

AVALIAÇÃO DA LETALIDADE DO HERBICIDA GLIFOSATO SOBRE O CLADOCERO *Daphnia magna*

Marta Estavas¹, Daiany Crystina Macagnan², Cristina Viana Sales³, Nyamien Yahaut Sebastien⁴.

RESUMO: O Estado do Paraná é o segundo maior produtor de soja do Brasil, só perdendo para o Estado do Mato Grosso, em virtude disto o herbicida Glifosato é amplamente utilizado, devido aos “benefícios” trazidos para o cultivo da soja transgênica. Esta pesquisa objetivou verificar a concentração letal do herbicida glifosato sobre o organismo teste *Daphnia magna*. Para tal, foram realizados quatro testes com três repetições cada utilizando as seguintes concentrações: $4,055 \times 10^{-3}$ g/L; $2,0276 \times 10^{-3}$ g/L; $8,1105 \times 10^{-4}$ g/L e $4,0552 \times 10^{-4}$ g/L de glifosato, em cada teste adicionou trinta neonatos de *Daphnia magna* com 2 á 26 horas de vida, sendo dez por repetição. Estes foram mantidos em ambiente controlado (B.O.D) durante todo período de realização do teste (48 horas). Após a realização dos testes concluiu-se que as dosagens de $2,0276 \times 10^{-3}$ g/L; $8,1105 \times 10^{-4}$ g/L e $4,0552 \times 10^{-4}$ g/L de glifosato não apresentaram problemas para as *Daphnia magna*. Sendo a concentração de $4,055 \times 10^{-3}$ g/L de glifosato deletéria para as *Daphnia magna*.

PALAVRAS-CHAVE: Microcrustáceo; Glifosato; Poluição Ambiental.

EVALUATION OF LETHALITY OF HERBICIDE GLYPHOSATE ON THE CLADOCERO *Daphnia magna*

SUMMARY: the state of Paraná is the second largest producer of soybeans in Brazil, losing only to the state of Mato Grosso, in view of this the herbicide glyphosate and widely used, due to the “benefits” brought to the cultivation of transgenic soybeans. This study aimed to determine the lethal concentration of glyphosate on the test organism *daphnia magna* to this end, four tests with three repetition each were performed using the following concentrations: $4,055 \times 10^{-3}$ g/L; $2,0276 \times 10^{-3}$ g/L; $8,1105 \times 10^{-4}$ g/L e $4,0552 \times 10^{-4}$ g/L of glyphosate, each test add thirty neonates of *Daphnia magna* with 2 to 26 hours of life with ten in each repetition. They were kept in a controlled environment (B.O.D) during the whole period of the test (48 hours). After the tests it was concluded that the dosages of $2,0276 \times 10^{-3}$ g/L; $8,1105 \times 10^{-4}$ g/L e $4,0552 \times 10^{-4}$ g/L of glyphosate did not present problems for *Daphnia magna*. With the concentration of $4,055 \times 10^{-3}$ g/L of glyphosate deleterious to *Daphnia magna*.

KEYWORDS: Microcrustacean; Glyphosate; Environmental pollution.

INTRODUÇÃO

O Estado do Paraná é o segundo maior produtor de soja do Brasil, só perdendo para o Estado do Mato Grosso (EMBRAPA, 2009), a cidade de Toledo está colocada em 3º neste ranking com uma produção de 215 mil toneladas (PREFEITURA DE TOLEDO, 2010). Devido à

¹Especialista, Bióloga, Pesquisadora, UNIOESTE, Campus de Toledo, Toledo, PR, estavisqui@hotmail.com.

²Mestranda em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, Pesquisadora, UNIOESTE, Campus Toledo, Toledo, PR.

³Mestranda em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, UNIOESTE, Campus de Toledo, Toledo, PR.

⁴Doutor em Ciências Ambientais, Eng. De Pesca, prof. Adjunto CECE, UNIOESTE, Campus de Toledo, Toledo, PR.

alta demanda de alimento os produtores hoje visam maior produção e com isso o uso de pesticidas para controle de pragas e ervas daninhas aumentaram consideravelmente.

