

## Acta Iguazu

ISSN: 2316-4093

### Avaliação da mortalidade e reprodução de *Daphnia magna* submetida ao herbicida Glifosato

Édela Marisa Santos Boufleuer<sup>1</sup>, Cristiana Rocker<sup>1</sup>, Rosineide Daleaste<sup>2</sup>, Nyamien Yahaut Sebastien<sup>1</sup>, Silvia Maccari Petrikoski<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais – Nível Mestrado, Toledo – PR.

<sup>2</sup>Secretaria Municipal de Educação, Matelândia - PR.

<sup>3</sup>Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, Programa de Pós Graduação em Engenharia de Energia na Agricultura – Nível Mestrado, Cascavel - PR.  
E-mail: edelaboufleuer@hotmail.com

**RESUMO:** A preocupação com o uso excessivo de agrotóxicos próximo a corpos hídricos é crescente, pois sua contaminação causa desequilíbrio nos ambientes aquáticos e em consequência aos organismos desses habitats. O herbicida glifosato por apresentar baixa toxicidade ao ser humano é um dos agrotóxicos mais utilizados e tem um amplo espectro. Nesse sentido o trabalho teve como objetivo estimar a concentração letal 50% do herbicida glifosato sobre o microcrustáceo *Daphnia magna* por meio do teste agudo e avaliar a consequência da concentração letal e subletais sobre a reprodução, através do teste crônico. Com uma solução estoque do glifosato 48%, definiu-se as concentrações 0,4217 mg/L; 1,2652 mg/L; 2,1087 mg/L; 2,9522 mg/L e 3,7957 mg/L. O teste agudo, apresentou como concentração efetiva (CE<sub>50</sub>) de 2,1087 mg/L no período de 48h, já o teste crônico demonstrou problemas na reprodução dos organismos-teste. Desta forma o experimento permitiu identificar a concentração limitante para sobrevivência e reprodução das *Daphnia magna*.

**Palavras-chave:** Agrotóxico, toxicidade, ambientes aquáticos.

### Assessment of mortality and reproduction of *Daphnia magna* subjected to the herbicide Glyphosate

**Abstract:** The concern with the overuse of pesticides near water bodies is growing, because its cause contamination in aquatic environments and imbalance as a result of these organisms habitats. The herbicide glyphosate due to low toxicity to humans is one of the most widely used pesticides and has a broad spectrum. In this sense the work aimed to estimate the 50% lethal concentration of the herbicide glyphosate on *Daphnia magna*

microcrustáceo through the acute test and evaluate the effect of sublethal and lethal concentration on playing through the chronic test. With a stock solution of glyphosate 48%, defined 0.4217 concentrations mg/L; 1.2652 mg/L; 2.1087 mg/L; 2.9522 mg/L and 3.7957 mg/L. The acute test, presented as effective concentration (Ec50) of 2.1087 mg/L within 48 hours, already the chronic test showed problems in reproduction of organisms-test. In this way the experiment identified the limiting concentration for survival and reproduction of *Daphnia magna*.

**Keywords:** Pesticides, toxicity, aquatic environments.

### Introdução

O uso constante de herbicidas na agricultura, principalmente quando desenvolvida próxima à corpos hídricos, vem ocasionando preocupação pela alta contaminação (BRITTO et al., 2012). Os agrotóxicos podem atingir os mananciais de diversas formas, nas águas superficiais por meio da drenagem, escoamento, percolação lateral e nas águas subterrâneas por erosão, deriva e volatilização (SILVA et al., 2009).

Segundo Olivi e Costa (2008), os contaminantes químicos podem estar presentes na água, sedimentos e alimentos e quando absorvidos podem causar efeitos deletérios em organismos aquáticos à medida que os níveis são elevados.

O glifosato por apresentar baixa toxicidade aos seres humanos é um agrotóxico amplamente utilizado (NETO, 2009). Ainda de acordo com o autor, o glifosato [N-(Fosfonometil) glicina] é um herbicida pós-emergente, altamente efetivo, não seletivo e largamente utilizado na agricultura mundial.

A adoção de mecanismos para monitoramento da qualidade da água são imprescindíveis para mitigação de possíveis impactos ambientais causados pelo uso de agrotóxicos. Os testes de toxicidade permitem avaliar a qualidade da água e estimam a toxicidade de determinadas substâncias de forma específica e controlada (OLIVI e COSTA, 2008), além de estabelecer em quais circunstâncias essa exposição de riscos podem causar efeitos prejudiciais (SILVA, 2013).

