

Avaliação da exposição crônica de *Daphnia magna* a atrazina e glifosato

Assessment of chronic exposure of *Daphnia magna* to atrazine and glyphosate

RESUMO

A utilização de herbicidas como atrazina e glifosato, gera uma preocupação ambiental, pois esses herbicidas atingem o meio aquático e podem afetar organismos não alvo. O presente trabalho buscou avaliar os efeitos da exposição crônica do organismo *Daphnia magna* a soluções de concentrações ambientais permitidas, de produtos comerciais que contém atrazina ($2 \mu\text{g L}^{-1}$), glifosato ($65 \mu\text{g L}^{-1}$) e sua mistura ($2 + 65 \mu\text{g L}^{-1}$). Ao realizar a exposição crônica, observou-se que o parâmetro de reprodução não apresentou significância estatística ao realizar o teste de Dunnett ($p < 0,05$), porém, em relação a primípara, o teste estatístico apontou valores significantes para as amostras de glifosato e a mistura dos herbicidas, quando comparadas ao controle. Esses resultados evidenciam a importância da realização de ensaios crônicos para a obtenção de informações sobre o efeito que os compostos podem causar aos organismos aquáticos, mesmo utilizando concentrações ambientais permitidas segundo a legislação.

PALAVRAS-CHAVE: Concentração ambiental. Ecotoxicidade. Pesticidas.

ABSTRACT

The use of herbicides such as atrazine and glyphosate, generates a great environmental concern, as these herbicides affect the aquatic environment and can affect non-target organisms. The present work sought to evaluate the effects of the chronic exposure of the organism *Daphnia magna* to solutions of permitted environmental concentrations, of commercial products containing atrazine ($2 \mu\text{g L}^{-1}$), glyphosate ($65 \mu\text{g L}^{-1}$) and its mixture ($2 + 65 \mu\text{g L}^{-1}$). When performing chronic exposure, it was observed that the reproduction parameter did not show statistical significance when performing the Dunnett test ($p < 0.05$), however, in relation to primiparous, the statistical test showed significant values for the glyphosate samples and the mixture of herbicides, when compared to control. These results show the importance of carrying out chronic tests to obtain information about the effect that compounds can cause to aquatic organisms, even using environmental concentrations allowed according to the legislation.

KEYWORDS: Environmental concentration. Ecotoxicity. Pesticides.

Renan César Munhoz
renan.mhz@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

Eduarda Roberta Bordin
eduardabordin@yahoo.com.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

Wanessa Algarte Ramsdorf
wanessa6@yahoo.com.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

Adriane Martins de Freitas
afreitas_27@yahoo.com.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



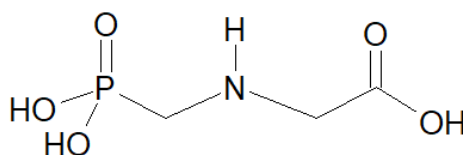
INTRODUÇÃO

Os pesticidas são a classe de contaminantes mais estudada no Brasil e no mundo devido à preocupação que esses compostos podem causar ao meio ambiente. O crescimento populacional das últimas décadas gera um aumento pela demanda de alimentos, a qual aliada a práticas modernas de cultivo, consolidam o uso de pesticidas como a principal ferramenta para garantir a proteção contra perdas na produção ou a destruição de culturas agrícolas. Há, portanto, uma disseminação de diferentes substâncias químicas desenvolvidas para atuar em conjuntos específicos de pragas (MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017).

Os herbicidas são a classe de pesticidas mais utilizadas no mercado. Quando essas formulações são aplicadas no campo agrícola, cerca de 20 a 30% da dose pulverizada não atinge a área alvo (ALONSO, et al. 2018). A dinâmica atmosférica dos herbicidas aumentam a probabilidade de serem transportados por longas distâncias, e posteriormente, devolvidos a superfície por deposição úmida ou seca, podendo também atingir os mananciais de outras formas, nas águas superficiais por meio da drenagem, escoamento, percolação lateral, e nas águas subterrâneas por erosão, deriva e volatilização (GOEL; MCCONNELL; TORRENTS, 2005; SILVA, et al. 2009).