Com o aparecimento dos transgênicos, que são resistentes a herbicidas, o uso de glifosato se tornou indispensável à agricultura e seu consumo elevou-se significativamente, o mesmo, apresenta grande ação na eliminação de ervas daninhas, e utilizado em áreas agrícolas por todo mundo. O herbicida Polaris® e composto por Sal de Isopropilamina de glifosato, equivalente ácido N *phosphonomethyl glycine*, o seu nível de toxicidade e classificado III – perigoso ao meio ambiente (DU PONT, 2010). O glifosato é um produto não seletivo, sistêmico e pós-emergente (AMARANTE E SANTOS, 2002).

Em levantamento realizado por Pinheiro e Rosa (2008), verificou-se que em relação aos organismos aquáticos 47% dos herbicidas apresentaram risco baixo ou muito baixo para degradação das águas superficiais, no entanto, outros 19% foram classificados como risco alto ou muito alto.

Os pesticidas consistem em um agente deletério a muitos animais terrestres e aquáticos, bem como, para o meio ambiente em geral. A contaminação dos solos tornou-se um grave problema ambiental já que as pessoas utilizam estes de forma indiscriminada e irracional. Por ficarem aderidas às partículas de solo, esses agroquímicos podem ser facilmente transportados aos corpos d'água, através da lixiviação ou escoamento superficial, o que acarreta no aumento da extensão da poluição (RISSI et al, 2008).

A ecotoxicologia revela os efeitos agudos e crônicos produzidos por substâncias químicas utilizando matéria viva nos ensaios (KNIE E LOPES, 2004).

Os testes de toxicidade com organismos têm sido muito utilizados como complementando as análises físico-químicas. Através desses ensaios, podem-se estabelecer padrões que permitam identificar problemas de lançamento de misturas de substâncias tóxicas, estabelecer prioridades de controle em regiões críticas, viabilizar as ações corretivas, bem como monitorar o ecossistema aquático (CÉSAR, SILVA E SANTOS, 1997).

O teste de toxicidade aguda e um dos testes mais usados, pois, apresenta rápido resultado para estudo de compostos letais, este também é realizado em 48 horas, ao contrario do teste crônico que necessita de 21 dias para sua realização, o mesmo fornece dados importantes da ação de determinadas substâncias no organismo teste escolhido (KNIE E LOPES, 2004). Segundo os mesmo autores estes testes podem ser realizados não somente com *Daphnia* sp. mas com, peixes (*Danio rerio*), Algas (*Scenedesmus subspicatus*) ou fotobactérias (*Vibrio fischeri*).

Os Cladocera popularmente conhecidos como pulgas d' água são uns dos grupos mais característicos de águas doces (TAVARES E ROCHA, 2003). Dentre eles se destaca as *Daphnia* sp para o uso em testes ecotoxicológico pela sua praticidade, sensibilidade e reprodutibilidade (KNIE E LOPES, 2004). Para o desenvolvimento desta pesquisa foi escolhido como organismo teste o microcrustáceo *Daphnia magna*, pois, além de suas vantagens, obtemos um cultivo destes organismos.

As atividades humanas introduzem diferentes compostos químicos no ambiente aquático em quantidades excessivas, estas podem ser introduzidas acidentalmente, por descarte de esgoto e/ ou escoamento superficial (BACKHAUS et al, 2003).

Devido ao grande uso do herbicida glifosato na nossa região fez-se necessário um estudo da ação deste, para verificar os possíveis efeitos do mesmo na comunidade aquática. O presente estudo objetivou verificar a concentração letal do herbicida glifosato sobre o organismo teste *Daphnia magna*.

MATERIAL E MÉTODOS

MICROORGANISMO E MEIO DE CULTIVO

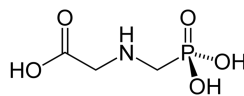
Neste estudo utilizou-se neonatos de *Daphnia magna* (Figura 1) de 2 a 26 horas de idade cultivadas no Laboratório de Ecotecnologia e Biomanipulação - Centro de Piscicultura e Aqüicultura Ambiental (CPAA).



