

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANEAMENTO,
MEIO AMBIENTE E RECURSOS HÍDRICOS

AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DO GLIFOSATO PARA
MANEJO DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS

Marina Andrada Maria

Belo Horizonte
2017

AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DO GLIFOSATO PARA MANEJO DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS

Marina Andrada Maria

Marina Andrada Maria

AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DO GLIFOSATO PARA MANEJO DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos.

Área de concentração: Meio Ambiente

Linha de pesquisa: Caracterização, prevenção e controle da poluição.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Liséte Celina Lange

Belo Horizonte
Escola de Engenharia da UFMG
2017

M332a

Maria, Marina Andrada.

Avaliação da utilização do glifosato para manejo de macrófitas aquáticas [manuscrito] / Marina Andrada Maria. - 2017. 144 f., enc.: il.

Orientadora: Liséte Celina Lange.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Apêndices: f. 122-144.

Inclui bibliografia.

1. Engenharia sanitária - Teses. 2. Meio ambiente - Teses. 3. Recursos hídricos - Teses. 4. Avaliação de riscos ambientais - Teses. 5. Herbicidas - Teses. I. Lange, Liséte Celina. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. III. Título.

CDU: 628(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Escola de Engenharia

Programa de Pós-Graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos

Avenida Antônio Carlos, 6627 - 4º andar - 31270-901 - Belo Horizonte - BRASIL

Telefone: 51 (31) 3409-1882 - posgrad@desa.ufmg.br

<http://www.smarh.eng.ufmg.br>

FOLHA DE APROVAÇÃO

Avaliação da Utilização do Glifosato Para Manejo de Macrófitas Aquáticas

MARINA ANDRADA MARIA

Tese defendida e aprovada pela banca examinadora constituída pelos Senhores:

Prof. LISETE CELINA LANGE - Orientadora

Prof. EDMARCIO VON SPERLING

Prof. JULIANA CALÁBRIA DE ARAÚJO

Prof. ARNILDO POTT

Prof. ANN HONOR MOUNTEIL

Aprovada pelo Colegiado do PG SMARH

Prof. NILÓ DE OLIVEIRA NASCIMENTO
Coordenador

Versão Final aprovada por

Prof. LISETE CELINA LANGE
Orientadora

Belo Horizonte, 10 de novembro de 2017.

“Aquilo que eu desconheço é a minha melhor parte, porque aquilo que eu ainda não sei é o meu território de renovação, é o terreno em que eu posso fazer de outro modo, em que eu posso crescer, me elevar. O que eu já sei é mera repetição.”

Clarice Lispector

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado força e sabedoria para conduzir este trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Saneamento, Meio Ambiente e Recursos Hídricos da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pela oportunidade.

A minha querida orientadora, professora Liséte Celina Lange, de quem tanto me orgulho e em quem me espelho, pelo seu eterno controle, pelo profissionalismo, pela força e pelo carinho. Obrigada por confiar em mim.

Ao Centro de Inovação e Tecnologia Senai Fiemg e ao diretor, Marcos Tannús, por permitir o uso dos laboratórios e das instalações da instituição para o desenvolvimento deste estudo.

A minha família, em especial a minha mãe, Nádia Milagres, e ao meu companheiro, Marcus Maia, pelo amor, pelo carinho e pela paciência.

Aos meus grandes amigos e parceiros que me ajudaram na condução deste trabalho, Samuel Castro, Aylton Carlos e Zenilde Viola, obrigada pelo apoio e pelas contribuições.

Aos fornecedores que apoiaram e acreditaram neste estudo: Metrohm, Abraxis, Hexis e Biolux.

Por fim, a tantas outras colegas e amigas que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço à Sylvia Meyer, Mônica Campos, Cláudia Fróes, Márcia Carneiro, Rose Miranda, Mônica Mamão e Patrícia Pimentel.

RESUMO

A possibilidade do uso de herbicidas em ecossistema aquático, para controle de macrófitas em condição de desequilíbrio, levou à necessidade de estudos que avaliem a eficiência e os impactos ambientais decorrentes desse uso. O glifosato é um dos principais princípios ativos utilizados no mundo como herbicida e é conhecido por sua eficácia, seu amplo espectro de ação e sua baixa toxicidade. Para compreender e avaliar o efeito do uso de um herbicida sobre as macrófitas, assim como o seu impacto e as alterações no ecossistema aquático, foram realizados estudos de bancada somados a microcosmos de ambientes de lagoa. Os experimentos foram conduzidos utilizando a sua formulação comercial, Roundup Original[®], para o controle das macrófitas *Eichhornia crassipes* e *Salvinia* sp. Verificou-se das doses avaliadas de 6,25 a 100 L.ha⁻¹, apenas a última apresentou diferença significativa de efeito, comparada ao controle, impedindo a rebrota e com baixo efeito residual para as duas espécies estudadas. O glifosato em amostras naturais apresenta meia-vida curta, entre 3,6 e 7,3 dias, reduzindo sua concentração mesmo em amostras refrigeradas ou congeladas, podendo ser armazenada, com o objetivo de quantificação, por no máximo quatro dias. O glifosato acarreta alterações nos parâmetros pH e condutividade e elevação da concentração dos ânions cloreto, nitrato e sulfato na água. Quando avaliada individualmente em solução, a toxicidade do padrão de glifosato, do AMPA, do Roundup e do surfactante Iharaguens[®] é alta, no entanto as amostras dos microcosmos não apresentaram toxicidade, assim como não foram evidenciados comportamentos ou resultados anômalos na avaliação ecossistêmica. Os efeitos sobre os organismos não alvo foram sutis, sem grande relevância ecológica. Não houve diferença significativa para bactérias heterotróficas, apenas indícios de uma possível seleção de cepa degradadora de glifosato. O fitoplâncton e o perifíton apresentaram redução da riqueza de espécies e diversidade e elevação da densidade de organismos, porém não significativas, e alterações na abundância relativa das famílias das espécies. O princípio ativo apresentou quociente de risco crônico de 0,66 e agudo de 0,52 para microcústáceos, que comparado ao pressuposto de risco não compromete a área e as condições avaliadas. Já a formulação comercial apresentou quociente de risco crônico de 5,06 e agudo de 2,02, o que indica risco ambiental, no entanto, a ausência de toxicidade das amostras de água dos microcosmos evidenciou que não há risco ambiental na condição avaliada. Foram identificados efeitos tóxicos em aplicações diretas em água sem cobertura de macrófitas.

Palavras-chave: Recursos hídricos; glifosato; herbicida; macrófitas; e avaliação de risco.

ABSTRACT

The possibility of using herbicides in aquatic ecosystems to control macrophytes in unbalanced conditions led to the need for studies that evaluate the efficiency and environmental impacts of this use. Glyphosate is one of the major active ingredients used worldwide as an herbicide and is known for its effectiveness, broad spectrum of action and low toxicity. In order to understand and evaluate the effect of the use of an herbicide on the macrophytes, as well as their impact and changes in the aquatic ecosystem, benchtop studies and pond environments microcosms were carried out. The experiments were conducted using their commercial formulation, Roundup Original®, for the control of macrophytes *Eichhornia crassipes* and *Salvinia* sp. The evaluated doses were from 6.25 to 100 L.ha⁻¹ only the latter showed a significant difference of effect, compared to the control, preventing regrowth and with low residual effect for the two species studied. Glyphosate in natural samples has a short half-life, ranging from 3.6 to 7.3 days, suffering reduction even in refrigerated or frozen samples, and it can be stored, for quantification purpose, for a maximum of four days. Glyphosate causes changes in the pH and conductivity parameters and increase in the concentration of chloride, nitrate and sulfate anions in the water. When evaluated individually in solution, the toxicity of glyphosate, AMPA, Roundup and Iharaguens® surfactant standard is high; however, the microcosm samples showed no toxicity and the absence of abnormal behaviors or results in the ecosystem evaluation. The effects on the non-target organisms were subtle, without great ecological relevance. There was no significant difference for heterotrophic bacteria, only indications of a possible selection of glyphosate degrading strain. The phytoplankton and the periphyton had a reduction in species richness and diversity and increase of the density of organisms, but not significant. There were also changes in the relative abundance of the families of the species. The active ingredient had a chronic risk quotient of 0.66 and acute of 0.52 for microcrustaceans, which compared to the risk assumption does not compromise the area and the conditions evaluated. The commercial formulation had a chronic risk quotient of 5.06 and an acute risk of 2.02, which indicates an environmental risk, however, the toxicity absence of water samples from the microcosms showed that there is no environmental risk in the assessed condition of application. Toxic effects were identified in direct applications in water without macrophyte coverage.

Keywords: Water resources; Glyphosate; herbicide; Macrophytes; and risk assessment.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	XI
APRESENTAÇÃO	12
OBJETIVOS.....	16
<i>CAPÍTULO 1 - Avaliação da concentração de efeito do glifosato para controle de Eichhornia crassipes e Salvinia sp.</i>	17
1 INTRODUÇÃO	18
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES	32
REFERÊNCIAS	33
<i>CAPÍTULO 2 - Avaliação das alterações físico-químicas da água causadas pela utilização de herbicida à base de glifosato para controle de Eichhornia crassipes e Salvinia sp.</i>	35
1 INTRODUÇÃO	36
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES	49
REFERÊNCIAS	50
<i>CAPÍTULO 3 - Avaliação ecotoxicológica do glifosato utilizado para controle de Eichhornia crassipes e Salvinia sp.</i>	52
1 INTRODUÇÃO	53
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES	72
REFERÊNCIAS	74
<i>CAPÍTULO 4 - Avaliação do efeito do glifosato utilizado para controle de Eichhornia crassipes e Salvinia sp. sobre organismos não alvo</i>	77
1 INTRODUÇÃO	78
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	81
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	84
4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES	94
REFERÊNCIAS	95
<i>CAPÍTULO 5 - Avaliação do risco ecológico do glifosato em água superficial quando utilizado para controle de macrófitas aquáticas flutuantes</i>	98
1 INTRODUÇÃO	99
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	102
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	107
4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES	114
REFERÊNCIAS	115
DISCUSSÃO GERAL	118
CONSIDERAÇÕES FINAIS	119
RECOMENDAÇÕES	122
APÊNDICE	124

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Caixas de berçário: <i>Salvinia</i> sp (A) e <i>Eichhornia crassipes</i> (B)	19
Figura 1.2 - Recipientes teste, <i>Salvinia</i> sp (A) e <i>E. crassipes</i> (B).....	20
Figura 1.3 - Efeito do glifosato observado em <i>Salvinia</i> sp no 20º dia de exposição	25
Figura 1.4 - Efeito observado em <i>E. crassipes</i> no 20º dia de exposição	25
Figura 1.5 - Avaliação do efeito de glifosato em <i>Salvinia</i> sp. (A) e <i>E. crassipes</i> (B) ao longo de 20 dias	26
Figura 1.6 - <i>Box plot</i> e <i>Kruskal-Wallis</i> comparando o efeito no 20º dia de exposição para <i>Salvinia</i> sp. (A) e <i>E. crassipes</i> (B).....	26
Figura 1.7 - Efeitos de glifosato observados em <i>E. crassipes</i> e <i>Salvinia</i> sp.: (A): Clorose (A), necrose (B) e degradação tecidual (C e D)	26
Figura 1.8 - Microcosmos dos experimentos-teste após 20 dias de exposição ao glifosato .	27
Figura 1.9 - Coeficiente de massa entre o início e fim do experimento (A) e Índice de tolerância (B)	27
Figura 1.10 - <i>Box plot</i> e <i>Kruskal-Wallis</i> comparando a massa fresca final dos tratamentos com glifosato em: <i>Salvinia</i> sp. (A) e <i>E. crassipes</i> (B)	28
Figura 1.11 - Efeito residual do glifosato após 30 dias de aplicação: <i>E. crassipes</i> (A) e <i>Salvinia</i> sp. (B).....	29
Figura 2.1 - Rotas de decomposição microbiológica do glifosato (AMARANTE Jr. et al., 2002)	35
Figura 2.2 - Montagem dos microcosmos	37
Figura 2.3 - Coleta e monitoramento dos microcosmos	38
Figura 2.4 - Avaliação da concentração de glifosato em amostras submetidas a diferentes temperaturas de preservação – ambiente, refrigerada e congelada.....	39
Figura 2.5 - Valores de (A) pH; (B) Condutividade; e (C) concentração de glifosato em soluções com água deionizada obtidas do padrão de glifosato e de sua formulação comercial	41
Figura 2.6 - Concentração de glifosato com o tempo dos experimentos nos microcosmos: (A) <i>Salvinia</i> sp.; e (B) <i>E. crassipes</i>	42
Figura 2.7 - Experimentos em microcosmos para controle de <i>Salvinia</i> sp. e <i>E. crassipes</i> com a aplicação de glifosato. Avaliação físico-química de: (A) pH; (B) condutividade; (C) fluoreto; (D) cloreto; (E) nitrato; (F) AMPA; (G) fosfato; (H) sulfato; e (I) glifosato.....	43
Figura 3.1 - Vista da lagoa matriz dos microcosmos	58
Figura 3.2 - Coleta de água (A), peixes (B) e sedimento (C e D).	58
Figura 3.3 - Organismos e testes indicadores: <i>D. similis</i> (A), <i>C. dubia</i> (B), <i>A. fischeri</i> (C), teste agudo (D), teste crônico (E), termociclador – Microtox (F)	59
Figura 3.4 - <i>Poecilia</i> sp. macho (A) <i>Poecilia</i> sp. fêmea (B) e <i>Danio rerio</i> (C)	60
Figura 3.5 - Tratamentos com macrófita (A) e sem macrófita (B)	61
Figura 3.6 - Tratamentos com diferentes volumes de água: (A) 2500 mL e (B) 250 mL	62
Figura 3.7 - Resultados da toxicidade crônica e aguda das substâncias testadas	64

Figura 3.8 - Diferentes fases de desenvolvimento etário de moluscos (A) e peixes (B)	66
Figura 4.1 - Fixação de lâminas para substrato de perifíton	80
Figura 4.2 - Ensaio para contagem de bactérias heterotróficas.	81
Figura 4.3 - Preparo das amostras de plâncton	81
Figura 4.4 - <i>Box-plot</i> e teste de <i>Kruskal-Wallis</i> para comparação dos resultados do ensaio de bactérias heterotróficas.....	82
Figura 4.5 - Contagem de bactérias heterotróficas: sedimento (A), água antes da aplicação (B) e na água após aplicação de glifosato (C)	83
Figura 4.6 - <i>Box-plot</i> e teste de <i>Kruskal-Wallis</i> para comparação da riqueza de espécies (A) e densidade (B) encontrada nas amostras de fitoplâncton sob aplicação de glifosato	84
Figura 4.7 - Abundância relativa das famílias de microalgas fitoplanctônicas encontradas nas amostras antes e após 20 dias da aplicação de glifosato	85
Figura 4.8 - Espécies mais abundantes das famílias Chlorophyceae e Cryptophyceae: <i>Monoraphidium</i> sp. (A) e <i>Cryptomonas</i> sp. (B), respectivamente.	86
Figura 4.9 - <i>Box-plot</i> e teste de <i>Kruskal-Wallis</i> para comparação da riqueza de espécies (A) e densidade (B) encontrada nas amostras de perifíton sob aplicação de glifosato	87
Figura 4.10 - <i>Box-plot</i> e teste de <i>Kruskal-Wallis</i> para comparação da diversidade de <i>Shannon</i> encontrada nas amostras de perifíton sob aplicação de glifosato	87
Figura 4.11 - Perifíton na folha da <i>E. crassipes</i> (A) e macrófitas do gênero <i>Lemna</i> . (B)	88
Figura 4.12 - Abundância relativa das famílias perifíton encontradas nas amostras sob aplicação de glifosato	89
Figura 4.13 - Espécies mais abundantes da família Bacillariophyceae: <i>Eunotia</i> sp. (A) <i>Achnanthes</i> sp. (B) <i>Gomphonema gracile</i> (C).	89
Figura 5.1 - Diagrama do modelo conceitual descrevendo o risco ambiental relativo ao uso de glifosato para controle de macrófitas aquáticas flutuantes	108

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Solução nutritiva de Hoagland & Arnon original	21
Tabela 1.2 - Tratamentos realizados com cada uma das espécies estudadas.....	21
Tabela 1.3 - Escala ALAM utilizada para avaliação da eficácia de controle de plantas daninhas.....	22
Tabela 2.1 - Teste de correlação de <i>Spearman</i> para parâmetros físico-químicos monitorados em microcosmos com <i>E. crassipes</i> e <i>Salvinia</i> sp. submetidos à aplicação da formulação comercial de glifosato.	46
Tabela 3.1 - Resultados ecotoxicológicos encontrados na literatura para formulações comerciais de glifosato	52
Tabela 3.2 - Resultados ecotoxicológicos de todas as substâncias testadas.....	63
Tabela 3.3 - Resultados ecotoxicológicos agudos e crônicos das amostras dos microcosmos e concentração média de glifosato por amostra.....	65
Tabela 3.4 - Resultados ecotoxicológicos agudos e crônico dos testes de sensibilidade dos organismos teste (média $\pm$ desvio padrão)	67
Tabela 3.5 - Resultados ecotoxicológicos agudos e crônico das amostras dos diferentes volumes avaliados	68
Tabela 5.1 - Propriedades físico-químicas do glifosato.....	105
Tabela 5.2 - Concentração ambiental de glifosato e AMPA quantificada dos microcosmos.....	109
Tabela 5.3 - Resultados ecotoxicológicos de todas as substâncias testadas.....	109
Tabela 5.4 - Quociente de Risco (QR) crônico e agudo para as substâncias avaliadas em diferentes organismos teste	110

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas
AMPA - Ácido aminometilfosfônico
ANA - Agência Nacional de Águas
CE(I)₅₀ - Concentração efetiva inicial mediana
CENO(I) - Concentração inicial de efeito não observado
CEO(I) - Concentração inicial de efeito observado
CI - Cromatógrafo iônico
CITSF - Centro de Inovação e Tecnologia Senai Fiemg
CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente
COPAM - Conselho Estadual de Política Ambiental
DESA - Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental
DIQUA - Diretoria de Qualidade Ambiental
EIA - Ensaio imunoenzimático
ELISA - do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
EPI - Equipamento de proteção individual
FIEMG - Federação das Indústrias de Minas Gerais
IBAMA - Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis
IT - Índice de Tolerância
Kow - Coeficiente de partição octanol-água
MMA - Ministério do Meio Ambiente
MRC - Material de referência certificado
MS - Ministério da Saúde
NMP - Número mais provável
OD - Oxigênio dissolvido
ONG - Organização não governamental
PCA - Ágar padrão de contagem
POEA - Polioxietileno amine
PROAM - Instituto Brasileiro de Proteção Ambiental
QR - Quociente de risco
SENAI - Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial
SISNAMA - Sistema Nacional do Meio Ambiente
UFC - Unidades Formadoras de Colônias
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
USEPA - do inglês *United States Environmental Protection Agency*
UT - Unidade tóxica
VC(I) - Valor crônico inicial

APRESENTAÇÃO

As macrófitas aquáticas são plantas que apresentam diferentes adaptações ao ambiente, sendo muitas vezes intencionalmente introduzidas devido à beleza de suas florações ou por sua eficiência em remover compostos da água, funcionando como filtros biológicos. A maioria delas tem crescimento fácil e reprodução clonal, o que favorece seu crescimento desordenado, principalmente em ambientes lênticos.

O controle de macrófitas em reservatórios é de grande relevância econômica, devido aos inúmeros prejuízos em diversas áreas, por exemplo, na geração de energia em várias usinas hidroelétricas. Atualmente são utilizados três métodos de controle: mecânicos, químicos, físicos e biológicos.

As medidas mecânicas de controle das macrófitas aquáticas apresentam uma grande variação de formas, desde a retirada manual até a utilização de modernas colheitadeiras com percurso orientado por satélite, adequadas às condições específicas de cada corpo hídrico ou trecho deste. O controle químico consiste na aplicação de substâncias com ação herbicida para matar ou reduzir o crescimento de uma ou mais populações que são indesejáveis naquela situação, sendo um método utilizado em vários países pelo baixo custo e rapidez de ação. Medidas físicas incluem a aplicação de barreiras/cobertura do sedimento, alterações no nível de água, uso de calor (chamas) e alterações de cor da coluna d'água. Como controle biológico é considerado toda e qualquer pressão biótica que limite o crescimento de uma determinada população, com expressiva redução do crescimento, da capacidade reprodutiva ou aumento da mortalidade de indivíduos. As pressões bióticas mais comuns utilizadas no controle biológico são a competição, o amensalismo, o parasitismo e a predação (AGEVAP, 2012).

A forma mais comum de controle é a retirada manual e mecanizada, o que gera elevado custo, com resultados nem sempre satisfatórios. Os métodos químicos são os menos aceitos pela sociedade, por utilizarem substâncias como agrotóxicos, cuja toxicidade a diferentes espécies e ao próprio homem nem sempre é inteiramente conhecida. No entanto, a utilização de herbicidas para o controle das macrófitas aquáticas invasoras pode resultar em menor investimento financeiro, menor volume de material removido e menor frequência de remoção.

Em 2008 foi iniciado um debate, em um grupo de trabalho criado no Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), para discussão da proposta apresentada pela Diretoria de Qualidade Ambiental (DIQUA/IBAMA), que dispunha sobre a pesquisa, o registro, a comercialização e a utilização de agrotóxicos em ambientes hídricos, com a expectativa de que

o Conama estabelecesse condições e critérios a serem observados nos processos de produção e na utilização desses produtos, orientando e padronizando, minimamente, a atuação dos órgãos competentes que fazem parte do Sistema Nacional do Meio Ambiente (SISNAMA).

Em 16 de julho de 2015 foi publicada a Resolução n.º 467 do Conama, que dispõe sobre os 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.

A resolução elaborada estabelece que a aplicação de agrotóxicos deve ser previamente autorizada pelo órgão ambiental estadual ou federal que detenha, em relação ao ambiente hídrico envolvido, a competência de controlar e fiscalizar o desenvolvimento de atividades potencialmente poluidoras. Além disso, deve ser apresentada a descrição do produto ou do agente de processo a ser utilizado, assim como a justificativa fundamentada da escolha, contendo o plano de aplicação, com modo de uso, dose e frequência de aplicação, a análise detalhada dos riscos da intervenção pretendida, considerando as peculiaridades do ambiente aquático, os múltiplos usos de seus recursos e direitos de outorga concedidos, como também os meios de gerenciamento desses riscos, as precauções de uso da água, as medidas de segurança e a indicação dos períodos de carência e possíveis efeitos do tratamento pretendido sobre os usos da água.

Os riscos ambiental e à saúde humana associado ao uso de herbicidas em corpos hídricos são um tema que exige atenção, portanto é fundamental o desenvolvimento de estudos aprofundados sobre os efeitos diretos e indiretos para minimizar ou evitar esses riscos, fornecendo dados seguros aos solicitantes de autorização e aos órgãos ambientais.

A possibilidade do uso de herbicidas em ecossistema aquático, para controle de macrófitas em condição de desequilíbrio, levou à necessidade de estudos que avaliem a concentração de efeito que seja eficiente e ecologicamente equilibrada, sem causar maiores impactos aos organismos não alvos e ao ecossistema aquático. O glifosato é o princípio ativo de alguns herbicidas e é conhecido por sua eficácia, seu amplo espectro de ação e sua baixa toxicidade.

A utilização de herbicidas à base de glifosato tem gerado preocupação crescente com os impactos ambientais que possam vir a ser gerados, uma vez que o conhecimento a respeito do mecanismo de resposta em ecossistemas aquáticos é limitado.

Neste estudo, primeiramente, buscou-se identificar a menor concentração de efeito para controle das espécies *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (1883) e *Salvinia* sp., macrófitas aquáticas flutuantes, de grande ocorrência no Brasil, pelo período máximo de 20 dias após a aplicação única da formulação comercial Roundup Original®.

Após a identificação da melhor concentração de efeito foram realizados estudos em microcosmos de lagoa, simulando ambientes naturais, com o intuito de responder de forma mais completa as alterações físico-químicas, ecotoxicológicas e ecossistêmicas para as comunidades de organismos não alvo e avaliar o risco ambiental.

Outros experimentos foram desenvolvidos em paralelo com os estudos em microcosmos, a fim de complementar e apoiar estes estudos, como a avaliação do tempo e a melhor condição de preservação das amostras de água para quantificação de glifosato; estudos de meia-vida do padrão de glifosato e da formulação comercial; estudos ecotoxicológicos de soluções do padrão de glifosato, da formulação comercial, do padrão de ácido aminometilfosfônico (AMPA) e de Iharaguens®, como também para avaliar o efeito ecotoxicológico tradicional e global de ambientes sem cobertura de macrófitas e com aplicação do herbicida.

Os resultados foram divididos em cinco capítulos, equivalentes aos agrupamentos realizados para divulgação deste trabalho, pensados e escritos como artigos científicos. Houve algumas repetições de conceitos, definições e metodologias, e dentro de cada tema foram reunidos todo conhecimento e os resultados gerados, conforme descrição a seguir:

- Capítulo 1 - “Avaliação da concentração de efeito do glifosato para controle de *Eichhornia crassipes* e *Salvinia* sp.” Este capítulo reúne os experimentos preliminares para definição da melhor concentração de efeito da formulação comercial Roundup Original® sobre as macrófitas aquáticas em estudo, assim como os resultados dos experimentos em microcosmos de rebrota e efeito residual.
- Capítulo 2 – “Avaliação das alterações físico-químicas causadas pela utilização de herbicida à base de glifosato para controle de *Eichhornia crassipes* e *Salvinia* sp.” Este capítulo contempla todos os resultados físico-químicos, tanto dos experimentos em microcosmos quanto dos experimentos complementares de meia-vida e da preservação de amostras para quantificação de glifosato.
- Capítulo 3 - “Avaliação ecotoxicológica do glifosato utilizado para controle de *Eichhornia crassipes* e *Salvinia* sp.” Este capítulo contempla os ensaios ecotoxicológicos tradicionais

das substâncias e produtos utilizados; das amostras dos microcosmos; das avaliações ecotoxicológicas ecossistêmicas dos microcosmos; e das avaliações complementares, para identificar a ocorrência de toxicidade em caso de aspersão do herbicida em área sem cobertura de macrófitas.

- Capítulo 4 – “Avaliação do efeito do glifosato utilizado para controle de *Eichhornia crassipes* e *Salvinia* sp. sobre organismos não alvo.” Este capítulo apresenta o monitoramento dos organismos não alvo realizado nos estudos de microcosmos, incluindo fitoplâncton, perifíton, bactérias, peixes e moluscos.
- Capítulo 5 – “Avaliação do risco ecológico do glifosato em água superficial quando utilizado para controle de macrófitas aquáticas flutuantes.” Neste capítulo estão os dados do monitoramento físico-químico dos microcosmos, inclusive a concentração ambiental máxima de glifosato e AMPA, assim como os resultados ecotoxicológicos tradicionais dos produtos estudados e da água dos microcosmos.

Considerando a necessidade de estudos a respeito da suscetibilidade dos ecossistemas aquáticos e dos efeitos de herbicidas quando aplicados diretamente em corpos d’água, o presente trabalho vem suprir as lacunas do conhecimento, avaliando o uso de herbicida à base de glifosato para o manejo eficiente de macrófitas, conjugando os efeitos desejados com os efeitos indiretos abióticos e bióticos às espécies não alvo, investigando detalhadamente diferentes níveis tróficos da comunidade biológica, os fatores físico-químicos relevantes e as condições passíveis de previsão. O objetivo foi avaliar a possibilidade de eliminação das macrófitas com o mínimo impacto possível ao meio ambiente, respeitando os mecanismos de manutenção do ecossistema, buscando a conservação dos recursos naturais e a sustentabilidade ambiental.

Os resultados desta tese poderão ajudar na definição da melhor forma de manejo ambiental nas áreas do uso de glifosato e auxiliar nas definições de padrões de aplicação, permitindo uma análise detalhada do risco dessa intervenção, buscando a conservação dos recursos naturais. Este estudo será útil na avaliação das exigências legais e poderá apoiar a decisão do órgão ambiental sobre a autorização do uso de produtos químicos para o controle de macrófitas em condição de desequilíbrio em corpos hídricos superficiais.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar o efeito do glifosato sobre o ecossistema aquático, quando utilizado para manejo de macrófitas aquáticas em corpos hídricos lânticos.

Objetivos Específicos

- Avaliar a eficiência do glifosato no controle de macrófitas aquáticas, identificando a menor concentração de efeito para *Eichhornia crassipes* e *Salvinia* sp.;
- Estudar a dispersão, o efeito residual e o tempo de residência do glifosato, associando-os às alterações físico-químicas da qualidade das águas, assim como a forma de preservação das amostras;
- Avaliar o efeito tóxico crônico e agudo do glifosato como princípio ativo, metabólito e formulação comercial, assim como de uma substância inerte (surfactante) possivelmente presente na formulação comercial;
- Avaliar alterações causadas pelo glifosato na comunidade microbiana, fitoplanctônica e perifítica, como organismos não alvo; e
- Identificar o risco ambiental associado ao uso do glifosato por aspersão para controle de macrófitas aquáticas em corpo de água.

CAPÍTULO 1

Avaliação da concentração de efeito do glifosato para controle de *Eichhornia crassipes* e *Salvinia* sp.

1 INTRODUÇÃO

Macrófitas aquáticas são vegetais visíveis a olho nu, com partes fotossinteticamente ativas, permanente, total ou parcialmente submersas em água-doce ou salobra, ou ainda flutuantes sobre a água. Entre suas principais características destacam-se: acumular biomassa, acelerar a ciclagem de nutrientes, influenciar a química da água, atuar como substrato para algas e sustentar a cadeia de detritos e de herbivoria. São importantes componentes estruturais e do metabolismo dos ecossistemas aquáticos tropicais, onde apresenta crescimento durante todo o ano, pois há regimes térmico e luminoso favoráveis. No entanto, podem apresentar intenso crescimento, o que as torna potencialmente prejudiciais aos usos múltiplos de reservatórios, por exemplo, a geração de energia e água para abastecimento público (POMPÊO, 2008).

Em condição controlada as macrófitas são importantes abrigos ecológicos, contribuindo para diversidade do habitat. No entanto, seu crescimento excessivo gera inúmeros problemas, entre os quais se destacam: impedimento da navegação, prejuízos aos esportes náuticos, obstrução ou redução do fluxo de entrada de água nas turbinas de hidrelétricas, entre outros (ESTEVES, 1998).

O controle de macrófitas em reservatórios é de grande relevância econômica, em virtude dos inúmeros prejuízos à geração de energia em várias usinas hidroelétricas, especialmente em países tropicais. No Brasil a forma mais comum de controle é a retirada manual e mecanizada, uma vez que o controle químico e biológico teve sua autorização recente (CONAMA, 2015), no entanto, o controle mecânico gera elevado custo, com resultados nem sempre satisfatórios, por permitir rebrota e recolonização a partir de fragmentos que permanecem no ambiente.

Os agrotóxicos são rigorosamente controlados quanto ao seu uso no solo, buscando sempre a minimização dos riscos de contaminação de corpo de água subterrâneo ou superficial, devido à toxicidade que podem causar a esses ambientes.

Herbicida é um grupo de agrotóxico, sendo um produto químico utilizado para o controle de ervas, normalmente na agricultura. A descrição do produto é importante, pelo fato de, hoje, haver ampla gama de herbicidas com diferentes princípios ativos e formas de ação. Nos rótulos existem dados relativos à proteção do meio ambiente, incluindo a recomendação de não contaminar a água com esse produto ou com a sua embalagem, como também de não aplicá-lo em terrenos agrícolas adjacentes às águas superficiais, relatando a possibilidade de toxicidade para organismos aquáticos

Apesar do uso de agrotóxicos específicos para ambientes aquáticos ser permitido em países como os Estados Unidos da América, sua aplicação é motivo de controvérsias em vários países europeus e no Brasil. Ainda não foi irrefutavelmente comprovada que a exposição em longo prazo a alguns herbicidas, como o utilizado no combate ao *E. crassipes*, seja inofensiva para o ambiente e à saúde humana (THOMAZ e BINI, 2003). No Brasil, o glifosato tem sido o mais utilizado e está entre os preferidos pela sua baixa toxicidade.

O glifosato é um fosfonato, uma classe de compostos que são estruturalmente similares aos organofosforados. É eliminado sem ser metabolizado, não é residual e não há evidências de que bioacumule em tecidos animais (BAIRD e CANN, 2011). Segundo Dimitrakopoulos *et al.* (2010), estudos de destino e comportamento no ambiente revelaram que o produto de degradação do glifosato é o ácido aminometil fosfônico, que também é biologicamente degradável, mas a uma taxa mais lenta do que o composto original.

É um herbicida não seletivo registrado para uso em diferentes culturas alimentares e não alimentares, bem como em áreas não agrícolas, onde o controle total da vegetação é desejado. Quando aplicado a taxas mais baixas, o glifosato é também um regulador de crescimento da planta. Ele é um dos herbicidas mais utilizados por volume. Os locais de maior uso incluem pastagem, soja e campo de milho (EPA, 1993). O glifosato possui efeito inibitório do processo de fotossíntese em plantas terrestres e aquáticas. Algumas formulações comerciais possuem, além do glifosato, surfactantes, como o chamado polioxietileno amina (POEA), que pode ser a principal causa da toxicidade aquática das formulações à base de glifosato (TSUI *et al.*, 2005). Em caso de atingir reservatórios de água destinada ao consumo humano, o glifosato é rapidamente degradado durante o processo de cloração em estações de abastecimento público de água, onde, geralmente, uma grande razão molar cloro/glifosato é usada (DIMITRAKOPOULOS *et al.*, 2010).

Um dos problemas da utilização de herbicidas para controlar macrófitas é o efeito na qualidade da água. Os grupos de herbicidas agem de forma diferente, especificamente na água, variando de acordo com a sua composição molecular (SHIOGIRI *et al.*, 2010). O glifosato pode translocar-se e se acumular nas regiões de meristema, incluindo raízes e nódulos. O glifosato que se acumula nas raízes de plantas suscetíveis é eventualmente liberado na rizosfera (MEANS *et al.* 2007).

Segundo Cruz *et al.* (2015 b), desde 2003 o uso do glifosato está autorizado nos Estados Unidos para controle de erva daninha aquática, sendo, para isso, necessário o conhecimento sobre a

dinâmica de toxicidade para os organismos não alvo, da dose segura ambientalmente e das condições de degradação em regiões neotropicais. Nos últimos anos, no Brasil, têm ocorrido debates a respeito de sua utilização em corpo de água. Sabe-se que há uma prática em uso, contudo sem critérios estabelecidos, fato que gera a necessidade de regulamentação para a minimização dos riscos.

O combate de macrófitas deve ocorrer para espécies alóctones (exóticas), uma vez que sua erradicação é desejável, para evitar prejuízos maiores aos usos dos recursos hídricos, à conservação da biodiversidade e ao meio ambiente (BRASIL, 2015).

Ao fazer o controle químico, é muito importante utilizar a menor dose que atenda aos objetivos propostos, uma vez que essas substâncias podem levar ao desencadeamento de efeitos e impactos aos organismos não alvo e ao ecossistema. A aplicação do herbicida deve ser feita por aspersão e, assim como no solo, a quantidade deve se dar em função da área de expansão, uma vez que a quantificação do volume de água e da massa de macrófitas é complexa.

Diante do exposto e da necessidade de estudos sobre a suscetibilidade das macrófitas ao controle por herbicidas, o objetivo do presente estudo foi determinar a menor dose de efeito no estabelecimento de referências para a elaboração do plano de aplicação de glifosato para o controle de plantas aquáticas flutuantes.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram avaliados indivíduos das espécies *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (1883) e *Salvinia* sp., macrófitas flutuantes invasoras de rápida proliferação e grande ocorrência no Brasil (THOMAZ e BINI, 2003). Estas espécies, com destaque para *E. crassipes*, são as de maior ocorrência em reservatórios e acarretam problemas e gastos excessivos destinados a sua remoção constante.

Os experimentos foram conduzidos em escala laboratorial, em condições controladas e isoladas, para evitar a contaminação de ambientes naturais.

2.1 Obtenção e adaptação das macrófitas

As matrizes das duas espécies foram cedidas pelo Jardim Botânico da Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte, MG, Brasil, e dispostas em caixas d'água de 500 L (altura de 0,72 m e diâmetro de 1,22 m) para estabilização e reprodução em ambiente externo e temperatura ambiente (Figura 1.1). Para compor o sedimento e fornecer nutrientes para as macrófitas, as caixas foram forradas com cerca de 20 kg de massa de terra vegetal seca, comercialmente encontrada, e preenchidas com água tratada. Para impedir a proliferação de larvas de insetos, as caixas foram tampadas com tela e cultivadas com aproximadamente 20 peixes do gênero *Poecilia* por caixa, que são de pequeno porte, com comprimento médio de 2,8 cm e máximo de 6 cm e peso médio de 2 g.

Figura 1.1 - Caixas de berçário: *Salvinia* sp. (A) e *Eichhornia crassipes* (B)



2.2 Exposição das macrófitas ao glifosato

Após a etapa de reprodução, alguns indivíduos foram selecionados, considerando-se o aspecto visual saudável de folhas e raízes. Em laboratório, com umidade relativa aproximada de 50% e temperatura média de 23°C, os exemplares de macrófitas, com o auxílio de peneiras, foram lavados, removeu-se o excesso de água, com auxílio de papel toalha e avaliou-se a massa fresca inicial em balança analítica, procurando manter uma mesma massa aproximada entre as replicatas. Para *Salvinia* sp., utilizou-se uma massa fresca aproximada de 60 g, em número indiscriminado de indivíduos, transferidos para cristaleiras com área superficial de 0,0471 m². Para *E. crassipes*, utilizou-se um indivíduo (massa aproximada de 100 g) por recipiente, com área superficial de 0,0154 m² (Figura 1.2).

Figura 1.2 - Recipientes teste, *Salvinia* sp. (A) e *E. crassipes* (B)



Em cada um dos recipientes foram adicionados 2 L de solução nutritiva de Hoagland e Arnon (1950), com um quarto da força iônica original e pH entre 6,0 e 6,5 (Tabela 1.1). Os experimentos foram acondicionados em estante metálica, com quatro prateleiras de largura aproximada de 1,5 m e altura de 2,0 m, em sala de crescimento com temperatura (23 ± 2 °C) e luminosidade (média de 3.000 lux) controladas, com fotoperíodo de 16 horas de claro e 8 horas de escuro, com 10 lâmpadas fluorescentes tubulares de 10 W por prateleira. A *Salvinia* sp. foi submetida, por três dias, às condições experimentais antes da aplicação do herbicida, enquanto o *E. crassipes* estabilizou-se após seis dias, devido ao maior estresse causado pelo enovelamento de raiz. Estes períodos foram definidos com base na estabilização dos indivíduos e aspecto visual de folhas e raízes saudáveis.