O glifosato (figura 1) é um herbicida pertencente ao grupo químico das glicinas substituídas, classificado como não seletivo e de ação sistêmica. A molécula atua na inibição da enzima 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), que é catalisadora de uma das reações de síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e clorofila, a molécula estimula a produção de etileno, reduz a síntese de proteínas e eleva a concentração do ácido indolacético (COLE, 1985)

Figura 1 – Estrutura química do glifosato.

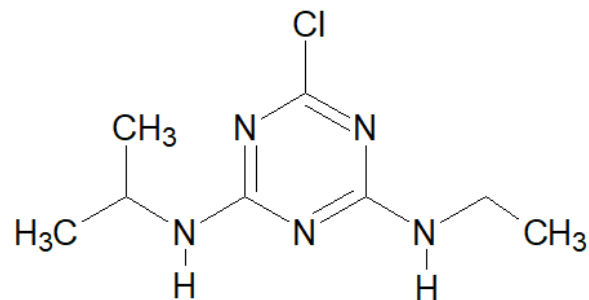


Fonte: Autoria própria (2020).

O glifosato é o princípio ativo mais vendido no Brasil. Em 2018, foram vendidas 195 mil toneladas deste herbicida. De acordo com o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), na resolução nº 357, de 17 de março de 2005, o limite do herbicida glifosato em águas doces de classe I é $65 \mu\text{g L}^{-1}$, e para águas doces de classe III, o limite é $280 \mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2005; IBAMA, 2019).

A atrazina (figura 2) é um herbicida pertencente ao grupo químico das clorotriazinas. A molécula atua como inibidor da fotossíntese, prejudicando o transporte de elétrons no local do fotossistema II (reação de Hill), evitando assim a produção de ATP e NADPH (PHYU, et al. 2011).

Figura 2 – Estrutura química da atrazina.



Fonte: Autoria própria (2020).

Em 2018, no Brasil, foram vendidas 28 mil toneladas de atrazina, tornando-a o quarto princípio ativo mais vendido do ano. De acordo com o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), na resolução nº 357, de 17 de março de 2005, o limite da concentração do herbicida atrazina em águas doces de classe I e III é de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2005; IBAMA, 2019).

Diferentes formulações comerciais desses princípios possuem diferentes tipos de compostos, entre eles os surfactantes. Esses surfactantes atuam como cossolventes e tendem a reduzir a tensão superficial do composto em que estão dissolvidas. Surfactantes são considerados ingredientes inertes e não necessitam de testes ou descrição na formulação do produto.

Considerando a interação desses compostos com o meio ambiente, a ecotoxicologia estuda os impactos deletérios de poluentes ambientais sobre populações de organismos vivos ou ecossistemas. Através do estudo de biomarcadores são obtidas respostas bioquímicas, fisiológicas ou sobre parâmetros morfológicos alterados, causados pela exposição de um organismo a uma determinada substância possivelmente tóxica (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Um dos bioindicadores utilizados em avaliações ecotoxicológicas é o microcrustáceo de água doce *Daphnia magna*, o qual possui reprodução assexuada e é sensível a uma grande gama de substâncias tóxicas. Este organismo é indicado pela Associação Brasileira de Normas e Técnicas para análise da toxicidade aguda de efluentes líquidos, apresentando um papel importante na comunidade zooplânctônica, pois compõe um elo entre os níveis tróficos inferiores e superiores da cadeia alimentar de um ecossistema (AZEVEDO; CHASIN, 2004).

Dentre os tipos de ensaios ecotoxicológicos, há os agudos e crônicos. Os ensaios agudos geram respostas imediatas e irreversíveis, pois o organismo-teste é exposto a altas concentrações da substância xenobiótica em um curto período de tempo, obtendo resultado de concentração efetiva (CE_{50}), definida como a concentração da substância capaz de causar efeito agudo em 50% dos organismos-teste. A dose letal média (DL_{50}) é outra forma de apresentar os resultados, sendo expresso em unidades de massa/massa e definido como a dose da substância xenobiótica fatal para 50% dos organismos (AZEVEDO; CHASIN, 2004; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

O ensaio crônico é realizado expondo o organismo-teste a baixas concentrações do composto químico por um período longo de tempo, podendo ser capaz de observar efeitos correspondentes ao ciclo de vida do organismo, e

possibilitando a avaliação de efeitos em gerações posteriores (AZEVEDO; CHASIN, 2004).