Figura 1. Cultivo de *Daphnia magna*.

Estas foram cultivadas em água de poço artesiano e receberam como única fonte de alimento a microalga *Scenedesmus* sp. cultivada no laboratório de ficologia do CPAA, uma vez ao dia.

METODOLOGIA DO TESTE



O glifosato de fórmula (C₃H₈NO₅P) e de massa molar 168,97 g é um herbicida utilizado para a erradicação de plantas perenes nas plantações de soja. Para a realização dos testes utilizou-se o herbicida Polaris® (glifosato a 48%) sendo 81,1 g a cada 100 ml. As fêmeas adultas de *Daphnia magna* foram separadas um dia antes da realização do teste, estas foram colocadas individualmente em erlenmeyers e alimentadas com 0,5mL da microalga *Scenedesmus* sp apenas uma vez (Figura 2), para os testes foram utilizados neonatos de 2 a 26 horas de vida. Foram realizados quatro testes e um controle com 3 repetições cada.

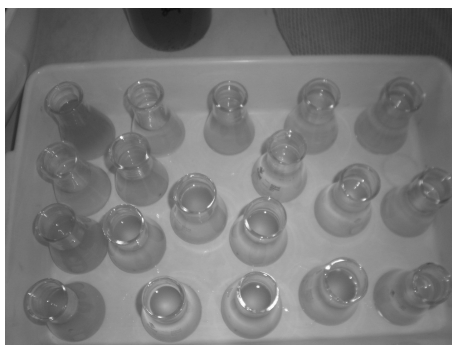


Figura 2. Daphnias magnas adultas separadas para isolamento dos neonatos.

Com o auxílio de uma proveta, balões volumétricos e uma pipeta foram realizadas as diluições para cada teste (Figura 3). O primeiro teste foi realizado com 0,005mL sendo uma concentração de $4,055 \times 10^{-3}$ g/L de glifosato; No segundo teste utilizou-se 0,0025 mL de glifosato sendo $2,0276 \times 10^{-3}$ g/L; No terceiro teste utilizou-se 0,0010 mL de glifosato sendo $8,1105 \times 10^{-4}$ g/L; No quarto teste utilizou-se 0,0005 mL sendo $4,0552 \times 10^{-4}$ g/L de glifosato e um teste controle com 200 mL de água de cultivo.



Figura 3. Preparação das soluções-teste.

Os testes foram colocados em béqueres de 250 mL, com aproximadamente 200 mL da solução teste em cada, o pH das amostras foram 7,64; 7,69; 7,71 e 7,59 e Oxigênio Dissolvido (OD) 4,92; 4,93; 4,93 e 4,94 mg/L respectivamente para cada tratamento. Com o auxílio de uma pipeta de vidro foram colocados 30 organismos por teste, sendo, 10 organismos por becker. Os béqueres foram cobertos com filme PVC para evitar a evaporação e contaminação, estes foram acondicionados em germinadora aclimatizada com temperatura constante de 20°C, com fotoperíodo de 12 horas luz/ 12 horas escuro, com intensidade luminosa de 2.660 lux e sem alimentação (Figura 4 e 5).



repetições.

Figura 4. D.B.O com os testes.

Figura 5. Testes e suas

ANÁLISES DOS DADOS

Após o período de teste (48 horas), calculou-se a porcentagem de organismos imóveis por teste (Tabela 1), através da verificação da perda ou não da capacidade natatória dos neonatos quando expostos as diferentes concentrações de glifosato.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos do glifosato e suas formulações sobre diferentes organismos aquáticos vem sendo estudados, observando que há diferentes graus de toxicidade, verificou-se que os nomeados “produtos inertes” do herbicida Roundup é mais tóxico para todos organismos aquáticos que seu principio ativo o glifosato (TSUI E CHU, 2003; PEIXOTO, 2005; BENACHOUR E SÉRALINI, 2009).

Um estudo realizado por Peixoto (2005) provou a diferença entre o composto ativo Glifosato e o produto Roundup, neste, ele analisou a capacidade desses agentes de cruzarem a membrana lipídica de ratos, verificando que o glifosato foi incapaz de cruzar esta membrana, já o herbicida Roundup teve esta capacidade comprovada afetando assim os estágios mitocôndriais e da respiração.

