicidas à base de glifosato em organismos aquáticos é a amplificação dos efeitos negativos destes herbicidas quando utilizadas as formulações comerciais. Os herbicidas à base de glifosato estão atualmente disponíveis em uma ampla variedade de formulações, cada uma baseada no mesmo ingrediente ativo, mas com uma combinação única de

surfactantes, adjuvantes e outros produtos químicos, os quais não são especificados pelo fabricante, o que torna difícil avaliar os seus efeitos.

Aqui e em outros estudos, demonstramos que a sensibilidade a herbicidas à base de glifosato é dependente da espécie e do herbicida utilizado. A confirmação que os herbicidas à base de glifosato afetam animais em diferentes compartimentos aquáticos é bastante preocupante, uma vez que o Brasil é um país agrícola e que o uso de herbicidas cresce cada vez mais, podendo alcançar o ambiente aquático de diversas maneiras. Esta preocupação é ainda maior porque detectamos efeitos significativos em baixas concentrações de herbicida. Lembrando que no presente trabalho, as concentrações testadas foram baseadas em concentrações realísticas dentro de uma faixa de variação já detectada em ambientes aquáticos. Adicionalmente, o surgimento de plantas daninhas resistentes pode amplificar ainda mais o problema. Assim, novas e mais eficientes formulações são produzidas mais rapidamente do que o nosso conhecimento sobre os impactos dessas formulações sobre a biodiversidade.

Os nossos dados indicam que considerar os herbicidas à base de glifosato como seguros para os organismos não alvos sem a devida avaliação é um risco. Os nossos resultados e os da literatura mostram que os efeitos negativos dos herbicidas à base de glifosato são dependentes do grupo, da espécie, do estágio de vida e do tipo de herbicida. Portanto, generalizações como: 1) os herbicidas à base de glifosato são seguros; 2) herbicidas à base de glifosato dificilmente chegam aos ambientes aquáticos; ou 3) herbicidas à base de glifosato sem a presença de surfactantes são seguros para serem aplicados em ambientes aquáticos são perigosas e não ajudam a entender os reais efeito destes produtos nos ecossistemas aquáticos. Por exemplo, quantidades significativas de herbicidas à base de glifosato têm sido detectadas em ambientes aquáticos localizados em diferentes partes do mundo, mostrando que estes produtos têm acumulado nesses locais. Além disso, os nossos resultados mostraram que o glifosato técnico, ou seja, sem a presença do surfactante, afetou negativamente uma das espécies estudadas.

Além dos efeitos sobre as espécies, a presença de herbicidas à base de glifosato pode afetar a comunidade e os processos ecossistêmicos em ambientes aquáticos à medida que afeta os organismos produtores, o que pode influenciar indiretamente outros níveis tróficos e eliminar ou diminuir a abundância de espécies animais, incluindo espécies chaves. Diante do exposto, enfatizamos a importância

de ampliar os ensaios para testar os efeitos de herbicidas à base de glifosato considerando espécies de diferentes compartimentos aquáticos; de monitorar o uso de glifosato e a biodiversidade em regiões agrícolas e próximas à elas; e estabelecer regras claras de utilização e fiscalização efetivas. Lembramos também, que estudos futuros que avaliem os efeitos negativos de surfactantes são muito importantes para entendermos os efeitos destes produtos químicos em diferentes espécies animais. Ainda assim, o uso de pesticidas sem a presença de surfactantes deve ser controlado, uma vez que aqui e em outros estudos, o glifosato técnico afetou negativamente de forma significativa uma das espécies estudadas (capítulo 2). Assim, os impactos negativos sobre os organismos aquáticos demonstrados no presente trabalho, poderiam ser mitigados.