O microcrustáceo de água doce, *Daphnia magna*, é amplamente utilizado como organismo-teste para ensaios toxicológicos. Nestes testes o organismo é submetido a uma ou mais substâncias para avaliar os efeitos letais e/ou subletais (LAITANO e MATIAS, 2006).

Como o uso abusivo de agrotóxicos vem aumentando, e ainda são poucos os estudos que identificam os efeitos que causam sobre a biota (SIMIONI, 2013), este trabalho teve por objetivo estimar a concentração letal do herbicida glifosato em *Daphnia magna* por meio do

teste agudo e avaliar a consequência da concentração letal e subletais sobre a reprodução a partir do teste crônico.

### Material e métodos

O experimento foi desenvolvido no laboratório de Limnologia, Ecotoxicologia e Biomanipulação (LEB) do Instituto de Pesquisa em Aquicultura Ambiental (InPAA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus Toledo/PR, seguindo o protocolo descrito pela NBR/ABNT (2004). Para realização dos testes de toxicidade utilizou-se o herbicida Polaris@ (glifosato a 48%).

Para os testes agudo e crônico, foram utilizadas neonatas de *Daphnia magna* com até 26 horas de idade, reproduzidas de fêmeas adultas entre 10 a 60 dias, cultivadas em meio de cultivo básico/M4 com pH de 7,86 e dureza total ( $\text{CaCO}_3/\text{L}$ ) de 212,58 mg/L, mantidas em ambiente controlado, com 12 horas de fotoperíodo em incubadora (BOD).

#### *Teste Agudo*

No teste agudo, 30 neonatas foram expostas a cinco concentrações do herbicida por um período de 48 horas. 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 de 65  $\mu\text{g/L}$ , e para águas doces de classe III, o limite é 280  $\mu\text{g/L}$ , por outro lado a Fundação Nacional da Saúde (FUNASA) na portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011, estabelece o limite de 500  $\mu\text{g/L}$  para água de consumo humano. Desta forma, a definição das concentrações testadas foi baseada em valores aproximados a esses limites.

Para tanto, preparou-se uma solução estoque a partir do glifosato 48%, em seguida, determinadas as diluições. Em recipientes descartáveis contendo 40 mL do meio de cultivo, foram preparadas as seguintes concentrações, [ ] 0,4214 mg/L; [ ] 1,2652 mg/L; [ ] 2,1087 mg/L, [ ] 2,9522 mg/L e [ ] 3,7957 mg/L. Em cada concentração utilizou-se 06 organismos-teste, em triplicata cada, todos cobertos com plástico PVC evitando a evaporação. Em seguida as neonatas foram acondicionadas em incubadora com 12 horas de fotoperíodo, sem alimentação, durante 48 horas. Concomitantemente realizou-se um controle somente com o meio de cultivo e a mesma quantidade de organismos-teste.

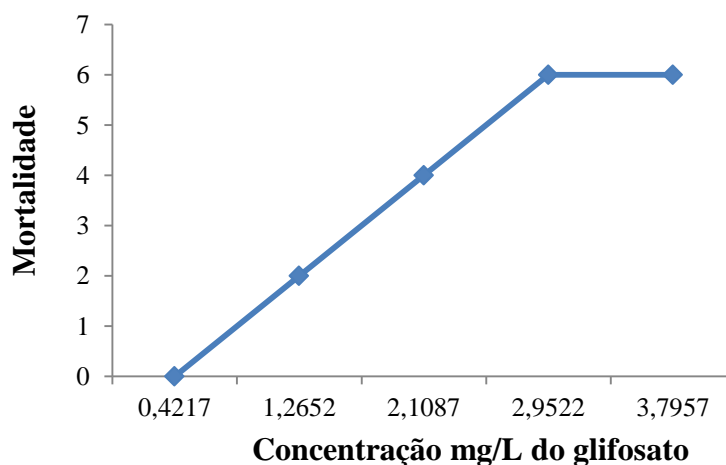
Após o período observou-se a quantidade de organismos mortos, em seguida calculada a concentração letal, utilizando o programa computacional Trimmed Sperm Karber.