Foram utilizadas solução nutriente e condições controladas para garantir que todo efeito negativo fosse em decorrência da ação do herbicida, minimizando-se, assim, a possibilidade de potencialização do efeito causado por infecções paralelas.

Tabela 1.1 - Solução nutritiva de Hoagland & Arnon original

Reagentes	Solução Estoque (g.L ⁻¹)	Solução Nutritiva Original (mL a pipetar por L)
Dihidrogenofosfato de potássio – KH ₂ PO ₄	136,1	1
Nitrato de potássio – KNO ₃	101,1	5
Nitrato de cálcio – Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	236,2	5
Sulfato de magnésio – MgSO ₄ .7H ₂ O	246,5	2
Fe-EDTA	5% de Fe	1
Ácido bórico – H ₃ BO ₃	2,86	1
Cloreto de manganês – MnCl ₂ .4H ₂ O	1,81	1
Sulfato de zinco – ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,22	1
Sulfato de cobre – CuSO ₄ .5H ₂ O	0,08	1
Ácido molibdico – H ₂ MoO ₄ .H ₂ O	0,02	1

Após o período de adaptação os indivíduos selecionados para o experimento foram divididos aleatoriamente em parcelas, da seguinte forma: grupo-controle (tratamento I) e mais cinco grupos (tratamentos II, III, IV, V e VI), todos em triplicata para cada uma das espécies estudadas (Tabela 1.2).

Realizou-se aplicação única do glifosato na sua formulação comercial Roundup Original®, utilizando-se um aspersor manual, em concentrações determinadas pela área superficial. A formulação testada tem a concentração de 36% (m.v⁻¹) de glifosato. As doses de aplicação foram escolhidas tomando como base inicialmente as doses remendadas para aplicação na agricultura.

Tabela 1.2 - Tratamentos realizados com cada uma das espécies estudadas

Espécies	Tratamentos (L.ha ⁻¹)	Área Superficial (m ²)	Formulação Comercial (mL)	Glifosato (mg)
<i>Eichhornia crassipes</i>	II=6,25	0,0154	II=0,009	II=3,46
	III = 12,5		III=0,019	III=6,93
	IV = 25,0		IV=0,039	IV=13,86
	V = 50,0		V=0,077	V=27,72
	VI = 100,0		VI = 0,154	VI = 55,44
<i>Salvinia</i> sp.	II=6,25	0,0471	II=0,029	II=10,60
	III=12,5		III=0,058	III=21,20
	IV=25,0		IV=0,118	IV=42,39
	V=50,0		V=0,236	V=84,78
	VI = 100,0		VI = 0,471	VI = 169,56

O experimento foi mantido e monitorado por 20 dias, uma vez que os efeitos na agricultura são observados em até dez dias. O volume dos recipientes foi completado com água deionizada a

cada dois dias, a fim de compensar a perda de volume de água por absorção, transpiração e evaporação.

2.3 Avaliação do efeito do glifosato sobre as macrófitas

A suscetibilidade das plantas ao herbicida, ou seja, a sua eficácia, foi avaliada a cada cinco dias, de forma visual e qualitativa, adotando-se a escala ALAM (1974) para definição de porcentagem de efeito. Foram feitos registros fotográficos e análise dos sintomas tóxicos (Tabela 1.3).

Tabela 1.3 - Escala ALAM utilizada para avaliação da eficácia de controle de plantas daninhas

Classe de porcentagem de efeito (%)	Nota e conceito de controle
0 – 40	1 – Nenhum a pobre
41 – 60	2 – Regular
61 – 70	3 – Suficiente
71 – 80	4 – Bom
81 – 90	5 – Muito bom
91 – 100	6 – Excelente

Com os resultados de massa fresca obtidos no início e no final dos experimentos, foi calculada a porcentagem de ganho ou de perda de massa, para cada réplica, e apresentada a média por experimento, sendo que a medida inicial corresponde a 100%, conforme a Equação 1. Os resultados variam de zero a 100, apresentando valor negativo quanto maior o efeito de ação.

$$C = \left(\frac{MF}{MI} * 100 \right) - 100 \quad (1)$$

em que

C = coeficiente de massa (%);

MF = massa final (g); e

MI = massa inicial (g).

Calculou-se também o índice de tolerância (IT), proposto por Nautiyal *et al.* (2002) para comparar o desempenho dos tratamentos com o controle, utilizando-se a massa fresca obtida ao final do experimento (Equação 2). O resultado encontra-se na faixa de zero a 1, ou seja, quanto maior o índice, menor a eficiência do tratamento, evidenciada por perdas de massa.

$$IT = \text{massa fresca do experimento} / \text{massa fresca do controle} \quad (2)$$

Para interpretação dos resultados qualitativos e semiquantitativos e identificação da concentração de melhor efeito, foram realizados testes estatísticos para avaliação da significância entre grupos independentes. Utilizou-se o *Kruskal-Wallis*, teste não paramétrico, devido ao reduzido número amostral de cada grupo comparado. Foram testadas as diferenças de efeito após os 20 dias de exposição e a diferença da massa final entre os seis tratamentos realizados com diferentes concentrações. O teste de *Mann-Whitney* foi utilizado para comparação entre dois grupos independentes, massa fresca inicial e final.

2.4 Avaliação de rebrota e efeito residual do glifosato sobre as macrófitas

Na última etapa, realizou-se outro experimento, em que foram montados quatro aquários de vidro com capacidade de 50 L e área superficial de 0,18 m². Dois deles receberam *E. crassipes* e os outros dois, *Salvinia* sp. Um aquário de cada espécie recebeu a aplicação de Roundup Original® em concentração de 100 L.ha⁻¹, enquanto o outro serviu de controle. Os tratamentos ficaram sob observação por 20 dias, a partir do qual foi feita a avaliação da rebrota e do efeito residual do glifosato sobre as macrófitas, mantendo a avaliação visual e fotográfica a cada cinco dias, durante um período de mais 30 dias. As plantas foram trocadas entre os aquários: as plantas dos tratamentos onde ocorreu aplicação do glifosato foram transferidas para os aquários-controle, e as plantas dos aquários-controle foram transferidas para os aquários-teste. Com isso, foi possível observar, simultaneamente, a possibilidade de rebrota das plantas afetadas após transferência para o aquário com água sem herbicida e o efeito do resíduo de glifosato dos aquários-testes sobre as plantas-controle.

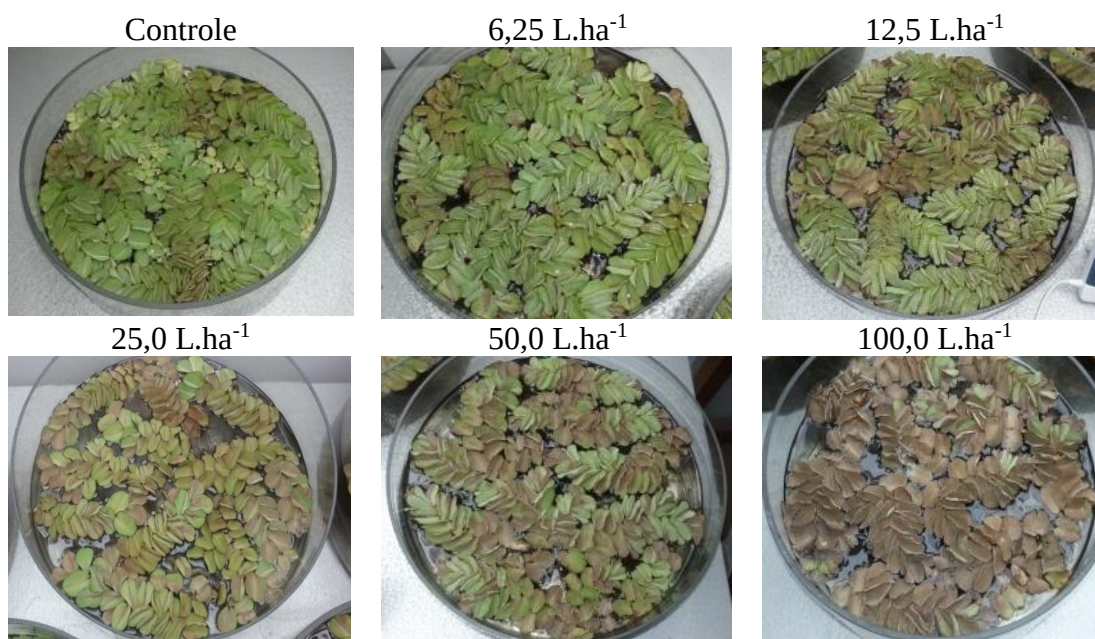
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A única concentração testada com efeito satisfatório para as duas espécies avaliadas foi de 100 L.ha⁻¹, sendo relativamente elevada, quando comparada com a de outros trabalhos publicados. Os resultados encontrados na literatura são variáveis, com concentrações de aplicação entre 8 e 10 L.ha⁻¹ e período de exposição de 7 e 45 dias, para diferentes formulações comerciais do glifosato. A mesma concentração de 8 L.ha⁻¹, para *E. crassipes*, chega a ser apresentada como sem efeito por Luna *et al.* (2010) e com efeito total por Olaleye e Akinyemiju (1996). Cruz e colaboradores (2015 a) constataram 100% de efeito após 45 dias de observação para a concentração de 10 L.ha⁻¹. Foloni e Pitelli (2005) e Cruz *et al.* (2012) relataram dificuldade de ação sobre a *Salvinia* sp., chegando a apresentar efeito a partir de 10 L.ha⁻¹ em maior período de observação, iniciando efeito em 21 até 45 dias.

Autores como Daam *et al.* (2009) relataram que temperaturas elevadas têm acelerado a decomposição de herbicidas, assim como altos níveis de nutrientes. Portanto, eles consideram que condições tropicais tendem a elevar a dose de resposta, consequentemente as condições abióticas dos testes são fundamentais para o efeito-resposta. Os experimentos de Cruz *et al.* (2012, 2015) ocorreram em temperatura de aproximadamente 25°C, no entanto, tiveram maior tempo de duração.

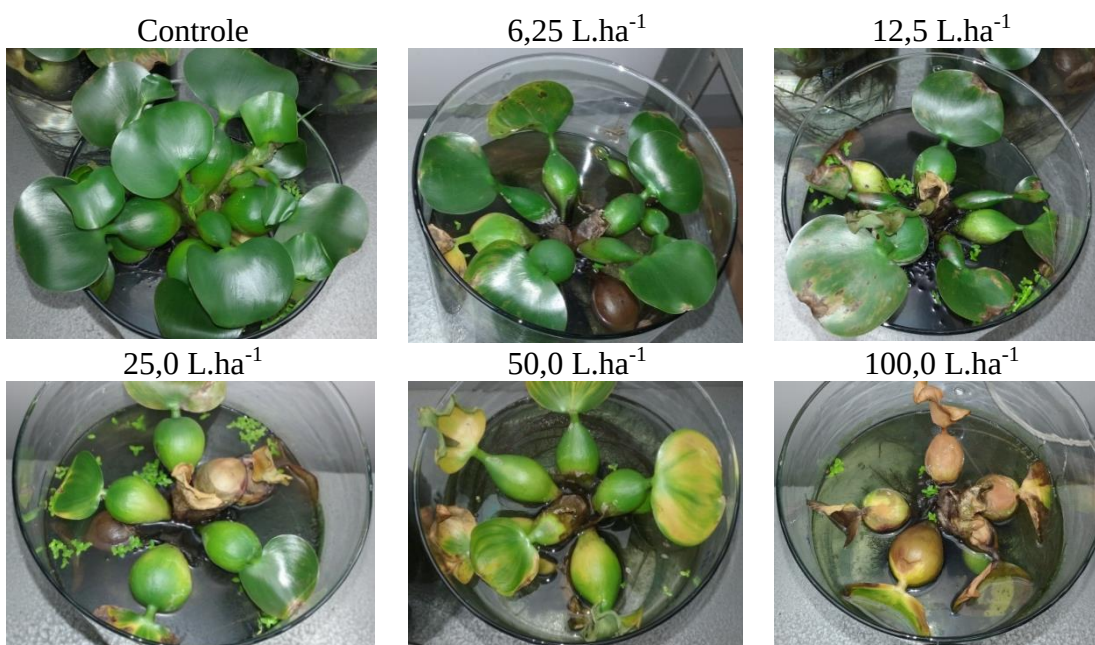
Neste experimento, a concentração de efeito para *Salvinia* sp. foi considerada “superior” à “boa” a partir do 15º dia, na concentração de 100 L.ha⁻¹, e ao 20º dia na concentração de 50 L.ha⁻¹, devendo ser ressaltado que apenas a maior concentração estudada apresentou efeito classificado como “excelente” (Figuras 1.3 e 1.5). Para essa espécie, a análise estatística dos resultados evidenciou diferença significativa apenas entre as condições de concentração igual a 100 L.ha⁻¹ e o controle. No entanto, essa diferença tornou-se evidente no décimo dia, atingindo um valor de "p" igual a 0,009 ao 20º dia de experimentação (Figura 1.6).

Figura 1.3 - Efeito do glifosato observado em *Salvinia* sp. no 20º dia de exposição



Para *E. crassipes* apenas a concentração de 100 L.ha⁻¹ foi superior à “boa”, chegando à classificação “excelente” no 20º dia (Figuras 1.4 e 1.5). Nesse caso, a análise estatística dos resultados de efeito também evidenciou diferença significativa entre o controle e o teste com concentração de 100 L.ha⁻¹ no 20º dia de exposição ($p = 0,015$) (Figura 1.6).

Figura 1.4 - Efeito observado em *E. crassipes* no 20º dia de exposição



Quando o efeito da concentração 100 L.ha⁻¹ é comparado para as duas espécies, constata-se efeito mais rápido em *Salvinia* sp., porém há uma semelhança no padrão de efeito, o que permite a padronização da mesma concentração para as duas espécies.

Figura 1.5 - Avaliação do efeito de glifosato em *Salvinia* sp. (A) e *E. crassipes* (B) ao longo de 20 dias

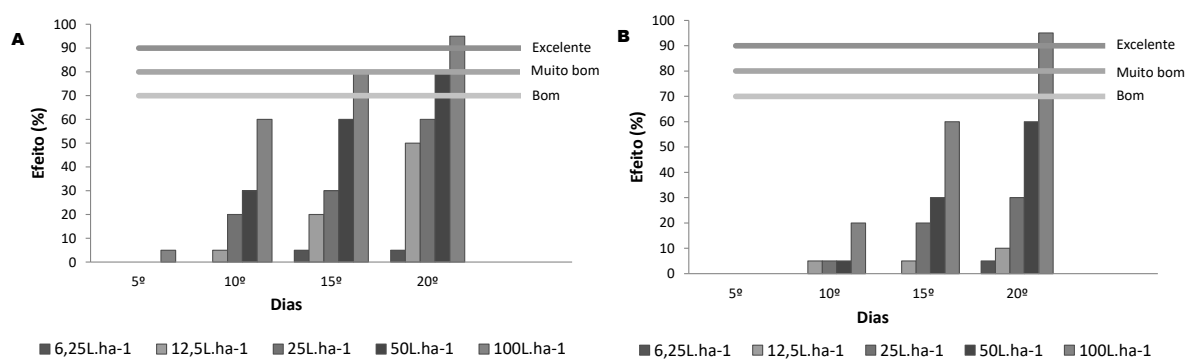
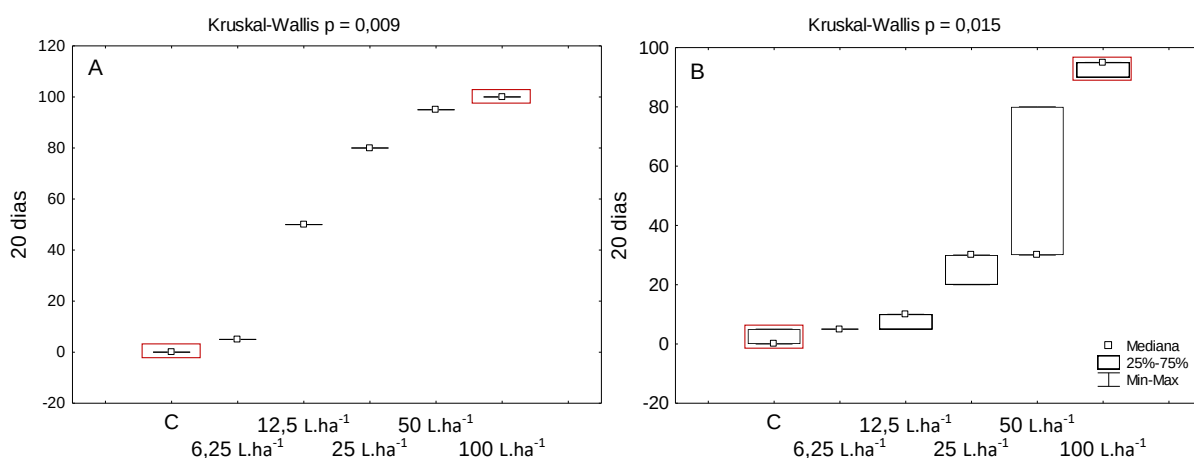


Figura 1.6 - Box plot e Kruskal-Wallis comparando o efeito no 20º dia de exposição para *Salvinia* sp. (A) e *E. crassipes* (B)



De modo geral, o efeito observado ao longo dos 20 dias de experimento foi a interrupção do crescimento em todas as concentrações-teste, seguida de clorose, necrose e degeneração tecidual para as duas espécies avaliadas (Figuras 1.7 e 1.8).

Figura 1.7 - Efeitos de glifosato observados em *E. crassipes* e *Salvinia* sp.: Clorose (A), necrose (B) e degradação tecidual (C e D)

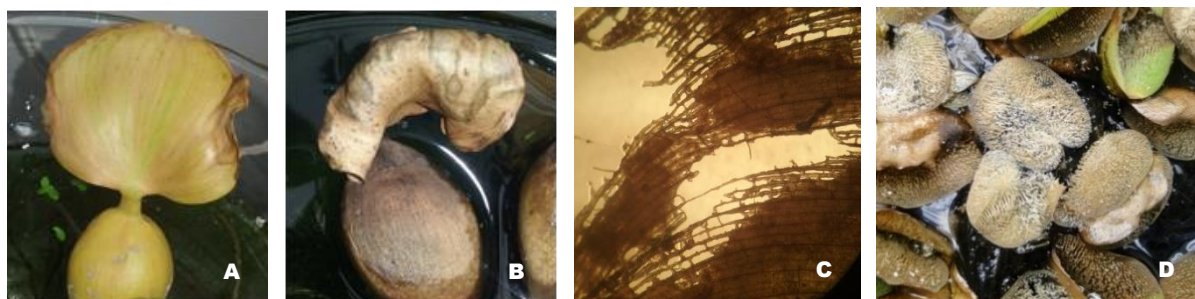


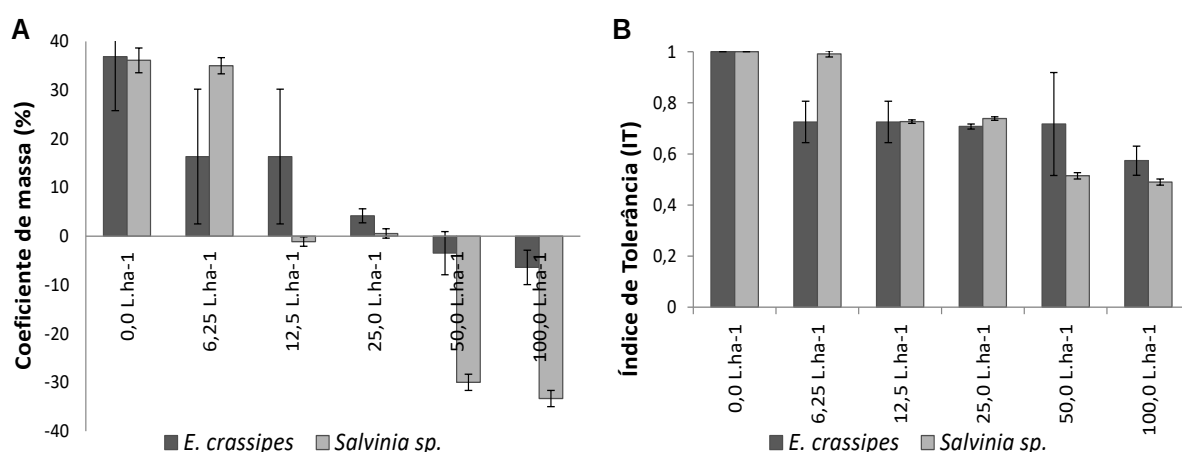
Figura 1.8 - Microcosmos dos experimentos-teste após 20 dias de exposição ao glifosato



O cálculo do coeficiente de massa (C) e o do índice de tolerância (IT) foram realizados para a avaliação semiquantitativa do efeito de aplicação do herbicida sobre as macrófitas. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 1.9.

De modo geral, os resultados de C evidenciam a redução de massa final dos experimentos, quando comparados com a condição inicial nos tratamentos com concentrações de 50 e 100 L.ha⁻¹, fato mais evidente para indivíduos de *Salvinia* sp. Os resultados de IT corroboram essas observações, uma vez que, nessas condições, os tratamentos apresentaram menores massas, comparadas às do controle.

Figura 1.9 - Coeficiente de massa entre o início e fim do experimento (A) e Índice de tolerância (B)

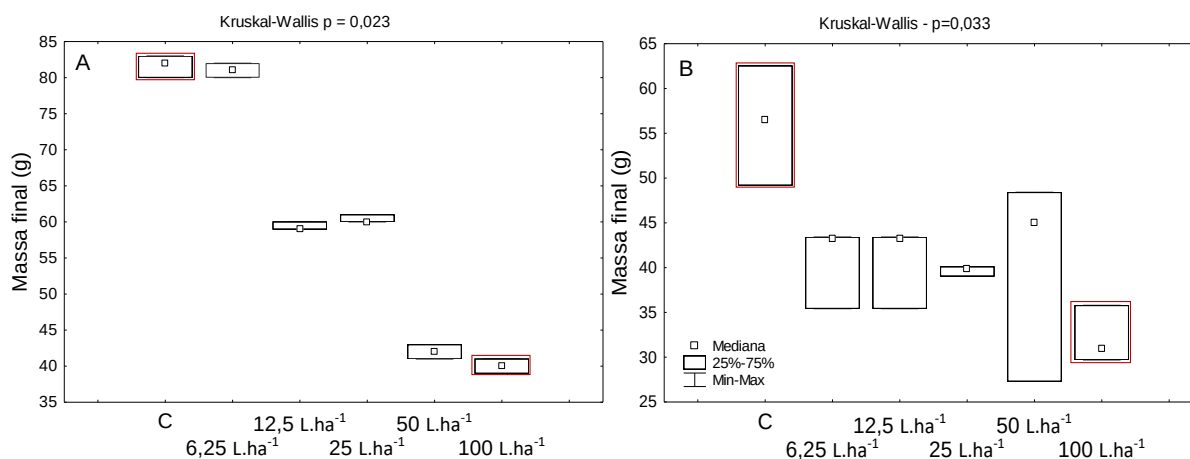


Testes estatísticos de *Mann-Whitney*, utilizados para comparar a massa fresca inicial e a final, apresentaram “p” superiores a 0,05 para todas as condições experimentais em que as duas espécies foram submetidas, o que indica que não existem diferenças significativas entre esses grupos. Ao comparar os dados de massa fresca final obtidos entre os diferentes tratamentos,

partindo do pressuposto que a massa inicial de todos era muito similar, evidenciaram-se, para *Salvinia* sp. e *E. crassipes*, diferenças significativas apenas entre o controle e a condição de concentração igual a 100 L.ha⁻¹, sendo obtidos valores de “p” iguais a 0,023 e 0,033, respectivamente (Figura 1.10).

Em *E. crassipes* a perda de massa é provavelmente minimizada devido à predominância de aerênquima e tecido fibroso, que levam a menor perda de massa. Mesmo para *Salvinia* sp., observou-se redução de massa não expressiva, inferior a 50%, devido ao tempo de exposição e finalização dos experimentos, uma vez que o efeito foi classificado como “bom” após o 15º dia e até a finalização do experimento não houve tempo suficiente para a decomposição do tecido vegetal.

Figura 1.10 - Box plot e Kruskal-Wallis comparando a massa fresca final dos tratamentos com glifosato em: *Salvinia* sp. (A) e *E. crassipes* (B)



Nos experimentos para avaliação de rebrota e efeito residual, após os 20 dias de exposição foi observado efeito superior em 90% das macrófitas dos aquários onde o herbicida foi aplicado, enquanto os organismos dos aquários-controle mantiveram seu crescimento normal. Após a troca dos organismos de aquário, não foi constatada a possibilidade de rebrota durante os 30 dias de avaliação. Essa conclusão foi com base na avaliação visual e nas medidas de oxigênio dissolvido, que se mantiveram inalteradas em todos os aquários, para as duas espécies, iguais a 3 mg.L⁻¹.

Já o efeito residual aconteceu de forma sutil, sendo evidenciadas áreas de necrose em indivíduos de *Salvinia* sp. e clorose e perda de turgência em *E. crassipes* após o 20º dia, chegando a um efeito visual próximo a 30% após os 30 dias de observação (Figura 1.11).

Figura 1.11 - Efeito residual do glifosato após 30 dias de aplicação: *E. crassipes* (A) e *Salvinia* sp. (B)



O efeito do glifosato pode variar em decorrência não só das características da água e da temperatura ambiente, mas também das características da aspersão, como deriva e tamanho da gota. O período de observação também é crítico, uma vez que é muito comum que substâncias tóxicas causem efeito de hormese quando utilizadas em pequena quantidade, pois o organismo eleva suas sínteses proteicas para defesa, e acaba levando ao crescimento inicial, o que pode causar a impressão de ausência de efeito, que então será observado após maior tempo da aplicação.

4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES

Os estudos mostram que as macrófitas aquáticas flutuantes são eficientemente controladas com herbicidas à base de glifosato, no entanto a concentração de trabalho é elevada (100 L.ha^{-1}), por isso é imprescindível que os trabalhadores que irão manipular o produto tenham bastante cuidado, devendo utilizar todos os EPIs necessários, uma vez que ainda não se tem certeza sobre os efeitos do glifosato para o ser humano, em longo prazo.

A concentração de 100 L.ha^{-1} é a única com efeito significativo em relação ao controle, tendo apresentado boa eficiência em aplicação única entre 15 e 20 dias, em *Eichhornia crassipes* e *Salvinia* sp, nas condições testadas neste trabalho. A possibilidade de reduzir a dose de aplicação pode ser avaliada, considerando que poderá levar mais tempo para atingir o efeito esperado. O efeito em dose elevada pode ser em decorrência das condições ideais de cultivo dos testes, em que foi utilizada solução nutriente e temperatura relativamente elevada, pois, conforme a literatura, quanto maior a temperatura menor o efeito do glifosato.

A dose de 100 L.ha^{-1} , considerando o total de 50 dias de observação, inibe a rebrota das macrófitas e continua a agir, com baixo efeito residual, sobre os organismos vegetais que venham a se estabelecer no ambiente após a aplicação.

Estudos complementares para avaliação da concentração residual de glifosato e seus metabólitos principais na água são fundamentais, em razão dos riscos ambientais e dos critérios de enquadramento de corpos hídricos.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA DA BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO PARAÍBA DO SUL – AGEVAP. *Estudos para identificação, localização e quantificação das causas da proliferação de plantas aquáticas, principalmente macrófitas, ao longo da calha do rio Paraíba do Sul, inclusive braços mortos, reservatórios e afluentes*. Relatório de prognóstico, São José dos Campos, 2012.
- ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA DE MALEZAS - ALAM. *Recomendaciones sobre unificación de los sistemas de evaluación en ensayos de control de malezas.*, Bogotá, v. 1, n.1, p. 35-38, 1974.
- BAIRD, C.; CANN, M.. *Química ambiental*. Tradução: Marco Tadeu Grassi; 4ª Ed. Porto Alegre: Bookman, 844p., 2011.
- BRASIL. Resolução CONAMA nº 467 de 16 de julho de 2015. *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*. 2015.
- CRUZ, C.; NADER-NETO, A.; GIRIO, A. C. F.; PITELLI, R. A. Eficácia do glyphosate no controle de macrófitas flutuantes e efeitos sobre organismos bioindicadores. *XXVIII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas na ERA da Biotecnologia*, Campo Grande-MS. 2012.
- CRUZ, C.; SILVA, A. F.; LUNA, L. V.; YAMAUCHI, A. K. F.; GARLICH, N.; PITELLI, R. A. Glyphosate Effectiveness in the control of macrophytes under a Greenhouse Condition. *Planta Daninha*. Viçosa-MG. V.33, n.2, p.241-247, 2015 a.
- CRUZ, C.; SILVA, A.F; SHIOGIRI, N. S.; GARLICH, N; AND PITELLI, R. A. Imazapyr Herbicide Efficacy on Floating Macrophyte Control and Ecotoxicology for Non-Target Organisms. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v.33, n. 1, p. 103-108, 2015 b.
- DAAM, M. A.; BRINK, P. J. V. D.; NOGUEIRA, A. J. A.. Comparison of the effects of the herbicide linuron in freshwater model ecosystems between tropical and temperate regions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 72, 424-433, 2009.
- DIMITRAKOPOULOS, I. K.; THOMAIDIS, N. S.; MEGOULAS, N. C.; KOUPPARIS, M. A. Effect of suppressor current intensity on the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid by suppressed conductivity ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, p. 3619-3627, 2010.
- EPA – United States Environmental Protection Agency. Prevention, Pesticides and Toxic Substances – R.E.D. Facts Glyphosate. 1993.
- ESTEVEES, F. de A. *Fundamentos de Limnologia*. Ed. 2ª, Rio de Janeiro: Interciência, 602 p., 1998.
- FOLONI, L. L.; PITELLI, R. A.. Avaliação da sensibilidade de diversas espécies de plantas daninhas aquáticas ao carfentrazone-ethyl, em ambiente controlado. *Planta Daninha*, Viçosa-MG, v.23, n. 2, p. 329-334, 2005.
- HOAGLAND, D.R.; ARNON, D. I.. The water culture method for growing plants without soils. Berkeley: *California Agricultural Experimental Station*, 347p., 1950.
- LUNA, L. A. V; CARRASCHI, S. P.; CUBO, P.; NADER-NETO, A.; SCHIAVETTI, B. L.; PANCELLI, M. L.; GIRIO, A.C.F; CRUZ, C.; PITELLI, R. A.. Efeitos da aplicação de glifosato para o controle de macrófitas sobre a qualidade da água e a comunidade perifítica em condições de mesocosmos. *XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas*, Ribeirão Preto – SP. 2010.

- MEANS, N. E.; KREMER R. J.; RAMSIER C. Effects of glyphosate and foliar amendments on activity of microorganisms in the soybean rhizosphere. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 42, 125–132; 2007.
- NAUTIYAL, P. C.; RACHAPUTI, N. R.; JOSHI, Y. C. Moisture-deficit-induced changes in leaf water content, leaf carbon Exchange rate and biomass productions in groundnut cultivars differing in specific leaf area. *Field Crop. Res.* 74:67-79, 2002.
- OLALEYE, V. F.; AKINYEMIJU, O. A. Effect of a Glyphosate (N-(Phosphonomethyl) glycine) Application to control *Eichhornia crassipes* Mart. On Fish Composition and Abundance in Abiala Creek, Niger Delta, Nigeria. *Journal of Environmental Management* , v. 47, p. 115-122, 1996.
- POMPÊO, M. Monitoramento e manejo de macrófitas aquáticas. *Oecol. Bras.*, 12 (3): 406-424, 2008.
- SHIOGIRI, N. S.; CARRASCHI, S. P.; CUBO, P.; SCHIAVETTI, B. L.; CRUZ, C.; PITELLI, R. A.. Ecotoxicity of glyphosate and atrazine surfactant on guaru (*Phalloperla caudimaculatus*). *Acta Scientiarum Biological Sciences*, Maringá, v.32, n.3, p.285-289, 2010.
- THOMAZ, S. M; BINI, L. M. *Ecologia e manejo de macrófitas aquática*. Maringá: EDUEM, 341 p.,2003.
- TSUI, M. T. K.;WANG, W. X.; CHU, L. M.. Influence of glyphosate and its formulation (Roundup®) on the toxicity and bioavailability of metals to *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Pollution*, 138, 59-68, 2005.

CAPÍTULO 2

Avaliação das alterações físico-químicas da água causadas pela utilização de herbicida à base de glifosato para controle de Eichhornia crassipes e Salvinia sp.

1 INTRODUÇÃO

Os glifosatos são compostos fosfonatos, com fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ ($m.m = 169,1 \text{ g.mol}^{-1}$). Eles pertencem a uma classe de compostos que são estruturalmente similares aos organofosforados e que são amplamente empregados como herbicidas no manejo agrícola. São considerados menos tóxicos por serem eliminados sem metabolização e evidências de sua bioacumulação em tecidos animais (BAIRD e CANN, 2011). O glifosato inibe a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintase (EPSP) e, consequentemente, interrompe a biossíntese de aminoácidos aromáticos, reduzindo, assim, a síntese de proteínas e o crescimento da biomassa, com eventual perturbação celular e morte (FORLANIA *et al.*, 1999).

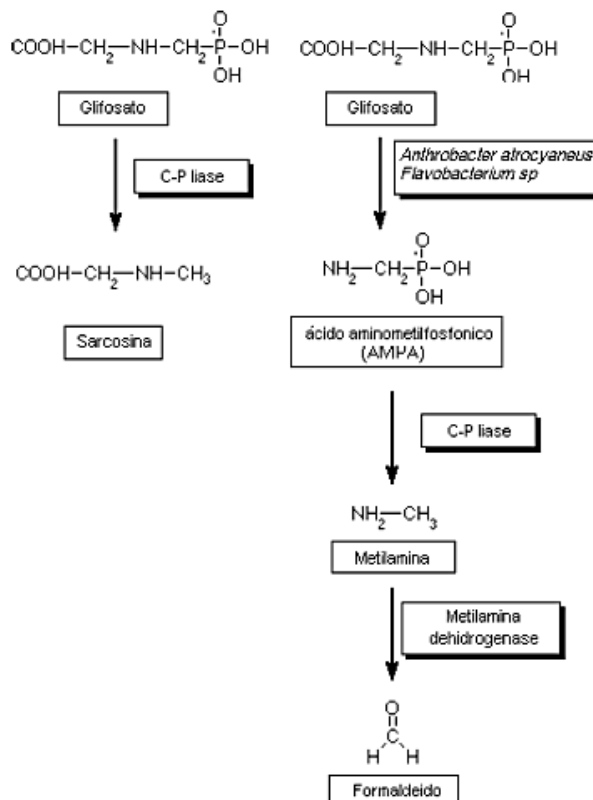
Há uma crescente preocupação com o impacto dos herbicidas à base de glifosato no meio ambiente, uma vez que os dados sobre os mecanismos de resposta em organismos aquáticos são limitados (ROCHA *et al.*, 2015). Esses herbicidas tendem a permanecer adsorvidos no solo, apesar de apresentarem considerável solubilidade em água. Nos ambientes aquáticos, os agrotóxicos podem passar por mecanismos de adsorção ou dessorção, de acordo com as interações químicas e físicas estabelecidas com partículas de sedimentos (BAIRD e CANN, 2011; SANCHES *et al.*, 2003). Segundo Tsui *et al.* (2005), a rápida adsorção de glifosato para as partículas do sedimento está bem documentada na literatura.

A especiação é um fator que merece destaque e está relacionado ao caráter iônico do elemento. A meia-vida revela a estabilidade do composto sob determinada condição e pode ser associada ao tempo de residência, que avalia a capacidade de um sistema reter uma substância com base na taxa de seu fluxo no sistema. No entanto, quando tratados isoladamente, esses parâmetros não revelam o verdadeiro potencial contaminante dos herbicidas, sendo necessária a avaliação das suas propriedades em conjunto e associadas às características físico-químicas do meio, o que permite prever processos importantes relacionados ao destino dos produtos orgânicos no meio ambiente (SAWYER *et al.*, 2003). Algumas plantas podem metabolizar o glifosato em ácido aminometilfosfônico (AMPA), que é um fitotóxico reconhecido (GOMES *et al.*, 2014).

A formação de subprodutos também é um fator que deve ser compreendido. A forma mais comum de degradação do glifosato é pela ação de bactérias que fazem a clivagem da ligação fósforo-carbono, formando a sarcosina, ou pela oxidação da ligação carbono-nitrogênio, produzindo o AMPA, que apresenta maior estabilidade, porém também pode ser degradado em

metilamina pelo rompimento da ligação fósforo-carbono. Essa última, por sua vez, também pode ser clivada, gerando formaldeídos (SANTOS, 2012) (FIGURA 2.1).

Figura 2.1 – Rotas de decomposição microbiológica do glifosato (AMARANTE Jr. *et al.*, 2002)



Estudos de Sihtmae *et al.* (2013) apontam o problema de surfactantes na formulação e questionam a segurança na aplicação do glifosato, devido, em grande parte, aos aditivos presentes em suas formulações. Por outro lado, Haberkorn *et al.* (2008) ressaltam o importante papel do surfactante em reter o herbicida na superfície das plantas evitando o seu aparecimento na água.

Diante da crescente utilização do glifosato para diversas aplicações em todo o mundo e da necessidade de avanço científico em um campo ainda incipiente, com vasta gama de fatores e interferentes que merecem ser abordados para permitir a utilização segura do glifosato no manejo de macrófitas aquáticas, torna-se importante a avaliação das propriedades físico-químicas e do comportamento desse composto em interações com componentes da água e solo, bem como sua detecção e quantificação em amostras naturais (AMARANTE Jr. *et al.*, 2002). O presente trabalho teve por objetivo avaliar as alterações físico-químicas causadas na água pela aplicação de glifosato adotado no controle de macrófitas aquáticas flutuantes em ambientes controlados (microcosmos).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir são apresentadas as etapas metodológicas adotadas nos estudos de aplicação de glifosato em microcosmos, assim como as avaliações complementares. Todas as condições experimentais foram avaliadas em replicatas, para buscar a confiabilidade estatística dos resultados obtidos.

2.1 Preservação de amostras

O tempo e a melhor condição de preservação das amostras de glifosato, sem perda ou degradação, foram avaliados. Tomou-se uma amostra de água bruta contaminada com a formulação comercial de glifosato, Roundup Original®, com concentração inicial aproximada de 35 mg.L⁻¹, que foi distribuída em 60 frascos, sendo 20 armazenados em temperatura ambiente (23 ± 2 °C), 20 refrigerados ($4,5 \pm 0,3$ °C) e 20 congelados ($< 0^\circ$ C). Em intervalos variados, realizou-se a quantificação de glifosato em amostras das diferentes condições de preservação avaliadas.