O ciclo de vida de *D. magna* é curto, em média 45 dias, o que permite sua utilização em ensaios crônicos, sendo possível constatar, além da mobilidade dos organismos, efeitos como a reprodução, o crescimento, a primípara (início do nascimento de filhotes), além de deformações estruturais como anomalia nos espinhos pós-anais ou garras terminais (KNIE; LOPES, 2004).

MATERIAL E MÉTODOS

Avaliou-se a primípara e a média de filhotes produzidos por réplica do organismo *D. magna* ao longo de 21 dias, sendo expostas ao controle (água de cultivo M4), as soluções dos produtos comerciais contendo atrazina e glifosato como princípios ativos (ATZ COM e GF COM) e a mistura dos produtos comerciais destes herbicidas (MIX COM). O teste crônico foi realizado seguindo as indicações da OECD (OECD, 2012).

Para a realização do ensaio crônico, utilizou-se soluções com concentração de atrazina igual a $2 \mu\text{g L}^{-1}$ e glifosato $65 \mu\text{g L}^{-1}$. As soluções estoque dos produtos comerciais utilizadas dos herbicidas atrazina (ATZ COM, formulação comercial contendo 40% do ingrediente ativo atrazina) e glifosato (GF COM, formulação comercial contendo 48% do princípio ativo glifosato) foram preparadas na concentração de 100 mg L^{-1} em água processada por osmose reversa.

Neonatos de *D. magna* de 2 a 26 horas de vida, foram expostos individualmente em béqueres contendo 40 mL das soluções anteriormente preparadas (ATZCOM, GFCOM, MIXCOM e Controle), resultando em 48 béqueres (12 réplicas para cada uma das 3 amostras e o controle).

As soluções dos béqueres eram substituídas diariamente, assim como a alimentação, que foi realizada com a adição de 0,5 mL de suspensão da alga *Desmodesmus subspicatus*, na concentração de 5×10^6 células. Após a realização da troca diária, os organismos foram acondicionados em câmara de incubação, do tipo BOD, com controle de temperatura ($20 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$) e fotoperíodo de 12 horas de luz.

A análise estatística de variância (ANOVA) foi realizada com o auxílio do software GraphPad Prism® 8.0, assim como o teste de Dunnett, que compara a significância dos valores do controle com os valores das amostras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

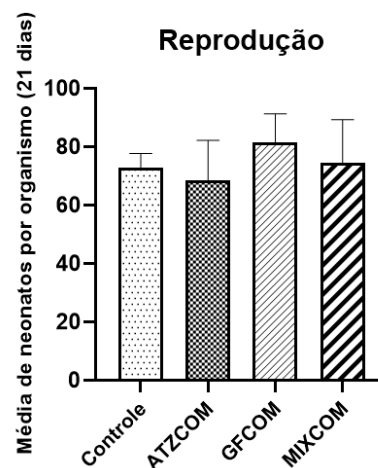
Testes de toxicidade crônica permitem avaliar os possíveis efeitos tóxicos de substâncias químicas sob condições de exposições prolongadas a concentrações subletais, ou seja, concentrações que permitem a sobrevivência dos organismos, mas que afetam suas funções biológicas, como reprodução, desenvolvimento de ovos, primípara, crescimento e maturação. Comparado aos testes agudos, essas análises são mais sensíveis à elevada diluição esperada em amostras ambientais. São, portanto, comumente utilizados quando os testes de toxicidade aguda são

insuficientes para caracterizar um efeito tóxico mensurável (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

As concentrações dos herbicidas utilizadas no presente trabalho (atrazina $2 \mu\text{g L}^{-1}$ e glifosato $65 \mu\text{g L}^{-1}$), foram escolhidas pois são as concentrações limite dos respectivos herbicidas permitidas em águas doces de classe I, de acordo com a legislação brasileira (BRASIL, 2005).

Os resultados da avaliação da reprodução do organismo *D. magna*, estão apresentados no gráfico de barras da figura 3, a qual exibe a média de neonatos gerados por *D. magna* expostas aos grupos avaliados no ensaio de exposição crônica. Ao realizar o teste de Dunnett ($p < 0,05$), que avalia e compara a significância do controle em relação as demais amostras, os resultados das amostras não se mostraram significativos em relação ao controle.