O efeito deletério causado no organismo-teste (*Daphnia magna*) depois de exposto ao herbicida glifosato por 48 horas em diferentes concentrações pode ser verificado na tabela abaixo:

Tabela 1. Apresenta a concentração de cada teste, a média de neonatos imóveis por teste e a porcentagem média imóvel por teste.

TESTES g/L	NEONATOS IMÓVEIS			MÉDIA	%
	R1	R2	R3		
4,0550 x 10 ⁻³ g	10	10	10	10	100
2,0276 x 10 ⁻³ g	5	1	0	2	20
8,1105 x 10 ⁻⁴ g	0	0	0	0	0
4,0552x 10 ⁻⁴ g	0	0	0	0	0

Pode-se verificar o efeito deletério em 100% de toda amostra/ repetição, expostos á concentração de 4,055 x 10⁻³g/L de glifosato. Houve também 20% de morte na concentração de 2,0276 x 10⁻³g/L e nenhuma morte nas concentrações de 8,1105 x 10⁻⁴g/L e 4,0552x 10⁻⁴g/L.

Observou-se que na concentração de 4,055 x 10⁻³g/L o herbicida Glifosato (Polaris®) teve efeito deletério sobre organismo-teste estudado, pode-se, ainda observar uma alteração morfológica do mesmo (Figura 6). Indicando assim que concentrações iguais ou maiores que 4,055 x 10⁻³g/L de glifosato são deletéria para *Daphnia magna*.

Dos 20% de mortos observados no teste com concentração de 2,0276 x 10⁻³g/L, verificou-se que 83,33% eram de uma única repetição, o que sugere algum problema na manipulação dos organismos-teste.

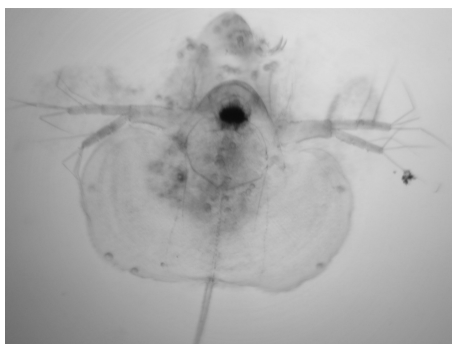


Figura 6. *Daphnia magna* exposta a $4,055 \times 10^{-3}$ g/L de glifosato.

Verificou-se também que as concentrações iguais ou menores que $8,1105 \times 10^{-4}$ g/L e $4,0552 \times 10^{-4}$ g/L deste composto (Polaris® - Glifosato) não teve efeito deletério sobre microcrustáceo *Daphnia magna* (Figura 7), mas, estudos quanto aos efeitos fisiológicos e estruturais devem ser realizados para verificar o efeito do herbicida a longo prazo.



Figura 7. *Daphnia magna* exposta a $4,055 \times 10^{-3}$ g de glifosato.

Em estudo realizado por Haughton et al (2001) foi observado que o herbicida glifosato afeta o habitat da aranha diminuindo assim sua população por falta da vegetação, mas teve efeito inofensivo sobre aranha (*Lepthyphantes tenuis*). Os mesmos verificaram que estes efeitos variam conforme a espécie de aranha e também e diferente para outros grupos de invertebrados. O mesmo foi observado por Bell et al (2002), em estudo sobre comunidade de aranhas.

Achiorno et al (2008), verificaram que larvas de *Chordodes nobilii* expostas a uma dosagem de $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ de glifosato perderam 50% da sua capacidade de infectibilidade, já adultos de *Chordodes nobilii* expostos a uma concentração de $1,76 \text{ mg l}^{-1}$ apresentaram 50% de mortos. Os mesmos autores enfatizam que algumas das concentrações de glifosato a que estes organismos foram expostos são bem menores que as permitidas em água doce pela legislação ($0,24 \text{ mg l}^{-1}$).