2.2 Avaliação físico-química – soluções em água deionizada

Buscou-se avaliar as alterações físico-químicas causadas em soluções obtidas a partir do padrão de glifosato e, ainda, a partir de sua formulação comercial Roundup Original® (360 g e.a.L⁻¹ de glifosato) em meio aquoso. Para isso, utilizou-se água deionizada no preparo de 2 L de soluções com concentração inicial média de 20 mg.L⁻¹ de glifosato. As soluções foram mantidas em recipientes de boca larga, cobertos com material semipermeável, para permitir a volatilização natural dos compostos à temperatura ambiente (23 ± 2 °C). As soluções foram monitoradas diariamente, durante um período de 20 dias, para avaliação dos parâmetros pH, condutividade e concentração de glifosato. Os parâmetros foram selecionados devido à possibilidade de medição e por serem parâmetros que permitem interpretações mais amplas relacionadas a outros fatores.

2.3 Estudo de microcosmos

Foram montados microcosmos de lagoa em aquários de vidro com capacidade de 50 L e área superficial de 0,18 m². Os recipientes foram recobertos lateralmente e acondicionados em sala de crescimento controlada, com temperatura de 23 ± 2 °C e luminosidade média de 3.000 lux, com fotoperíodo de 16 horas.

Salvinia sp. e *Eichhornia crassipes* foram submetidos às mesmas condições experimentais, tendo sido utilizada triplicata para cada espécie e controle. Os aquários de *Salvinia* sp. totalizaram, inicialmente, uma massa fresca média de 300 g por aquário. Em cada aquário de *E. crassipes* foram colocados oito indivíduos, com massa fresca média de 70 g cada, totalizando 560 g de biomassa por aquário. Cada aquário continha cerca de 35 L de água e aproximadamente 4 kg de sedimento, formando uma coluna com 2 cm de sedimento e 20 cm de água. Em cada aquário foram inseridos dez peixes nativos de lagoa (*Poecilia* sp.) e dez indivíduos de *Danio rerio*, comercialmente encontrados, em fase adulta (Figura 2.2).

Figura 2.2 - Montagem dos microcosmos



Após o período de estabilização (15 dias), realizou-se a aplicação da formulação comercial de glifosato, em dose única de 100 L.ha⁻¹ (aproximadamente 1,8 mL por aquário). O monitoramento das condições físico-químicas dos microcosmos foi realizado diariamente.

2.4 Monitoramento e tratamento de dados

Os experimentos foram monitorados diariamente quanto aos parâmetros de pH, oxigênio dissolvido (OD), temperatura e condutividade elétrica, segundo metodologias padronizadas pelo *Standard Methods* (SMEWW, 2012) – 4500H+B, 4500O+C, 2550B e 2510B, respectivamente (Figura 2.3). A quantificação de glifosato, AMPA e ânions (fluoreto, cloreto, nitrito, nitrato, sulfato, fosfato) foi realizada por cromatografia iônica, utilizando-se cromatógrafo Metrohm, modelo 850 Profissional IC, com amostrador 850, dozino, coluna Supp 7 250/4.0, coluna de guarda Supp 1 Guard/4.6.

Figura 2.3 - Coleta e monitoramento dos microcosmos



Os resultados foram analisados estatisticamente, utilizando o teste *U Mann-Whitney* para comparação entre dois grupos independentes, o teste *Kruskal-Wallis* para comparação entre mais de dois grupos independentes e o teste de *Spearman* para avaliação de correlação entre os parâmetros, adotando-se um nível de confiança igual a 95%.

O tempo de meia-vida foi calculado na avaliação do decaimento das concentrações de glifosato nas diferentes condições experimentais, pela identificação da ordem das reações e aplicação da lei de velocidade (BROWN *et al.*, 2005).

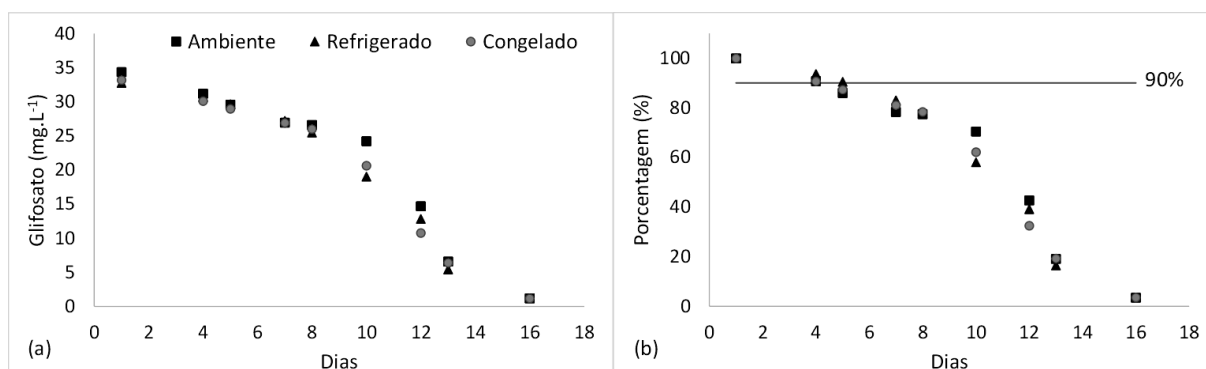
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente tópico são apresentados os principais resultados obtidos na condução do estudo com microcosmos, como também das avaliações complementares.

3.1 Preservação de amostras

Na Figura 2.4 estão os resultados do decaimento da concentração de glifosato, em valores absoluto (a) e percentual (b), ao longo do tempo, nas amostras em diferentes condições de preservação: temperatura ambiente, refrigerada e congelada. De modo geral, constatou-se que o decaimento foi mais lento até o décimo dia, a partir do qual se intensificou. Considerando a redução máxima de 10% da concentração inicial, o prazo máximo de quatro dias foi estabelecido como limite para quantificação das amostras.

Figura 2.4 - Avaliação da concentração de glifosato em amostras submetidas a diferentes temperaturas de preservação – ambiente, refrigerada e congelada



O tempo de meia-vida do glifosato foi calculado pelo modelo cinético de ordem zero, sendo 7,5 dias para as amostras à temperatura ambiente, 7,1 para amostras refrigeradas e 7,2 para amostras congeladas, com valor médio de 7,3 dias. Esse fato pode implicar certa dificuldade na preservação das amostras contendo glifosato, em razão do rápido decaimento da concentração de glifosato em solução com água bruta. O teste de comparações múltiplas *Kruskal-Wallis* retornou um valor de “p” igual a 0,862, a 5% de significância, o que indica que não há evidências de diferenças significativas entre as formas de preservação das amostras das soluções de glifosato em água bruta avaliadas.

Acredita-se que as características da água bruta possam influenciar a degradação e o decaimento da concentração de glifosato pelas maiores possibilidades de efeitos sinérgicos presentes no meio, quando comparada com as soluções em água deionizada.

3.2 Avaliação físico-química – soluções em água deionizada

Na Figura 2.4 estão os resultados da evolução de parâmetros físico-químicos em soluções de glifosato em água deionizada à temperatura de 23 ± 2 °C: (a) pH, (b) condutividade elétrica e (c) concentração de glifosato. A aplicação do padrão de glifosato e de sua formulação comercial em água deionizada evidenciou alterações nas características físico-químicas da água, em intensidades diferentes entre os produtos. Partindo de valores de pH e condutividade ($\mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$) iguais a 7,32 e 0,83, respectivamente, constatou-se que os valores de pH tiveram redução e os valores de condutividade se elevaram imediatamente após a aplicação (t_0).

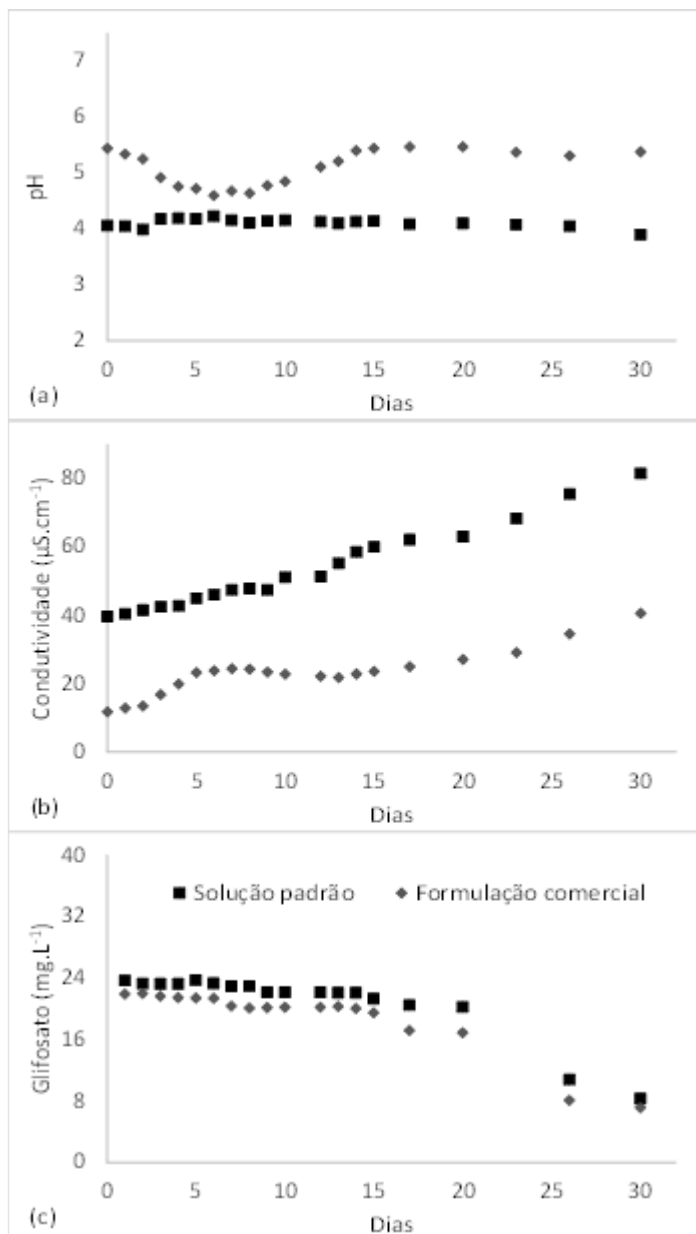
Pelo teste estatístico U de *Mann-Whitney*, verificou-se que os resultados do monitoramento das soluções obtidas a partir do padrão de glifosato e da formulação comercial em água deionizada indicaram evidências de diferenças significativas ($p < 0,05$) para os parâmetros apresentados na Figura 2.5. Os valores de pH foram significativamente menores quando da aplicação do padrão de glifosato, enquanto os parâmetros condutividade e concentração de glifosato apresentaram valores significativamente maiores com a aplicação do mesmo padrão, comparados com os da sua formulação comercial.

A concentração de glifosato decresceu, independentemente da fonte, chegando a 3 mg.L^{-1} até o 18º dia, a partir do qual se reduziu de forma considerável, atingindo um terço da concentração inicial ao final do período de monitoramento. Para os experimentos com água deionizada, a meia-vida foi superior aos resultados obtidos para água bruta nas diferentes temperaturas, ampliada para 21,6 dias para solução com padrão de glifosato e 20,9 dias para solução com a formulação comercial, que também apresentaram cinética de decaimento de ordem zero.

Avaliando a correlação entre os parâmetros pH, condutividade e concentração de glifosato para as soluções avaliadas (padrão e formulação comercial), constatou-se, por meio do teste de *Spearman*, correlações significativas, em ambos os casos, entre as concentrações de glifosato e os parâmetros pH e condutividade. Verificou-se que a correlação entre os parâmetros pH e concentração de glifosato foi diferente entre os tratamentos: correlação direta para a solução-padrão de glifosato, com coeficiente de correlação igual a +0,48, e correlação inversa para solução com a formulação comercial, com coeficiente igual a -0,50. Possivelmente, essa diferença está relacionada à presença de componente inerte/surfactante na composição da formulação comercial. Correlações negativas e de maiores intensidades foram evidenciadas entre os parâmetros condutividade e concentração de glifosato, com coeficientes de correlação

iguais a -0,95 e -0,82 para a solução-padrão de glifosato e sua formulação comercial, respectivamente.

Figura 2.5 – Valores de (A) pH, (B) condutividade e (C) concentração de glifosato em soluções com água deionizada obtidas a partir do padrão de glifosato e de sua formulação comercial

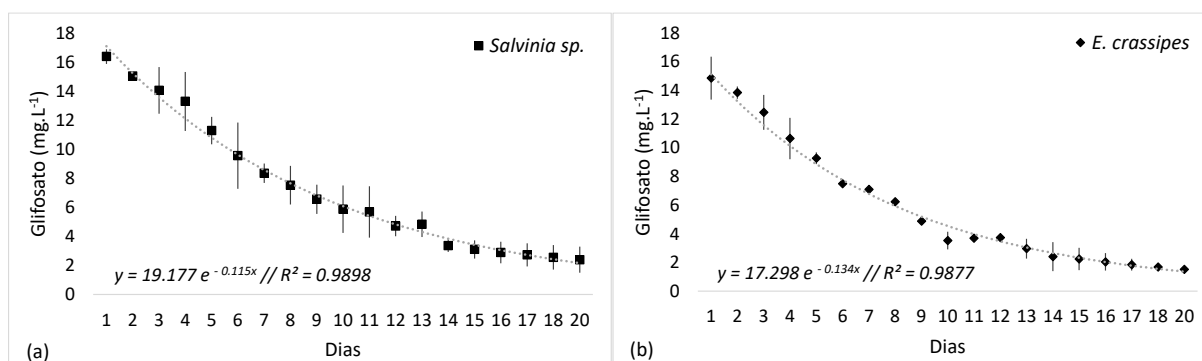


Os surfactantes são excelentes agentes molhantes e detergentes, possuindo como desvantagem a sua capacidade de reagir com sais presentes na água e com as moléculas do defensivo agrícola, alterando o equilíbrio eletrolítico na água (QUEIROZ *et al.*, 2008). Tensoativos iônicos podem acarretar variações bruscas em determinadas propriedades físico-químicas do meio, como pH, tensão superficial, pressão osmótica, destacando-se a redução na condutividade (SCHWUGER, 1973).

3.3 Microcosmos

Como resultado do experimento nos microcosmos foram gerados os gráficos de decaimento da concentração de glifosato ao longo do tempo, apresentados na Figura 2.6, sendo: (a) tratamento com *Salvinia* sp. e (b) tratamento com *E. crassipes*.

Figura 2.6 - Concentração de glifosato com o tempo dos experimentos nos microcosmos: (A) *Salvinia* sp. e (B) *E. crassipes*

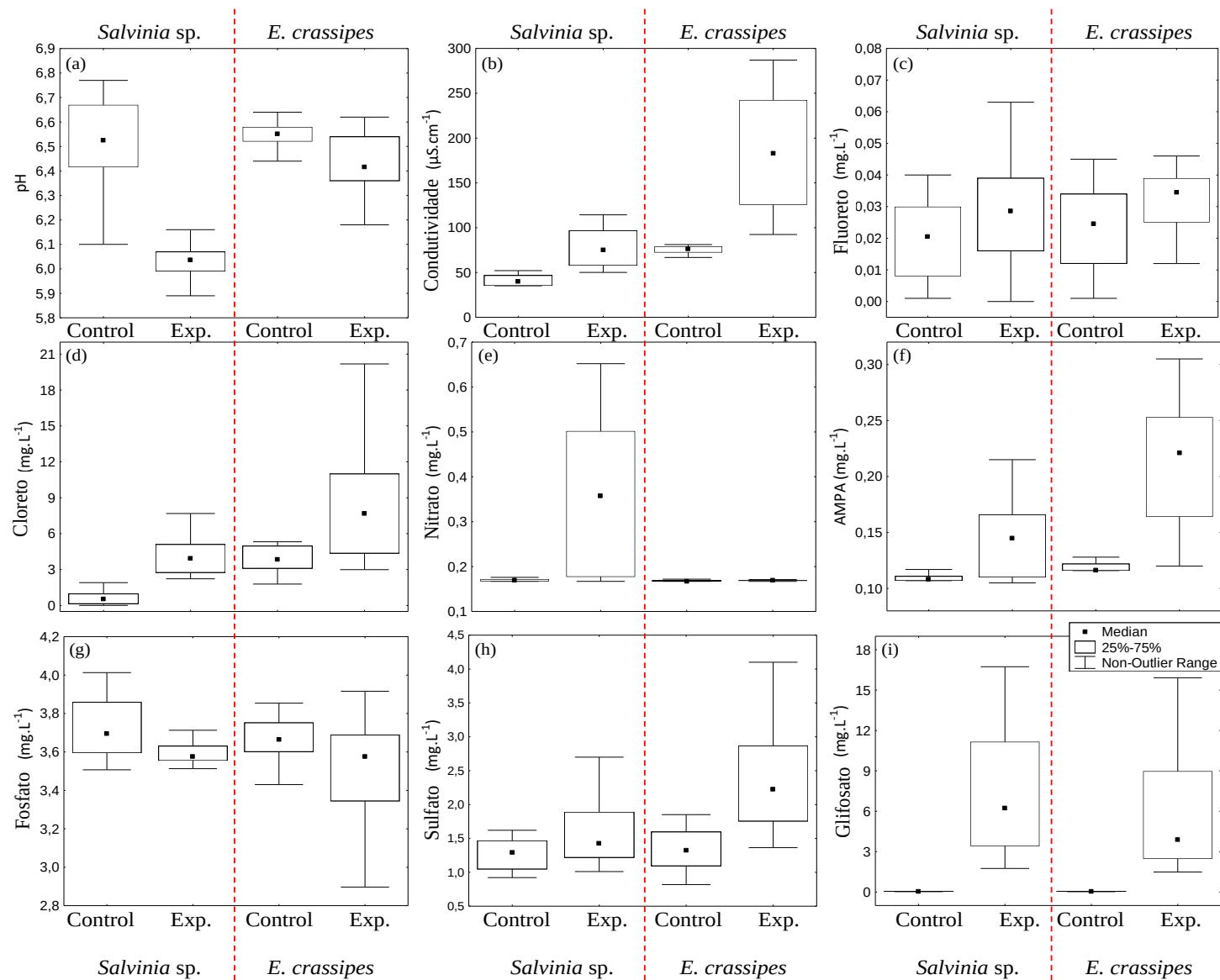


De modo geral, o comportamento da concentração do glifosato foi similar ao longo do período de experimentação, independentemente da espécie, com os dados indicando bons ajustes a modelos exponenciais, corroborados pelos valores de R^2 superiores a 0,98. As concentrações finais de glifosato na água dos experimentos com microcosmos atingiu, aos 20 dias, valores iguais a $2,39 \pm 0,90$ e $1,52 \pm 0,05$ mg.L⁻¹ para *Salvinia* sp. e *E. crassipes*, respectivamente, não havendo evidências de diferenças significativas entre os resultados pelo teste U Mann Whitney, a 5% de significância.

O tempo de meia-vida do glifosato para esses experimentos foi de 3,2 dias para *E. crassipes* e 3,9 para *Salvinia* sp., calculados pela cinética de segunda ordem. Foi o menor tempo de meia-vida entre os experimentos realizados, uma vez que se trata de água bruta com diversidade animal e vegetal, que provavelmente influenciaram e aceleraram o processo de decomposição e metabolização do glifosato.

Como resultado do monitoramento dos demais parâmetros físico-químicos nos experimentos em microcosmos, gerou-se a Figura 2.7, para dados de *E. crassipes* e *Salvinia* sp.

Figura 2.7 - Experimento em microcosmos para controle de *Salvinia* sp. e *E. crassipes* com a aplicação de glifosato. Avaliação físico-química de: (A) pH, (B) condutividade, (C) fluoreto, (D) cloreto, (E) nitrato, (F) AMPA, (G) fosfato, (H) sulfato e (I) glifosato



Deve ser ressaltado que na Figura 2.6 estão apenas os resultados dos parâmetros que apresentaram diferenças significativas entre controle *versus* tratamento, com p-valor inferior a 0,05. Assim, OD e nitrito, apesar de monitorados, não foram incluídos na avaliação.

Com base nos resultados, verificou-se que os valores de pH mantiveram-se estáveis ao longo do período de avaliação, apresentando-se inferiores aos do controle, com valores próximos a 6,5, nos testes com ambas as espécies. Foram identificados indícios de elevações na condutividade da água dos tratamentos em microcosmos de forma contínua após a aplicação da formulação comercial de glifosato, tendo o maior valor sido registrado em experimentos com *E. crassipes*, atingindo valores próximos a $290 \mu\text{S}.\text{cm}^{-1}$.

Os parâmetros fluoreto, cloreto e sulfato apresentaram concentrações significativamente superiores em experimentos com *E. crassipes*, a 5% de significância, quando comparados ao controle. Por outro lado, o parâmetro fosfato apresentou comportamento inverso, com valores de concentração significativamente superiores no controle. O parâmetro nitrato apresentou elevação no sexto dia após a aplicação da formulação comercial de glifosato para os experimentos com *Salvinia* sp., mantendo-se estável ao longo do período de experimentação. O parâmetro AMPA apresentou concentrações superiores para experimentos com *E. crassipes*, atingindo valores medianos de $0,23 \text{ mg}.\text{L}^{-1}$.

Os resultados analíticos demonstraram que a metabolização do glifosato inicia-se até o quarto dia e que o processo metabólico continua com a degradação do AMPA. Esse processo provavelmente ocorre pela sequência de formação de compostos como metilamina e formaldeído, quando, então, deveria ser observada a elevação de fósforo na coluna d'água, por meio da quantificação de fosfato. Esse fato não foi observado, o que minimiza os riscos associados à eutrofização de ambientes aquáticos pelo uso de glifosato.

Para comparação entre os resultados obtidos nos diferentes experimentos utilizou-se o teste *Kruskal-Wallis*, que evidenciou diferença significativa para todos os parâmetros avaliados. As diferenças indicadas entre os resultados de *E. crassipes* e *Salvinia* sp. podem ser pelo fato de essa última espécie possuir, sobre sua cutícula, uma camada de tricomas (pelos), o que lhe confere alguma proteção adicional, minimizando o contato direto com o herbicida e favorecendo o escoamento das gotículas diretamente para a água. Segundo Negrisoli *et al.* (2002), a presença de grande quantidade de pelos na epiderme foliar de *Salvinia molesta* reduz a molhabilidade das folhas, o que pode afetar a eficiência dos herbicidas. Esse fato, possivelmente, elevaria a concentração de glifosato na água e poderia acarretar diferentes

mecanismos metabólicos, por exemplo, a predominância de compostos, como metilamina ou sarcina preferencialmente ao AMPA, que poderiam favorecer reações de nitrificação.

Como avaliação complementar, utilizou-se o teste de *Spearman* para avaliar a correlação entre os resultados dos parâmetros físico-químicos obtidos em cada um dos experimentos, *Salvinia* sp. e *E. crassipes*. Os resultados encontram-se na Tabela 2.1, tendo em destaque as correlações que foram significativas a 5% de confiança.

De modo geral, os resultados obtidos pelo teste de correlação corroboram os resultados previamente verificados. Observou-se um quantitativo de correlações significativas superior nos parâmetros monitorados em experimentos com *E. crassipes*, totalizando 28 correlações a 5% de significância, 13 a mais do que nos experimentos com *Salvinia* sp. Essa diferença apresentou-se de forma bastante expressiva para o parâmetro glifosato.

A correlação inversa do glifosato com os parâmetros cloreto, fluoreto e AMPA se dá, provavelmente, pelo fato de esses íons serem subprodutos da metabolização da formulação comercial. Destaca-se que as correlações entre glifosato e cloreto se deram em intensidades consideráveis, corroboradas pelos elevados valores dos coeficientes, sendo -0,88 e -0,90 para *Salvinia* sp. e *E. crassipes*, respectivamente. Verificou-se que o cloreto, possivelmente advindo do surfactante, contribui de forma direta para a elevação da condutividade.

A maior biomassa inicial nos experimentos com *E. crassipes* pode ter favorecido maior grau de decomposição orgânica, acarretando maior consumo de OD, elevação de nitrito e redução de nitrato e fosfato, espécies absorvidas pelos organismos vivos. Já nos experimentos de *Salvinia* sp., há indícios de provável ocorrência de processos de nitrificação.

De acordo com Poiger *et al.* (2017), devido a sua combinação única de propriedades, o glifosato tem sido adotado em diversas aplicações e em áreas onde outros herbicidas poderiam causar riscos significativos de contaminação para águas superficiais e subterrâneas. Apesar de suas propriedades favoráveis, o uso urbano de glifosato pode contribuir substancialmente para a elevação da concentração em águas superficiais por longos períodos. Nesse sentido, estudos complementares são importantes para a avaliação de fatores e efeitos sinérgicos do glifosato e seus metabólitos no meio ambiente, além de estabelecer formas adequadas de gerir os possíveis usos desse composto.

Tabela 2.1 - Teste de correlação de Spearman para parâmetros físico-químicos monitorados em microcosmos com *E. crassipes* e *Salvinia* sp. submetidos à aplicação da formulação comercial de glifosato

	OD	pH	Condutividade	Fluoreto	Cloreto	Nitrito	Nitrato	AMPA	Fosfato	Sulfato	Glifosato
OD	--	-0,1606	-0,3195 *	0,4989 *	-0,4219 *	-0,0991	0,1956	-0,4513 *	0,6163 *	-0,4169 *	0,4723 *
pH	-0,323	--	0,8974 *	0,0418	0,5923 *	0,2605	-0,2171	-0,0691	-0,1310	0,4246 *	-0,4867 *
Condutividade	0,0226	-0,0399	--	-0,0801	0,6671 *	0,3000	-0,2946	-0,0932	-0,1750	0,4487 *	-0,5967 *
Fluoreto	-0,2676	0,2666	0,0721	--	-0,3751 *	0,1207	0,0020	-0,2094	0,3310 *	-0,2694	0,5301 *
Cloreto	0,0853	-0,4580 *	0,5242 *	-0,0375	--	0,4528 *	-0,2518	0,2083	-0,4976 *	0,8769 *	-0,9062 *
Nitrito	0,1362	0,1286	-0,0535	-0,2944	-0,2917	--	-0,3841 *	0,0063	-0,2234	0,3758 *	-0,3486 *
Nitrato	0,2104	-0,4613 *	0,4855 *	-0,3270 *	0,8241 *	0,0840	--	0,2396	0,1166	-0,0210	0,2856
AMPA	-0,1357	0,0600	-0,2460	-0,0047	-0,2445	0,0757	-0,1390	--	-0,6715 *	0,4497 *	-0,1232
Fosfato	0,1684	-0,0737	0,4165 *	0,2905	0,2091	-0,4524 *	-0,0665	-0,4008 *	--	-0,5412 *	0,3155
Sulfato	0,0897	0,1983	0,2072	0,4756 *	0,1374	0,0622	0,1221	-0,4979 *	0,1976	--	-0,7880 *
Glifosato	-0,1586	0,5480 *	-0,4242 *	0,2856	-0,8757 *	0,1836	-0,8584 *	0,2545	-0,2121	-0,0510	--

Fonte normal: *Salvinia* sp.

* Significante a 95% de confiança

Fonte itálica: *E. crassipes*

4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo, foi possível inferir que a metabolização do glifosato presente em soluções a partir de sua formulação comercial é mais rápida em ecossistemas aquáticos, seguida de soluções em água bruta, e mais lenta em água deionizada, com tempos de meia-vida iguais a 3,6; 7,3; e 20,9 dias, respectivamente.

Para monitoramento de áreas onde houve manejo de macrófitas aquáticas flutuantes utilizando herbicida a base de glifosato, assim como para avaliação de qualidade de água, é importante considerar que amostras de água brutas com glifosato sofrem alterações de concentração mesmo quando congeladas ou refrigeradas, ou assim que ambientalizadas para realização da análise, sendo aconselhável a medição imediata ou, no máximo, quatro dias, quando apresenta redução na concentração de até 10% da concentração inicial.

Os testes comparativos entre soluções de glifosato em água deionizada a partir do padrão de glifosato e de sua formulação comercial evidenciou alterações significativas nos parâmetros pH e condutividade. Essas alterações podem estar relacionadas com a presença de substância inerte na formulação comercial. As duas soluções avaliadas apresentaram comportamento comum de decaimento na concentração de glifosato ao longo do tempo, acentuando-se ao décimo dia de experimentação.

A utilização de glifosato como herbicida causa variações físico-químicas na água, principalmente em decorrência da elevação da condutividade e ânions, como cloreto, nitrato e sulfato. O comportamento de decaimento da concentração de glifosato em microcosmos é semelhante em testes aplicados a *Salvinia* sp. e *E. crassipes*, atingindo cerca de um décimo da concentração inicial no 20º dia de experimentação.

As diferenças observadas entre resultados obtidos nos experimentos com *E. crassipes* e *Salvinia* sp. podem ser em razão de essa última espécie possuir, sob sua cutícula, uma camada de tricomas (pelos), o que lhe confere alguma proteção, minimizando o contato direto com o herbicida e favorecendo o escoamento das gotículas diretamente para a água.

REFERÊNCIAS

- AMARANTE Jr., O. P. de, SANTOS, T. C. R. dos, BRITO, N. M., RIBEIRO, M. L., 2002. Glifosato: propriedades, toxicidade, uso e legislação. *Quim. Nova*, 25 (4):589-593.
- APHA, AWWA, WEF, 2012. Standard methods for the examination of water and wastewater, 22 ed. Washington DC.
- BAIRD, C., CANN, M., 2011. Química ambiental. Tradução: Marco Tadeu Grassi; 4ª Ed. Porto Alegre: Bookman, 844p.
- BROWN, T. L., LEMAY, H. E., BURSTEN, B. E., BURDGE, J. R., 2005. *Química a ciência central*. São Paulo: Prentice Hall, 992p.
- FORLANIA, G., MANGIAGALLIA, A., NIELSENA, E., SUARDIB, C.M., 1999. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*, 31:991-99.
- GOMES; M. P., SMEDBOL, E., CHALIFOUR, A., ETHIER, L. H., LABRECQUE, M., LEPAGE, L., LUCOTTE, M., JUNEAU, P., 2014. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. *Journal of Experimental Botany*, 65 (17):4691–4703.
- HABERKORN, S. S., QUINIOU, F., NEDELEC, M., ROBERT, R., LIMON, G., BROISE, D. L., 2008. In-situ microcosms, a tool for assessment of pesticide impacts on oyster spat (*Crassostrea gigas*). *Ecotoxicology*, 17:235-245.
- JONGE, H., JONGE, L. W., 1999. Influence of pH and solution composition on the sorption of glyphosate and prochloraz to a sandy loam soil. *Chemosphere*, 39:753-763.
- NEGRISOLI, E., TOFOLI, G. R., VELINI, E. D., MARTINS, D., PALLADINI, L. A., 2002. Depósitos Unitários de Calda de Pulverização com e sem Surfactante em Plantas de *Salvinia molesta*. *Planta Daninha*, Viçosa, v.20, p. 51-56.
- NELSON, M., 2001. Ambientes micelares em química analítica. *Quím. Nova*, 24 (1): 87-93.
- PICCOLO, A., CELANO, G., ARIENZO, M., MIRABELA, A., 1994. Adsorption and desorption of glyphosate in some European soils. *J. Environ. Sci. Health*, 6:1105-1115.
- POIGER, T., BUERGE, I. J., BÄCHLI, A., MÜLLER, M. D., BALMER, M. E., 2017. Occurrence of the herbicide glyphosate and its metabolite AMPA in surface waters in Switzerland determined with on-line solid phase extraction LC-MS/MS. *Environ Sci Pollut Res.*, 24:1588–1596.
- QUEIROZ, A. A., MARTINS, J. A. S., CUNHA, J. P. A. R. da., 2008. Adjuvantes e Qualidade da Água na Aplicação de Agrotóxicos. *Biosci. J.*, 24 (4):8-19.
- ROCHA, T. L., SANTOS, A. P. R. Dos, SOARES, C. M. De A., BORGES, C. L., BAILÃO, A. M., MORAIS, S. M. T. S., 2015. Proteomic and histoathological response in the gills of *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate-based herbicide. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 175-186.
- SANCHES, S. M., SILVA, C. H. T. P., CAMPOS, S. X., VIEIRA, E. M., 2003. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. E Meio Ambiente*, 13:53-58.

- SANTOS, S. C., 2012. Desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para a determinação de pesticida glifosato em amostras ambientais. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Centro-Oeste, 112.
- SAWYER, C. N., MCCARTY, P. L., PARKIN, G. F., 2003. Chemistry for environmental engineering and science. 5ª Ed. North America: McGraw-Hill Companies, 752.
- SCHWUGER, M. J., 1973. Mechanism of interaction between ionic surfactants and polyglycol ethers in water. *Journal of Colloid and Interface Science*, 43 (2):491-498.
- SCHWUGER, M. J., 1973. Mechanism of interaction between ionic surfactants and polyglycol ethers in water. *Journal of Colloid and Interface Science*, 43 (2):491-498.
- SIHTMAE, M., BLINOVA I., BERES, K. H., KANARBIK, L., HEINLAAN, M., KAHRU, A., 2013. Ecotoxicological effects of different glyphosate formulations. *Applied Soil Ecology*, 72:215-224.
- SPRANKLE, P., MEGGIT, W. F., PENNER, D., 1975. Adsorption, mobility and microbial degradation of glyphosate in the soil. *Weed Science*, 23(3):229-234.
- TSUI, M. T. K.; WANG, W. X.; CHU, L.M., 2005. Influence of glyphosate and its formulation (Roundup®) on the toxicity and bioavailability of metals to *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Pollution*, 138:59-68.

CAPÍTULO 3

*Avaliação ecotoxicológica do glifosato utilizado para controle de *Eichhornia crassipes* e *Salvinia* sp.*

1 INTRODUÇÃO

As macrófitas aquáticas são vegetais que vivem em corpos d'água, podendo ser submersas ou flutuantes, muitas vezes de rápida proliferação, apresentando grande capacidade de adaptação ecológica. Os estudos sobre ecologia de macrófitas aquáticas no Brasil são relativamente escassos. As justificativas para a necessidade atual do aumento do número de estudos podem ser resumidas considerando-se os seguintes aspectos: (i) existe uma grande quantidade de ecossistemas que abrigam várias espécies de macrófitas aquáticas; (ii) as macrófitas aquáticas desempenham diferentes funções ecológicas; (iii) as macrófitas aquáticas constituem um grupo de organismos especialmente adequado, devido à alta biodiversidade e ao rápido crescimento para o teste de hipóteses ecológicas e para estudos experimentais; e (iv) em ambientes alterados por atividades humanas, as macrófitas aquáticas podem ocasionar efeitos indesejáveis (THOMAZ e BINI, 2003).

O controle das macrófitas em reservatórios é de grande relevância econômica, devido aos inúmeros prejuízos causados à geração de energia em várias usinas hidroelétricas brasileiras. Atualmente são utilizados três métodos de controle das macrófitas: mecânicos, químicos e biológicos. A forma de controle mais comumente utilizada é a sua retirada manual e mecanizada, o que gera elevado custo, com resultados nem sempre satisfatórios. Os métodos químicos são os que possuem menor aceitação pela sociedade, por utilizarem substâncias, por exemplo, agrotóxicos, cuja toxicidade a diferentes espécies de organismos, inclusive ao homem, nem sempre é conhecida.

Em julho de 2015 foi publicada a Resolução nº 467 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama), 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. Além disso, essa resolução estabelece a necessidade da análise detalhada dos riscos da intervenção pretendida, considerando as peculiaridades do ambiente aquático e os múltiplos usos de seus recursos. Também devem ser levados em conta os meios de gerenciamento desses riscos, as precauções, as medidas de segurança, a indicação dos períodos de carência e os possíveis efeitos do tratamento pretendido.

A ecotoxicologia estuda os efeitos adversos de substâncias tóxicas sobre comunidades e espécies em um ecossistema, podendo ser realizada por meio de bioensaios de ecotoxicidade

aguda e crônica ou de avaliações ecossistêmicas. É uma ciência de grande relevância para avaliação de risco ambiental de substâncias e produtos antes da sua comercialização, sendo fundamental para o monitoramento ambiental de situações de impacto ou alteração ecológica.

As avaliações ecotoxicológicas podem ser realizadas em ar, solo, sedimento e água. Existem muitos estudos de avaliação ecotoxicológica do glifosato em solo, uma vez que o seu grande uso sempre foi na agricultura. No entanto, diante dos debates crescentes sobre sua utilização em corpos d'água, para controle de macrófitas aquáticas flutuantes, foi necessária a complementação de ensaios e experimentos envolvendo o ecossistema aquático. Alguns trabalhos apresentam resultados de ensaios ecotoxicológicos para diferentes formulações comerciais de glifosato, que são variáveis conforme organismo teste, ensaio e formulação (TABELA 3.1).

Tabela 3.1 – Resultados ecotoxicológicos encontrados na literatura para formulações comerciais de glifosato

Formulação	Ensaio	Resultado	Referência
Roundup TM	Morfologia testicular do <i>Astyanax bimaculatus</i>	CL _{50:96} =14 mg.L ⁻¹	Silva Filho, 2010
Roundup [®]	<i>Oreochromis niloticus</i>	CL _{50:96} =21,63 mg.L ⁻¹	Moura, 2009
Roundup [®]	<i>Cyprinus carpio</i>	CL _{50:96} =15,33 mg.L ⁻¹	Moura, 2009
Roundup [®]	<i>Colossoma macropomum</i>	CL _{50:96} =20,06 mg.L ⁻¹	Moura, 2009
Roundup [®]	<i>Danio rerio</i>	CL _{50:96} =71 mg.L ⁻¹	Araújo <i>et al.</i> , 2008
Roundup [®]	<i>Daphnia magna</i>	CE _{50:48} =3,7 – 10,6 mg.L ⁻¹	Cuhra <i>et al.</i> , 2012
Roundup Max TM	<i>Daphnia magna</i>	CE _{50:48} =38,1 ± 6,7 mg.L ⁻¹	Sihtmae <i>et al.</i> , 2013
Roundup Quick TM	<i>Daphnia magna</i>	CE _{50:48} =48,9 ± 5,5 mg.L ⁻¹	Sihtmae <i>et al.</i> , 2013
Roundup [®]	<i>Vibrio fischeri</i>	CI _{50:15min} =24,9 mg.L ⁻¹	Tsui e Chu, 2003
Roundup [®]	<i>Selenastrum capricornutum</i>	CI _{50:96} =5,81 mg.L ⁻¹	Tsui e Chu, 2003
Roundup [®]	<i>Skeletonema costatum</i>	CI _{50:96} =1,85 mg.L ⁻¹	Tsui e Chu, 2003
Roundup [®]	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CL _{50:48} =5,39 mg.L ⁻¹	Tsui e Chu, 2003
Roundup [®]	<i>Daphnia magna</i>	CE _{50:48} =3,7 – 10,6 mg.L ⁻¹	Tsui e Chu, 2003

CL_{50:96}: Concentração letal mediana em 96 horas – CE_{50:48}: Concentração efetiva mediana em 48 horas – CI_{50:15min}: Concentração de inibição mediana em 15 minutos.