Figura 3 – Média e erro padrão de neonatos gerados pelo organismo-teste *D. magna* expostas aos grupos avaliados no ensaio de exposição crônica.



Fonte: Autoria própria (2020).

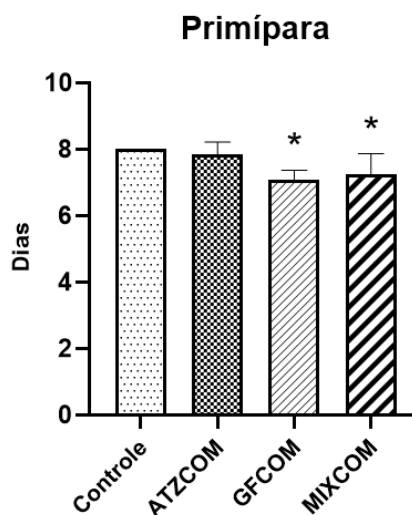
Apesar das amostras não apresentarem valores significativos, trabalhos realizados analisando a reprodução dos organismos *D. magna* utilizando o herbicida atrazina, mostra que o composto afeta a taxa de reprodução dos organismos-teste (PALMA, 2009). Assim como, o ensaio crônico realizado com a exposição do organismo-teste *Drosophila melanogaster* ao herbicida, em que mostra um aumento significativo, tanto no número de ovos, quanto no número total de descendentes gerados (MARCUS; FIUMERA, 2016).

Em estudo crônico realizado com o herbicida glifosato utilizando o organismo *Apaida veniliae*, verificou-se que não houve morte do organismo, porém observou o efeito tóxico do glifosato sobre a construção da teia, fecundidade, fertilidade e desenvolvimento da progênie, demonstrando que o herbicida traz consequências malélicas a longo prazo (BENAMÚ, 2010). Em trabalho realizado com o organismo *Danio rerio*, observou-se que após 10 dias de exposição do peixe ao glifosato, ocorreu uma menor produção de ovos em relação ao controle, e essa diminuição foi ainda mais expressiva após 21 dias, assim como um aumento na mortalidade embrionária (WEBSTER, 2019).

Ao realizar o teste de Dunnett ($p < 0,05$), em relação a primípara (período de início da produção de neonatos) dos organismos *D. magna*, observou-se que as

amostras GF COM ($65 \mu\text{g L}^{-1}$) e MIX COM (atrazina $2 \mu\text{g L}^{-1}$ e glifosato $65 \mu\text{g L}^{-1}$) apresentaram valores significativos em relação ao controle, como mostra a figura 4. Isso indica que a formulação comercial de glifosato pode gerar uma primípara precoce no organismo *D. magna*.

Figura 4 – Tempo médio para o início da produção de neonatos de *D. magna* expostas aos grupos avaliados no ensaio de exposição crônica.



Fonte: Autoria própria (2020).

Em trabalho realizado expondo de forma crônica ratas Wistar à formulação comercial de glifosato, observou-se que a massa do fígado da prole de ratos era menor em relação ao controle negativo, assim como um retardo no desenvolvimento do esqueleto fetal (RELYEA; JONES, 2009; RIEG, 2016). E em estudo realizado com girinos das espécies *Physalaemus cuvieri* e *Rhinella ictérica* expostos a um formulado comercial de glifosato, observou-se alteração morfológica e de comprimento dos girinos analisados (ALMEIDA; RODRIGUES; IMPERADOR, 2019).

CONCLUSÃO

A realização de testes mais minuciosos como o teste crônico são necessários para avaliar de forma mais conclusiva as condições de sobrevivência e reprodução dos organismos avaliados frente a compostos químicos a longo prazo. No presente estudo, ao analisar a reprodução de uma geração do organismo-teste *Daphnia magna*, nenhum valor foi significativo, entretanto, em relação a primípara (período de início da produção de neonatos), observou-se que as amostras GF COM ($65 \mu\text{g L}^{-1}$) e MIX COM (atrazina $2 \mu\text{g L}^{-1}$ e glifosato $65 \mu\text{g L}^{-1}$) apresentaram valores significativos em relação ao controle.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à UTFPR pelo suporte financeiro e à CAPES (bolsa de mestrado de Bordin, E.).