Albinati et al (2007) em estudo realizado com o peixe Piauçu (*Leporinus macrocephalus*) verificaram que quando expostos a concentrações de 6,67 e 13,33 ppm de glifosato apresentaram problemas hepáticos.

Em estudo realizado por Jiraungkoorskul et al (2002) com tilápia (*Oreochromis niloticus*) constataram que estes quando expostos a concentrações de glifosato no valor de 36 ppm apresentaram diversos problemas renais.

Em trabalho realizado Gluszczak et al (2005) verificaram que o glifosato tem efeito sobre o declínio da atividade da Acetylcholinesterase no cérebro, bem como, de alguns parâmetros metabólicos e hematológicos do peixe piava (*Leporinus Obtusidens*), podendo assim este, ser utilizado como indicador de contaminação por herbicida.

Comstock et al (2007), verificaram o efeito tóxico do glifosato (Roundup) em estudo realizado com larvas de anfíbio (*Rana sylvatica*).

Resultados positivos ao efeito tóxico do herbicida glifosato também foram encontrados por Schneider et al (2009), onde verificaram os efeitos destes sobre a fertilidade, desenvolvimento e demografia do artropode (*Chrysoperla externa*), observaram que o glifosato diminuiu a longevidade, afetou a fecundidade e a fertilidade, ocorrendo também, o aparecimento de má formações e anormalidades.

Resultados semelhantes foram encontrados por Benamú et al (2010), onde verificaram o efeito tóxico do glifosato sobre a construção da teia, alimentação, fecundidade, fertilidade e desenvolvimento da progênie da aranha *Alpaida veniliae*.

Um estudo realizado por Peixoto (2005) provou a diferença entre o composto ativo Glifosato e o produto Roundup, neste, ele analisou a capacidade desses agentes de cruzarem a membrana lipídica de ratos, verificando que o glifosato foi incapaz de cruzar esta membrana, já o herbicida Roundup teve esta capacidade comprovada afetando assim os estágios mitocondriais e da respiração.

CONCLUSÃO

Conclui-se que as concentrações de $2,0276 \times 10^{-3}$ g/L; $8,1105 \times 10^{-4}$ g/L e $4,0552 \times 10^{-4}$ g/L de glifosato não apresentaram problemas para as *Daphnia magna*. Sendo a concentração de $4,055 \times 10^{-3}$ g/L de glifosato deletéria para as mesmas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHIORNO, C. L.; VILLALOBOS, C.; FERRARI, L. Toxicity of the herbicide glyphosate to *Chordodes nobilii* (Gordiida, Nematomorpha). **Chemosphere** (71) 1816 – 1822, 2008.

ALBINATI, A. C. L.; MOREIRA, E. L. T.; ALBINATI, R. C. B.; CARVALHO, J. V.; SANTOS, G. B.; LIRA, A. D. Toxicidade aguda do herbicida Roundup® para piauçu (*Leporinus macrocephalus*). **Revista Brasileira de Saúde**, Prod. An., v.8, n.3, p. 184-192, jul/set, 2007.

AMARANTE, O.P; SANTOS, T.C. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, São Paulo – SP. v.25, n.4, jul/ago. 2002.

BACKHAUS, T.; ALTENBURGER, R.; ARRHENIUS, A.; BLANCK, H.; FAUST, M.; FINIZIO, A.; GRAMATICA, P.; GROTE, M.; JUNGHANS, M.; MEYER, W.; PAVAN, M.; PORSBRING, T.; SCHOLZE, M.; TODESCHINI, R.; VIGHI, M.; WALTER, H.; GRIMME, L. H. The BEAM – Project: prediction and assessment of mixture toxicities in the aquatic environment. **Continental Shelf Research** (23), 1757 – 1769, 2003.

BENACHOUR, N.; SÉRALINI, G. E. Glyphosate Formulations Induce Apoptosis and Necrosis in Human Umbilical, Embryonic, and Placental Cells. **Chem. Res. Toxicol.** (22), 97 – 105, 2009.

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** (78) 871 – 876, 2010.

BELL, J. R.; HAUGHTON, A. J.; BOATMAN, N. D.; WILCOX, A. Do Incremental Increases of the Herbicide Glyphosate Have Indirect Consequences for Spider Communities?. **The Journal of Arachnology** (30), 288 – 297, 2002.