### **Teste Crônico**

A partir dos resultados obtidos no teste de toxicidade agudo, realizou-se o teste crônico avaliando a exposição ao glifosato na reprodução das Daphnias ao longo do tempo. Para realização do teste crônico, utilizou-se a concentração letal 50% (2,1087 mg/L) e subletais (0,4217 mg/L; 1,2652 mg/L) preparadas seguindo o procedimento do teste agudo. Em recipientes descartáveis contendo 40 mL de meio de cultivo, utilizou-se 01 organismo-teste jovem, com 10 repetições cada, e o controle. Em seguida, as Daphnias expostas ao glifosato foram acondicionadas em estufa (BOD) com 12 horas de fotoperíodo, recebendo alimentação uma vez ao dia. A reprodução dos indivíduos foi analisada durante o período de 21 dias, sendo que a cada reprodução os filhotes eram retirados. As fêmeas que atingiram a terceira geração de filhotes, anterior ao período de 21 dias, foram descartadas.

### **Resultados e discussão**

Com a realização do teste agudo observou-se a mortalidade das Daphnias expostas a diferentes concentrações do glifosato no período de 48 horas e por meio do programa estatístico Trimmed Sperm Karber calculou-se a concentração letal 50% conforme demonstrado na Figura 1.



**Figura 1.** Mortalidade das *Daphnia magna* após 48 horas de exposição a diferentes concentrações.

A concentração letal causadora de mortalidade em até 50% dos organismos (CL<sub>50</sub>), foi de 2,1087 mg/L. Na menor concentração (0,4217 mg/L) pode-se observar a sobrevivência de 100% dos organismos após 48 horas. Conforme a portaria nº 2.914 (FUNASA, 2011), que estabelece um limite de 500 µg/L de glifosato em água para consumo humano, os resultados obtidos corroboram com a resolução, uma vez que o organismo-teste possui alta sensibilidade a perturbações no meio aquático. Já nas concentrações mais elevadas 2,9522 mg/L e 3,7957 mg/L ocorreu a mortalidade dos organismos. Na amostra controle do experimento observou-se sobrevivência de todos os indivíduos de *Daphnia magna*.

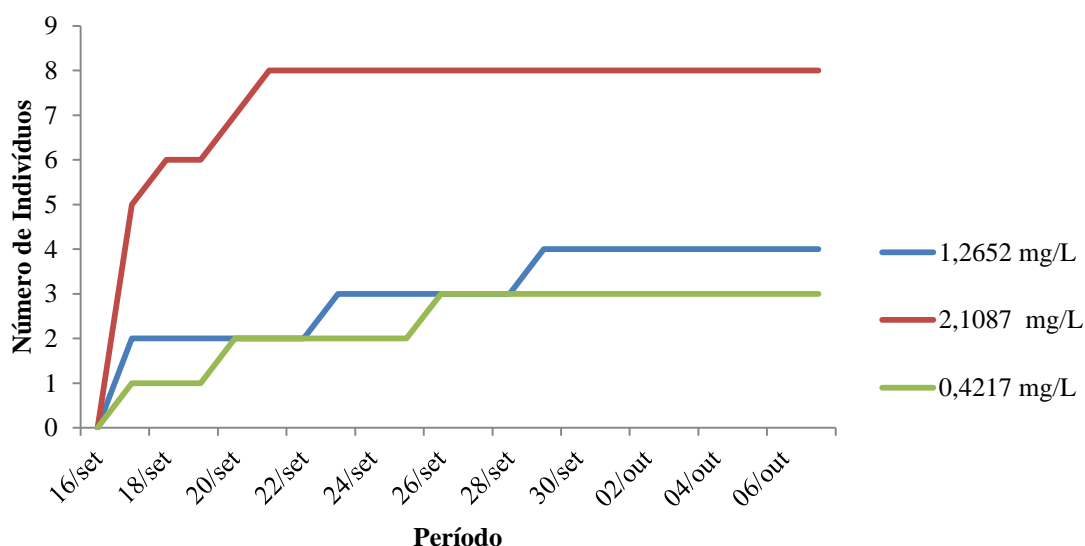
De acordo com a resolução nº 357 (CONAMA, 2005), que estabelece o limite de 65 µg/L do glifosato em águas doces de classe I e 280 µg/L para águas doces de classe III, destaca-se que as concentrações testadas estão acima dos parâmetros, por outro lado nas menores concentrações somente 20% dos organismos morreram após a exposição em 48 horas, mas acredita-se que o limite estabelecido pelo CONAMA prevê uma margem de segurança, uma vez que poucos são os estudos que evidenciam todos os efeitos que o agrotóxico possa causar sobre os organismos aquáticos. Outra hipótese pode ser estar relacionada com concentração menos tóxica do glifosato utilizado.