Os herbicidas à base de glifosato são os mais utilizados nos Estados Unidos e, comumente, adotados em todo o mundo. A necessidade de compreensão dos efeitos dos herbicidas à base de glifosato sobre a vida selvagem não alvo para a avaliação dos regulamentos relativos à sua utilização surge com caráter de urgência e de extrema importância (LEVIS e JOHNSON, 2015). Há uma crescente preocupação com os impactos dos herbicidas à base de glifosato no meio ambiente aquático, uma vez que os dados sobre o mecanismo de resposta em peixes são limitados. Torna-se necessária a realização de trabalhos que avaliem diferentes ambientes e o efeito da exposição de animais a concentrações de herbicidas ao longo do tempo (ROCHA *et al.*, 2015).

Vera *et al.* (2010) reportaram a influência causada em organismos não alvo e na qualidade da água quando da utilização de herbicidas nas práticas agrícolas, atribuindo efeito toxicológico ao Roundup pelas modificações ocasionadas na estrutura e funcionalidade dos ecossistemas de água-doce, com a redução do crescimento do perifíton em áreas afetadas.

Segundo Rocha *et al.* (2015), herbicidas podem induzir ao estresse ambiental em organismos aquáticos, bem como danos ao sistema respiratório de peixes, reduzindo a capacidade de absorção do oxigênio e causando hipóxia. No Sudeste Asiático, Yusof *et al.* (2014) realizaram ensaios ecotoxicológicos com peixes cultivados em laboratório, avaliando a sobrevivência, a taxa de eclosão de embriões, as alterações no ritmo cardíaco e as deficiências morfológicas. Como resultado, verificou-se que a sobrevivência e a taxa de eclosão diminuíram com o aumento das concentrações de glifosato e que essas alterações podem servir como instrumento de alerta precoce para a contaminação por glifosato nas áreas costeiras da região tropical, sendo uma forma eficaz de avaliação da toxicidade em água.

Pesce *et al.* (2009) detectaram efeitos sobre a composição da comunidade de algas e diversidade da comunidade eucariótica apenas em amostras coletadas no verão e constataram que mesmo com os efeitos de um curto pulso de glifosato em microrganismos limitados, as respostas das comunidades microbianas naturais expostas ao glifosato (e provavelmente a outros riscos de agrotóxicos) podem variar claramente entre diferentes experimentos, podendo ser sazonais.

Os resultados dos experimentos de Silva *et al.* (2014) mostraram que o glifosato pode provocar efeitos nocivos sobre os parâmetros reprodutivos de *Danio rerio* machos, com a redução drástica da fertilidade causada pela diminuição da motilidade dos espermatozoides, além da redução da integridade da membrana mitocondrial e funcionalidade. Autores como Arenzon *et*

al. (2011) e Bertolotti (2009) reportam *Poecilia reticulata*, espécie tradicionalmente adotada em ensaios ecotoxicológicos, com sensibilidade semelhante à da espécie *D. rerio*, que possui metodologia normatizada no Brasil.

Segundo Amarante Jr *et al.* (2002), peixes e invertebrados aquáticos são organismos mais sensíveis ao glifosato e aos demais componentes de seus produtos comerciais, seguidos por bactérias, fungos e alguns invertebrados do solo, incluindo ácaros. Costa e Nomura (2016) realizaram estudos de avaliação ecotoxicológica de ambientes contaminados por formulação comercial à base de glifosato e constataram que a contaminação pode acelerar o declínio de populações de espécies nativas de anfíbios, que se mostraram altamente suscetíveis à contaminação por glifosato, por meio de efeitos letais e subletais.

A toxicidade e as alterações provocadas pelo glifosato nem sempre causam impactos diretos ao meio ambiente. Segundo Tsui *et al.* (2005), a aplicação direta dessas formulações de herbicidas em água superficial contaminada por metal resulta simultaneamente em perda de efeitos herbicidas e alteração na biodisponibilidade dos metais tóxicos aos organismos aquáticos. No entanto, como as concentrações ambientais do glifosato e os metais pesados são geralmente abaixo dos níveis tóxicos agudos, a influência em longo prazo do glifosato sobre a toxicidade do metal é um cenário mais provável. Por outro lado, a rápida absorção do glifosato por partículas do sedimento está bem documentada. Assim, o estudo da interação de glifosato e metal pesado na fase sedimentar torna-se importante para a compreensão de como esses herbicidas afetam a toxicidade de ecossistemas aquáticos.

A causa principal da toxicidade dos herbicidas à base de glifosato pode estar em outros componentes químicos da formulação, que normalmente não é indicada pelos fabricantes. O Roundup Original® tem 68,4% de ingrediente inerte. Segundo Vera *et al.* (2012), é difícil conhecer o verdadeiro mecanismo de ação dessas formulações sobre o meio ambiente, uma vez que a composição química dessas misturas é desconhecida. Tsui *et al.* (2005) relataram que a toxicidade aquática do glifosato é principalmente devido à presença do surfactante na formulação comercial do Roundup. Sihtmae *et al.* (2013) também reportaram o problema ao surfactante, colocando o glifosato como menos seguro, devido, em grande parte, aos aditivos presentes nas formulações. O surfactante tem uma importante função na ação do herbicida, pois facilita o contato e a ação foliar do princípio ativo. Segundo Haberkorn *et al.* (2008), o

surfactante pode reter o herbicida na superfície da água, do aquário e da planta, sendo esta a sua principal via de desaparecimento na água.

Devido à complexidade do produto a ser testado e considerando a composição química, as interações moleculares no ambiente e as variações físico-químicas, é necessária a realização de estudos que se aproximem mais à situação real. Segundo Arenzon *et al.* (2011), para a realização de ensaios ecotoxicológicos, mesmo que normatizados, há uma preocupação constante em aproximar ao máximo as condições experimentais daquelas encontradas no ambiente, tanto por meio de novas abordagens, como os testes *in situ*, quanto pela utilização de espécies de ocorrência local nativas, mais representativas para os locais de estudo.

Mikó *et al.* (2015) investigaram a importância do local experimental para estudos ecotoxicológicos e constataram discrepâncias consideráveis entre resultados de testes laboratoriais clássicos e experimentos realizados em mesocosmos. Estudos de mesocosmos indicam que a ecotoxicologia baseada em padrão de testes laboratoriais nem sempre pode prever adequadamente os efeitos da população, ou em nível da comunidade, no ambiente natural. Infelizmente, são escassos os estudos semelhantes, comparando os efeitos de agrotóxicos em diferentes locais-teste (MIKÓ *et al.*, 2015).

As avaliações dos ecossistemas são estudos com uma abordagem sistêmica que tem sido chamada de ecologia do estresse. Nesta visão, o conceito de nicho ecológico assume grande importância e o estudo torna-se mais realista. São testes multi-espécies, como meso e microcosmos, além de testes tradicionais, avaliando em uma abordagem reduzida os efeitos comportamentais e não apenas a sobrevivência, crescimento e reprodução de um único organismo indicador (MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008).

Este estudo teve por objetivo realizar ensaios ecotoxicológicos tradicionais e ecossistêmicos em microcosmos para avaliação da ecotoxicidade causada pelo uso de Roundup Original®, herbicida à base de glifosato adotado no controle de macrófitas aquáticas flutuantes em ecossistemas aquáticos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios ecotoxicológicos (agudo e crônico) foram realizados com microcrustáceos e bactérias, utilizando a formulação comercial Roundup Original®, o padrão de glifosato, o padrão de AMPA (99,7% de pureza Sigma Aldrich, Brasil), o surfactante Iharaguens® e as amostras dos microcosmos. Também foram realizados ensaios ecotoxicológicos com sedimento, ao final dos experimentos em microcosmos, utilizando-se as mesmas espécies, mediante a obtenção do elutriato segundo ABNT NBR 15.469:2007. Durante os 20 dias de experimentação em microcosmos, foram realizadas, ainda, avaliações ecotoxicológicas ecossistêmicas.

O surfactante presente no Roundup Original® é segredo de fórmula, por isso foi utilizado neste estudo o surfactante indicado pelas lojas do ramo como sendo o mais utilizado para aplicações com formulações de glifosato sem surfactante (Iharaguens®).

Os ensaios de ecotoxicidade aguda foram realizados com base em metodologia padronizada e espécies-padrão de diferentes níveis tróficos: *Daphnia similis* (ABNT NBR 12.713:2016) e *Aliivibrio fischeri* (ABNT NBR 15.411-2:2012).

O resultado do ensaio agudo foi apresentado por meio da concentração efetiva inicial mediana, CE(I)₅₀, que é de 48 horas para *D. similis* e de 5 a 30 minutos para *A. fischeri*. Na primeira, o efeito observado é imobilidade e, ou, mortalidade, determinado por meio da análise estatística, utilizando-se o *software* PROBIT 1.5. Para a bactéria *A. fischeri*, a avaliação do ensaio foi realizada pelo decréscimo da luminescência, considerando um fator de correlação, que é uma medida das alterações da luminescência do controle durante o período de exposição. Esse último cálculo foi realizado pelo *software* Omni (luminômetro do Sistema Microtox® M500 analyser), com a utilização de biomassa liofilizada da Biolux® NRRL-B-11177.

A ecotoxicidade crônica foi avaliada por meio de uma única espécie, *Ceriodaphnia dubia*, com base na metodologia ABNT NBR 13.373:2016. O ensaio estabelece a CENO(I) (concentração inicial de efeito não observado) e a CEO(I) (concentração inicial de efeito observado), que possibilitam o cálculo do VC(I) (valor crônico inicial) pela média geométrica entre as duas medidas, sendo elas obtidas por análises estatísticas, utilizando-se o *software* TOXTAT 3.3.

A quantificação de glifosato foi realizada com o uso de um cromatógrafo Metrohm Profissional IC, com amostrador 850, dozino, coluna Supp 7 250/4.0 e de guarda Supp 1/4.6. O método consiste em um gradiente binário que permitiu a análise simultânea de glifosato, AMPA e ânions na mesma corrida, com um tempo de retenção de até 35 minutos e um limite de detecção de 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para glifosato e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para AMPA, limite de quantificação de 60 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para glifosato e 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ para AMPA. A metodologia desenvolvida pela Metrohm (ABE, 2014) foi aplicada com algumas adaptações, como a subtração do branco para reduzir o ruído que poderia prejudicar a detecção de AMPA, assim como a concentração e fluxo dos eluentes.

2.1 Ensaios Ecotoxicológicos com substâncias e produtos

Foram preparadas soluções de trabalho nas concentrações de 50 mg.L^{-1} para o padrão de glifosato e AMPA; 50 mL.L^{-1} para o Roundup (18 g e.a. L^{-1}); e 1 mL.L^{-1} para Iharaguens® (polioxietileno alquifenol éter). Para o preparo das soluções foi utilizada a água de cultivo dos organismos teste, que é a mesma utilizada como controle, sendo água de nascente com características adequadas conforme especificação na norma do ensaio.

Para essas soluções, foram realizados ensaios de ecotoxicidade aguda com *D. similis* e *A. fischeri* e ensaios de ecotoxicidade crônica com *C. dubia*.

2.2 Ensaios ecotoxicológicos com amostras dos microcosmos

Foram criados microcosmos de lagoa para avaliação do controle de indivíduos das espécies *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (1883) e *Salvinia* sp., macrófitas aquáticas flutuantes, utilizando a formulação Roundup Original® à base de glifosato.

Os microcosmos foram construídos de forma padronizada, simulando uma lagoa existente no bairro Horto, em Belo Horizonte, que fica dentro da área da Fundação João Pinheiro, localizada na coordenada geográfica 19°53'15.702''S 43°54'57.906''O, local de coleta de amostras para a composição de aquários contendo 35 L de água e 4 kg de sedimento. Obteve-se uma coluna de sedimento e água com 2 e 20 cm, respectivamente, totalizando 22 cm (Figuras 3.1 e 3.2).

Figura 3.1 - Vista da lagoa matriz dos microcosmos



Figura 3.2 - Coleta de água (A), peixes (B) e sedimento (C e D)



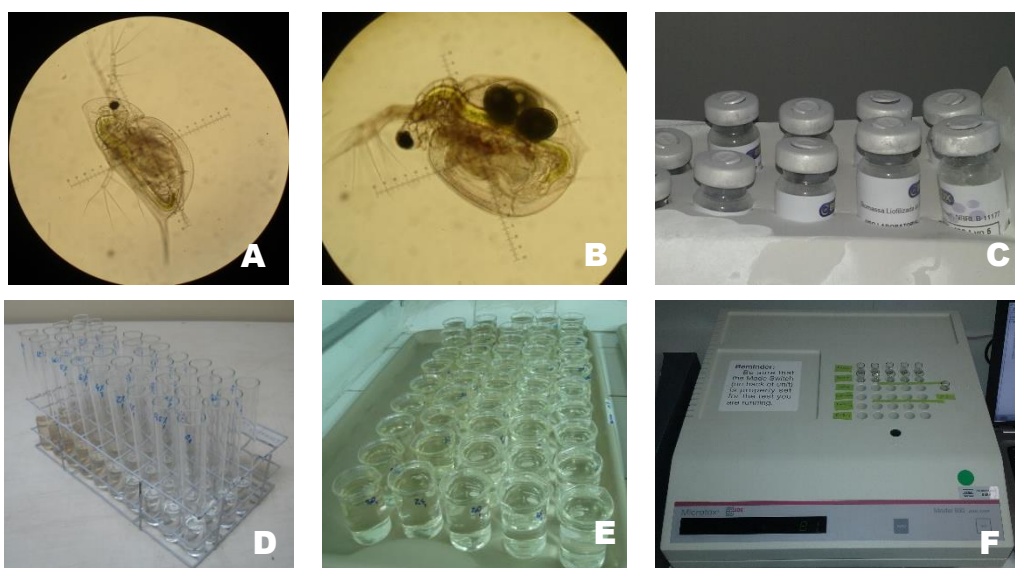
Foram adicionados oito indivíduos de *E. crassipes*, com massa fresca média de 70 g cada, totalizando 560 g; ou 300g de *Salvinia sp.* por aquário. Além disso, cada aquário foi composto por dez caramujos, dez indivíduos de peixes do gênero *Poecilia* e dez indivíduos de *Danio rerio*. Os aquários tiveram isolamento lateral de iluminação, com papel kraft, e foram mantidos em laboratório controlado à temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e luminosidade média de 3.000 lux, com fotoperíodo de 16 horas claro e 8 horas escuro.

Vale ressaltar que todos os microcosmos foram montados e estabilizados usando uma quantidade suficiente de macrófitas aquáticas flutuantes para cobrir toda a superfície da água. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada uma das espécies de macrófitas e controle, mantidos por 20 dias em observação após aplicação única de Roundup Original® na concentração de 100 L.ha⁻¹.

Em cada aquário foi retirada uma amostra de água após 4 e 24 horas da aplicação e a cada cinco dias, e ao final dos 20 dias retirou-se uma amostra de sedimento, todas destinadas à realização de ensaios ecotoxicológicos agudos com *D. similis* e *A. fischeri* e crônico com *C. dubia* (Figura 3.3).

Para permitir a utilização da metodologia padronizada, seguindo integralmente as normas técnicas da ABNT, foram realizados testes de sensibilidade com substâncias de referência para cada um dos organismos utilizados nos bioensaios.

Figura 3.3 - Organismos e testes indicadores: *D. similis* (A), *C. dubia* (B), *A. fischeri* (C), teste agudo (D), teste crônico (E) e termociclador – Microtox (F)



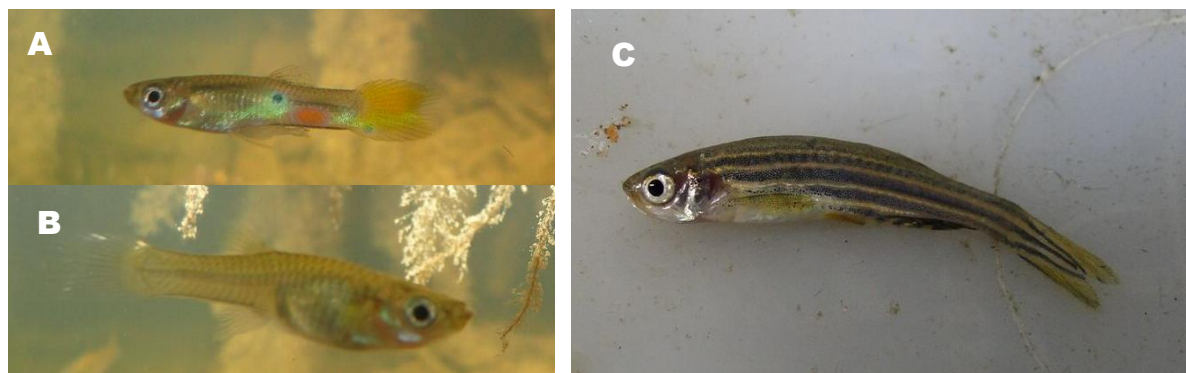
2.3 Avaliação ecotoxicológica ecossistêmica

A avaliação ecotoxicológica ecossistêmica foi realizada a partir da observação direta do efeito sobre os organismos presentes no ambiente, sem a utilização do bioindicador autóctone ao ambiente nem de coletas de amostras.

Durante 50 dias, sendo os 20 dias de experimentação dos microcosmos e 30 dias subsequentes, foram realizadas observações diárias de 10 minutos em cada um dos aquários experimentais. Durante esse período, observou-se o comportamento natatório dos peixes; deslocamentos dos caramujos e o desenvolvimento das espécies vegetais.

Para *Danio rerio* existe uma norma padronizada para a realização de ensaio ecotoxicológico (ABNT NBR 15.499:2016). Os peixes da espécie *Poecilia* sp., apesar de não possuírem norma correlata, também são utilizados em ensaios ecotoxicológicos (Figura 3.4). Segundo Bertoletti (2009), essa espécie é tão sensível quanto *D. rerio* e pode substituir as espécies nativas de caracídeos nos ensaios de ecotoxicidade.

Figura 3.4 - *Poecilia* sp. macho (A) *Poecilia* sp. fêmea (B) e *Danio rerio* (C)



Essa avaliação também pode ser chamada de ecotoxicidade global, pois são observados o comportamento, a sobrevivência e a reprodução de todos os organismos vivos no ambiente, ao longo do período experimental.

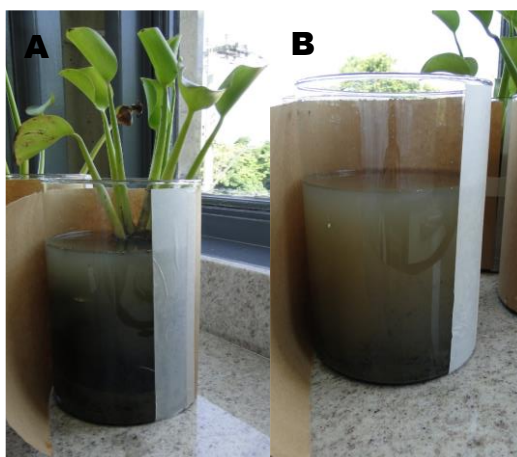
2.4 Avaliações ecotoxicológicas complementares

Análises complementares foram realizadas utilizando experimentos montados em aquários de vidro de capacidade de 3 L e área superficial de 0,0154 m², revestidos lateralmente com papel kraft, utilizando também amostras coletadas na já referida lagoa. O objetivo destes estudos foi avaliar a influência da presença da macrófita e do volume de água na toxicidade aquática.

2.4.1 Avaliação da influência de macrófitas na toxicidade aquática

Os experimentos foram montados em triplicata, duas vezes para confirmação, sendo um composto por 2,5 L de água, 250 g de sedimentos, três peixes *Poecilia* sp. ou *Danio rerio* e um indivíduo de *E. crassipes*; e o outro, de modo similar, excluindo a macrófita (FIGURA 3.5). Foram realizadas observações no efeito sobre os peixes e avaliada a toxicidade aguda (com *D. similis* e *A. fischeri*), crônica (com *C. dubia*) e a concentração de glifosato na água. Foi aplicado em todos os tratamentos o Roundup Original® na concentração de 100 L.ha⁻¹.

Figura 3.5 – Tratamentos com macrófitas (A) e sem macrófitas (B)



2.4.2 Avaliação da influência do volume de água na toxicidade aquática

Foram montados dois experimentos, o primeiro, para avaliar a toxicidade do glifosato quando utilizado nas concentrações de 100, 200, 300 e 400 L.ha⁻¹, partindo da maior concentração que não causa efeito ecotoxicológico e que é eficiente para o controle de macrófitas. O segundo experimento, repete as condições anteriores, porém com volume de água dez vezes inferior objetivando avaliar hipoteticamente os impactos ecotoxicológicos decorrentes das variáveis hidromorfológicas de um reservatório, como volume e profundidade. Foram utilizados aquários com 25 g de *Salvinia* sp, com volumes de água bruta de 250 e 2500 mL (FIGURA 3.6).

Figura 3.6 – Tratamentos com diferentes volumes de água: (A) 2500 mL e (B) 250 mL



Os aquários foram montados e após estabilização de cinco dias foi aplicado Roundup Original[®]. Os testes foram mantidos por mais cinco dias após a aplicação, sendo que 24 horas após a mesma foram realizados ensaios ecotoxicológicos nos experimentos com maior e menor volume e após 5 dias apenas no de maior volume. Foram realizados ensaios de toxicidade aguda utilizando *D. similis* e *A. fischeri* e ensaios de toxicidade crônica utilizando *C. dubia*. Foi realizada a quantificação de glifosato em todas as amostras de água submetidas à ensaios ecotoxicológicos.

2.5 Sensibilidade dos organismos teste

A sensibilidade de todos os organismos-testes foi avaliada com substâncias de referência a cada nova série de experimentação. *D. similis* e *C. dubia* foram testados com cloreto de sódio e *A. fischeri* foi testada com fenol e sulfato de zinco, conforme estabelecido pela norma técnica.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 3.2 estão os resultados dos ensaios ecotoxicológicos para as substâncias avaliadas neste estudo. Destaca-se que o glifosato é o equivalente para o Roundup Original® e que o polioxietileno alquilfenol éter é o equivalente para Iharaguens®.

Tabela 3.2 - Resultados ecotoxicológicos de todas as substâncias testadas

Amostra	<i>C. dubia</i> - VC(I)	<i>D. similis</i> - CE(I)₅₀	<i>A. fischeri</i> - CE(I)₅₀
Glifosato	28,72 mg.L ⁻¹	35,13 mg.L ⁻¹	11,46 mg.L ⁻¹
AMPA	17,68 mg.L ⁻¹	52,80 mg.L ⁻¹	20,25 mg.L ⁻¹
Roundup	5,76 mg e.a.L ⁻¹	9,00 mg e.a.L ⁻¹	20,16 mg e.a.L ⁻¹
Iharaguens	2,80 mg e.a.L ⁻¹	5,80 mg e.a.L ⁻¹	59560 mg e.a.L ⁻¹

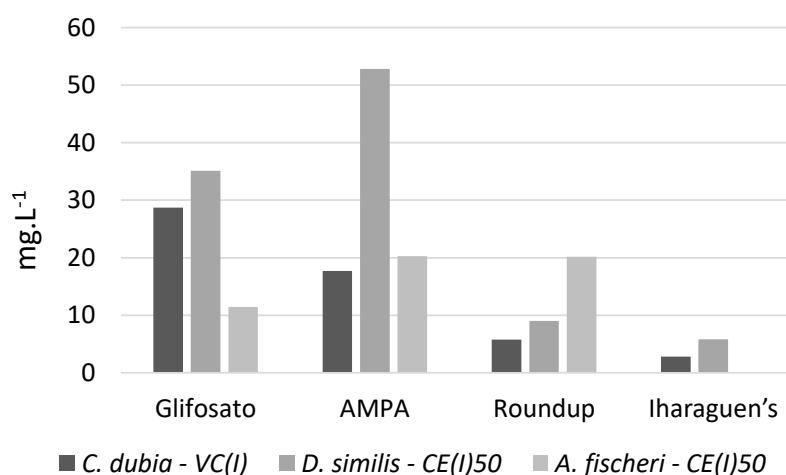
Análises isoladas são importantes para a compreensão da origem da toxicidade. Assim, os resultados mostram que tanto o glifosato quanto seu metabólito, AMPA, apresentaram toxicidade crônica e aguda para todos os organismos testados. Verificou-se, porém, que ao ser comparado aos resultados obtidos para o AMPA, o glifosato apresentou maior toxicidade aguda em análises com *D. similis* e *A. fischeri*, iguais a 35,13 e 11,46 mg.L⁻¹, respectivamente, e menor toxicidade crônica, com VC(I) igual a 28,72 mg.L⁻¹, cerca de 1,6 vez superior.

A formulação comercial Roundup apresentou toxicidade mais elevada do que o glifosato e o AMPA, com VC(I) igual a 5,76 mg e.a.L⁻¹ e CE(I)₅₀ iguais a 9,00 e 20,16 mg e.a.L⁻¹ para *D. similis* e *A. fischeri*, respectivamente. Considerando que apenas 36% do Roundup é composto por glifosato, pode-se inferir que a maior toxicidade desse composto seja causada por compostos adicionais, normalmente surfactantes, que auxiliam no contato da superfície foliar e são conhecidos como espalhantes adesivos. Essa possível causa pode ser corroborada pela elevada toxicidade do Iharaguens®, que apresentou como resultado valores inferiores de VC(I) para *C. dubia* e CE(I)₅₀ para *D. similis* iguais a 2,80 e 5,80 mg e.a.L⁻¹, respectivamente. Como exceção destaca-se a toxicidade aguda para *A. fischeri*, que apresentou menor toxicidade para esse último composto, quando comparado aos demais, possivelmente por se tratar de uma bactéria marinha com menor sensibilidade a esse tipo de composto.

A sensibilidade para *C. dubia* demonstrou ser crescente na seguinte sequência: glifosato < AMPA < Roundup < Iharaguens. Para *D. similis* é: AMPA < glifosato < Roundup < Iharaguens. Já para *A. fischeri*: Iharaguens < AMPA < Roundup < glifosato.

Os valores numéricos de toxicidade aguda e crônica, expressos em $CE(I)_{50}$ e $VC(I)$ na Tabela 3.1, mostram uma relação inversa, isto é, quanto menor esse valor maior é a toxicidade. A representação gráfica facilita o entendimento, não sendo o resultado da toxicidade aguda com *A. fischeri* expresso para Iharaguens®, devido à reduzida toxicidade ($CE(I)_{50} = 59.560 \text{ mg e.a.L}^{-1}$), que prejudicaria a visualização dos demais resultados (Figura 3.7).

Figura 3.7 - Resultados da toxicidade crônica e aguda das substâncias testadas



Esses resultados são relevantes para destacar a importância de escolher corretamente os organismos-testes para realizar um ensaio ecotoxicológico. Com base nos resultados, percebeu-se que a espécie *A. fischeri* não apresenta sensibilidade adequada para avaliação da toxicidade de Roundup Original® e de Iharaguens®, não sendo, então, recomendada para monitoramento de área de manejo que tenha adotado esses produtos.

Aplicou-se 1,8 mL de Roundup Original® em cada microcosmos (648 mg equivalentes de glifosato), sendo esses aquários de 35 L, o que resultaria em uma concentração de 18,5 mg e.a.L⁻¹ em caso de mistura completa. As concentrações iniciais da primeira amostragem nos microcosmos após a aplicação do herbicida, que foram as mais elevadas, variaram de 13,8 a 38,6 mg.L⁻¹, com média de 19,7 mg.L⁻¹. As concentrações mais elevadas ocorreram por ainda não ter havido a mistura completa do herbicida no volume de água do aquário.

Essa concentração é superior aos valores de toxicidade obtidos para Roundup por *C. dubia* e *D. similis*, iguais a 5,76 e 9,00 mg e.a.L⁻¹ respectivamente, e inferior aos valores de toxicidade obtidos para o padrão de glifosato por *C. dubia* e *D. similis*, iguais a 28,72 mg.L⁻¹ e 35,13 mg.L⁻¹ respectivamente. Apenas a amostra que teve a maior concentração de glifosato quantificada na água (38,6 mg.L⁻¹) apresentou efeito tóxico crônico para *C. dubia*, com $VC(I)$

de 70,7%, e agudo para *D. similis*, com CE(I)₅₀ de 81,8%. Não houve evidência de toxicidade, crônica ou aguda, em nenhuma das demais amostras de água, assim como no sedimento coletado nos microcosmos (Tabela 3.3).

Tabela 3.3 – Resultados ecotoxicológicos agudos e crônico das amostras dos microcosmos e concentração média de glifosato por amostra

Amostras (após aplicação)	Glifosato (mg.L⁻¹)	<i>C. dubia</i> - VC(I)	<i>D. similis</i> - CE(I)₅₀	<i>A. fischeri</i> - CE(I)₅₀
Água - 4 horas	19,31	70,7% ^o	81,8% ^o	NT*
Água – 24 horas	15,60	NT*	NT*	NT*
Água – 5 ^o dia	11,79	NT*	NT*	NT*
Água – 10 ^o dia	6,68	NT*	NT*	NT*
Água – 15 ^o dia	4,67	NT*	NT*	NT*
Água – 20 ^o dia	3,66	NT*	NT*	NT*
Sedimento – 20 ^o dia	0,96•	NT*	NT*	NT*

NT: Não tóxico - ^o Resultado obtido em amostra de apenas um microcosmos - * Mesmo resultado em todas as amostras de microcosmos - • Equivalente a 0,24 mg.g⁻¹.

Os resultados mostraram que mesmo utilizando a formulação comercial, a concentração que causou toxicidade nas amostras de água foi a concentração tóxica relativa ao padrão de glifosato, e não do Roundup, o que evidencia a remoção prévia do componente de maior toxicidade presente na formulação pelo contato prévio com as macrófitas.

Sabe-se que durante a aspersão perde-se parte da solução por deriva e que grande parte da outra porção, que atinge a área do experimento, fica aderida nas folhas das macrófitas, com uma menor quantidade sendo carregada para a água. O surfactante, principalmente, tende a ficar retido nas folhas e nas superfícies do aquário, o que pode acarretar redução da toxicidade ao ecossistema aquático.

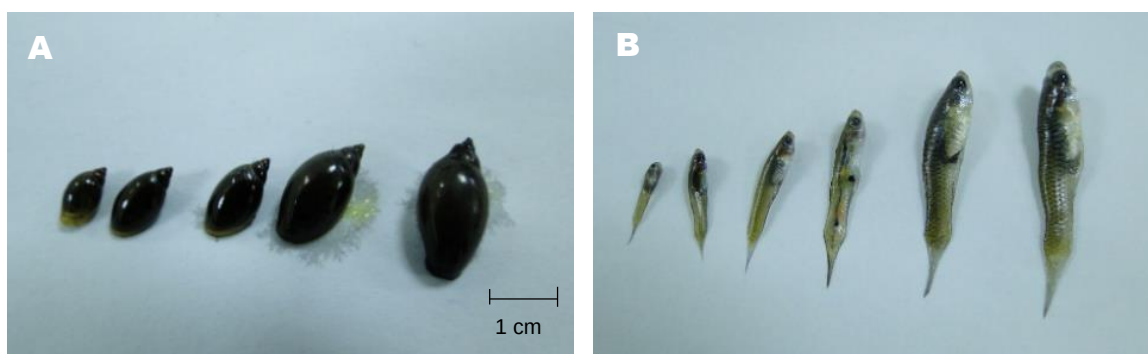
Destaca-se que todos os experimentos de microcosmos foram estabilizados atingindo uma quantidade de macrófita aquática flutuante suficiente para a cobertura de todo o espelho de água.

Na avaliação ecossistêmica, não foi observada nenhuma alteração no comportamento dos peixes (*D. rerio* e *Poecilia* sp.) e moluscos, no entanto, durante os 20 dias de experimento, não houve reprodução e a taxa de mortalidade foi relativamente baixa ($\leq 20\%$), equivalente ao controle. Durante os dias seguintes de observação, após os 20 primeiros dias, ambos os grupos

voltaram a se reproduzir, e no final dos experimentos, após 50 dias, foram identificados indivíduos de diferentes faixas etárias (Figura 3.8). Esse resultado corrobora os estudos de Silva *et al.* (2014), que reportaram efeitos nocivos à reprodução de *D. rerio*, porém há indicativos de que esse efeito é reversível. Há de se considerar, ainda, a necessidade de avaliação do surgimento de mutações ou de más-formações em longo prazo.

A resposta apresentada pelos moluscos evidencia a baixa toxicidade da água para a espécie, pois são organismos que, em situações desfavoráveis, se deslocam pela estrutura do experimento (paredes do aquário) e saem de dentro da água, numa tentativa de evasão da condição tóxica. Esse fato não foi observado ao longo do período experimental e os moluscos se deslocavam livremente dentro da coluna de água.

Figura 3.8 - Diferentes fases de desenvolvimento etário de moluscos (A) e peixes (B)



Nos experimentos com *E. crassipes* e com outros grupos, como algas e macrófitas, foram observadas alterações que não são indícios de toxicidade, pelo contrário, mas de respostas a alterações ambientais que levam à predominância de diferentes espécies que coexistem e que passam a se desenvolver com o decréscimo da outra, em uma sucessão ecológica. Com o início da morte dos *E. crassipes*, abriu-se uma clareira no espelho d'água, o que possibilitou o crescimento de perifíton e de macrófitas menores, como as do gênero *Lemna*, que são, inclusive, utilizadas como organismos-testes em ensaios ecotoxicológicos, como descrito pelo guia de testes de compostos químicos da *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD, 2006).

Os experimentos complementares tiveram como objetivo identificar a ocorrência de toxicidade em caso de aspersão do herbicida em área sem cobertura de macrófitas e apresentaram como resultado a morte dos peixes em menos de 3 horas após a aplicação, devendo ser ressaltado que

nos aquários que continham macrófitas não foi evidenciada nenhuma letalidade ou alteração comportamental.

Foram realizados ensaios de toxicidade crônica e aguda com amostra de água dos experimentos em que ocorreu a morte dos peixes. Esta causou toxicidade crônica para *C. dubia* com VC(I) de 70,7% e aguda para *D. similis* com CE(I)₅₀ de 36,9%, não apresentando toxicidade aguda para *A. fischeri*.

A quantificação do glifosato foi realizada na água do experimento imediatamente após a morte dos peixes, tendo sido detectados 9,6 mg.L⁻¹ (desvio de 0,3 mg.L⁻¹), e um novo experimento foi montado com as mesmas condições anteriores, com 2,5 L de água e três peixes, adicionando-se padrão de glifosato em quantidade suficiente para 10 e 20 mg.L⁻¹, o que não ocasionou morte nem alteração comportamental nos peixes, pelo período de 48 horas. Esse resultado comprova os indicativos de que a maior toxicidade do Roundup Original[®] advém do surfactante que, em casos de recobrimento vegetal, fica retido sobre a superfície foliar, não atingindo a água em concentração tóxica, confirmando a toxicidade causada quando aplicado o Roundup Original[®] em área sem cobertura de macrófitas aquáticas flutuantes.

A fim de facilitar comparações, neste estudo foram utilizadas metodologias padronizadas, seguindo na íntegra as normas técnicas da ABNT, tendo sido realizados testes de sensibilidade com substâncias de referência para cada um dos organismos usados nos bioensaios. A média e o desvio-padrão dos resultados estão apresentados na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 - Resultados ecotoxicológicos agudos e crônico dos testes de sensibilidade dos organismos teste (média ± desvio padrão)

Substância	<i>C. dubia</i> - VC(I)	<i>D. similis</i> - CE(I) ₅₀	<i>A. fischeri</i> - CE(I) ₅₀
Cloreto de sódio	0,60 g.L ⁻¹ ± 0,13	1,83 g.L ⁻¹ ± 0,23	-
Fenol	-	-	21,40 mg.L ⁻¹ ± 2,46
Sulfato de zinco	-	-	7,73 mg.L ⁻¹ ± 2,29

Nos tratamentos com variação de volume a concentração inicial de 100 L.ha⁻¹ não apresentou efeito tóxico para nenhum dos organismos testados nas amostras dos aquários de maior volume, enquanto que nos aquários com os experimentos de menor volume apresentou toxicidade crônica, CEO = 100%. Todas as demais concentrações, 200, 300 e 400 L.ha⁻¹ apresentaram toxicidade crônica e aguda para todas as amostras avaliadas, após 24 horas da aplicação, sendo sempre maior a toxicidade nas amostras de menor volume e mais tóxica quão maior a

concentração aplicada. A aplicação de 200 L.ha⁻¹ apresentou para os aquários de 2500 e 250 mL, respectivamente, CE_{50:48h} = 75,05 e 42,12% para *D. similis* e CEO = 100 e 100% para *C. dubia*. A dose de 300 L.ha⁻¹ apresentou CE_{50:48h} = 48,87 e < 12,5% para *D. similis* e CEO = 50 e 12,5% para *C. dubia*. Já a aplicação de 400 L.ha⁻¹ apresentou CE_{50:48h} < 12,5% para *D. similis* nos dois volumes e CEO = 25 e 12,5% para *C. dubia*. Os resultados mostraram que a concentração de 100 L.ha⁻¹ é a maior concentração que não causa efeito tóxico, desde que avaliada a relação de volume de água do ambiente, sendo inadequada a aplicação do herbicida nas demais concentrações testadas (200, 300 e 440 L.ha⁻¹). Para a bactéria *A. fischeri* nenhuma das amostras testadas apresentou toxicidade aguda, mostrando que essa espécie apresenta baixa sensibilidade para essa matriz contaminante. As amostras coletadas após cinco dias da aplicação deixaram de apresentar toxicidade aguda ou crônica, para todas as concentrações avaliadas, o que demonstra a rápida depuração do composto tóxico (TABELA 3.5). As amostras foram testadas até a diluição de 12,5% devido ao reduzido volume de amostra disponível. As concentrações de glifosato detectadas nas amostras apresentam diferença de 3,1 a 3,8 vezes superior nas amostras de menor volume do que nas de volume dez vezes maior, evidenciando que a alteração da concentração de glifosato não apresenta a mesma ordem de grandeza da diferença do volume. A redução da concentração do glifosato nas amostras, após cinco dias da aplicação, foi eficiente e variou de 57 a 75%.