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, P. R.; RODRIGUES, M. V.; IMPERADOR, A. M. Acute toxicity (CL₅₀) and behavioral and morphological effects of a commercial formulation with glyphosate active ingredient in tadpoles of physalaemus cuvieri (anura, leptodactylidae) and rhinella icterica (Anura, Bufonidae). **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 24, n. 6, p. 1115–1125, nov. 2019. Disponível em: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-41522019000601115&tlng=pt. Acesso em: 30 agosto. 2020.
- ALONSO, L. L. et al. Glyphosate and atrazine in rainfall and soils in agroproductive areas of the pampas region in Argentina. **Science of the Total Environment**, v.645, p. 89–96, 15 dez. 2018.
- AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A. A.M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa; São Paulo, SP: InterTox, 2004.
- BENAMÚ, M. A.; SCHNEIDER, M. I.; SÁNCHEZ, N. E. Effects of the herbicide glyphosate on biological attributes of Alpaida veniliae (Araneae, Araneidae), in laboratory. **Chemosphere**. v. 78, n. 7, p. 871-876, fev. 2010.
- COLE, D. J. Mode of action of glyphosate – a literature analysis. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). The herbicide glyphosate. 1985. Londres. **Anais...** Londres: Butterworths, 1985. p. 49-54.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA nº 357**. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente, 17 mar. 2005. Assunto: Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Disponível em: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em: 30 agosto. 2020.
- GOEL, A.; MCCONNELL, L. L.; TORRENTS, A. Wet deposition of current use pesticides at a rural location on the Delmarva Peninsula: Impact of rainfall patterns and agricultural activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, n. 20, p. 7915-7924, out. 2005.
- IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e de Recursos Naturais Renováveis) Relatórios de comercialização de agrotóxicos. **Boletim 2018**. Disponível em: <http://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais>. Acesso em: 30 agosto. 2020.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B.. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações.** Florianópolis (SC): FATMA/GTZ, 2004.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta para o biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis.** Rio de Janeiro (RJ), v. 12, n. 3, p. 355-381, out. 2008.

MARCUS, S. R.; FIUMERA, A. C.; Atrazine exposure affects longevity, development time and body size in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Insect Physiology**, v. 91-92, p. 18-25, ago. 2016.

MONTAGNER, C.C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R.D. Contaminantes Emergentes em Matrizes Aquáticas do Brasil: Cenário Atual e Aspectos Analíticos, Ecotoxicológicos e Regulatórios. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1090-1110, jul. 2017. Disponível em:

https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422017000901094&lng=en&nrm=iso&tlng=pt. Acesso em: 30 agosto. 2020.

OECD, **Test Nº. 211:** Daphnia magna Reproduction Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, 2012. Disponível em:

<https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264185203-en.pdf?expires=1600518793&id=id&accname=guest&checksum=B99FA9CF023DCDCFF1180380EBAAFAB5> Acesso em: 16 set. 2020.

PALMA, P; et. al. Effects of atrazine and endosulfan sulphate on the acdysteriod system of *Daphnia magna*. **Chemosphere.** v. 74, n. 5, p. 676-681, fev. 2009.

Phyu, Y.L. et al. A comparison of mixture toxicity assessment: Examining the chronic toxicity of atrazine, permethrin and chlorothalonil in mixtures to *Ceriodaphnia cf. dubia*. **Chemosphere.** v. 85, n. 10, p. 1568–1573, nov. 2011.

RELYEA, R. A.; JONES, D. K. The toxicity of roundup original max® to 13 species of larval amphibians. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 28, n. 9, p. 2004–2008, 1 set. 2009.

RIEG, C. E. R. **Consequências da exposição materna à formulação comercial contendo glifosato nos parâmetros bioquímicos e morfológicos em fígado e sangue periférico de ratos imaturos.** 2016. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/167696/340465.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 30 agosto. 2020.

SILVA, D. R. O. et al. Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 9 p. 2383-2389, dez. 2009. Disponível em:

https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782009000900001. Acesso em: 16 set. 2020.

WEBSTER, T. M. U., et. al. Effects of glyphosate and its formulation Roundup, on reproduction in zebrafish (*Danio rerio*). **Environmental Science & Technology**. v. 48, p. 1271-1279. 2019.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática** – Princípios e Aplicações. 2. ed. Editora Rima, São Carlos, 2006.