Outros estudos realizados avaliando a toxicidade do glifosato sobre o parasita *Chordodes nobilii*, Achiorno et al. (2008), observaram a mortalidade de 50% de adultos expostos a uma concentração de 1,76 mg/L em 96 horas e a diminuição significativa da capacidade infectante em larvas expostas diretamente a uma concentração de 0,1 mg/L, porém quando testados em embriões nenhuma das concentrações afetaram seu desenvolvimento.

Albinati et al. (2007), realizaram um estudo com peixe Piauçu (*Leporinus macrocephalus*) e verificaram que a CL<sub>50</sub>% do glifosato foi de 15,8 ppm em 96 horas, mostrando ter baixa toxicidade de acordo com as normas do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (IBAMA), mas na exposição do herbicida nas concentrações de 6,67 e 13,33 ppm os indivíduos testados apresentaram problemas hepáticos.

Estimado o valor CL50% no teste agudo, realizou-se o teste crônico para obtenção de resultados mais detalhados que refletissem o efeito da substância na reprodução dos organismos-teste ao longo do tempo das concentrações estimadas.

A concentração letal 50% e subletais desencadearam efeitos na reprodução dos organismos-teste a longo prazo, conforme demonstrado na figura 2. A mortalidade de 50% dos organismos expostos a maior concentração (2,1087 mg/L) do glifosato ocorreu nas primeiras 24 horas, sendo que a partir do 5º dia houve uma estabilização da mortalidade, porém ao término do experimento somente 02 organismos-teste sobreviveram. Na concentração 1,2652 mg/L, a mortalidade foi de 40% até o 13º dia e a partir desse período estabilizou e na menor concentração (0,4217 mg/L) a mortalidade atingiu 30% estabilizando a partir do 11º dia.

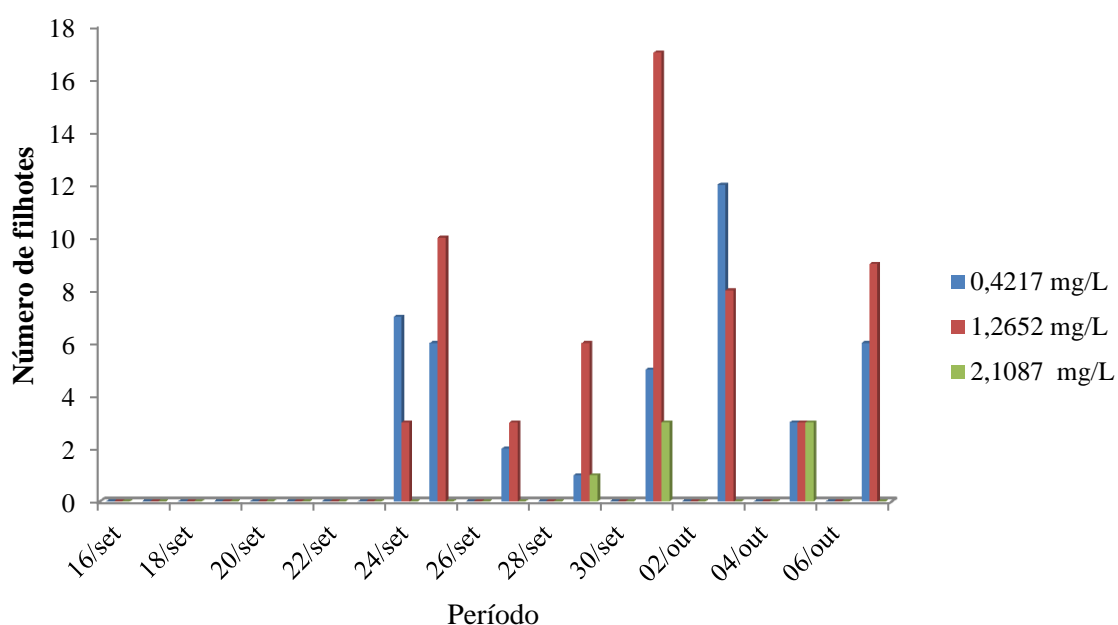


**Figura 2.** Mortalidade das *Daphnia magna* submetidas à concentração letal 50% e subletais no período de 21 dias.

Os resultados demonstraram que os organismos-testes foram afetados ao longo do período de realização do experimento e que a mortalidade predominou quando as *Daphnias* foram expostas nas concentrações mais elevadas. Com relação a reprodução, verificou-se que as fêmeas após atingirem a maturidade, iniciaram a ovulação no 8º dia do experimento e a reprodução ocorreu no 9º dia nas concentrações 0,4217 mg/L e 1,2652 mg/L. A relação de filhotes gerados pelas *Daphnias* que permaneceram vivas em cada concentração até o término do experimento está relacionada na figura 3.