Tabela 3.5 – Resultados ecotoxicológicos agudos e crônico das amostras dos diferentes volumes avaliados

Ambientes	Período	Glifosato (mg.L ⁻¹)	<i>C. dubia</i> CEO(I) %	<i>D. similis</i> CE(I) ₅₀ %	<i>A. fischeri</i> CE(I) ₅₀ %
Maior volume (2500 mL)	24 horas	100L.ha ⁻¹ =4,7	100L.ha ⁻¹ =NT	100L.ha ⁻¹ =NT	NT
		200L.ha ⁻¹ =8,2	200L.ha ⁻¹ =100	200L.ha ⁻¹ =75	
		300L.ha ⁻¹ =10,2	300L.ha ⁻¹ =50	300L.ha ⁻¹ =49	
		400L.ha ⁻¹ =13,1	400L.ha ⁻¹ =25	400L.ha ⁻¹ =<12,5	
	5 dias	100L.ha ⁻¹ =1,3	NT	NT	NT
		200L.ha ⁻¹ =3,2			
		300L.ha ⁻¹ =3,2			
		400L.ha ⁻¹ =4,7			
Menor volume (250 mL)	24 horas	100L.ha ⁻¹ =14,5	100L.ha ⁻¹ =100	100L.ha ⁻¹ =NT	NT
		200L.ha ⁻¹ =25,5	200L.ha ⁻¹ =100	200L.ha ⁻¹ =42	
		300L.ha ⁻¹ =38,5	300L.ha ⁻¹ =12,5	300L.ha ⁻¹ =<12,5	
		400L.ha ⁻¹ =46,3	400L.ha ⁻¹ =12,5	400L.ha ⁻¹ =<12,5	

NT: Não tóxico

Os organismos-teste apresentaram sensibilidade estável. Os organismos *C. dubia* e *D. similis* foram cultivados em laboratório, em condições controladas, o que forneceu lotes de filhotes com sensibilidades aproximadas para cloreto de sódio, apresentando VC(I) 0,60 g.L⁻¹ com desvio-padrão de 0,13 g.L⁻¹ e CE(I)₅₀ de 1,83 g.L⁻¹ ($\pm$ 0,23 g.L⁻¹), respectivamente. As cepas de *A. fischeri* utilizadas eram de biomassa liofilizada da marca Biolux® de identificação NRRL-B-11177, e todas responderam adequadamente às substâncias-referência, fenol e sulfato de zinco, com valores de CE(I)₅₀ médios de 21,40 mg.L⁻¹ ($\pm$ 2,46 mg.L⁻¹) e 7,73 mg.L⁻¹ ($\pm$ 2,29 mg.L⁻¹), respectivamente.

4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES

Com base nos resultados apontados no presente estudo, verificou-se a elevada toxicidade do glifosato, no entanto sua formulação comercial, Roundup Original®, apresenta condições tóxicas ainda mais consideráveis, fato que aponta a real necessidade de avaliação dos possíveis impactos causados pelo seu uso.

O AMPA, metabólito principal do glifosato, apresenta efeito tóxico semelhante ao do glifosato, de modo que sua degradação nesse metabólito não acarretaria redução da toxicidade ao meio. O componente inerte da composição do Roundup Original® pode ser o responsável pela maior toxicidade do composto comercial.

Foi constatada a possibilidade do uso da formulação em ambientes com crescimento descontrolado de macrófitas aquáticas flutuantes, em concentrações controladas, e o rigor no processo de aspersão, sem efeitos tóxicos aos organismos vivos do ecossistema aquático. Porém, mesmo em concentrações não tóxicas para avaliação global e para os organismos avaliados neste estudo, foram evidenciadas alterações na dinâmica reprodutiva dos peixes, dos moluscos e do ambiente aquático, mesmo que por consequências indiretas. As macrófitas são parte do equilíbrio do ecossistema, e sua morte acarreta alterações físico-químicas da água, o que naturalmente compensado pela plasticidade ambiental, gerando alterações na comunidade biológica, com maior proliferação de outros grupos.

Deve-se garantir que o herbicida nunca seja utilizado em local sem cobertura de macrófitas flutuantes, ou que esses ambientes possam ser atingidos por deriva de gotas durante a aspersão do produto. Nesses casos, o efeito tóxico pode gerar grandes prejuízos ambientais.

O volume de água é relevante, podendo tornar uma concentração considerada como não tóxica, em tóxica. Um plano de manejo de macrófitas com herbicida, deve considerar a dose de aplicação e características do reservatório, preservando os organismos não alvo. Mesmo reduzindo ou eliminando a toxicidade em poucos dias, impactos de curto prazo são importantes e podem ser de difícil recuperação. A escolha do organismo-teste, para esse tipo de monitoramento, é importante uma vez que a bactéria *A. fischeri* foi menos sensível para a matriz testada.

Estudos complementares para avaliação da concentração residual de glifosato e AMPA na água são fundamentais, considerando o elevado risco ao meio ambiente e aos seres humanos, assim como o atendimento aos padrões de enquadramento do corpo hídrico.

REFERÊNCIAS

- ABE, M.. Application Work IC BR6-0006-032015 - *Avaliação da Separação dos Ânions comuns, Oxihaleto, AMPA e Glifosato com Gradiente com Dosino em coluna Metrosep A Supp 7* – 250. Metrohm Pensalab Instrumentação Analítica LTDA. 2014.
- AMARANTE Jr, O. P. A.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L.. Glifosato: propriedades, toxicidade, uso e legislação. *Quim. Nova*, vol. 25, Nº 4, 589-593, 2002.
- ARAÚJO, R. S. de; GARCIA, M. V. B.; GARCIA, T. B. Toxicidade Aguda do Herbicida Glifosato (Roundup) para *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae), em Condições Tropicais. *Anais da III Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônia Ocidental*. ISSN 1517-3135, 2008.
- ARENZON, A.; PEREIRA NETO, T. J.; GERBER, W.. *Manual sobre toxicidade em efluentes industriais*. Porto Alegre: CEP SENAI de Artes Gráficas Henrique d'ávila Bertaso, 2011.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713. *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com Daphnia spp (Crustacea, Cladocera)*, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13373. *Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com Ceriodaphnia spp (Crustacea, Cladocera)*, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15411-2. *Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras aquosas sobre a emissão de luz de Vibrio fischeri (ensaio de bactéria luminescente)*, 2012.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15469. *Ecotoxicologia aquática – Preservação e preparo de amostras*, 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15499. *Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com peixes*, 2016.
- BERTOLETTI, E. Sensibilidade de Algumas Espécies de Peixes de água doce Utilizadas no Brasil. *J. Braz. Soc. Ecotoxicol.*, v.4, n. 1-3, 2009, 9-13.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução nº 467 de 16 de julho de 2015. *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*. 2015.
- COSTA, R. N.; NOMURA, F. Measuring the impacts of Roundup Original on fluctuating asymmetry and mortality in a Neotropical tadpole. *Hydrobiologia* (2016) 765:85–96.
- CUHRA, M.; TRAAVIK, T.; BOHN, T. Clone and age dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*. *Ecotoxicology* (2013) 22: 251-262.
- HABERKORN, S. S.; QUINIOU, F.; NEDELEC, M.; ROBERT, R.; LIMON, G.; BROISE, D. L. In-situ microcosms, a tool for assessment of pesticide impacts on oyster spat (*Crassostrea gigas*). *Ecotoxicology* (2008) 17:235-245.
- LEVIS, N. A.; JOHNSON, J. R. Level of UV-B radiation influences the effects of glyphosate-based herbicide on the spotted salamander. *Ecotoxicology* (2015) 24:1073–1086.

- MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras.* (2008) 12 (3): 355-381.
- MIKÓ, Z.; UJSZEGI, J.; GÁL, Z.; IMREI, Z.; HETTYEY, A. Choice of experimental venue matters in ecotoxicology studies: Comparison of a laboratory-based and an outdoor mesocosm experiment. *Aquatic Toxicology* (2015) 20-30.
- MOURA, E. E. S. de. *Determinação da toxicidade aguda e caracterização de risco ambiental do herbicida Roundup (glifosato) sobre três espécies de peixes*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN, 2009.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. 221. *Lemna sp. Growth Inhibition Test*. In: Guidelines for the testing of chemicals, 23 mar. 2006. Disponível em: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/1948054.pdf>. Acessado em: 18 de dezembro de 2016.
- PESCE, S.; BATISSON, I.; BARDOT, C.; FAJON, C.; PORTELLI, C.; MONTUELLE, B.; BOHATIER, J. Reponse of spring and summer riverine microbial communities following glyphosate exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* (2009), 1905-1912.
- ROCHA, T. L.; SANTOS, A. P. R.; SOARES, C. M. A.; BORGES, C. L.; BAILÃO, A. M.; MORAIS, S. M. T. S. Proteomic and histopathological response in the gills of *Poecilia reticulata* exposed to glyphosate-based herbicide. *Environmental Toxicology and Pharmacology* (2015) 175-186.
- SIHTMAE, M.; BLINOVA I.; BERES, K. H.; KANARBIK, L.; HEINLAAN, M.; KAHRU, A. Ecotoxicological effects of different glyphosate formulations. *Applied Soil Ecology*. 72 (2013) 215-224.
- SILVA FILHO, P. B. da. *Efeitos do RoundupTM e do Thiodan em adultos de Astyanax bimaculatus (Characidae: teleostei): Valores de CL₅₀ e morfologia testicular*. Dissertação de mestrado, Viçosa. 2010.
- SILVA, A. C.; GUAZZELLI, V. G.; LOPES, F. M.; JUNIOR, A. S. V.; CORCINI, C. D.; TAVARES, G.; ROSA, C. E. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology* (2014) 322-326.
- THOMAZ, S. M, BINI, L. M. *Ecologia e manejo de macrófitas aquática*. Maringá: EDUEM, 341 p.,2003.
- TSUI, M. T. K.; CHU, L. M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* (2003) 52: 1189-1197.
- TSUI, M. T. K.; WANG, W. X; CHU, L.M.. Influence of glyphosate and its formulation (Roundup[®]) on the toxicity and bioavailability of metals to *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Pollution* 138 (2005) 59-68.
- VERA, M. S.; FIOR, E. D.; LAGOMARSINO, L.; SINISTRO, R.; ESCARAY, R.; IUMMATO, M. M.; JUAREZ, A.; MOLINA, M. C. R.; TELL, G.; PIZARRO, H. Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanoron freshwater microbial communities. *Ecotoxicology* (2012) 21:1805–1816.
- VERA, M. S.; FIOR, E. D.; LAGOMARSINO, L.; SINISTRO, R.; ESCARAY, R.; IUMMATO, M. M.; JUAREZ, A.; MOLINA, M. C. R.; TELL, G.; PIZARRO, H.. New evidences of Roundup (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology* (2010) 19:710–721.

YUSOF, S.; ISMAIL, A.; ALIAS, M. S. Effect of glyphosate-based herbicide on early life stages of java medaka (*Oryzias javanicus*): A potential tropical test fish. *Marine Pollution Bulletin*, (2014) 494 – 498.

CAPÍTULO 4

*Avaliação do efeito do glifosato utilizado para controle
de Eichhornia crassipes e Salvinia sp. sobre
organismos não alvo*

1 INTRODUÇÃO

As macrófitas aquáticas são vegetais que vivem em corpos d'água, apresentando grande capacidade de adaptação ecológica e rápida proliferação. A proliferação exagerada dessas plantas acarreta efeitos deletérios, de ordem econômica, estética e ecológica, prejudicando a geração de energia elétrica, o abastecimento público, o cultivo de organismos, a recreação e o lazer. O crescimento exagerado das macrófitas aquáticas normalmente é decorrente de descontrole no aporte de nutrientes, principalmente pelo lançamento *in natura* dos esgotos domésticos e industriais (POMPÊO, 2017).

A forma mais comum de controle é a retirada manual e mecanizada, o que gera elevado custo, com resultados nem sempre satisfatórios. Atualmente são utilizados três métodos de controle: mecânicos, químicos e biológicos. Os métodos químicos são os menos aceitos pela sociedade, por utilizarem substâncias, por exemplo, agrotóxicos, cuja toxicidade a diferentes espécies e ao próprio homem nem sempre é inteiramente conhecida.

Em 16 de julho de 2015 foi publicada a Resolução nº 467 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama), 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 estabelece que uma análise detalhada dos riscos da intervenção pretendida deve ser apresentada, considerando as peculiaridades do ambiente aquático, os múltiplos usos de seus recursos, assim como os meios de gerenciamento desses riscos, as precauções de uso da água, as medidas de segurança e a indicação dos períodos de carência e possíveis efeitos do tratamento pretendido sobre os usos da água.

Segundo Levis e Johnson (2015), herbicidas à base de glifosato são os mais utilizados nos Estados Unidos e são comumente usados em todo o mundo. Compreender os efeitos dos herbicidas à base de glifosato sobre organismos não alvo é imprescindível para a avaliação dos regulamentos relativos à utilização desses herbicidas. Segundo Yusof *et al.* (2014), apesar de globalmente utilizado, ainda há pouca informação sobre a toxicidade do glifosato para o ecossistema aquático.

O glifosato é um fosfonato, uma classe de compostos que são estruturalmente similares aos organofosforados. É amplamente utilizado como herbicida, sendo considerado um composto menos tóxico que outros herbicidas, por ser eliminado sem ser metabolizado, por não ser

residual e não haver evidências de que é bioacumulado em tecidos animais (BAIRD e CANN, 2011). Inibe a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato-sintase (EPSP), que sintetiza os aminoácidos aromáticos, e interrompe a biossíntese dos aminoácidos aromáticos, reduzindo assim a síntese de proteína e o crescimento, e, eventualmente, pode provocar a perturbação celular e morte (FORLANIA *et al.*, 1999). Essa via chiquimato não está presente nos animais, por isso não ocorrem maiores impactos à biota e apresenta a tendência de permanecer adsorvido no solo, apesar de apresentar alta solubilidade em água (BAIRD e CANN, 2011).

Segundo Fiori *et al.* (2012), embora se acredite que o glifosato seja inofensivo para organismos não alvo, as formulações comerciais podem ter aditivos que afetam não só as plantas, mas também os animais e os microrganismos aquáticos e terrestres, podendo causar outros efeitos nos corpos d'água, incluindo a mudança da estrutura da comunidade microbiana e os efeitos negativos em organismos aquáticos, principalmente filtradores, como crustáceos e moluscos, e em organismos que se alimentam de sedimento (peixes e anfíbios). DeLorenzo *et al.* (1999) ressaltaram que o efeito de agrotóxicos é em nível ecológico no ecossistema aquático, ao alterar a cadeia alimentar, uma vez que o impacto na comunidade microbiana interfere na ciclagem e na transferência de nutrientes para os demais níveis tróficos.

Há uma crescente preocupação com o impacto dos herbicidas à base de glifosato sobre o meio ambiente, sendo necessária a realização de trabalhos para avaliação da exposição de animais em ambientes com diferentes concentrações de herbicida à base de glifosato, ao longo tempo de exposição (ROCHA *et al.*, 2015).

A influência causada em organismos não alvo e na qualidade da água, quando da utilização de herbicidas nas práticas agrícolas, vem sendo debatida e avaliada por diversos autores. Vera *et al.* (2010) relataram a modificação da estrutura e funcionalidade dos ecossistemas de água-doce, atribuindo efeito toxicológico do Roundup pela redução do crescimento do perifíton em áreas afetadas.

Pesce *et al.* (2009) detectou efeitos sobre a composição da comunidade de algas apenas nas amostras coletadas no verão, o que demonstra que o efeito pode ser sazonal, relatando efeito limitado e variável do glifosato.

Pizarro *et al.* (2016), em um experimento de 25 dias usando mesocosmos, constataram que a adição do glifosato diminuiu significativamente a abundância fitoplanctônica.

Vera *et al.* (2012) constataram, em uma única aplicação de glifosato, rápida estimulação de bacterioplâncton e picocianobactérias planctônicas, bem como elevação da concentração de clorofila na coluna d' água, acelerando a eutrofização do sistema, que elevou a disponibilização de alimentos, aumentando a abundância de rotíferos. Neste cenário, aplicações de uso intensivo e repetidas de herbicidas podem promover mudanças profundas em corpos d'água.

Segundo Santos (2012), a forma mais comum de degradação do glifosato é pela ação das bactérias que fazem a clivagem da ligação fósforo-carbono, formando a sarcosina, ou pela sua clivagem pela oxidação da ligação carbono-nitrogênio, produzindo o AMPA, que é bem mais resistente, mas pode ser quebrado em metilamina, pelo rompimento da ligação fósforo-carbono, que também pode ser quebrada em formaldeído. Os sedimentos desempenham papel fundamental na degradação microbiana de glifosato, tanto pela via de sarcosina quanto de AMPA (WANG *et al.*, 2016 a).

A comunidade microbiana muitas vezes fica esquecida, mas ela contribui extensivamente para a atenuação, mineralização e transformação dos contaminantes orgânicos no ambiente (FIORI *et al.*, 2012). O tempo de residência do contaminante no ambiente pode ser variável de acordo com a comunidade microbiana, assim como essa passa a ser alterada com a presença do contaminante, sendo também um organismo não alvo que pode ser significativamente afetado.

Devido à complexidade do estudo, considerando a composição química e as variações físico-químicas do glifosato e as interações moleculares no ambiente, é necessário realizar estudos mais realistas. Por esse motivo, foram conduzidos experimentos em microcosmos em condição de elevada densidade de macrófitas aquáticas flutuantes, que foram controladas com glifosato, a fim de avaliar o efeito em alguns organismos não alvo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguir são apresentadas as etapas metodológicas adotadas neste estudo, incluindo o detalhamento experimental e os grupos de organismos não alvo avaliados.

2.1 Experimentação em Microcosmos

Foram criados microcosmos de lagoa para avaliação do controle de indivíduos da espécie *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (1883) e *Salvinia* sp., macrófitas aquáticas flutuantes, utilizando a formulação Roundup Original[®], à base de glifosato.

Os microcosmos foram construídos de forma padronizada e simulando a lagoa existente na coordenada geográfica 19°53'15.702''S 43°54'57.906''O, de onde foram coletados, para cada aquário, 35 L de água e 4 kg de sedimento, formando uma coluna com 2 cm de sedimento e 20 cm de coluna d'água, com altura total de 22 cm, além de dez indivíduos de peixes do gênero *Poecilia*. Foram acrescidos ainda oito indivíduos com massa fresca média de 70 g cada e total de 560 g de *E. crassipes* ou 300 g de *Salvinia* sp. por aquário, além de dez caramujos e dez peixes *Danio rerio*. Os aquários foram revestidos lateralmente com papel kraft e mantidos em laboratório controlado, com temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e luminosidade média de 3.000 lux, com fotoperíodo de 16 horas claro e 8 horas escuro.

Os experimentos foram montados em triplicata para cada uma das espécies de macrófitas e controle, e mantidos em estabilização por 15 dias, quando foi aplicada a dose única de Roundup Original[®] na concentração de 100 L.ha⁻¹ (1,8 mL por aquário, perfazendo 0,05 mL.L⁻¹). Após a aplicação os experimentos foram monitorados por 20 dias e observados por mais 30 dias.

Em cada um dos aquários, oito lâminas de vidro nas dimensões de 26 x 76 mm foram suspensas por fio de náilon, funcionando como substrato para avaliação da comunidade perifítica (Figura 4.1).

Figura 4.1 - Fixação de lâminas para substrato de perifíton



A cada cinco dias foi retirada uma amostra de água. Ao final dos 20 dias e antes da aplicação foi retirada uma amostra de sedimento de cada aquário, para a realização dos ensaios microbiológicos. Amostras de fitoplâncton foram coletadas antes da aplicação do herbicida e no final do experimento.

Realizou-se a quantificação de glifosato a cada cinco dias, por meio de cromatografia iônica, utilizando um cromatógrafo da marca Metrohm, modelo 850 Profissional IC com amostrador 850, usando um dozino para permitir o sistema de gradiente automático.

2.2 Avaliação microbiológica

Foram realizadas quantificações da abundância de bactérias heterotróficas antes da administração do herbicida e nas coletas sequenciais à administração em intervalo de cinco dias. Também foram ensaiadas amostras do elutriato obtido do sedimento.

Para determinação da concentração bacteriana foi utilizado procedimento metodológico de contagem em placa, conforme SMEWW 9215, considerando as unidades formadoras de colônias (UFC) presentes na amostra sob análise. A técnica de semeadura utilizada foi a de profundidade, em que são distribuídas alíquotas da amostra ou das diluições escolhidas em placas de Petri estéreis, acrescentando 15 a 20 mL de Ágar Padrão de Contagem de bactérias (PCA), homogeneizando em movimentos na forma de 8, deixando solidificar e incubando a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, por 48 ± 4 horas (Figura 4.2).

Os ensaios foram realizados em local limpo, e foi feita a assepsia das mãos. As placas foram incubadas a $35^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, por um período de 48 horas.

Figura 4.2 - Ensaio para contagem de bactérias heterotróficas



2.3 Avaliação fitoplanctônica e perifítica

A avaliação do fitoplâncton foi realizada nas amostras coletadas nos microcosmos antes da aplicação do herbicida e no final do experimento. Já o perifíton foi removido do substrato artificial utilizado, no final do experimento, tendo como comparação o controle experimental. As amostras quantitativas para fitoplâncton foram coletadas diretamente com o frasco âmbar de 500 mL na subsuperfície e fixadas com solução de lugol acético 5%. O perifíton foi fracionado em amostras para avaliação quantitativa e qualitativa, fixadas com lugol acético 5% e formol 4%, respectivamente (Figura 4.3).

Figura 4.3 - Preparo das amostras de plâncton



As amostras foram sedimentadas, de acordo com Uthermöl (1958), e as algas foram contadas por meio de campos aleatórios (UEHLINGER, 1964) até 100 indivíduos da espécie predominante (LUND *et al.*, 1958). Os cálculos de densidade foram feitos conforme Weber (1973). Metodologia conforme SMEWW 10200 F.

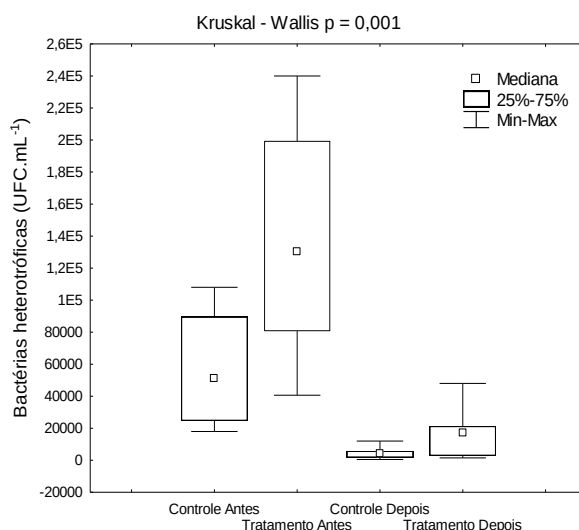
Os organismos encontrados foram identificados até o menor nível taxonômico possível, com o auxílio de bibliografia especializada, pela Bióloga Rose Lílian de Miranda.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A maior concentração de glifosato quantificada nos microcosmos foi de 38,65 mg.L⁻¹, medida quatro horas após a aplicação do herbicida. As concentrações médias de glifosato no 1º, 5º, 10º, 15º e 20º dias após a aplicação foram de 19,31; 11,79; 6,68; 4,67; e 3,66 mg.L⁻¹, respectivamente.

Houve redução de bactérias a partir do décimo dia de experimento, apresentando diferença significativa entre os experimentos iniciais e finais (*Kruskal-Wallis* $p = 0,001$), o que não é consequência do tratamento com o herbicida, pelo fato de ocorrer de forma equivalente no controle e tratado (Figura 4.4).

Figura 4.4 - *Box-plot* e teste de *Kruskal-Wallis* para comparação dos resultados do ensaio de bactérias heterotróficas

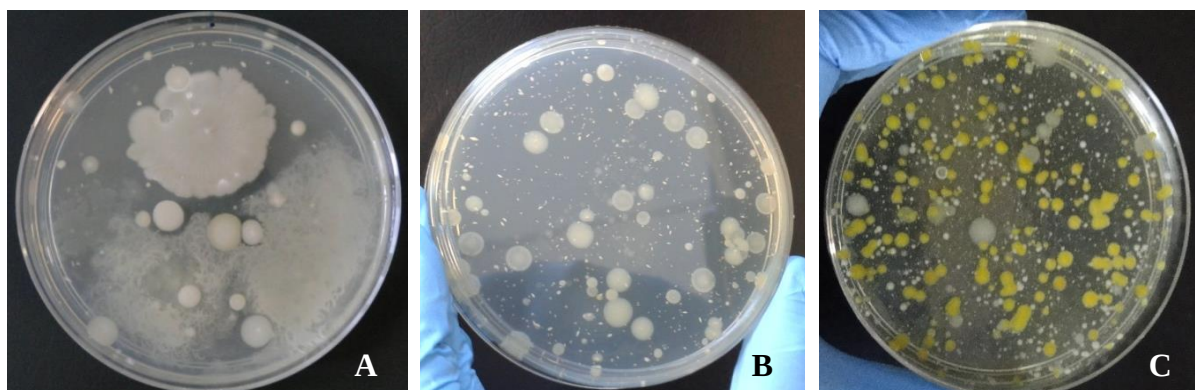


Não houve alteração significativa no número de bactérias heterotróficas do sedimento, o que pode ser constatado nos ensaios das amostras coletadas antes da aplicação e no final do experimento que apresentaram resultados médios iguais a $5,02 \times 10^5$ UFC.g e $5,62 \times 10^5$ UFC.g, respectivamente (*Kruskal-Wallis* $p = 1,00$).

No entanto, na contagem de bactérias heterotróficas em amostras de água foi possível verificar o predomínio de um grupo específico de bactérias, com células mais homogêneas e características, com diferente coloração, em todas as amostras coletadas dos tratamentos após cinco dias, sendo normalizado até o 15º dia. Essa ocorrência pode refletir uma alteração

momentânea do ambiente, que levou à homogeneidade biótica, selecionando espécies mais resistentes ou mais efetivas na degradação do glifosato (Figura 4.5).

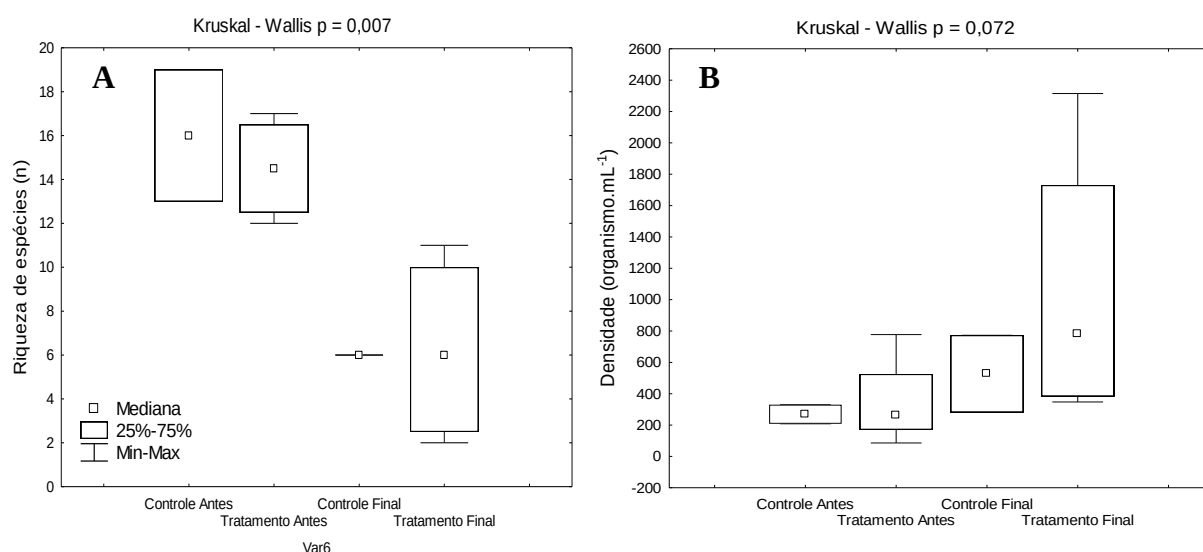
Figura 4.5 - Contagem de bactérias heterotróficas: sedimento (A), água antes da aplicação (B) e na água após a aplicação de glifosato (C)



Para a comunidade fitoplanctônica, houve diferença significativa para a riqueza e a diversidade antes e após o tratamento, no entanto a diferença foi verificada no controle, com redução da riqueza e elevação da diversidade, que apesar de mais variável para o aquário tratado ocorreu em virtude do tempo de experimento, e não pelo tratamento com o herbicida, pelo fato de acontecer de forma equivalente no controle e no tratado (Figura 4.8).

Esse padrão, observado para bactérias heterotróficas e fitoplâncton, de diferenciação da comunidade entre o início e o final do experimento e de ausência de diferença significativa entre tratamento e controle, pode ser resposta de variações ambientais ocorridas nos aquários desde sua montagem até o final do experimento, considerando o fato de ser um sistema fechado sem entrada de água. Assim, essas comunidades são mais afetadas por causas ambientais do que pelo herbicida. Sullivan *et al.* (1981) concluíram que a comunidade fitoplanctônica sob efeito do glifosato foi determinada, principalmente, pelo efeito do habitat e da sazonalidade.

Figura 4.6 - Box-plot e teste de *Kruskal-Wallis* para comparação da riqueza de espécies (A) e densidade (B) encontrada nas amostras de fitoplâncton sob aplicação de glifosato

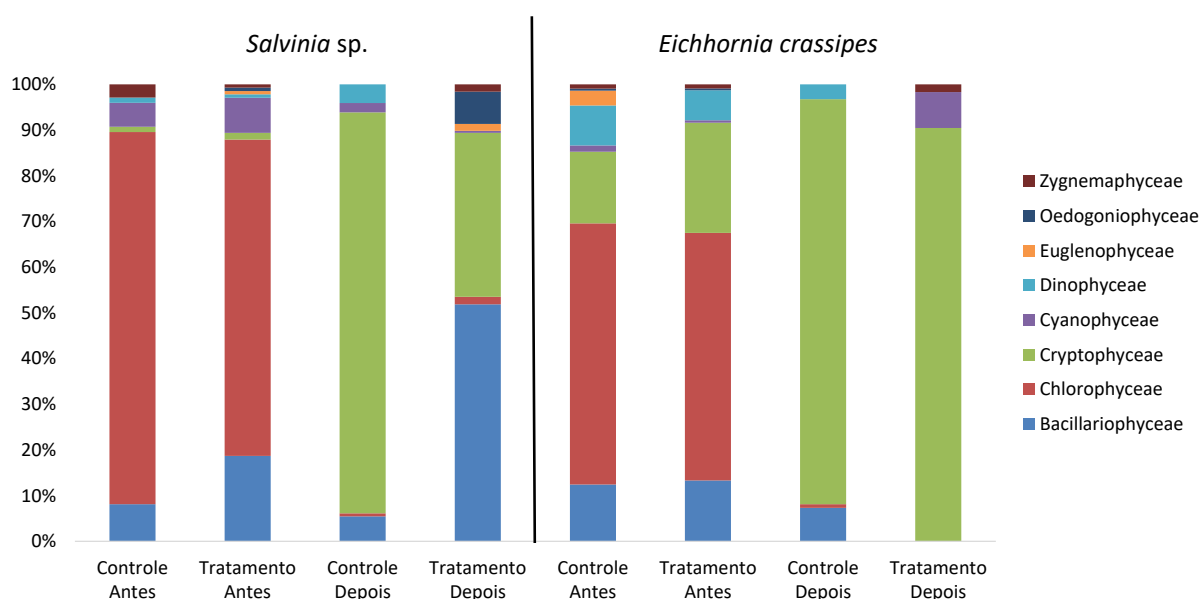


A diversidade de *Shannon* não apresentou diferença significativa, mas foi reduzida com o tempo de experimento, afetando novamente os aquários-controle e os tratamentos com glifosato (*Kruskal-Wallis* p = 0,262).

Ao correlacionar a densidade das famílias encontradas no controle e tratamento com glifosato para *Salvinia* sp. e *E. crassipes* antes e no final do experimento, observa-se relação inversa entre o controle inicial e o tratamento final de *Salvinia* sp. (-0,09); o controle inicial e o tratamento final de *E. crassipes* (-0,03); o tratamento final de *Salvinia* sp. e *E. crassipes* (-0,01), e relação direta significativa entre: controle e tratamento de *Salvinia* sp. antes da aplicação (0,81); controle e tratamento de *E. crassipes* antes da aplicação (0,83); controle de *Salvinia* sp. e *E. crassipes* ao final do experimento (0,89); e controle de *E. crassipes* antes da aplicação e ao final do experimento (0,79).

Esses resultados mostram que os microcosmos responderam bem ao objetivo do estudo, com boa estabilidade, de modo que os experimentos possuíam elevada correlação antes do tratamento com herbicida, passando a se diferenciar no final do estudo, o que pode ser comprovado pelo gráfico de abundância relativa das famílias (Figura 4.7).

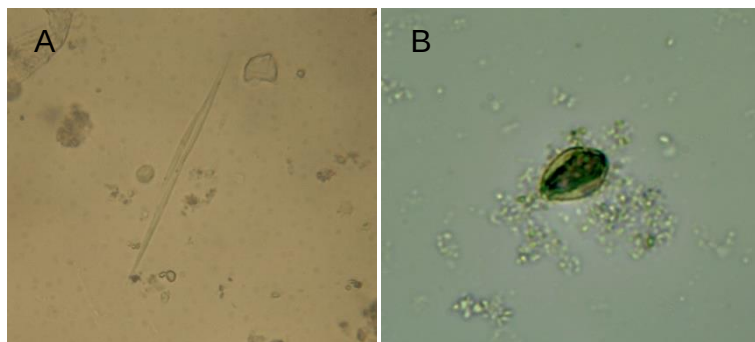
Figura 4.7 - Abundância relativa das famílias de microalgas fitoplanctônicas encontradas nas amostras antes e após 20 dias da aplicação de glifosato



Constata-se diferença entre o início e o final do experimento para a abundância relativa das famílias fitoplanctônicas, pois houve redução e até mesmo eliminação de Chlorophyceae, que teve sua predominância substituída, principalmente, por Cryptophyceae. As espécies pertencentes à família Cryptophyceae possuem a vantagem adaptativa de possuírem flagelos, o que possibilita seu posicionamento na coluna d'água em condições luminosas e nutricionais ideais (JANSSON *et al.* 1996). Além disso, as diferentes condições tróficas encontradas no início e no final do experimento podem ter favorecido as Cryptophyceae, uma vez que elas ocorrem com frequência em ambientes com elevada trofia (BICUDO *et al.*, 2009), tendo sido observado o aumento da abundância dessa família em experimentos de mesotrofia (CROSSETTI e BICUDO, 2005). As famílias Oedogoniophyceae e Cyanophyceae ocorreram apenas após o tratamento nos estudos de *Salvinia sp.* e *E. crassipes*, respectivamente, podem apresentar potencial de degradação de glifosato.

A espécie mais abundante da família Chlorophyceae foi *Monoraphidium sp.* e a da família Cryptophyceae foi a *Cryptomonas sp.* (Figura 4.8).

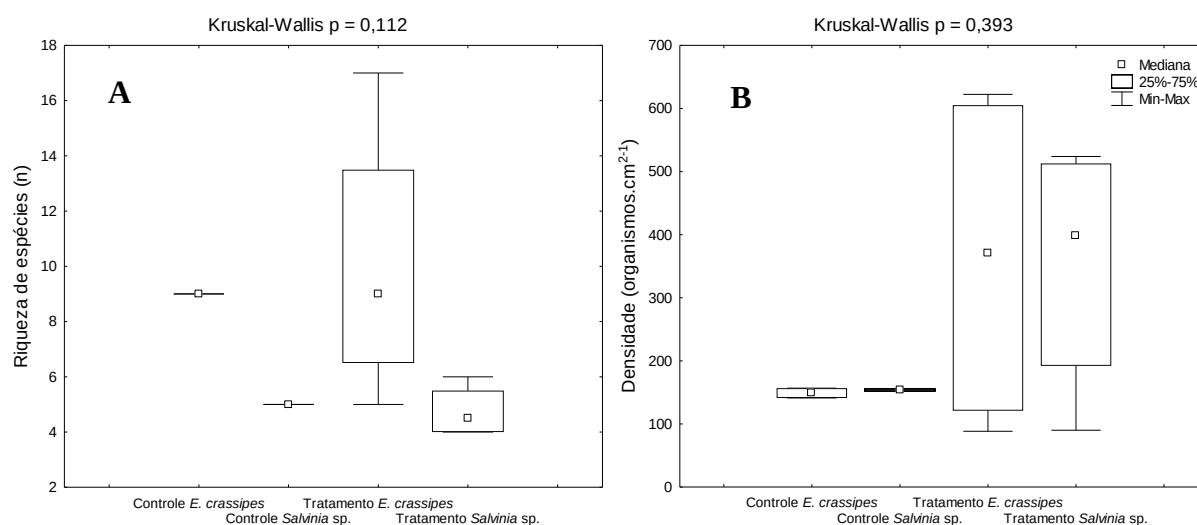
Figura 4.8 - Espécies mais abundantes das famílias Chlorophyceae e Cryptophyceae: *Monoraphidium* sp. (A) e *Cryptomonas* sp. (B), respectivamente



Masini *et al.* (2009) verificaram alteração no crescimento de duas algas fitoplanctônicas a partir de concentração de 50 mg.L⁻¹ de glifosato. Como a maior concentração de glifosato detectada neste trabalho foi 38,65 mg.L⁻¹, pode-se justificar a ausência de diferença entre controle e tratamento na estrutura da comunidade fitoplanctônica - riqueza, densidade e diversidade. Contrariamente, o estudo de Haberkorn *et al.* (2008) em microcosmo demonstrou que o fitoplâncton marinho foi afetado com uma concentração de apenas 0,001 mg.L⁻¹ de glifosato. Isso indica que o efeito do glifosato pode ser espécie-específico. Além disso, alguns estudos têm apontado influência do glifosato somente no picoplâncton (PÉREZ *et al.*, 2007; VERA *et al.*, 2012), que são espécies pertencentes à comunidade fitoplanctônica, mas de tamanho reduzido (<2µm), possuindo assim rápida resposta a impactos (REYNOLDS, 2006).