CESAR, A.; SILVA, S.R.L.; SANTOS, A. R. Testes de Toxicidade Aquática no Controle da Poluição. São Paulo: Santos, 4º Ed. 1997.

COMSTOCK, B. A.; SPRINKLE, S. L.; SMITH, G. R. Acute toxic effects of Round-up herbicide on wood frog tadpoles (*Rana sylvatica*). **Journal of Freshwater Ecology** (22), 705 – 708, 2007.

DU PONT. CHEMICAL PRODUCT AND COMPANY IDENTIFICATION. Disponível em: < http://www2.dupont.com/Crop_Protection/en_CA/assets/downloads/Polaris_29479_E_MSDS_0110.pdf >. Acesso em: 16/03/2010.

EMBRAPA. Soja em Números Safra de 2008/2009. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index.php?cod_pai=16&op_page=294>. Acesso em: 15.03.2010.

GLUSCZAK, L.; MIRON, D. S.; CRESTANI, M.; FONSECA, M. B.; PEDRON, F. A.; DUARTE, M. F.; VIEIRA, V. L. P. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety** (62), 237 – 241, 2005.

HAUGHTON, A. J.; BELL, J. R.; WILCOX, A.; BOATMAN, N. D. The effect of the herbicide glyphosate on non-target spiders: Part I. Direct effects on *Lepthyphantes tenuis* under laboratory conditions. Society of Chemical Industry. **Pest Management Science**, 2001.

HAUGHTON, A. J.; BELL, J. R.; WILCOX, A.; BOATMAN, N. D. The effect of the herbicide glyphosate on non-target spiders: Part II. Indirect effects on *Lepthyphantes tenuis* in field margins. Society of Chemical Industry. **Pest Management Science**, 2001.

JIRAUNGKOORSKUL, W.; UPATHAM, E. S.; KRUAETRACHUEA, M.; SAHAPHONGC, S.; VICHASRI-GRAMSA, S.; POKETHITIYOOKA, P. Histopathological Effects of Roundup, a Glyphosate Herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **ScienceAsia** (28), 121-127, 2002.

PEIXOTO, F. Comparative effects of the Roundup and Glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation. **Chemosphere** (61) 1115 - 1122, 2005.

PREFEITURA MUNICIPAL DE TOLEDO. Disponível em: < <http://www.toledo.pr.gov.br/?q=portal/meio-ambiente/sobre-o-conselho> >. Acesso em: 17/03/2010.

KNIE, J. L. M.; LOPES, E.W.B. Testes Ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. FATMA/GTZ, 2004.

PINHEIRO, A.; ROSA, F.C. **Classificação dos Pesticidas Usados na Bacia Hidrográfica do Itajaí (SC) Quanto ao Risco de Degradação dos Recursos Hídricos.** Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente, Curitiba, v. 18, p. 45-58, jan./dez. 2008

RISSI, T. A.; RODRIGUES-PINTO, M.; CAVALCANTE, N. O.; GODDOY, E. F.; ALMEIDA, G.; ATTILI-ANGELIS, D. Teste Ecotoxicológico Antes a Após a Mineralização dos Compostos Glifosato, Cihexatina e Cipermetrina, Utilizando o Organismo-Teste *Daphnia similis*. Disponível em: < <http://cecemca.rc.unesp.br/ojs/index.php/holos/article/viewFile/1528/1417> >. Acesso em: 15/03/2010.

SCHNEIDER, M. I.; SANCHEZ, N.; PINEDA, S. ; CHI, H. ; RONCO, A. Impact of glyphosate on the development, fertility and demography of *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae): Ecological approach. **Chemosphere** (76) 1451 - 1455, 2009.

TAVARES, L. H. S.; ROCHA, O. Produção de Plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para Alimentação de Organismos Aquáticos. São Carlos, RiMa, 2003.

TSUI, M. T. K.; CHU, L. M. Aquatic toxicity of glyposate based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. **Chemosphere** (52) 1189 – 1197, 2003.