O teste crônico permitiu avaliar o comprometimento do glifosato sobre a reprodução. Na concentração 2,1087 mg/L, o número de filhotes foi 07, sendo que a reprodução iniciou ao final da 2ª semana, outras por sua vez, reproduziram nas duas menores concentrações, no início da 2ª semana em mais de 50% dos organismos-teste.

Benamú et al. (2010), realizaram estudos sobre o efeito do herbicida em aranha *Apaida veniliae* e verificaram que não houve morte diretamente das aranhas, porém observou o efeito tóxico do glifosato sobre a construção da teia, alimentação, fecundidade, fertilidade e desenvolvimento da progênie, demonstrando que o herbicida traz consequências maléficas a longo prazo.



**Figura 3.** Reprodução das *Daphnia magna* submetidas à concentração letal 50% e subletais no período de 21 dias.

Um estudo avaliando a toxicidade do glifosato em girinos de anuros *Physalaemus albonotatus*, Simioni et al. (2013) verificaram que a porcentagem de mortalidade aumentava de acordo com o aumento da concentração do herbicida, corroborando com o resultado do presente trabalho. O mesmo estudo apresentou o valor do CL50% de 5,38 mg/L em 96 horas e notaram que após uma semana somente girinos do controle haviam sobrevivido, demonstrando um CL50% mais elevado do que o encontrado neste trabalho, indicando que as *Daphnias* são mais sensíveis ao glifosato que girinos de anuros.

### Considerações finais

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.

O experimento revelou que para o organismo-teste *Daphnia magna* o glifosato foi limitante para sua sobrevivência numa concentração de 2,1087 mg/L, por outro lado esta mesma concentração a longo prazo afetou o índice de reprodução, o que compromete a dinâmica desses organismos.

### Agradecimentos

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelas bolsas de mestrado concedidas.

### Referências

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

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 piaçu (*Leporinus macrocephalus*). **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 8, n. 3. 2007. p. 1840-192.

**ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713:** Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 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. 2010. p.871 – 876.

BRITTO, F. B.; VASCO, A. N.; PEREIRA, A. P. S.; JÚNIOR, A. V. M.; NOGUEIRA, L. C. Herbicidas no alto Rio Poxim, Sergipe e os riscos de contaminação dos recursos hídricos. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, 2012. p. 390-398.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE - CONAMA. 2005. **Resolução CONAMA** n° **357**. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>. Acesso em: 14 set. 2013.



MINISTÉRIO DA SAÚDE – FUNASA. 2011. **Portaria N° 2.914**. Disponível em: [http://site.sabesp.com.br/uploads/file/asabesp\\_doctos/kit\\_arsesp\\_portaria2914.pdf](http://site.sabesp.com.br/uploads/file/asabesp_doctos/kit_arsesp_portaria2914.pdf) Acesso em: 14 set. 2013.

LAITANO, K. S.; MATIAS, W. G. Teste de toxicidade com *Daphnia magna*: uma ferramenta para avaliação de um reator experimental UASB. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, v. 1, n. 1. 2006. p. 43-47.

NETO, S. A. **Degradação do herbicida glifosato e suas formulações comerciais: uma comparação entre processos eletroquímicos**. 2009. 139p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, USP, Ribeirão Preto, 2009.

OLIVI, P.; COSTA, C. R. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7. 2008. p. 1820-1830.

SILVA, D. R. O.; AVILA, L. A.; AGOSTINETTO, D.; MAGRO, T. D.; OLIVEIRA, E.; ZANELLA, R.; NOLDIN, J. A. Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 9. 2009. p.2383-2389.

SILVA, M. R.; CAMPOS A. C. E.; BOHMF. Z. Agrotóxicos e seus impactos sobre ecossistemas aquáticos continentais. **Saúde e Biologia**. v. 8, n. 2. 2013. p. 46-58.

SIMIONI, F.; SILVA, D.F.N. da; MOTT, T. Toxicity of Glyphosate on *Physalaemus albonotatus* (Steindachner, 1864) **Ecotoxicology Environmental Contamination**, v.8, n. 1. 2013. p. 55-58.

---

**Recebido para publicação em:** 16/11/2016

**Aceito para publicação em:** 18/11/2016