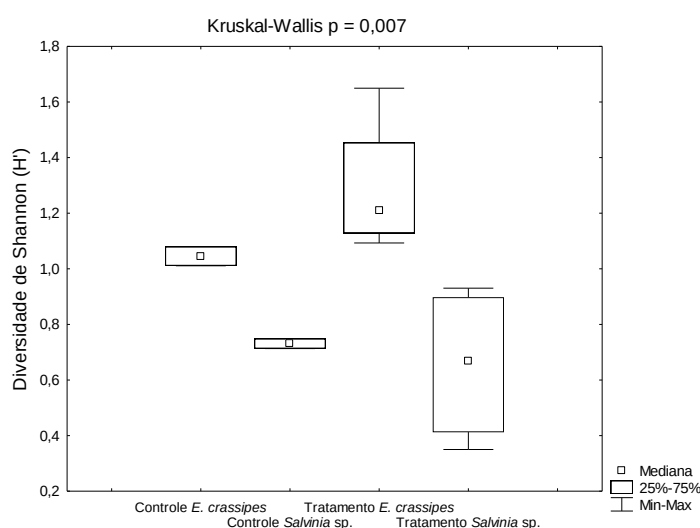
Como pode ser comprovado na Figura 4.9, a comunidade perifítica não teve grandes variações na riqueza de espécies em decorrência do tratamento e manteve as medianas dos controles e dos tratamentos equivalentes muito próximas, não apresentando diferença significativa (*Kruskal-Wallis* p=0,112). Já a densidade tendeu a ser maior nas amostras dos microcosmos tratados com herbicidas, no entanto essa diferença não foi significativa (*Kruskal-Wallis* p=0,393).

Figura 4.9 - Box-plot e teste de *Kruskal-Wallis* para comparação da riqueza de espécies (A) e densidade (B) encontrada nas amostras de perifíton sob aplicação de glifosato



Por sua vez, a diversidade apresentou diferença significativa ($p=0,007$), porém entre os tratamentos e não entre o controle e o tratamento, explicitando que o tratamento de *E. crassipes* apresentou diversidade significativamente maior que o de *Salvinia* sp. (Figura 4.10).

Figura 4.10 - Box-plot e teste de *Kruskal-Wallis* para comparação da diversidade de Shannon encontrada nas amostras de perifíton sob aplicação de glifosato



Como pode ser constatado na Figura 4.11, nos experimentos com *E. crassipes* foi visível o surgimento do perifíton após a morte das macrófitas, assim como foi possível evidenciar alteração na abundância de outros grupos vegetais que passaram a ser mais predominantes no ambiente. Alterações ambientais podem levar à predominância de diferentes espécies que coexistem e que passam a crescer com o decréscimo da outra. Com o início da morte dos aguapés, abriu-se uma clareira no espelho d'água que possibilitou o crescimento de perifíton

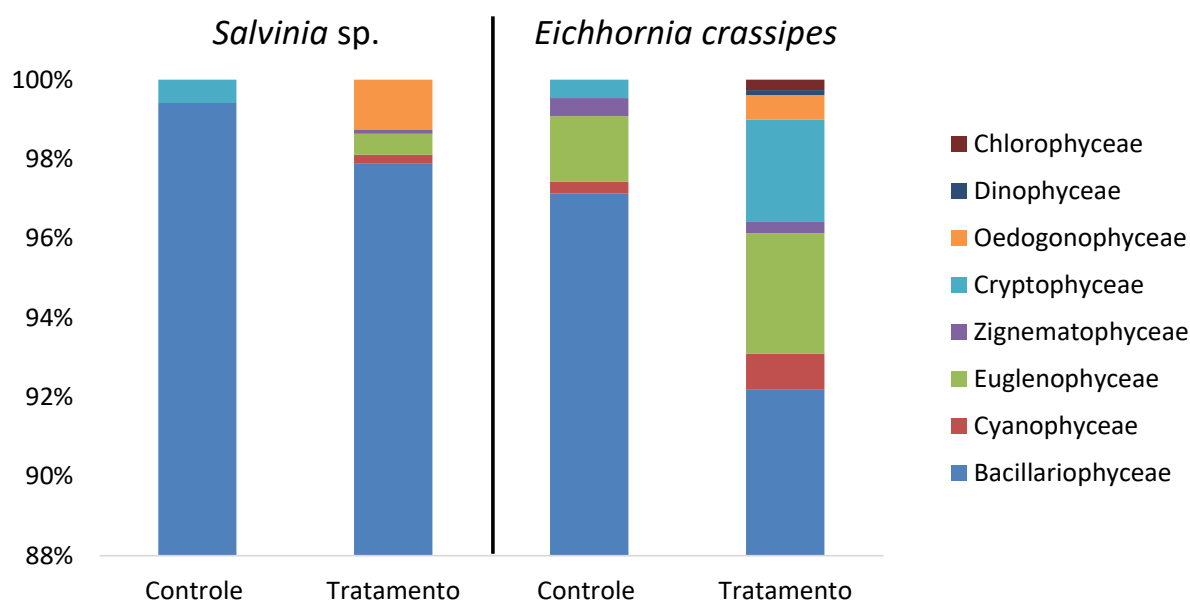
aderido à macrófita e de macrófitas menores, como a do gênero *Lemna*, que são inclusive utilizadas como organismos-testes em ensaios ecotoxicológicos. Esse aumento da luminosidade pode também ter favorecido a comunidade perifítica, aderida às lâminas, dos aquários com *E. crassipes*, levando assim ao aumento da diversidade. Desta forma, o efeito do Roundup sobre a composição algal pode ser observado tardia e indiretamente, devido ao efeito no ambiente em torno, que poderá ocasionar aumento da luminosidade e temperatura da água (SULLIVAN *et al.*, 1981).

Figura 4.11 – Perifíton na folha da *E. crassipes* (A) e macrófitas do gênero *Lemna* (B)



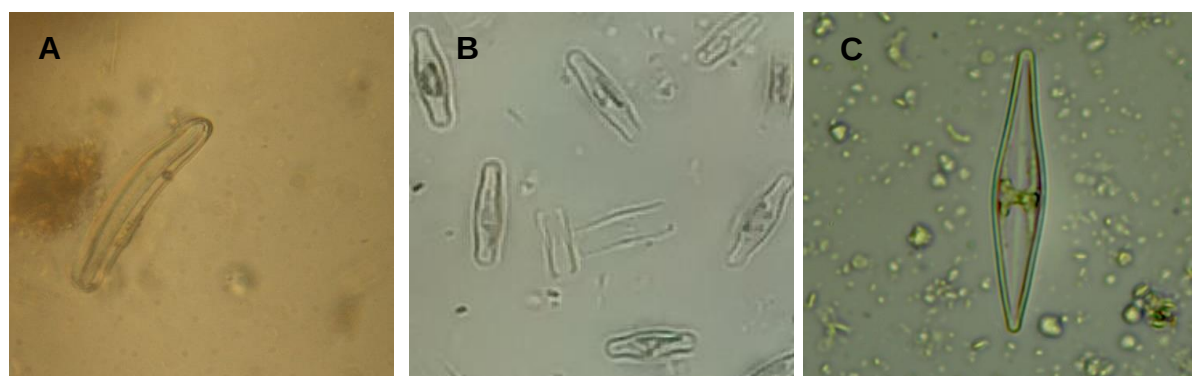
Na Figura 4.12 tem-se o gráfico de abundância relativa das famílias de perifíton encontradas nas amostras analisadas, o que confirma e evidencia a elevação da diversidade nos experimentos após o tratamento com herbicida, principalmente nos microcosmos de *E. crassipes*. Observa-se menor frequência de Bacillariophyceae (diatomáceas) nos aquários tratados com herbicida, dando espaço a diferentes famílias, com destaque novamente à Oedogonophyceae. Fiori e Pistocchi (2014), em laboratório, constataram diminuição no crescimento e atividade fotossintética de uma espécie de Bacillariophyceae sob efeito de herbicida. Já em um outro experimento, Wang *et al.* (2016 b), obtiveram respostas diferentes de espécies de Bacillariophyceae: algumas responderam ao glifosato com crescimento da população, enquanto para outras o glifosato foi tóxico. Dessa forma, o efeito do glifosato parece ser espécie-específico.

Figura 4.12 - Abundância relativa das famílias perifíton encontradas nas amostras sob aplicação de glifosato



Nas amostras de perifíton, a família mais abundante foi a Bacillariophyceae, sendo *Eunotia* sp. a mais abundante em todos os experimentos, enquanto *Achnantheidium* sp. teve maior abundância apenas nos experimentos de *Salvinia* sp. e *Gomphonema gracile*, apenas nos experimentos de *E. crassipes* (Figura 4.13).

Figura 4.13 - Espécies mais abundantes da família Bacillariophyceae: *Eunotia* sp. (A), *Achnantheidium* sp. (B), *Gomphonema gracile* (C)



Durante os 20 dias de experimento não foi observada nenhuma alteração no comportamento dos peixes (*D. rerio* e *Poecilia* sp.) e dos moluscos, assim como não houve reprodução e a taxa de mortalidade foi relativamente baixa ($\leq 20\%$), equivalente ao controle. Durante os dias seguintes de observação ambos os grupos voltaram a se reproduzir, e após 50 dias foram identificados indivíduos de diferentes faixas etárias. Esse resultado corrobora os estudos de

Silva *et al.* (2014), que reportaram efeitos nocivos à reprodução de *D. rerio*, porém há indicativos de que esse efeito é reversível. Há de se considerar, ainda, a necessidade de avaliação do surgimento de mutações ou má formações em longo prazo.

O efeito do glifosato em um nível trófico acarretará mudança em todos os outros. No entanto, neste estudo constatou-se que não houve alterações significativas de densidade no nível trófico primário, assim como não foram detectados efeito tóxico agudo aos peixes, predadores e nem grandes alterações na contagem de bactérias heterotróficas. Dessa forma, considerando aplicação única, o efeito observado, pode ter sido de forma indireta, acarretado pelas alterações da composição físico-química da água.

Ao avaliar os dados físico-químicos conjuntamente com os biológicos para os experimentos tratados com glifosato, foi possível constatar por meio de teste de correlação de *Spearman* que o glifosato é diretamente relacionado com a riqueza (0,80) e a diversidade (0,40) de fitoplâncton e inversamente relacionado à densidade de fitoplâncton (-0,20), e teores de cloreto (-0,60), nitrato (-0,21) e sulfato (-0,65). Esses ânions, por sua vez, apresentam correlação inversa com a diversidade e a riqueza de perifíton. As bactérias heterotróficas apresentam correlação inversa à densidade (-0,62), riqueza (-0,57) e diversidade (-0,55) perifítica. As densidades de fitoplâncton e perifíton apresentaram perfil semelhante, com correlação inversa a temperatura da água, condutividade, bactérias heterotróficas, riqueza e diversidade do próprio grupo (fitoplâncton ou perifíton), cloreto e fosfato, sem, no entanto, mostrarem correlações diretas com o glifosato. Já a turbidez apresenta correlação inversa para as densidades de fitoplâncton e perifíton e correlação direta para riqueza e diversidade.

Esses resultados mostram que a presença de glifosato eleva a riqueza e a diversidade e reduz a densidade de fitoplâncton, enquanto o glifosato não apresentou correlação relevante para riqueza e densidade de perifíton, com a diversidade correlacionada positivamente. O cloreto, o nitrato e o sulfato formaram correlação inversa ao glifosato, enquanto o fosfato não apresentou correlação representativa, assim como para bactérias heterotróficas. Os ânions podem ser decorrentes da dissociação da formulação comercial (glifosato e ingrediente inerte), por isso as correlações são inversas ou fracas em alguns casos. A correlação inversa com as densidades de fitoplâncton e perifíton evidencia que o herbicida pode, indiretamente, favorecer o crescimento dessas comunidades, devido ao incremento de nutrientes por meio da sua dissociação.

O efeito do glifosato pode ser atribuído desde a mudança na concentração de nutrientes até a mudança nas relações ecológicas entre esses organismos, como competição por recursos ou predação por organismos eucariontes heterotróficos (HABERKORN *et al.*, 2008). Por isso, estudos que avaliem o efeito do glifosato em nível de comunidade, nas interações que ocorrem em cadeias alimentares, podem detectar os efeitos indiretos e diretos sobre os organismos não alvo (RELYEA, 2005).

4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES

Os efeitos sobre os organismos não alvo avaliados neste estudo foram sutis, sem grande relevância ecológica. Para as bactérias heterotróficas foram evidenciadas reduções sem significativa relação com o tratamento com o herbicida, devido à diminuição concomitante do resultado do controle. No entanto, observou-se uma possível seleção de bactérias específicas, que se sobrepuseram às outras espécies por um curto período de tempo, apresentando alterações de contagem relacionadas ao decaimento da concentração de glifosato nas amostras de água.

Para o fitoplâncton foi possível observar variação na abundância relativa das famílias, tendo havido alteração entre as porcentagens e as famílias presentes no ambiente após o tratamento com herbicida, com diferenças significativas pouco relevantes para os dados de riqueza, densidade e não significativa para diversidade. Já o perifíton, apesar de não significativo, teve elevação na densidade de organismos, além da alteração das abundâncias relativas das famílias. Pode ter havido um efeito na redução de reprodução de moluscos e peixes, que foi então recuperado com o passar do tempo da exposição ao herbicida.

A diferença encontrada nas comunidades fitoplanctônica, perifítica e microbiológica demonstra que o glifosato pode apresentar efeito na comunidade aquática, o que pode levar à reorganização da comunidade. Desta forma, o principal impacto está na alteração sutil das comunidades, com processos básicos de ciclagem de nutrientes, devido à diminuição da concentração de glifosato, com incremento de nutrientes e concomitante elevação de densidade de organismos planctônicos.

Essas alterações podem se tornar representativas com o uso recorrente do herbicida, podendo levar a modificações nos ecossistemas, com efeito sobre as comunidades biológicas não alvo e resistência dos organismos-alvo. No entanto, usos isolados e esporádicos parecem não levar a impactos significativos. É fundamental a percepção de que esses resultados foram em decorrência do uso do herbicida em uma área totalmente coberta por macrófitas, o que funciona como uma barreira que retém parte do princípio ativo e principalmente do surfactante presente na sua formulação, reduzindo o efeito tóxico da porção que atinge o corpo hídrico.

REFERÊNCIAS

- BAIRD, C.; CANN, M.. *Química ambiental*. Tradução: Marco Tadeu Grassi; 4ª Ed. Porto Alegre: Bookman. (2011), 844p.
- BICUDO, C. E. de M.; FERRAGUT, C.; MASSAGARDI, M. R.. Cryptophyceae population dynamics in an oligo-mesotrophic reservoir (Ninféias pond) in São Paulo, southeast Brazil. *Hoehnea* [online]. (2009), vol.36, n.1
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução nº 467 de 16 de julho de 2015. *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*. 2015.
- CROSSETTI, L. O.; BICUDO, C. E. de M. Structural and functional phytoplankton responses to nutrient impoverishment in mesocosms placed in a shallow eutrophic reservoir (Garças Pond), São Paulo, Brazil. *Hydrobiologia* (2005) 541: 71.
- DELORENZO, M. E.; SCOTT, G. I.; ROSS, P. E.. Effects of the agricultural pesticides atrazine, deethylatrazine, endsulfan, and chlorpyrifos on an estuarine microbial food web. *Environmental Toxicology and Chemistry* (1999), volume 18(12), pp. 2824-2835.
- FIORI, E. D.; PIZARRO, H.; AFONSO, M. dos S.; CATALDO, D. Impact of the invasive mussel *Limnoperna fortunei* on glyphosate concentration in water. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, (2012), 106-113.
- FIORI, E.; PISTOCCHI, R.. Skeletonema marinoi (Bacillariophyceae) sensitivity to herbicides and effects of temperature increase on cellular responses to terbuthylazine exposure. *Aquatic Toxicology* 147 (2014) 112–120.
- FORLANIA, G.; MANGIAGALLIA, A.; NIELSENA, E.; SUARDIB, C.M. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry* (1999), 31, 991-997.
- HABERKORN, S. S.; BECKERB, B.; MARIEC, D.; HABERKORN, H; COROLLERA L.; BROISEA, D. de la. Impact of Roundup on the marine microbial community, as shown by an in situ microcosm experiment. *Aquatic Toxicology*. September (2008), Volume 89, Issue 4, Pages 232–241.
- JANSSON, M.; BLOMQVIST, P.; JONSSON, A.; BERGSTRÖM, A. K.. Nutrient limitation of bacterioplankton, autotrophic and mixotrophic phytoplankton, and heterotrophic nanoflagellates in Lake Östräsket. *Limnology and Oceanography*. (1996), Volume 41, Issue7 , Pages 1552–1559.
- LEVIS, N. A.; JOHNSON, J. R. Level of UV-B radiation influences the effects of glyphosate-based herbicide on the spotted salamander. *Ecotoxicology*, (2015) 24:1073–1086.
- LUND, J.W.G.; KIPLING, C. e LE-CREN, D. The inverted microscope method of estimating algal numbers and statistical basis of estimation by counting. *Hydrobiologia*, (1958) 11: 143-170.
- MASINI, M. R.; COLOMBO, S. de M.; MASINI, J. C.. Influência do Glifosato no crescimento e fluorescência fotossintética das microalgas *Phaeodactylum tricornutum* e *Tetraselmis gracilis*. *Sociedade Brasileira de Química*. 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo (2009).

- PÉREZ, G. L.; TORREMORELL, A.; MUGNI, H.; RODRÍGUEZ, P.; VERA, M. S.; NASCIMENTO, M.; ALLENDE, L.; BUSTINGORRY, J.; ESCARAY, R.; FERRARO, M.; IZAGUIRRE, I.; PIZARRO, H.; BONETTO, C.; DONALD, P. M.; ZAGARESE, H.. Effects of the herbicide roundup on freshwater microbial communities: A mesocosm study. *Ecological Applications*, (2007) 17(8), pp. 2310-2322.
- PESCE, S.; BATISSON, I.; BARDOT, C.; FAJON, C.; PORTELLI, C.; MONTUELLE, B.; BOHATIER, J. Reponse of spring and summer riverine microbial communities following glyphosate exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, (2009), 1905-1912.
- PIZARRO, H.; FIORI, E. D.; SINISTRO, R.; RAMIREZ, M.; RODRIGUEZ, P.; VINOCUR, A.; CATALDO, D.. Impact of multiple anthropogenic stressors on freshwater: how do glyphosate and the invasive mussel *Limnoperna fortunei* affect microbial communities and water quality. *Ecotoxicology*, (2016), 25:56–68.
- POMPÊO, M. *Monitoramento e manejo de macrófitas aquáticas em reservatórios tropicais*. São Paulo; Instituto de Biociências da USP, (2017). 138 p.
- RELYEA, R. A.. The Impact of Insecticides and Herbicides on the Biodiversity and Productivity of Aquatic Communities. *Ecological Applications*, (2005), 15(2), pp. 618-627.
- REYNOLDS, C. S.. *The Ecology of Phytoplankton – Ecology, Biodiversity and Conservation*. (2006), Cambridge University Press.
- ROCHA, T. L.; SANTOS, A. P. R.; SOARES, C. M. A.; BORGES, C. L.; BAILÃO, A. M.; MORAIS, S. M. T. S. Proteomic and histopathological response in the gills of *Poeciliareticulata* exposed to glyphosate-based herbicide. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, (2015), 175-186.
- SANTOS, S. C.. *Desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para a determinação de pesticida glifosato em amostras ambientais*. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual do Centro-Oeste. (2012), 112p.
- SILVA, A. C.; GUAZZELLI, V. G.; LOPES, F. M.; JUNIOR, A. S. V.; CORCINI, C. D.; TAVARES, G.; ROSA, C. E. Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology* (2014) 322-326.
- STANDARD methods for the examination of water and wastewater (SMEWW) 22 ed. Washington: APHA, AWWA, WEF, 2012. 1v
- SULLIVAN, D. S.; SULLIVAN, T. P.; BISALPUTRA, T.. Effects of Roundup | Herbicide on Diatom Populations in the Aquatic Environment of a Coastal Forest. *Bull. Environm. Contain. Toxicol.* (1981) 26, 91-96.
- UEHLINGER, V. Étude statistique des méthodes de dénombrement planctonique. *Arch. Sci.*, (1964), 17(2): 121-123.
- UTERMÖHL, H. Zur Vervollkommung der quantitativen Phytoplankton – Methodik. *Mitteilungen Internationale Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, (1958), 9:1-38.
- VERA, M. S.; FIORI, E. D.; LAGOMARSINO, L.; SINISTRO, R.; ESCARAY, R.; IUMMATO, M. M.; JUAREZ, A.; MOLINA, M. C. R.; TELL, G.; PIZARRO, H. Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor on freshwater microbial communities. *Ecotoxicology* (2012) 21:1805–1816.
- VERA, M. S.; FIORI, E. D.; LAGOMARSINO, L.; SINISTRO, R.; ESCARAY, R.; IUMMATO, M. M.; JUAREZ, A.; MOLINA, M. C. R.; TELL, G.; PIZARRO, H.. New

- evidences of Roundup (glyphosate formulation) impact on the periphyton community and the water quality of freshwater ecosystems. *Ecotoxicology* (2010) 19:710–721.
- WANG, C.; LIN, X.; LI, L.; LIN, S.. Differential Growth Responses of Marine Phytoplankton to Herbicide Glyphosate. *Plos One* (2016 a) 11(3).
- WANG, S.; SEIWERT, B.; KASTNER, M.; MILTNER, A.; SCHAFFER, Andreas; REEMTSMA, Thorsten; YANG, Qi; NOWAK, Karolina M.. (Bio) degradation of glyphosate in water-sediment microcosms – A stable isotope co-labeling approach. *Water Research* (2016 b), 91-100.
- WEBER, C.I. Plankton. In: National Environmental Research Center Office of Research and Development U. S. Environmental Protection Agency Cincinnati (ed.), Biological field and laboratory methods for measuring the quality surface water and effluents. U.S.A. (1973) 1 – 17.
- YUSOF, S.; ISMAIL, A.; ALIAS, M. S. Effect of glyphosate-based herbicide on early life stages of java medaka (*Oryzias javanicus*): A potential tropical test fish. *Marine Pollution Bulletin*, (2014) 494 – 498.

CAPÍTULO 5

Avaliação do risco ecológico do glifosato em água superficial quando utilizado para controle de macrófitas aquáticas flutuantes

1 INTRODUÇÃO

A realização da avaliação de risco de agrotóxicos é uma exigência legal no Brasil, prevista no Decreto nº 4.074 de 2002 e em legislação específica do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - Ibama (Portaria nº 84 de 1996). No entanto, para que ela seja implementada de forma sistemática, devem ser elaboradas rotinas e procedimentos que permitam organizar e avaliar dados e informações, testar suposições e diminuir incertezas, no que se refere a prever o comportamento dos agrotóxicos no ambiente e seus possíveis efeitos ecológicos, de modo que agilize e facilite a tomada de decisões e a implementação da legislação (IBAMA, 2012).

O Ibama fundamenta a implantação da avaliação de risco de agrotóxicos no trabalho desenvolvido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, que é de grande relevância e renome. A formulação do problema de avaliações de risco não inclui considerações a respeito da maior caracterização do ambiente (dados de clima ou solo), uma vez que é pressuposto que os produtos são destinados à aplicação em vastas regiões. É necessário obter informações pertinentes ao produto, o que inclui potenciais usos, instruções de aplicação, propriedades físico-químicas, bem como persistência no meio ambiente, destino e transporte, e ainda informação sobre os efeitos ambientais por meio dos resultados dos testes ecotoxicológicos previamente definidos (IBAMA, 2012).

A avaliação de risco pode ser feita em três fases principais: formulação do problema, análise e caracterização de risco (USEPA, 2004). A análise e a caracterização de risco ecológico podem ser descritas em termos quantitativos (PETERSON e HULTING, 2004). A quantificação do risco é realizada por meio da comparação do efeito agudo com a concentração ambiental estimada, que pode ser calculada com modelos ambientais, microcosmos ou medições em campo (INAO *et al.*, 2008). Para Peterson e Hulting (2004) e QU *et al.* (2011), o risco ecológico é um estudo que deve ser avaliado pelo método do quociente de risco, que pode ser calculado para mais de uma substância, podendo utilizar a medida de toxicidade apropriada e não só aguda.

Os modelos para cálculo da exposição do herbicida em água superficial utilizam dados de coeficiente de partição, adsorção, solubilidade e meia-vida, uma vez que estimam a exposição decorrente de escoamento do solo, consideram a redução da concentração do agrotóxico devido

à adsorção ao solo ou sedimento, assim como a degradação no solo antes de atingir a água, e consideram a contaminação por deposição direta da deriva de pulverização no corpo d'água (PETERSON e HULTING, 2004).

Segundo Brock (2013), existem duas vias principais de exposição a agrotóxicos, exposição aquosa e alimentar, o que pode indicar riscos a diferentes comunidades da fauna aquática e terrestre, incluindo aves e insetos, assim como espécies vegetais. Para avaliação de riscos indiretos decorrentes da exposição de herbicidas, deve-se avaliar o efeito ecológico para os diferentes grupos de organismos não alvo, terrestres e aquáticos, incluindo aves, mamíferos, peixes, invertebrados aquáticos e plantas (PETERSON e HULTING, 2004).

Os organismos são frequentemente expostos a misturas de contaminantes químicos no ambiente, causando efeito combinado. Os efeitos tóxicos da ação conjunta de diferentes moléculas e aditivos devem ser avaliados (PANIZZII *et al.*, 2016). Em alguns estudos, como o de Peterson e Hulting (2004), pode-se optar por avaliar também a formulação comercial e não só o ingrediente ativo, como de costume, uma vez que a formulação pode ser mais tóxica do que o padrão.

Segundo Solomon *et al.* (2013), o risco deve ser sempre expresso como uma probabilidade. O principal desafio na caracterização de risco é a análise de exposição e a análise de efeitos, sendo, inclusive, desejável considerar as diferenças de sensibilidade entre espécies bioindicadoras (HAYASHI *et al.*, 2016).

Os corpos d'água são tratados normalmente como adjacentes às áreas tratadas, e não como a área tratada, sendo uma nova perspectiva, uma vez que os herbicidas são comumente utilizados na agricultura e por isso possuem seus princípios ativos avaliados quanto ao risco relacionado à atividade, incluindo contato primário com o solo, atingindo a água superficial por lixiviação ou deriva. Desta forma, faz-se necessária a avaliação do risco ambiental ao utilizar a formulação comercial com o objetivo de manejo de plantas aquáticas.

Em 16 de julho de 2015 foi publicada a Resolução nº 467 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama), 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. Deve-se, entre outras

exigências, apresentar a avaliação de risco da intervenção pretendida, considerando as peculiaridades do ambiente aquático.

O presente trabalho teve por objetivo realizar a avaliação do risco ecológico do glifosato em água superficial, quando utilizado para controle de macrófitas aquáticas flutuantes por aspersão da formulação comercial Roundup Original[®], o que permite conhecer as causas e a fonte dos riscos e, conseqüentemente, favorece o plano de manejo para utilização do herbicida.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A avaliação de risco foi realizada considerando a contaminação da água superficial pela utilização da formulação comercial Roundup Original®, para manejo de macrófitas aquáticas flutuantes. Foram considerados o risco da formulação comercial e o princípio ativo e do metabólito ácido aminometilfosfônico (AMPA), por meio de quatro etapas: formulação do problema, análise da exposição, análise de efeitos ecológicos e caracterização do risco, conforme detalhamento metodológico proposto pelo Ibama (2012) e apresentado a seguir.

2.1 *Formulação do problema*

Consiste na prévia avaliação das características do produto e do seu padrão de uso para prever os riscos da exposição e os efeitos do produto. Avaliam-se as características físicas e químicas do glifosato que refletem na interação com o meio ambiente, tendo como produto dessa etapa as hipóteses de risco ambiental relativo ao uso do ingrediente ativo e o diagrama de modelo conceitual.

Buscou-se, por meio das características físicas e químicas, extrair informações como persistência, destino e transporte do herbicida no ambiente, assim como estabelecer um padrão de uso, o modo de utilização do produto formulado e o reconhecimento dos possíveis organismos não alvo, com o objetivo de definir as possíveis hipóteses de risco.

A meia-vida do glifosato foi calculada por experimentos de laboratório, partindo da aplicação da formulação comercial em microcosmos, como descrito a seguir, e em quantificações de solução do padrão de glifosato em água deionizada. Os demais dados de parâmetros físicos e químicos utilizados nessa etapa foram secundários.

2.2 *Análise da exposição*

Para essa etapa foi considerado, além do ingrediente ativo, o metabólito AMPA, realizando uma avaliação de risco isolada para cada substância.

A estimativa da concentração ambiental das substâncias (glifosato e AMPA) na água foi realizada por meio da simulação da realidade, com aplicação da formulação comercial em microcosmos de lagoa, para controle de macrófitas aquáticas (organismo alvo), o que permitiu

avaliar e prever os valores de concentração residual do princípio ativo e do seu metabólito na água, após a aplicação, a serem considerados no estudo de avaliação de risco.

Os microcosmos foram construídos de forma padronizada e simulando a lagoa localizada em Belo Horizonte, MG, Brasil, na coordenada geográfica 19°53'15.702''S 43°54'57.906''O, com clima quente e temperado. A temperatura média anual fica em torno de 20,5°C e a pluviosidade média anual em torno de 1.430 mm (<https://pt.climate-data.org/location/2889/>, acessado em 11 de abril de 2017). Foram coletados 35 L de água e 4 kg de sedimento para cada aquário, formando uma coluna com 2 cm de sedimento e 20 cm de coluna d'água, com altura total de 22 cm, além de dez indivíduos de peixes do gênero *Poecilia*, dez peixes *Danio rerio*, dez caramujos, oito indivíduos com massa média de 70 g cada e total de 560 g de *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms (1883) ou 300 g de *Salvinia* sp. por aquário. Os aquários foram revestidos lateralmente e mantidos em laboratório controlado, com temperatura de $23 \pm 2^\circ\text{C}$ e luminosidade média de 3.000 lux, com fotoperíodo de 16 horas claro e 8 horas escuro.

Os experimentos foram montados em triplicata para cada uma das espécies de macrófitas flutuantes e controle, sendo monitorados por 20 dias e apenas observados por mais 30 dias (totalizando 50 dias de experimento), após a aplicação única da formulação comercial de glifosato, Roundup Original®, na concentração de 100 L.ha⁻¹. Essa concentração foi definida após testes de laboratório, que foram realizados com o objetivo de encontrar a menor concentração que causasse efeito satisfatório nas macrófitas em 20 dias, sem evidência de rebrota.

A estimativa da concentração ambiental do ingrediente ativo e do metabólito na água foi realizada por meio da quantificação diária de glifosato e AMPA, por cromatografia iônica, nas amostras de água coletadas dos seis microcosmos, que funcionaram como uma simplificação da realidade, o que permitiu avaliar e prever o comportamento e o destino ambiental do produto.

2.3 Análise de efeitos ecológicos

A análise dos efeitos ecológicos foi realizada por meio de estudos ecotoxicológicos, como forma de avaliar a relação estressor-resposta.

Foram realizados ensaios de toxicidade agudos e crônicos com microcrustáceos (*Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*) e bactéria (*Aliivibrio fischeri*). Foram preparadas soluções de trabalho nas concentrações de 50 mL.L⁻¹ para a formulação comercial (360 g e.a.L⁻¹ de glifosato) e 50 mg.L⁻¹ para o padrão de glifosato e de AMPA. Optou-se por realizar o estudo para AMPA, por ser ele considerado o principal metabólito e pelo fato de a formulação comercial apresentar toxicidade superior à do princípio ativo.

Foram realizados ensaios ecotoxicológicos com as mesmas espécies e metodologia nas amostras coletadas do microcosmos após 24 horas da aplicação da formulação comercial, e a cada cinco dias, durante os 20 dias de monitoramento, quando também foram realizadas medições da concentração de glifosato e AMPA, sendo o efeito ecotoxicológico avaliado após a exposição ambiental do produto.

A sobrevivência, a reprodução e o crescimento são os principais efeitos avaliados nos estudos ecotoxicológicos, sendo possível a realização de estudos ecotoxicológicos conduzidos em nível de comunidade e os estudos de meso ou microcosmos (IBAMA, 2012). Por isso foram realizadas observações diárias do efeito ecotoxicológico conduzidas em nível de comunidade nos microcosmos, após a aplicação do herbicida, durante os 20 dias de monitoramento, somados a mais 30 dias, totalizando 50 dias de observações diárias de 10 minutos.

É importante selecionar espécies de bioindicadores presentes nas vias de exposição traçadas hipoteticamente no diagrama conceitual, o que permite avaliar os efeitos da exposição ao agente estressor, consideradas as vias mais próximas da realidade, e aos organismos não alvo. No entanto, neste estudo foram avaliados apenas os organismos aquáticos, por ser o ambiente mais suscetível, utilizando como bioindicadores organismos invertebrados que apresentam maior sensibilidade.

Os ensaios de ecotoxicidade aguda foram realizados com metodologia padronizada e espécies-padrão de diferentes níveis tróficos: *Daphnia similis* (ABNT NBR 12713:2016) e *Aliivibrio fischeri* (ABNT NBR 15411-2:2012), e a ecotoxicidade crônica foi avaliada por meio de uma única espécie, *Ceriodaphnia dubia*, com o uso da metodologia ABNT NBR 13373:2016.

O resultado do ensaio agudo foi apresentado pela concentração efetiva inicial mediana CE(I)₅₀, que é de 48 horas para *D. similis* e de 5 a 30 minutos para *A. fischeri*. Na primeira, o efeito observado é imobilidade e, ou, mortalidade, que é determinado pela análise estatística

utilizando o programa PROBIT 1.5. Para a bactéria *A. fischeri* o critério de avaliação do ensaio é o decréscimo da luminescência, considerando um fator de correlação, que é uma medida das alterações da luminescência do controle durante o período de exposição, calculado pelo *software* Omni, por meio do equipamento luminômetro do Sistema Microtox® M500 *analyser*, com utilização de biomassa liofilizada da Biolux® NRRL-B-11177. O resultado do ensaio crônico é dado por CENO(I) (concentração inicial de efeito não observado), obtido pelas análises estatísticas utilizando o programa TOXTAT 3.3.

2.4 Caracterização do risco

A fase de caracterização do risco compreende a efetiva integração da exposição com os efeitos ecológicos. Na abordagem determinística, essa integração significa o cálculo do quociente de risco como sendo a razão da exposição estimada com o auxílio dos microcosmos pelo efeito do estudo ecotoxicológico, considerando o resultado mais restritivo, podendo ser discutido em bases agudas ou crônicas.

O mesmo procedimento de caracterização de riscos foi empregado para o ingrediente ativo, metabólito e formulação comercial, devendo ser ressaltado que, para o último, o cálculo não foi realizado com o objetivo de avaliação do risco específico, mas para compreensão e interpretação do efeito, tentando encontrar explicações nos estudos ecossistêmicos relacionados ao risco do princípio ativo.

Destaca-se que essas avaliações de riscos são decorrentes da introdução do ingrediente ativo em corpo d'água superficial para controle de macrófitas aquáticas, devendo a taxa e o modo de utilização previsto ser considerados para o respectivo produto formulado (IBAMA, 2012).

$$QR = CA/CENO \text{ ou } CE_{(I)50}$$

em que

QR = quociente de risco;

CA = concentração ambiental (em mg.L⁻¹);

CENO = concentração de efeito não observado em ensaio de toxicidade crônica; e

CE(I)₅₀ = concentração efetiva mediana de ensaios de toxicidade aguda.

Segundo Hayashi *et al.* (2016), o quociente de risco (QR) é calculado ao dividir a máxima concentração ambiental pela concentração de 50% de inibição (IC₅₀). O quociente maior que 1 significa que a concentração ambiental máxima ultrapassa a IC₅₀ e, portanto, o risco é elevado no local de estudo.

O quociente de risco (QR) obtido deve ser comparado ao pressuposto de risco e aos níveis de preocupação adotado e referenciado pela USEPA (2004). O pressuposto de risco (em inglês, *Level of Concern – LOC*) agudo para organismos aquáticos é de 0,5 e o crônico para todos os animais é de 1,0. Como neste estudo foram avaliados os efeitos agudo e crônico, a comparação do QR foi feita utilizando o valor de LOC igual a 1 para ambas as análises. Esse valor igual a 1,0 quer dizer que a máxima concentração ambiental é a mesma do estudo ecotoxicológico, a partir da qual o risco é iminente.

O valor máximo tolerável de referência para o ingrediente ativo em questão presente nas normas federais e estaduais relativas à qualidade de água (Portaria Ministério da Saúde nº 2.914/2011 e Resolução CONAMA nº 357/2005, Resolução CONAMA nº 430/2011 e COPAM 01/2008) é inferior à concentração estimada de exposição, uma vez que a legislação foi feita com base no risco de contaminação indireta de corpos d'água por utilização de herbicidas em atividades agrícolas. Por este motivo, essas concentrações não foram consideradas para validação da concentração máxima do químico na água.

Portanto, definiu-se que há risco potencial para organismos aquáticos quando $QR > 1,0$. Há de se observar o potencial risco separadamente para bases agudas como para bases crônicas, uma vez que são distintos os tempos de condução dos estudos e os níveis de sensibilidade.

Neste cenário seria desejável a avaliação de riscos às aves, que podem se alimentar das macrófitas afetadas, e às plantas não alvo, principalmente as de margem, que podem ser atingidas por deriva durante o processo de aplicação, porém essas avaliações não foram realizadas em virtude da ausência de dados de exposição e efeito para esses grupos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O glifosato é um fosfonato, uma classe de composto similar aos organofosforados ($C_3H_8NO_5P$), de nome IUPAC N-(fosfonometil) glicina. É um herbicida de uso agrícola que apresenta elevada eficiência na eliminação de ervas daninhas, atuando de forma não seletiva e sistêmica. Na bula da sua formulação comercial é classificado como uma glicina substituída de classe toxicológica III, sendo considerado mediantemente tóxico (MONSANTO, 2009). Apresenta vias de exposição e absorção respiratória, digestiva, dérmica e mucosa. A Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) do produto Roundup Original® classifica a mistura como extremamente tóxica para classificação toxicológica I e de Potencial de Periculosidade Ambiental III, sendo produto perigoso ao meio ambiente (MONSANTO, 2016).

As principais propriedades físico-químicas determinam o comportamento dos herbicidas no ambiente, relacionado à sua persistência e degradação, por isso é importante conhecê-las e entender como cada propriedade influencia o comportamento dos herbicidas. As principais características estão listadas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Propriedades físico-químicas do glifosato

Propriedades	Valores	Referência
Massa molar	169,1 g.mol ⁻¹	Teófilo <i>et al.</i> , 2008, apud Santos, 2012
pH (em solução aquosa 1% m.v-1) a 25°C	4,68	FISPQ, 2016
Densidade relativa	0,5 g.cm ⁻³	Teófilo <i>et al.</i> , 2008, apud Santos, 2012
Densidade a 20°C	1,17 g.cm ⁻³	FISPQ, 2016
Solubilidade em água (S _w)	12 g.L ⁻¹ (25°C)	Teófilo <i>et al.</i> , 2008, apud Santos, 2012
Acidez (pKa)	<2, 0; 2,32; 5,86; 10,86	Teófilo <i>et al.</i> , 2008, apud Santos, 2012
Pressão de vapor (P)	1,94 x 10 ⁻⁷ mmHg	FISPQ, 2016
Coeficiente de partição n-octanal-água (K _{ow})	Log Kow = 2,58	FISPQ, 2016
Lei de Henry (K _H).	<2,10 ⁻⁷ Pam ³ .mol ⁻¹	Cabrera <i>et al.</i> , 2008
Meia-vida (água deionizada)	21,6	Este trabalho
Meia-vida (microcosmos)	3,6	Este trabalho

A solubilidade do glifosato é de 12 g por litro de água, a 25°C, sendo a concentração máxima da molécula que pode ser solubilizada em água, a uma determinada temperatura, acima da qual duas fases distintas coexistirão.

O glifosato é pouco volátil, o que pode ser confirmado pela pressão de vapor, que é uma medida da tendência de volatilização do composto no seu estado normal puro. Compostos com $P > 10^{-2}$ mmHg são considerados muito voláteis à temperatura ambiente; $10^{-4} < P < 10^{-3}$, mediantemente voláteis; $10^{-7} \leq P \leq 10^{-5}$, pouco voláteis; e $P < 10^{-8}$, não voláteis (BELTRÃO, 2010).

A constante da lei de Henry refere-se ao coeficiente de partição ar-líquido ou vapor-líquido, e quanto maior o valor de K_H , maior é o potencial de volatilização da molécula, e geralmente esse valor diminui com o aumento da solubilidade do componente (PRATA, 2002). O glifosato apresenta K_H baixo ($< 2 \cdot 10^{-7} \text{ Pam}^3 \cdot \text{mol}^{-1}$), o que reflete a sua baixa volatilização e consequentemente a sua maior solubilidade.

O coeficiente de partição n-octanol-água apresenta um valor mediano (2,58), que representa bem o seu comportamento na água, pois tem boa solubilidade, porém tende a se adsorver ao sedimento. O K_{ow} é um parâmetro que está relacionado ao destino da molécula no ambiente. Valores de $\log K_{ow} > 4,0$ tendem a se acumular na fração orgânica do sedimento e valores $< 1,0$ são mais solúveis em água com baixa sorção ao sedimento. Geralmente os compostos muito solúveis apresentam baixos coeficientes de sorção. A exceção da regra são os compostos que, embora solúveis, possuem elementos de alta afinidade para adsorção no solo, a exemplo do glifosato (BELTRÃO, 2010).

A constante de ionização indica em que faixa de pH da solução o herbicida irá se ionizar. A ionização do glifosato ocorre em uma faixa ampla de pH de 2 a 10, sendo rapidamente transformado. A meia-vida é um indicador da longevidade de uma molécula e é o tempo requerido para que a metade da concentração da molécula original desapareça. O glifosato é rapidamente degradado em ambientes naturais, podendo se manter estável por mais tempo em ambientes isentos de microrganismos e íons.

É importante lembrar que a formulação comercial é uma mistura que contém “outros ingredientes”, não informados por segredo industrial, de propriedade do fabricante, não sendo possível, portanto, avaliar suas características físico-químicas, seu comportamento ou sua toxicidade.

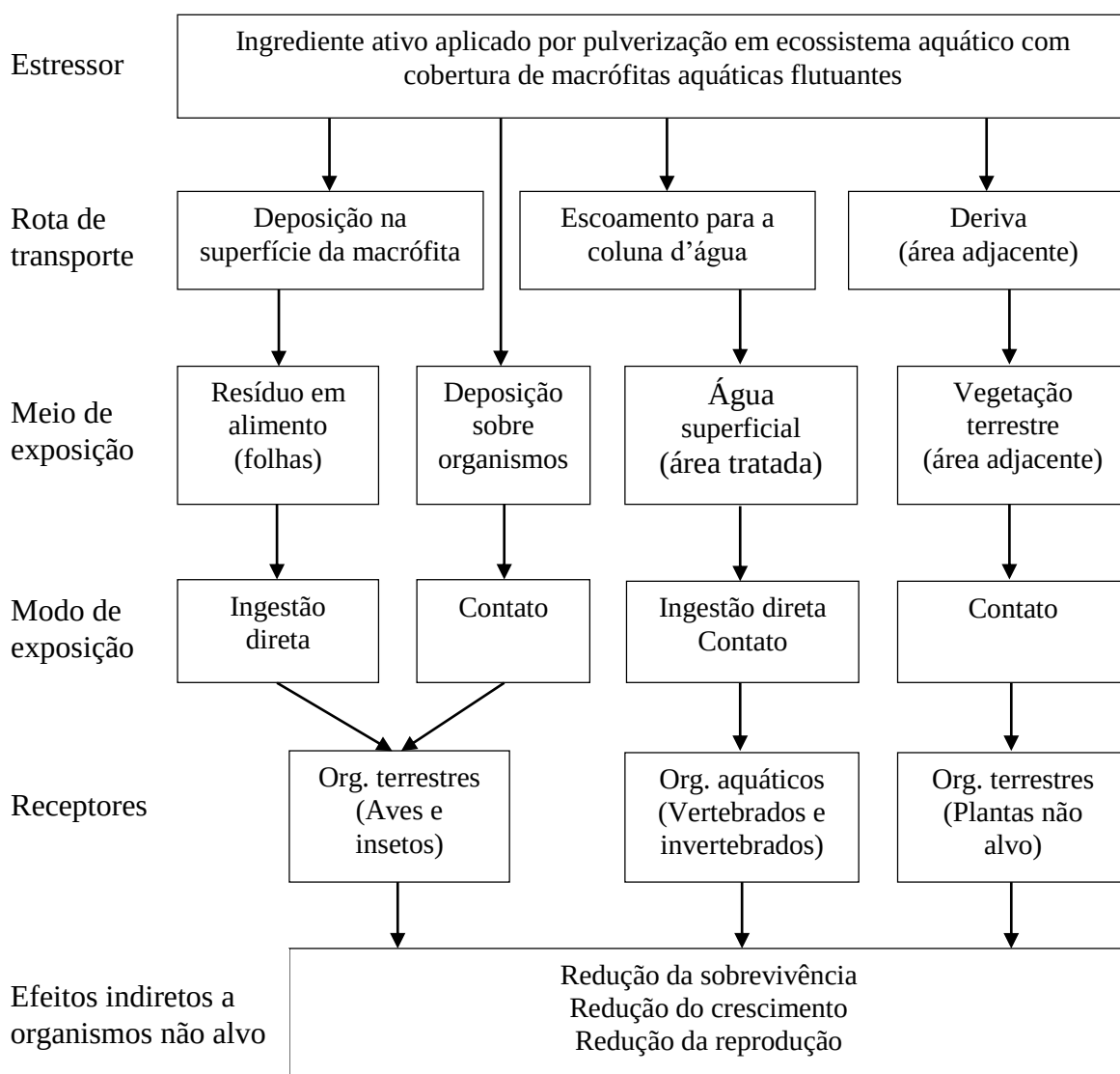
Segundo Carvalho (2013), as formulações comerciais apresentam adjuvantes, que são substâncias para manutenção da estabilidade, facilidade de aplicação, aumento da eficiência ou diminuição de risco. Eles podem influenciar o comportamento do herbicida de diversas formas,

como: dispersantes (impedem a aglomeração de partículas), emulsificantes (compatibilizam frações polares e apolares), espessantes (aumentam a viscosidade), solventes (dissolvem o ingrediente ativo), molhantes (permitem rápida umectação do produto em contato com a água) e tamponantes (deixam o pH dentro de uma faixa desejada).

O risco é minimizado quanto mais direcionada for a aplicação sobre o organismo-alvo, evitando-se o uso de calda excedente que possa atingir o corpo d'água, onde será solubilizado e disponível para a biota, mesmo que fique em maior parte adsorvido nas partículas suspensas ou sedimento.

A Figura 5.1 apresenta um diagrama do modelo conceitual que descreve o risco ambiental relativo ao uso do glifosato aplicado por pulverização para controle de macrófitas aquáticas flutuantes para o produto formulado. Observa-se que grande parte do risco está associada à aplicação, devido ao risco de deriva e de contato direto em organismos não alvo. Desta forma, o risco está associado não somente aos organismos aquáticos, mas também aos terrestres, incluindo vegetação terrestre adjacente (mata ciliar), aves e insetos. Os possíveis efeitos são os mesmos para todos os receptores, indo de morte à redução na reprodução; os efeitos mais sensíveis, como bioquímicos, não são avaliados.

Figura 5.1 – Diagrama do modelo conceitual descrevendo o risco ambiental relativo ao uso de glifosato para controle de macrófitas aquáticas flutuantes



Nos microcosmos foi aplicado 1,8 mL da formulação comercial de glifosato (648 mg equivalentes de glifosato), o que resultaria em uma concentração de 18,5 mg e.a.L⁻¹ considerando a mistura completa no aquário. No entanto, parte dessa concentração fica retida nas folhas das macrófitas durante o processo de aplicação e parte é perdida por deriva, levando a concentrações mais baixas na água.

Para a concentração ambiental máxima do glifosato foram consideradas as medições realizadas 24 horas após a aplicação, a partir da qual começou a sua redução. Quantificações e estudos realizados antes deste prazo não foram considerados por não ter havido ainda a mistura do herbicida na coluna de água. Para AMPA, buscou-se a maior concentração ao longo do experimento, tendo as maiores concentrações sido verificadas entre o quinto e o décimo dia.

Na Tabela 5.2 tem-se a estatística descritiva para as quantificações realizadas de glifosato e AMPA nos experimentos de microcosmos. O valor médio de concentração máxima de glifosato encontrado para os seis microcosmos foi de 15,6 mg.L⁻¹, variando de 13,8 a 18,2 mg.L⁻¹, com desvio-padrão de 1,5 mg.L⁻¹. Para AMPA, o valor médio de concentração máxima encontrada foi de 0,322 mg.L⁻¹, variando de 0,186 a 0,553 mg.L⁻¹, com desvio-padrão de 0,130 mg.L⁻¹.

Tabela 5.2 - Concentração ambiental de glifosato e AMPA quantificação dos microcosmos

Parâmetro	Média mg.L ⁻¹	Mínimo mg.L ⁻¹	Máximo mg.L ⁻¹	Desvio-padrão mg.L ⁻¹
Glifosato	15,6	13,8	18,2	1,5
AMPA	0,322	0,186	0,553	0,130

Para o cálculo do quociente de risco foram utilizadas as concentrações ambientais máximas encontradas nos microcosmos.

Na Tabela 5.3 estão os resultados dos ensaios ecotoxicológicos para o padrão de glifosato, AMPA e sua formulação comercialmente disponível.

Tabela 5.3 - Resultados ecotoxicológicos de todas as substâncias testadas

Amostra	<i>C. dubia</i> CENO	<i>D. similis</i> CE(I) ₅₀	<i>A. fischeri</i> CE(I) ₅₀
Glifosato	27,5 mg.L ⁻¹	35,13 mg.L ⁻¹	11,46 mg.L ⁻¹
AMPA	12,5 mg.L ⁻¹	52,80 mg.L ⁻¹	20,25 mg.L ⁻¹
Roundup	3,6 mg e.a.L ⁻¹	9,00 mg e.a.L ⁻¹	20,16 mg e.a.L ⁻¹

O cálculo do quociente de risco agudo foi realizado para as duas espécies vegetais avaliadas, podendo ser levada em consideração a espécie mais sensível para cada produto, ou optar-se pela resposta tóxica de maior relevância, em que a sobrevivência se destaca sobre as respostas bioquímicas. Alguns efeitos na diversidade das espécies podem ser tolerados, e medidas de sobrevivência ou reprodução e crescimento são mais úteis que aquelas baseadas nas respostas fisiológicas ou bioquímicas que não estejam claramente relacionadas ao nível de resposta daquela população ou comunidade, como é o caso da *A. fischeri*, em que é avaliado o decréscimo da luminescência (IBAMA, 2012).

A relevância de se fazer avaliações ecotoxicológicas com mais de uma espécie é porque alguns bioindicadores são menos sensíveis a determinadas substâncias, como ocorreu com a espécie *A. fischeri* no ensaio com a formulação comercial. Esse fato pode ser em decorrência do menor efeito tóxico da substância inerte presente na formulação para esse organismo-teste. A espécie

A. fischeri, em termos ecológicos para ambientes aquáticos de água-doce, é menos representativa do que a *D. similis*, pois é uma bactéria de água salgada, no entanto se faz relevante por representar outro nível trófico, sem representante de água doce, e que pode estar sendo afetada de forma semelhante.

Devido à maior toxicidade da formulação comercial quando comparada com o princípio ativo, optou-se pela realização do cálculo do seu quociente de risco, com o intuito de compreender a dinâmica e o risco em caso de uma aplicação real. A Tabela 5.4 apresenta os resultados do quociente de risco crônico e agudo para os três compostos avaliados. Deve-se ressaltar que o quociente de risco (QR) obtido deve ser comparado ao pressuposto de risco (LOC) e que se QR > 1,0 pressupõe-se que há risco ambiental na área estudada e nas condições avaliadas.

Tabela 5.4 - Quociente de Risco (QR) crônico e agudo para as substâncias avaliadas em diferentes organismos teste

Composto	QR - crônico CA / CENO	QR - agudo - <i>D. similis</i> CA / CE(I) ₅₀	QR - agudo - <i>A. fischeri</i> CA / CE(I) ₅₀
Padrão de glifosato	0,66	0,52	1,59
Padrão de AMPA	0,04	0,01	0,03
Formulação comercial	5,06	2,02	0,90

Analisando os resultados para o princípio ativo recomendado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, observa-se que não há risco crônico ou agudo para microcrustáceos, podendo haver risco agudo, pois a espécie *A. fischeri* apresentou resultado mais sensível. Já a formulação comercial apresenta QR agudo e crônico superiores ao pressuposto de risco, sendo um alerta da diferença do risco apresentado pelo princípio ativo e pela formulação comercial, sendo provavelmente em decorrência do outro ingrediente presente na formulação.

O AMPA não apresenta riscos ambientais crônico ou agudo, provavelmente pela baixa concentração de formação na água.

Para caracterização do risco é preciso compreender a diferença do quociente de risco entre o princípio ativo e a formulação comercial e estabelecer uma avaliação do risco da utilização do produto. Para isso, foram fundamentais as análises ecotoxicológicas das amostras coletadas no microcosmo 24 horas após a aplicação da formulação comercial. Os resultados mostraram que mesmo apresentando concentrações de glifosato superiores aos valores de CENO e CE(I)₅₀

encontrados para os testes com a formulação comercial, não houve efeito crônico ou agudo para nenhuma das espécies testadas.

Destaca-se que todos os microcosmos, quando da aplicação do herbicida, apresentavam o espelho d'água completamente coberto por macrófitas flutuantes, que podem ter funcionado como um filtro para remoção do surfactante da formulação, que passou a apresentar toxicidade referente apenas ao princípio ativo e, portanto, não apresentou efeito agudo ou crônico. Por fim, foram realizadas observações do efeito ecotoxicológico conduzidas em nível de comunidade nos microcosmos, após a aplicação do herbicida, não sendo evidenciadas anormalidades.

4 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES

As características físicas e químicas do glifosato demonstram sua baixa volatilidade, alta solubilidade em água e tendência de adsorção no sedimento. Esse herbicida apresenta característica ácida, com quatro constantes de dissociação, o que mostra a degradação da molécula em ambientes com pH variando de 2 a 10. Esta característica pode refletir na curta meia-vida em ambientes naturais.

O modelo conceitual de risco delimitado pelo diagrama evidencia risco indireto, não só aos organismos aquáticos, mas também aos terrestres, e destaca os riscos decorrentes da aplicação pela deriva ou pelo contato direto com organismos não alvo.

Os estudos realizados mostraram, por meio do quociente de risco, que o padrão de glifosato não apresenta risco de redução de sobrevivência ou reprodução para microcrustáceos, mas que pode causar efeitos mais sensíveis com alterações bioquímicas de outros organismos não alvo, sendo pertinentes estudos complementares para definição de quais efeitos devem ser relevados, assim como a realização de ensaios com organismos terrestres não alvo.

O AMPA, aparentemente, não apresenta risco ecológico, mesmo apresentando efeito tóxico, devido a sua formação em baixas concentrações no ecossistema aquático.

A formulação comercial do glifosato é composta por uma mistura que inclui outros ingredientes, o que a torna mais tóxica que o ingrediente ativo. Essa maior toxicidade é atenuada quando ele é aplicado de modo correto em uma área completamente coberta por macrófitas aquáticas flutuantes.

Considerando a definição da concentração ambiental máxima quantificada em microcosmos a partir da aplicação da formulação comercial de glifosato (Roundup Original[®]) na concentração de 100 L.ha⁻¹, para controle de macrófitas aquáticas em área de crescimento descontrolado e com o espelho d'água completamente cobertos por macrófitas, não há evidência de risco para invertebrados aquáticos pelo escoamento do produto para a coluna d'água após a aplicação.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12713. *Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com Daphnia spp (Crustacea, Cladocera)*, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 13373. *Ecotoxicologia Aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com Ceriodaphnia spp (Crustacea, Cladocera)*, 2016.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15411-2. *Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras aquosas sobre a emissão de luz de Vibrio fischeri (ensaio de bactéria luminescente)*, 2012.
- BELTRÃO, Danielle Silva. *Efeitos da aplicação de glifosato na química de solos alagados*. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos. Goiás: 111 p. 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 2914/MS de 2011. *Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade*. Ministério da Saúde, Brasília, DF, dezembro de 2011.
- BRASIL. Decreto Federal nº 4071, de 04 de janeiro de 2002. *Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins e dá outras providências*. Brasília: Publicado no D.O.U de 08 de janeiro de 2002.
- BRASIL. Resolução CONAMA nº 357. *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*. Brasília, DF, n. 53, de 18 março de 2005.
- BRASIL. Resolução CONAMA nº 430, de 13 de maio de 2011. *Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357/2005*. Conselho Nacional do Meio Ambiente: CONAMA, Brasília, DF, maio de 2011
- BROCK, Theo CM. Priorities to Improve the Ecological Risk Assessment and Management for Pesticides in Surface Water. *Integrated Environmental Assessment and Management*. Volume 9, Number 3. pp. 64–74. 2013.
- CABRERA, Lizlara; COSTA, Fabiane Pinho; PRIMEL, Ednei Gilberto. Estimativa de risco de contaminação das águas por pesticidas na região sul do Estado do RS. *Química Nova*, vol. 31, nº 8, 1982-1986, 2008.
- CARVALHO, Leonardo Bianco de. *Herbicidas*. Lages, Santa Catarina: distribuído pelo autor. 62 p. 2013.
- CONSELHO ESTADUAL DE POLÍTICAS PÚBLICAS – COPAM. Deliberação Normativa Conjunta COPAM/CERH-MG nº01, de 05 de maio de 2008. *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*. 2008.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. Resolução nº 467 de 16 de julho de 2015. *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. 2015.

HAYASHI, Takehiko I.; IMAIZUMI, Yoshitaka; YOKOMIZO, Hiroyuki; ATARAZAKO, Norihisa; SUZUKI, Noriyuki. Ecological risk assessment of herbicides in japan: integrating spatiotemporal variation in exposure and effects using a multimedia model and algal density dynamics models. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 35, No. 1, pp. 233–240, 2016.

IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). Portaria Normativa Ibama nº 84, de 15 de outubro de 1996. *Estabelece procedimentos a serem adotados junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, para efeito de registro e avaliação do potencial de periculosidade ambiental – (ppa) de agrotóxicos, seus componentes e afins*. Brasília: Publicado no D.O.U. de 18 de outubro de 1996.

IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis). *Avaliação de risco ambiental de agrotóxicos no Ibama*. Santos, Marlos Moreira dos. 23 p. 2012.

INAO, Keiya; WATANABE, Hirozumi; KARPOUZAS, Dimitrios G.; CAPRI, Ettore. Review – Simulation Models of Pesticide fate and Transport in paddy Environment for Ecological Risk. *Assessment and Management*. JARQ 42 (1), 13-21. 2008.

MONSANTO. *Bula Roundup Original*. 2009.

MONSANTO. *Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos – Roundup Original*. 13 p. 2016.

PANIZZI, Silvia; SUCIU, Nicoleta Alina; TREVISAN, Marco. Combined ecotoxicological risk assessment in the frame of European authorization of pesticides. *Science of the Total Environment*, 2016.

PETERSON, Robert K. D.; HULTING, Andrew G.. A comparative ecological risk assessment for herbicides used on spring wheat: the effect of glyphosate when used within a glyphosate-tolerant wheat system. *Weed Science*, 52(5):834-844. 2004.

PRATA, Fábio. *Comportamento do glifosato no solo e deslocamento miscível de atrazina*. Tese (doutorado), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba, 149 p. 2002.

QU C.S.; CHEN, W.; BI, J.; HUANG, L.; LI, F.Y.. Ecological risk assessment of pesticide residues in Taihu Lake wetland, China. *Ecological Modelling*: 222 (2011) 287–292.

SANTOS, Simone Carla dos. *Desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para a determinação de pesticida glifosato em amostras ambientais*. Dissertação (mestrado) Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-graduação em Química. Guarapuava, 74 f. 2012.

SOLOMON, Keith R.; GIESY, John P.; LAPOINT, Thomas W.; GIDDINGS, Jeffrey M.; RICHARDS, R. Peter. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 32, No. 1, pp. 10–11, 2013.

USEPA (U. S. Environmental Protection Agency). *Overview of the Ecological Risk Assessment Process in the Office of Pesticide Programs, U. S. Environmental Protection Agency: Endangered and Threatened Species Effects Determinations. Office of prevention, pesticides and toxic substances, Office of pesticide programs*. Washington, D.C. 92 p. 2004.

WEST, INC.; DAVE GULLEY. EPA PROBIT Version 1.5. Wyoming: University of Wyoming, 1994.

WEST, INC.; DAVE GULLEY. TOXTAT Version 3.3. Wyoming: University of Wyoming, 1994.

DISCUSSÃO GERAL

Os estudos realizados neste trabalho foram desenvolvidos com o intuito de simular, de modo mais realístico, as condições dos ambientes naturais e considerar o maior número possível de fatores intervenientes para avaliar a utilização do glifosato para manejo de macrófitas aquáticas.

Os resultados e o conhecimento acumulado nos cinco capítulos desta tese apresentam, de forma integrada, um panorama para o manejo de macrófitas aquáticas utilizando a formulação comercial Roundup Original®.

A definição da concentração de efeito foi realizada considerando as melhores condições de cultivo dos organismos-alvo e aplicação única. Os estudos em microcosmos foram iniciados após estabilização do ecossistema, sem a necessidade de adição de nutrientes ou oxigênio, realizando-se a aplicação após a cobertura completa do espelho d'água com macrófitas.

As análises ecotoxicológicas tradicionais e ecossistêmicas associadas às avaliações dos organismos não alvo foram fundamentais para compreender os efeitos e os impactos sobre a comunidade aquática. Associados aos resultados físico-químicos, elas completaram a avaliação da dinâmica ecossistêmica e a avaliação de risco ecológico da utilização de herbicidas à base de glifosato para utilização em corpos d'água para controle de macrófitas aquáticas.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo foi investigada a menor concentração de efeito para controle de *Eichhornia crassipes* e de *Salvinia* sp., e como resultado verificou-se que apenas a concentração de 100 L.ha⁻¹ apresentou diferença significativa de efeito, comparada ao controle. A dose de 100 L.ha⁻¹ impediu a ocorrência de rebrota, no prazo de 30 dias, e causou baixo efeito residual em espécies vegetais inseridas no ambiente após a aplicação do herbicida. Os estudos mostram que as macrófitas podem ser controladas com herbicidas à base de glifosato, no entanto a concentração de trabalho é elevada.

Diferentes espécies de macrófitas podem apresentar comportamentos e impactos ambientais variados, mesmo que sejam afetadas com concentrações semelhantes de herbicidas, uma vez que podem apresentar diferenças morfológicas de superfície foliar, como presença de tricomas, cutículas e diferenças nos estômatos. Essas variações podem influenciar a aderência e a deposição das gotas sobre as folhas, levando a variações de concentração na água, assim como na absorção do herbicida pela planta.

O glifosato em amostras naturais apresenta meia-vida curta, entre 3,6 e 7,3 dias, sofrendo redução mesmo em amostras refrigeradas ou congeladas, devendo ser armazenadas por no máximo quatro dias, quando poderá ocorrer a redução de até 10% da concentração inicial, o que torna o procedimento analítico para monitoramento ambiental bastante rígido quanto ao tempo de armazenamento da amostra. Águas contaminadas com glifosato apresentam alterações significativas nos parâmetros pH e condutividade, que podem estar relacionadas com a presença de substância inerte na formulação comercial. Porém, ainda pode haver variações como a elevação dos ânions, cloreto, nitrato e sulfato.

A toxicidade do padrão de glifosato, do AMPA, do Roundup Original® e do surfactante Iharaguens®, quando avaliada individualmente em solução, é alta, principalmente dos dois últimos. Como mencionado em outros trabalhos, é possível que o componente inerte da composição do Roundup Original® seja o responsável pela maior toxicidade do composto comercial. Essa maior toxicidade pode ser atenuada quando aplicado corretamente, em área completamente coberta por macrófitas aquáticas flutuantes, devido à adsorção do surfactante na área foliar das macrófitas, não atingindo o corpo d'água. No entanto, as amostras coletadas nos microcosmos não apresentaram toxicidade relevante, assim como não foram evidenciados

comportamentos ou resultados anômalos na avaliação global (ecossistêmica). Foram percebidas alterações do ambiente aquático e na dinâmica reprodutiva dos peixes e moluscos, assim como efeitos tóxicos graves em aplicações em corpos d'água sem cobertura de macrófitas. Deve-se garantir que o herbicida nunca seja utilizado em local sem cobertura de macrófitas flutuantes, ou que esses ambientes possam ser atingidos por deriva de gotas durante a aspersão do produto. Nesses casos, o efeito tóxico pode gerar grandes prejuízos ambientais.

Mesmo em concentrações não tóxicas para avaliação global e para os organismos utilizados, as alterações no ambiente são evidentes, e podem ocorrer por consequências indiretas, uma vez que as macrófitas são parte do equilíbrio do ecossistema e sua morte leva a alterações físico-químicas da água, que são naturalmente compensadas pela plasticidade ambiental que acarreta alteração na comunidade biológica, com maior proliferação de outros grupos.

Os efeitos sobre os organismos não alvo avaliados neste estudo foram sutis, sem grande relevância ecológica. Ocorreram flutuações na abundância de bactérias heterotróficas com rápido reestabelecimento sem diferença significativa. No entanto, observou-se uma possível seleção de bactérias específicas, que se sobrepuseram às outras, sendo potenciais bactérias degradadoras. O fitoplâncton e o perifíton apresentaram redução da riqueza de espécies e diversidade de *Shannon*, elevação da densidade de organismos, porém não significativas, e alterações na abundância relativa das famílias das espécies. Os peixes e os caramujos ficaram por aproximadamente 20 dias sem se reproduzir, e após esse período voltaram a se reproduzir e a crescer. As alterações não significativas podem ser potencializadas com o uso recorrente de herbicidas, além da possibilidade de seleção de espécies resistentes dos organismos-alvo.

Na avaliação do risco ecológico do glifosato em água superficial, quando utilizado para controle de macrófitas aquáticas flutuantes por aspersão da formulação comercial, Roundup Original®, as características físicas e químicas do glifosato demonstraram sua baixa volatilidade, alta solubilidade em água e tendência de adsorção no sedimento. O glifosato apresenta característica ácida, com quatro constantes de dissociação, o que mostra a degradação da molécula em ambientes com pH variando de 2 a 10, característica esta que pode refletir sua curta meia-vida em ambientes naturais. O modelo conceitual de risco delimitado pelo diagrama evidencia o risco indireto não só aos organismos aquáticos, mas também aos terrestres, e destaca os riscos decorrentes da aplicação, pela ocorrência de deriva ou de aplicação direta sobre organismos não alvo. A caracterização do risco foi feita com base no quociente de risco, que foi menor que o

pressuposto de risco para todas as avaliações de AMPA e para as avaliações do princípio ativo com microcrustáceos. O quociente de risco evidenciou risco para a formulação comercial, que apresentou elevada toxicidade quando testado separadamente, mas que foi reavaliado após a caracterização e a avaliação ecotoxicológica de amostras de água dos microcosmos, que não apresentaram toxicidade para nenhum dos organismos-teste. A avaliação de risco permite conhecer as causas e as fontes dos riscos, favorecendo o plano de manejo para utilização do herbicida com risco ecológico desconsiderável. Considerando a definição da concentração ambiental máxima quantificada nos microcosmos deste estudo, não foi evidenciado risco para invertebrados aquáticos pelo escoamento do produto para a coluna d'água após a aplicação. Por fim, há de se considerar como condição fundamental e obrigatória a aplicação em ambientes com o espelho d'água completamente cobertos por macrófitas.

Portanto, considerando o panorama avaliado neste trabalho, constatou-se a possibilidade do uso do Roundup Original®, formulação à base de glifosato, em ambientes com crescimento descontrolado de macrófitas aquáticas flutuantes, em concentração controlada, e o rigor no processo de aspersão, sem efeitos tóxicos relevantes aos organismos vivos do ecossistema aquático e sem causar efeito significativo, observados em curto prazo, aos organismos não alvo avaliados neste estudo.

No entanto, deve-se lembrar que qualquer tipo de manejo de macrófitas aquáticas, assim como o seu excessivo crescimento, causam alterações no ambiente, devendo-se buscar a melhor intervenção com foco na sustentabilidade ambiental. Ainda, a melhor forma de controlar o crescimento descontrolado é primeiramente a eliminação da causa, como a remoção do aporte exagerado de nutrientes, para então fazer o manejo dos organismos, reduzindo a chance de recorrências.

É importante considerar que a utilização recorrente de herbicidas pode levar ao aparecimento de populações resistentes, conduzindo à elevação da concentração da dose aplicada e redução dos intervalos entre elas, podendo comprometer a qualidade da água e do sedimento, assim como os usos múltiplos do ecossistema aquático.

O emprego de herbicidas para controle de macrófitas deve ser uma opção bem pensada e planejada, com metodologia rígida e uso esporádico, só aplicado após exaustivos estudos no ecossistema em foco, avaliando, além da eficiência, o impacto aos organismos não alvo e o efeito residual do princípio ativo da formulação escolhida.

RECOMENDAÇÕES

Este tema é relevante e outros estudos podem ser desenvolvidos para aprofundar e ampliar os conhecimentos e as possibilidades na área, como:

- Avaliação do efeito do glifosato sobre os seres humanos, decorrente de contaminação direta por concentrações residuais, quanto por acumulação na cadeia trófica.
- Avaliação sobre a estrutura e composição da comunidade bacteriana em área sob aplicação de glifosato.
- Avaliação da presença de cianotoxinas em ambientes com glifosato, uma vez que o herbicida pode ser visto como um fator estressante para as cianobactérias, levando à produção e, ou, liberação de cianotoxinas no ambiente.
- Confirmação e identificação das cepas bacterianas selecionadas pela presença do herbicida, podendo levar a importantes estudos e desenvolvimento científico na área de tratamento de água.
- Avaliação do efeito sobre a comunidade zooplancônica, que não foram consideradas neste estudo, e que representam importante elo nos níveis tróficos ecossistêmicos.
- Avaliação de diferentes períodos de observação do efeito do herbicida sobre as macrófitas, uma vez que é muito comum que substâncias tóxicas causem efeito de hormese, quando utilizadas em pequena quantidade, pois o organismo eleva suas sínteses proteicas para defesa, o que acaba levando a um crescimento inicial, que pode causar a impressão de ausência de efeito, que então será observado após mais tempo da aplicação.
- Avaliação da utilização de mais de uma aplicação para viabilizar a redução da concentração aplicada, assim como o intervalo adequado entre elas.

Avaliação da diferença do efeito do glifosato em decorrência das características da água, da temperatura ambiente e das características da aspersão, como deriva e tamanho da gota.

APÊNDICE

Resultados brutos:

- A – Avaliação do efeito do Roundup Original[®] sobre *E. crassipes* e *Salvinia* sp.
- B – Monitoramento físico-químico dos microcosmos com *E. crassipes* e *Salvinia* sp.
- C – Monitoramento físico-químico em água deionizada com padrão de glifosato e Roundup Original[®]
- D – Avaliações Ecotoxicológicas
- E – Avaliações Microbiológicas
- F – Densidade de fitoplâncton e perifíton

A – Avaliação do efeito do Roundup Original® sobre *Salvinia* sp.

<i>Salvinia</i> sp.								
Tratamentos	Avaliações adotando-se a escala ALAM (1974)				Massa inicial (g)	Massa final (g)	Coeficiente de massa (%)	IT
	1ª Avaliação	2ª Avaliação	3ª Avaliação	4ª Avaliação				
Controle	0	0	0	0	60	80,0	33	—
Controle	0	0	0	0	60	82,0	37	
Controle	0	0	0	0	60	83,0	38	
6,5 L.ha ⁻¹	0	0	5	5	60	82,0	37	0,991837
6,5 L.ha ⁻¹	0	0	5	5	60	80,0	33	
6,5 L.ha ⁻¹	0	0	5	5	60	81,0	35	
12,5 L.ha ⁻¹	0	5	20	50	60	60,0	0	0,726531
12,5 L.ha ⁻¹	0	5	20	50	60	59,0	-2	
12,5 L.ha ⁻¹	0	5	20	50	60	59,0	-2	
25,0 L.ha ⁻¹	0	5	50	80	60	60,0	0	0,738776
25,0 L.ha ⁻¹	0	5	50	80	60	61,0	2	
25,0 L.ha ⁻¹	0	5	50	80	60	60,0	0	
50,0 L.ha ⁻¹	2	50	80	95	60	42,0	-30	0,514286
50,0 L.ha ⁻¹	2	50	80	95	60	41,0	-32	
50,0 L.ha ⁻¹	2	50	80	95	60	43	-28	
100,0 L.ha ⁻¹	5	80	95	100	60	40,0	-33	0,489796
100,0 L.ha ⁻¹	5	80	95	100	60	41,0	-32	
100,0 L.ha ⁻¹	5	80	95	100	60	39,0	-35	

A – Avaliação do efeito do Roundup Original® sobre *E. crassipes*

<i>E. crassipes</i>								
Tratamentos	Avaliações adotando-se a escala ALAM (1974)				Massa inicial (g)	Massa final (g)	Coeficiente de massa (%)	IT
	1ª Avaliação	2ª Avaliação	3ª Avaliação	4ª Avaliação				
Controle	0	0	0	0	46,3	62,5	35	—
Controle	0	0	2	5	44,6	56,5	27	
Controle	0	0	0	0	33,1	49,2	49	
6,5 L.ha ⁻¹	0	0	0	5	33,4	43,2	29	0,725144
6,5 L.ha ⁻¹	0	0	0	5	36,8	43,4	18	
6,5 L.ha ⁻¹	0	0	0	5	34,8	35,4	2	
12,5 L.ha ⁻¹	0	0	0	5	33,4	43,2	29	0,725144
12,5 L.ha ⁻¹	0	0	10	10	36,8	43,4	18	
12,5 L.ha ⁻¹	5	5	10	10	34,8	35,4	2	
25,0 L.ha ⁻¹	5	5	30	30	38,1	39,9	5	0,707494
25,0 L.ha ⁻¹	0	5	30	30	39,1	40,1	3	
25,0 L.ha ⁻¹	2	2	20	20	37,1	39,1	5	
50,0 L.ha ⁻¹	3	5	30	30	47,8	48,4	1	0,717181
50,0 L.ha ⁻¹	0	2	20	30	48,6	45,0	-7	
50,0 L.ha ⁻¹	0	2	50	80	28,5	27,3	-4	
100,0 L.ha ⁻¹	0	5	10	90	33,1	31,0	-6	0,573483
100,0 L.ha ⁻¹	0	20	30	95	30,6	29,7	-3	
100,0 L.ha ⁻¹	2	30	60	95	39,8	35,8	-10	

B – Monitoramento físico-químico dos microcosmos com *Salvinia* sp.

Experimento	Fluoreto mg.L ⁻¹	Cloreto mg.L ⁻¹	Nitrito mg.L ⁻¹	Nitrato mg.L ⁻¹	AMPA mg.L ⁻¹	Fosfato mg.L ⁻¹	Sulfato mg.L ⁻¹	Glifosato mg.L ⁻¹	Temperatura ambiente °C	Temperatura água °C	OD mg.L ⁻¹	pH	Condutividade μS.cm ⁻¹
Controle	0,038	1,909	0,007	0,176	0,107	3,652	1,367	0,040	22,3	20,6	6,16	6,73	49,3
Controle	0,030	1,902	0,007	0,176	0,108	3,652	1,287	0,036	22,1	20,8	5,77	6,71	48,1
Controle	0,033	1,579	0,008	0,176	0,108	3,652	1,260	0,031	22,4	20,8	6,18	6,67	46,8
Controle	0,032	1,542	0,007	0,176	0,108	3,652	1,246	0,050	23,1	20,8	5,98	6,66	45
Controle	0,035	1,324	0,007	0,170	0,108	3,842	1,364	0,037	23,3	21,1	6,15	6,45	43,2
Controle	0,036	1,349	0,007	0,171	0,108	3,865	1,405	0,045	22,4	20,6	6,23	6,45	42,5
Controle	0,034	1,233	0,007	0,172	0,108	3,905	1,471	0,046	25,9	23,7	4,91	6,55	40,6
Controle	0,037	1,282	0,007	0,173	0,108	3,810	1,511	0,043	21,2	20	6,72	6,56	40,2
Controle	0,029	0,977	0,007	0,242	0,107	3,547	1,580	0,039	23	20,4	6,28	6,53	39,9
Controle	0,033	1,016	0,007	0,245	0,107	3,549	1,621	0,032	21,6	21,1	6,39	6,39	37,1
Controle	0,025	0,774	0,007	0,167	0,107	3,551	0,986	0,062	23,3	20,7	5,96	6,6	35,2
Controle	0,026	0,781	0,007	0,167	0,107	3,553	0,968	0,033	23,6	21,3	5,89	6,41	37,2
Controle	0,028	0,482	0,007	0,169	0,107	3,516	1,442	0,061	22,1	20,4	6,4	6,52	35,3
Controle	0,025	0,465	0,007	0,170	0,107	3,622	1,591	0,032	24,4	21,3	6,41	6,49	35,2
Controle	0,026	0,406	0,007	0,171	0,107	3,507	1,551	0,044	23,6	21,4	5,75	6,1	37,2
Controle	0,024	0,371	0,007	0,172	0,107	3,529	1,357	0,082	24,2	21	6,15	6,49	35,3
Controle	0,019	0,213	0,007	0,167	0,107	3,551	0,934	0,035	23,1	20,6	6,22	6,42	35,2
Controle	0,022	0,247	0,007	0,167	0,107	3,573	0,942	0,035	22,2	22,1	5,92	6,39	37,2
Controle	0,019	0,076	0,007	0,175	0,107	3,595	1,047	0,035	24,8	22,2	5,83	6,39	35,3
Controle	0,010	0,042	0,007	0,175	0,107	3,617	1,079	0,035	22,3	21,7	6,16	6,73	49,3
Controle	0,015	0,005	0,007	0,167	0,107	3,639	0,940	0,041	22,1	20,8	5,77	6,77	48,1
Controle	0,017	0,018	0,007	0,167	0,107	3,661	0,922	0,041	22,4	20,8	6,18	6,67	46,8
Controle	0,020	0,037	0,007	0,167	0,107	3,683	0,964	0,041	23,1	20,8	5,98	6,66	45,9
Controle	0,015	0,034	0,007	0,167	0,107	3,705	1,006	0,041	23,3	21,3	6,16	6,45	43,2

B – Monitoramento físico-químico dos microcosmos com *Salvinia* sp. (continuação)

Experimento	Fluoreto mg.L ⁻¹	Cloreto mg.L ⁻¹	Nitrito mg.L ⁻¹	Nitrato mg.L ⁻¹	AMPA mg.L ⁻¹	Fosfato mg.L ⁻¹	Sulfato mg.L ⁻¹	Glifosato mg.L ⁻¹	Temperatura ambiente °C	Temperatura água °C	OD mg.L ⁻¹	pH	Condutividade μS.cm ⁻¹
Controle	0,013	0,132	0,007	0,167	0,107	3,727	1,048	0,041	22,4	20,8	6,23	6,45	42,5
Controle	0,010	0,130	0,007	0,167	0,108	3,749	1,090	0,045	22,1	23,7	4,91	6,55	40,6
Controle	0,006	0,149	0,007	0,168	0,109	3,771	1,132	0,045	21,2	20,4	6,72	6,56	40,6
Controle	0,005	0,141	0,007	0,169	0,110	3,793	1,174	0,041	23	20,4	6,28	6,56	39,9
Controle	0,040	0,141	0,007	0,169	0,111	3,815	1,216	0,041	21,6	21,3	6,39	6,39	37,1
Controle	0,005	0,621	0,007	0,169	0,112	3,837	1,258	0,041	23,3	20,7	5,92	6,6	35,3
Controle	0,021	0,621	0,007	0,169	0,113	3,859	1,300	0,041	23,6	21,3	5,83	6,41	37,2
Controle	0,008	0,781	0,007	0,169	0,114	3,881	1,342	0,041	22,1	20,4	6,41	6,52	35,2
Controle	0,001	0,781	0,007	0,169	0,115	3,903	1,384	0,041	21,6	21,9	6,41	6,41	35,2
Controle	0,003	0,621	0,007	0,169	0,116	3,925	1,426	0,041	23,6	21,4	5,75	6,1	37,2
Controle	0,003	0,621	0,007	0,169	0,117	3,947	1,468	0,041	24,2	21	6,15	6,49	35,3
Controle	0,003	0,621	0,007	0,169	0,118	3,969	1,510	0,041	21,6	20,6	6,22	6,42	35,3
Controle	0,002	0,482	0,007	0,167	0,119	3,991	1,552	0,041	22,2	22,1	5,92	6,39	37,2
Controle	0,002	0,482	0,007	0,167	0,120	4,013	1,594	0,041	23,6	22,2	5,83	6,39	35,3
Tratamento (1)	0,036	2,229	0,007	0,169	0,110	3,558	1,931	16,022	23,2	23	5,78	6,14	51,4
Tratamento (1)	0,037	2,567	0,007	0,168	0,110	3,581	1,890	15,220	23,2	23	5,78	6,03	56,4
Tratamento (1)	0,034	2,783	0,007	0,167	0,110	3,581	1,890	15,184	24,1	21,8	5,66	6,05	62,2
Tratamento (1)	0,039	2,672	0,007	0,168	0,110	3,713	2,058	14,724	23,6	23	6,25	6,12	62,4
Tratamento (1)	0,027	2,303	0,009	0,172	0,110	3,631	1,775	11,954	23,4	24,5	6,59	6,08	63
Tratamento (1)	0,035	2,637	0,008	0,174	0,154	3,561	2,017	11,166	22,8	24,3	6,44	6,01	66,9
Tratamento (1)	0,028	2,351	0,008	0,199	0,197	3,561	1,288	8,811	23,8	22,7	7,01	6,05	72,7
Tratamento (1)	0,027	2,745	0,008	0,252	0,215	3,561	1,392	8,457	23,5	23,3	6,76	5,97	77
Tratamento (1)	0,027	3,327	0,008	0,353	0,170	3,569	1,386	7,263	22,6	24	6,65	6,07	81,9
Tratamento (1)	0,023	3,901	0,008	0,430	0,137	3,569	1,419	7,021	23,6	22,3	6,76	5,95	87,5

B – Monitoramento físico-químico dos microcosmos com *Salvinia* sp. (continuação)

Experimento	Fluoreto mg.L ⁻¹	Cloreto mg.L ⁻¹	Nitrito mg.L ⁻¹	Nitrato mg.L ⁻¹	AMPA mg.L ⁻¹	Fosfato mg.L ⁻¹	Sulfato mg.L ⁻¹	Glifosato mg.L ⁻¹	Temperatura ambiente °C	Temperatura água °C	OD mg.L ⁻¹	pH	Condutividade μS.cm ⁻¹
Tratamento (1)	0,008	2,300	0,008	0,361	0,137	3,569	1,257	6,925	24,3	23,5	6,04	6,06	93,4
Tratamento (1)	0,016	4,334	0,008	0,555	0,137	2,789	1,432	5,209	25,3	25,3	6,2	6,06	96,2
Tratamento (1)	0,020	5,363	0,008	0,652	0,137	3,081	1,568	5,452	23,7	23,5	6,57	6,07	96,7
Tratamento (1)	0,013	4,326	0,008	0,515	0,138	3,081	1,396	3,664	24	24,4	6,33	6,06	100,1
Tratamento (1)	0,005	4,924	0,008	0,515	0,140	3,550	1,552	3,536	23,3	22,9	6,42	5,97	104
Tratamento (1)	0,003	5,522	0,007	0,515	0,142	3,570	1,708	3,408	23,9	23,3	6,47	6,07	105,9
Tratamento (1)	0,039	6,120	0,007	0,515	0,144	3,590	1,864	3,280	23,5	23,6	6,2	6,06	108
Tratamento (1)	0,039	7,684	0,007	0,630	0,146	3,610	2,020	3,152	23,9	23,7	6,11	6,08	112,1
Tratamento (1)	0,046	9,592	0,007	0,636	0,148	3,630	5,229	3,024	23,1	22,8	6,31	6,11	114,4
Tratamento (2)	0,039	2,747	0,007	0,168	0,151	3,702	1,218	16,739	23,1	23,1	6,23	5,99	51,8
Tratamento (2)	0,046	3,250	0,007	0,168	0,146	3,638	1,254	14,843	23,5	23,1	6,1	6,1	54,5
Tratamento (2)	0,063	3,122	0,007	0,168	0,150	3,652	1,324	12,913	24,1	23,1	5,61	5,96	50,1
Tratamento (2)	0,041	3,190	0,008	0,177	0,154	3,542	1,492	11,854	23,6	24,3	6,7	6,03	58,4
Tratamento (2)	0,045	3,295	0,007	0,186	0,158	3,513	1,581	10,615	24,6	25,1	6,67	5,96	59,4
Tratamento (2)	0,026	2,434	0,007	0,193	0,162	3,513	1,536	7,937	22,9	24,8	6,02	5,96	66,4
Tratamento (2)	0,035	3,575	0,007	0,231	0,166	3,527	1,011	7,866	23,8	24	6,89	5,96	67,8
Tratamento (2)	0,029	3,946	0,007	0,277	0,170	3,541	1,032	6,582	23,8	23,7	6,02	5,89	68,8
Tratamento (2)	0,031	4,967	0,007	0,334	0,174	3,555	1,064	5,836	24,2	24,1	6,4	6	73,4
Tratamento (2)	0,015	3,942	0,007	0,346	0,178	3,569	1,122	4,707	23,6	23,5	6,78	5,94	81,3
Tratamento (2)	0,020	3,974	0,007	0,435	0,182	3,583	1,149	4,426	24,5	24,4	6,41	6,02	85
Tratamento (2)	0,023	4,006	0,007	0,446	0,186	3,597	1,139	4,214	25	24,9	6,25	5,95	89,8
Tratamento (2)	0,015	4,038	0,007	0,424	0,190	3,611	1,080	4,204	23,7	24,4	6,61	6,01	91,7
Tratamento (2)	0,008	4,070	0,007	0,426	0,105	3,625	1,130	3,054	24,7	24	6,67	5,99	96,1
Tratamento (2)	0,000	5,102	0,007	0,428	0,105	3,639	1,180	2,654	23,3	24	6,29	6,05	97

B – Monitoramento físico-químico dos microcosmos com *Salvinia* sp. (continuação)

Experimento	Fluoreto mg.L ⁻¹	Cloreto mg.L ⁻¹	Nitrito mg.L ⁻¹	Nitrato mg.L ⁻¹	AMPA mg.L ⁻¹	Fosfato mg.L ⁻¹	Sulfato mg.L ⁻¹	Glifosato mg.L ⁻¹	Temperatura ambiente °C	Temperatura água °C	OD mg.L ⁻¹	pH	Condutividade μS.cm ⁻¹
Tratamento (2)	0,003	5,134	0,007	0,430	0,105	3,653	1,230	2,354	23,4	24,3	6,33	6,01	102,2
Tratamento (2)	0,043	6,470	0,007	0,426	0,105	3,667	2,100	2,154	23,5	24,3	6,24	6,02	103,2
Tratamento (2)	0,043	8,789	0,007	0,502	0,105	3,681	2,700	1,954	23,9	24,5	6,16	6,03	104,3
Tratamento (2)	0,050	10,683	0,007	0,611	0,105	3,695	4,306	1,754	23,1	23,7	6,26	6,05	109,5
Tratamento (3)	0,038	2,488	0,007	0,169	0,131	3,630	1,575	16,381	23,15	23,05	6,005	6,065	51,6
Tratamento (3)	0,042	2,909	0,007	0,168	0,128	3,610	1,572	15,032	23,35	23,05	5,94	6,065	55,45
Tratamento (3)	0,049	2,953	0,007	0,168	0,130	3,617	1,607	14,049	24,1	22,45	5,635	6,005	56,15
Tratamento (3)	0,040	2,931	0,008	0,173	0,132	3,628	1,775	13,289	23,6	23,65	6,475	6,075	60,4
Tratamento (3)	0,036	2,799	0,008	0,179	0,134	3,572	1,678	11,285	24	24,8	6,63	6,02	61,2
Tratamento (3)	0,031	2,536	0,008	0,184	0,158	3,537	1,777	9,552	22,85	24,55	6,23	5,985	66,65
Tratamento (3)	0,032	2,963	0,008	0,215	0,182	3,544	1,150	8,339	23,8	23,35	6,95	6,005	70,25
Tratamento (3)	0,028	3,346	0,008	0,265	0,193	3,551	1,212	7,520	23,65	23,5	6,39	5,93	72,9
Tratamento (3)	0,029	4,147	0,008	0,344	0,172	3,562	1,225	6,550	23,4	24,05	6,525	6,035	77,65
Tratamento (3)	0,019	3,922	0,008	0,388	0,158	3,569	1,271	5,864	23,6	22,9	6,77	5,945	84,4
Tratamento (3)	0,014	3,137	0,008	0,398	0,160	3,576	1,203	5,675	24,4	23,95	6,225	6,04	89,2
Tratamento (3)	0,020	4,170	0,008	0,501	0,162	3,193	1,286	4,712	25,15	25,1	6,225	6,005	93
Tratamento (3)	0,018	4,701	0,008	0,538	0,164	3,346	1,324	4,828	23,7	23,95	6,59	6,04	94,2
Tratamento (3)	0,011	4,198	0,008	0,471	0,122	3,353	1,263	3,359	24,35	24,2	6,5	6,025	98,1
Tratamento (3)	0,003	5,013	0,008	0,472	0,123	3,595	1,366	3,095	23,3	23,45	6,355	6,01	100,5
Tratamento (3)	0,003	5,328	0,007	0,473	0,124	3,612	1,469	2,881	23,65	23,8	6,4	6,04	104,05
Tratamento (3)	0,041	6,295	0,007	0,471	0,125	3,629	1,982	2,717	23,5	23,95	6,22	6,04	105,6
Tratamento (3)	0,041	8,237	0,007	0,566	0,126	3,646	2,360	2,553	23,9	24,1	6,135	6,055	108,2
Tratamento (3)	0,048	10,138	0,007	0,624	0,127	3,663	4,768	2,389	23,1	23,25	6,285	6,08	111,95

B – Monitoramento físico-químico dos microcosmos com *E. crassipes*

Experimento	Fluoreto mg.L ⁻¹	Cloreto mg.L ⁻¹	Nitrito mg.L ⁻¹	Nitrato mg.L ⁻¹	AMPA mg.L ⁻¹	Fosfato mg.L ⁻¹	Sulfato mg.L ⁻¹	Glifosato mg.L ⁻¹	Temperatura ambiente °C	Temperatura água °C	OD mg.L ⁻¹	pH	Condutividade μS.cm ⁻¹
Controle	0,036	5,172	0,007	0,167	0,116	3,752	1,537	0,041	23,1	21,2	5,7	6,6	80,4
Controle	0,036	5,147	0,007	0,167	0,116	3,837	1,605	0,049	21,8	20,7	5,59	6,64	79
Controle	0,033	5,223	0,008	0,172	0,116	3,837	1,441	0,052	22,6	21,9	5	6,59	81,2
Controle	0,035	5,295	0,008	0,172	0,116	3,837	1,399	0,031	22	20,9	5,65	6,58	80,1
Controle	0,037	5,084	0,007	0,170	0,116	3,837	1,680	0,040	23,3	21,1	5,58	6,58	78,7
Controle	0,034	4,974	0,007	0,169	0,116	3,816	1,598	0,057	22,6	20,6	5,69	6,56	79,1
Controle	0,037	5,044	0,007	0,178	0,116	3,854	1,622	0,040	27	23,7	4,91	6,55	76,8
Controle	0,037	5,323	0,007	0,180	0,118	3,782	1,653	0,034	20,9	20,1	5,67	6,53	76,1
Controle	0,034	5,015	0,007	0,167	0,120	3,637	1,726	0,031	22,9	20,8	5,72	6,48	74,3
Controle	0,033	5,241	0,007	0,167	0,122	3,601	1,852	0,035	21,6	21,1	5,38	6,45	76,1
Controle	0,029	4,429	0,007	0,167	0,124	3,601	1,087	0,033	23,3	20,9	5,65	6,55	74
Controle	0,027	4,572	0,007	0,167	0,126	3,601	1,140	0,033	23,4	21	5,26	6,52	72
Controle	0,027	4,098	0,007	0,170	0,116	3,430	1,495	0,033	22,2	19,8	6,29	6,51	74,9
Controle	0,024	4,142	0,007	0,171	0,116	3,576	1,597	0,031	22,8	21,1	5,48	6,44	75,7
Controle	0,025	3,938	0,007	0,172	0,116	3,626	1,586	0,045	23,4	21,4	4,79	6,54	71,5
Controle	0,026	3,904	0,007	0,173	0,116	3,550	1,529	0,059	24,2	20,9	5,7	6,58	71,4
Controle	0,022	3,597	0,007	0,167	0,116	3,560	1,067	0,102	23,2	21,1	5,16	6,55	68,5
Controle	0,022	3,841	0,007	0,167	0,122	3,570	1,111	0,035	22,6	22,1	5,43	6,55	72
Controle	0,012	2,619	0,007	0,167	0,128	3,580	1,147	0,035	24,2	22	5,25	6,5	66,8
Controle	0,006	1,788	0,007	0,167	0,134	3,590	0,819	0,039	23,1	21,9	5,58	6,6	80,4
Controle	0,019	3,186	0,007	0,168	0,140	3,600	0,074	0,095	21,8	20,6	5,59	6,64	80,4
Controle	0,017	3,165	0,007	0,169	0,146	3,610	1,094	0,039	22,6	21,9	5,42	6,59	81,2
Controle	0,019	3,330	0,007	0,167	0,152	3,620	1,093	0,039	22,6	20,9	5,65	6,58	79,1
Controle	0,018	3,097	0,007	0,167	0,158	3,630	1,024	0,039	23,3	21,1	5,58	6,54	78,7

B – Monitoramento físico-químico dos microcosmos com *E. crassipes* (continuação)

Experimento	Fluoreto mg.L ⁻¹	Cloreto mg.L ⁻¹	Nitrito mg.L ⁻¹	Nitrato mg.L ⁻¹	AMPA mg.L ⁻¹	Fosfato mg.L ⁻¹	Sulfato mg.L ⁻¹	Glifosato mg.L ⁻¹	Temperatura ambiente °C	Temperatura água °C	OD mg.L ⁻¹	pH	Condutividade μS.cm ⁻¹
Controle	0,012	2,305	0,007	0,168	0,116	3,640	1,088	0,046	22,6	20,6	5,69	6,55	79,1
Controle	0,012	2,245	0,007	0,167	0,116	3,650	1,023	0,030	27	23,7	4,91	6,55	76,8
Controle	0,010	3,841	0,007	0,167	0,116	3,660	1,063	0,040	20,9	20,1	5,67	6,53	76,1
Controle	0,006	3,841	0,007	0,167	0,116	3,670	1,103	0,040	22,9	20,8	5,72	6,45	74,3
Controle	0,045	3,841	0,007	0,167	0,116	3,680	1,143	0,040	21,6	21,1	5,38	6,45	76,1
Controle	0,001	2,619	0,007	0,167	0,116	3,690	1,183	0,040	23,3	20,9	5,65	6,55	74,3
Controle	0,026	2,619	0,008	0,167	0,116	3,700	1,223	0,040	23,3	21,1	5,26	6,52	72,5
Controle	0,025	2,619	0,008	0,167	0,116	3,710	1,263	0,040	22,2	20,9	6,29	6,52	74,9
Controle	0,003	3,597	0,008	0,167	0,116	3,720	1,303	0,040	22,6	21,1	5,48	6,44	75,7
Controle	0,003	3,597	0,008	0,167	0,116	3,730	1,343	0,040	23,4	21,4	4,91	6,52	71,5
Controle	0,002	3,597	0,008	0,167	0,116	3,740	1,383	0,040	24,2	20,9	5,7	6,54	71,4
Controle	0,014	3,597	0,008	0,167	0,116	3,750	1,423	0,040	23,4	21,1	5,16	6,55	68,5
Controle	0,021	2,619	0,008	0,167	0,116	3,760	2,795	0,040	22,6	22,1	5,26	6,55	68,5
Controle	0,041	2,619	0,008	0,167	0,116	3,770	2,495	0,040	24,2	22,3	5,25	6,55	66,8
Tratamento (1)	0,043	3,778	0,008	0,167	0,120	3,584	1,426	15,918	22	22,1	4,49	6,38	103,7
Tratamento (1)	0,042	3,460	0,007	0,168	0,120	3,695	1,364	14,156	21,7	22,2	4,65	6,37	112,9
Tratamento (1)	0,040	2,993	0,007	0,168	0,120	3,759	1,364	11,616	21,6	21,9	1	6,21	123,1
Tratamento (1)	0,046	3,014	0,007	0,175	0,120	3,757	1,623	11,670	21,5	22,9	1,72	6,33	133
Tratamento (1)	0,040	3,462	0,007	0,170	0,227	3,611	1,996	9,568	23,9	23,9	2,41	6,35	144,1
Tratamento (1)	0,032	3,282	0,007	0,168	0,268	3,574	1,462	7,558	23,6	21,6	2,33	6,42	149,3
Tratamento (1)	0,035	4,027	0,007	0,168	0,275	3,574	1,776	7,152	21,9	22,4	2,98	6,33	159,3
Tratamento (1)	0,038	5,888	0,007	0,177	0,221	3,574	2,374	6,213	21,4	23,2	2,84	6,3	166
Tratamento (1)	0,027	5,259	0,007	0,174	0,221	3,574	2,093	4,696	21,9	22,8	2,58	6,41	181,3
Tratamento (1)	0,014	5,242	0,007	0,169	0,200	3,574	1,962	3,969	21,6	22	3,38	6,47	184,3

B – Monitoramento físico-químico dos microcosmos com *E. crassipes* (continuação)

Experimento	Fluoreto mg.L ⁻¹	Cloreto mg.L ⁻¹	Nitrito mg.L ⁻¹	Nitrato mg.L ⁻¹	AMPA mg.L ⁻¹	Fosfato mg.L ⁻¹	Sulfato mg.L ⁻¹	Glifosato mg.L ⁻¹	Temperatura ambiente °C	Temperatura água °C	OD mg.L ⁻¹	pH	Condutividade μS.cm ⁻¹
Tratamento (1)	0,025	6,349	0,007	0,168	0,165	3,574	1,970	3,619	22,1	23,5	2,39	6,49	197,4
Tratamento (1)	0,034	10,995	0,007	0,168	0,196	2,689	1,986	3,827	25	24,3	4,18	6,44	211
Tratamento (1)	0,021	8,731	0,007	0,167	0,164	3,689	2,002	2,478	21,7	23,3	3,42	6,49	220
Tratamento (1)	0,012	8,349	0,007	0,167	0,156	3,689	2,242	1,700	21,9	23,5	3,65	6,53	228
Tratamento (1)	0,001	10,995	0,007	0,169	0,158	3,689	2,282	1,700	21	22,6	2,92	6,41	234
Tratamento (1)	0,033	10,113	0,007	0,169	0,160	3,689	2,322	1,612	22,6	22,8	3,69	6,55	244
Tratamento (1)	0,034	11,080	0,011	0,169	0,162	3,689	2,362	1,561	22	22,8	3,7	6,57	245
Tratamento (1)	0,033	18,459	0,009	0,169	0,164	3,689	3,402	1,557	22,3	22,9	3,72	6,55	248
Tratamento (1)	0,066	24,280	0,007	0,168	0,166	3,689	6,871	1,553	20,8	22,5	3,55	6,59	250
Tratamento (2)	0,040	4,416	0,007	0,168	0,168	3,636	1,491	13,803	22	21,1	4,75	6,41	103,6
Tratamento (2)	0,046	4,361	0,007	0,170	0,147	3,583	1,387	13,542	21,7	21,5	4,28	6,4	114,2
Tratamento (2)	0,076	4,148	0,007	0,170	0,171	3,916	1,696	13,338	21,6	21,8	0,21	6,27	127,9
Tratamento (2)	0,037	3,851	0,007	0,171	0,236	3,693	1,729	9,633	21,5	22,5	1,72	6,37	140,7
Tratamento (2)	0,038	4,843	0,007	0,175	0,226	3,681	2,297	8,982	23,2	23	2,73	6,41	146,2
Tratamento (2)	0,032	4,812	0,007	0,176	0,266	3,625	1,755	7,431	22,7	21,3	2,62	6,45	164,4
Tratamento (2)	0,036	5,623	0,007	0,170	0,278	3,569	2,211	7,060	21,8	22	2,69	6,41	173,1
Tratamento (2)	0,037	7,664	0,007	0,179	0,305	3,513	2,882	6,270	21,8	22,7	2,42	6,41	186,2
Tratamento (2)	0,029	7,644	0,007	0,177	0,295	3,457	2,791	5,068	24,1	22,3	2,23	6,45	201
Tratamento (2)	0,017	8,069	0,007	0,169	0,251	3,401	2,171	3,094	21,6	21,9	2,41	6,42	216
Tratamento (2)	0,028	8,887	0,007	0,169	0,251	3,345	2,995	3,767	22,7	23	2,08	6,53	226
Tratamento (2)	0,035	9,926	0,007	0,169	0,253	3,289	2,868	3,639	25	24,5	2,9	6,55	241
Tratamento (2)	0,021	10,780	0,007	0,169	0,218	3,233	2,868	3,456	21,7	23,3	2,29	6,6	251
Tratamento (2)	0,012	10,634	0,007	0,169	0,228	3,177	2,868	3,128	21,9	23,4	3,03	6,55	258,4
Tratamento (2)	0,003	11,488	0,008	0,169	0,238	3,121	2,868	2,800	21	22,4	2,45	6,62	269

B – Monitoramento físico-químico dos microcosmos com *E. crassipes* (continuação)

Experimento	Fluoreto mg.L ⁻¹	Cloreto mg.L ⁻¹	Nitrito mg.L ⁻¹	Nitrato mg.L ⁻¹	AMPA mg.L ⁻¹	Fosfato mg.L ⁻¹	Sulfato mg.L ⁻¹	Glifosato mg.L ⁻¹	Temperatura ambiente °C	Temperatura água °C	OD mg.L ⁻¹	pH	Condutividade μS.cm ⁻¹
Tratamento (2)	0,039	12,342	0,008	0,167	0,248	3,065	3,781	2,472	22,6	22,9	3,16	6,6	277
Tratamento (2)	0,039	13,196	0,010	0,167	0,258	3,009	4,101	2,144	22	23	2,57	6,62	281
Tratamento (2)	0,039	16,034	0,012	0,167	0,268	2,953	4,961	1,816	22,3	23,1	2,42	6,57	287
Tratamento (2)	0,024	20,180	0,007	0,169	0,278	2,897	5,840	1,488	20,8	22,3	3	6,53	287
Tratamento (3)	0,042	4,097	0,008	0,168	0,144	3,610	1,459	14,861	22	21,6	4,62	6,395	103,65
Tratamento (3)	0,044	3,911	0,007	0,169	0,134	3,639	1,376	13,849	21,7	21,85	4,465	6,385	113,55
Tratamento (3)	0,058	3,571	0,007	0,169	0,146	3,838	1,530	12,477	21,6	21,85	0,605	6,24	125,5
Tratamento (3)	0,042	3,433	0,007	0,173	0,178	3,725	1,676	10,652	21,5	22,7	1,72	6,35	136,85
Tratamento (3)	0,039	4,153	0,007	0,173	0,227	3,646	2,147	9,275	23,55	23,45	2,57	6,38	145,15
Tratamento (3)	0,032	4,047	0,007	0,172	0,267	3,600	1,609	7,495	23,15	21,45	2,475	6,435	156,85
Tratamento (3)	0,036	4,825	0,007	0,169	0,277	3,572	1,994	7,106	21,85	22,2	2,835	6,37	166,2
Tratamento (3)	0,038	6,776	0,007	0,178	0,263	3,544	2,628	6,242	21,6	22,95	2,63	6,355	176,1
Tratamento (3)	0,028	6,452	0,007	0,176	0,258	3,516	2,442	4,882	23	22,55	2,405	6,43	191,15
Tratamento (3)	0,016	6,656	0,007	0,169	0,226	3,488	2,067	3,532	21,6	21,95	2,895	6,445	200,15
Tratamento (3)	0,027	7,618	0,007	0,169	0,208	3,460	2,483	3,693	22,4	23,25	2,235	6,51	211,7
Tratamento (3)	0,035	10,461	0,007	0,169	0,225	2,989	2,427	3,733	25	24,4	3,54	6,495	226
Tratamento (3)	0,021	9,756	0,007	0,168	0,191	3,461	2,435	2,967	21,7	23,3	2,855	6,545	235,5
Tratamento (3)	0,012	9,492	0,007	0,168	0,192	3,433	2,555	2,414	21,9	23,45	3,34	6,54	243,2
Tratamento (3)	0,002	11,242	0,008	0,169	0,198	3,405	2,575	2,250	21	22,5	2,685	6,515	251,5
Tratamento (3)	0,036	11,228	0,008	0,168	0,204	3,377	3,052	2,042	22,6	22,85	3,425	6,575	260,5
Tratamento (3)	0,037	12,138	0,011	0,168	0,210	3,349	3,232	1,853	22	22,9	3,135	6,595	263
Tratamento (3)	0,036	17,247	0,011	0,168	0,216	3,321	4,182	1,687	22,3	23	3,07	6,56	267,5
Tratamento (3)	0,045	22,230	0,007	0,169	0,222	3,293	6,356	1,521	20,8	22,4	3,275	6,56	268,5

C – Monitoramento físico-químico em água deionizada com padrão de glifosato e Roundup Original®

Solução	pH	Condutividade ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)	Glifosato (mg.L^{-1})
Padrão de glifosato	4,05	40,5	23,6785
Padrão de glifosato	3,99	41,6	23,281
Padrão de glifosato	4,18	42,5	23,25
Padrão de glifosato	4,19	42,8	23,25
Padrão de glifosato	4,18	45,1	23,75
Padrão de glifosato	4,23	46,1	23,308
Padrão de glifosato	4,16	47,5	22,9175
Padrão de glifosato	4,11	47,9	22,95
Padrão de glifosato	4,14	47,5	22,1645
Padrão de glifosato	4,16	51,2	22,15
Padrão de glifosato	4,13	51,4	22,15
Padrão de glifosato	4,1	55,3	22,1055
Padrão de glifosato	4,13	58,6	22,102
Padrão de glifosato	4,14	60,1	21,3
Padrão de glifosato	4,09	62,2	20,467
Padrão de glifosato	4,1	63,1	20,231
Padrão de glifosato	4,05	75,6	10,8
Padrão de glifosato	3,9	81,6	8,323
Roundup Original	5,34	12,86	21,9215
Roundup Original	5,25	13,48	21,9915
Roundup Original	4,92	16,79	21,6555
Roundup Original	4,76	19,92	21,4605
Roundup Original	4,72	23,3	21,4
Roundup Original	4,6	23,8	21,379
Roundup Original	4,68	24,4	20,3425
Roundup Original	4,64	24,3	20,0865
Roundup Original	4,78	23,4	20,148
Roundup Original	4,85	22,8	20,2
Roundup Original	5,11	22,2	20,2
Roundup Original	5,21	21,79	20,29
Roundup Original	5,4	22,9	20,068
Roundup Original	5,44	23,6	19,5
Roundup Original	5,47	25	17,1865
Roundup Original	5,47	27,1	16,8965
Roundup Original	5,31	34,6	8,1
Roundup Original	5,38	40,6	7,137

D – Resultados Ecotoxicológicos

Amostra	CENO	CEO	VC	<i>Daphnia similis</i> - CE _{50(I)}	<i>Alivibrio fisheri</i> - CE _{50(I)}
Controle 1º dia	NT	NT	---	NT	NT
Controle 1º dia	NT	NT	---	NT	NT
Controle 1º dia	NT	NT	---	NT	NT
Controle 5º dia	NT	NT	---	NT	NT
Controle 5º dia	NT	NT	---	NT	NT
Controle 5º dia	NT	NT	---	NT	NT
Controle 10º dia	NT	NT	---	NT	NT
Controle 10º dia	NT	NT	---	NT	NT
Controle 10º dia	NT	NT	---	NT	NT
Controle 15º dia	NT	NT	---	NT	NT
Controle 15º dia	NT	NT	---	NT	NT
Controle 15º dia	NT	NT	---	NT	NT
Controle 20º dia	NT	NT	---	NT	NT
Controle 20º dia	NT	NT	---	NT	NT
Controle 20º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>Salvinia</i> sp. 4 horas	50,0%	100,0%	70,7%	81,8% (68,2 - 102,43)	NT
<i>Salvinia</i> sp. 4 horas	NT	NT	---	NT	NT
<i>Salvinia</i> sp. 4 horas	NT	NT	---	NT	NT
<i>Salvinia</i> sp. 1º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>Salvinia</i> sp. 1º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>Salvinia</i> sp. 1º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>Salvinia</i> sp. 5º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>Salvinia</i> sp. 5º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>Salvinia</i> sp. 5º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>Salvinia</i> sp. 10º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>Salvinia</i> sp. 10º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>Salvinia</i> sp. 10º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>Salvinia</i> sp. 15º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>Salvinia</i> sp. 15º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>Salvinia</i> sp. 15º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>Salvinia</i> sp. 20º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>Salvinia</i> sp. 20º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>Salvinia</i> sp. 20º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>E. crassipes</i> 4 horas	NT	NT	---	NT	NT
<i>E. crassipes</i> 4 horas	NT	NT	---	NT	NT
<i>E. crassipes</i> 4 horas	NT	NT	---	NT	NT

D – Resultados Ecotoxicológicos (continuação)

Amostra	CENO	CEO	VC	<i>Daphnia similis</i> - CE _{50(I)}	<i>Alivibrio fisheri</i> - CE _{50(I)}
<i>E. crassipes</i> 1º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>E. crassipes</i> 1º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>E. crassipes</i> 1º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>E. crassipes</i> 5º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>E. crassipes</i> 5º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>E. crassipes</i> 5º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>E. crassipes</i> 10º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>E. crassipes</i> 10º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>E. crassipes</i> 10º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>E. crassipes</i> 15º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>E. crassipes</i> 15º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>E. crassipes</i> 15º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>E. crassipes</i> 20º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>E. crassipes</i> 20º dia	NT	NT	---	NT	NT
<i>E. crassipes</i> 20º dia	NT	NT	---	NT	NT
Sedimento controle	NT	NT	---	NT	NT
Sedimento controle	NT	NT	---	NT	NT
Sedimento controle	NT	NT	---	NT	NT
Sedimento tratamento	NT	NT	---	NT	NT
Sedimento tratamento	NT	NT	---	NT	NT
Sedimento tratamento	NT	NT	---	NT	NT
Sedimento tratamento	NT	NT	---	NT	NT
Sedimento tratamento	NT	NT	---	NT	NT
Sedimento tratamento	NT	NT	---	NT	NT
Iharaguen's (mg e.a.L-1)	2,00	4,00	2,83	5,80	59580 (27360 - 129660)
Padrão de glifosato (mg.L ⁻¹)	27,50	30,00	28,72	35,13	11,46 (8,98 - 14,64)
AMPA (mg.L-1)	12,50	25,00	17,68	52,80 (45,83 - 58,48)	20,25 (18,58 - 22,08)
Roundup (mg e.a.L ⁻¹)	3,90	9,00	5,92	9,00	20,16 (19,08 - 20,88)

NT: Não tóxico

E – Resultados Microbiológicos

Amostras	Bactérias heterotróficas (UFC.mL ⁻¹)
Controle 1º dia	108000
Controle 1º dia	31400
Controle 1º dia	69700
Controle 5º dia	71000
Controle 5º dia	18000
Controle 5º dia	44500
Controle 10º dia	500
Controle 10º dia	2500
Controle 10º dia	1500
Controle 15º dia	5400
Controle 15º dia	1800
Controle 15º dia	3600
Controle 20º dia	5800
Controle 20º dia	12000
Controle 20º dia	8900
<i>Salvinia</i> sp. 1º dia	240000
<i>Salvinia</i> sp. 1º dia	87200
<i>Salvinia</i> sp. 1º dia	163600
<i>Salvinia</i> sp. 5º dia	191000
<i>Salvinia</i> sp. 5º dia	208000
<i>Salvinia</i> sp. 5º dia	199500
<i>Salvinia</i> sp. 10º dia	48000
<i>Salvinia</i> sp. 10º dia	21050
<i>Salvinia</i> sp. 10º dia	34525
<i>Salvinia</i> sp. 15º dia	2650
<i>Salvinia</i> sp. 15º dia	3150
<i>Salvinia</i> sp. 15º dia	2900
<i>Salvinia</i> sp. 20º dia	30500
<i>Salvinia</i> sp. 20º dia	17050
<i>Salvinia</i> sp. 20º dia	23775
<i>E. crassipes</i> 1º dia	74000
<i>E. crassipes</i> 1º dia	40600
<i>E. crassipes</i> 1º dia	57300
<i>E. crassipes</i> 5º dia	141000
<i>E. crassipes</i> 5º dia	120000
<i>E. crassipes</i> 5º dia	130500

E – Resultados Microbiológicos (continuação)

Amostras	Bactérias heterotróficas (UFC.mL ⁻¹)
<i>E. crassipes</i> 10º dia	0,20 x 10 ⁴
<i>E. crassipes</i> 10º dia	0,15 x 10 ⁴
<i>E. crassipes</i> 10º dia	0,18 x 10 ⁴
<i>E. crassipes</i> 15º dia	1,72 x 10 ⁴
<i>E. crassipes</i> 15º dia	1,73 x 10 ⁴
<i>E. crassipes</i> 15º dia	1,73 x 10 ⁴
<i>E. crassipes</i> 20º dia	1,11 x 10 ⁴
<i>E. crassipes</i> 20º dia	2,16 x 10 ⁴
<i>E. crassipes</i> 20º dia	1,64 x 10 ⁴
Sedimento antes (UFC.g ⁻¹)	7,52 x 10 ⁵
Sedimento antes (UFC.g ⁻¹)	2,68 x 10 ⁵
Sedimento antes (UFC.g ⁻¹)	5,44 x 10 ⁵
Sedimento antes (UFC.g ⁻¹)	4,44 x 10 ⁵
Sedimento antes (UFC.g ⁻¹)	5,06 x 10 ⁵
Sedimento antes (UFC.g ⁻¹)	5,00 x 10 ⁵
Sedimento final (UFC.g ⁻¹)	5,56 x 10 ⁵
Sedimento final (UFC.g ⁻¹)	5,12 x 10 ⁵
Sedimento final (UFC.g ⁻¹)	6,72 x 10 ⁵
Sedimento final (UFC.g ⁻¹)	5,08 x 10 ⁵
Sedimento final (UFC.g ⁻¹)	5,60 x 10 ⁵
Sedimento final (UFC.g ⁻¹)	5,64 x 10 ⁵

F – Resultados de densidade de fitoplâncton em organismos por mL para *Salvinia* sp.

Organismo	Controle <i>Salvinia</i> sp. (antes)	Tratamento <i>Salvinia</i> sp. (antes)	Controle <i>Salvinia</i> sp. (final)	Tratamento <i>Salvinia</i> sp. (final)
<i>Achnanthes</i> sp.	0,00	0,00	0,00	2,00
<i>Achnanthidium</i> sp.	13,43	23,67	0,00	77,81
<i>Achnanthidium</i> sp.2	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	0,00	0,00	0,00	86,00
<i>Aphanothece</i> sp.	0,00	0,00	0,00	2,00
<i>Aulacoseira distans</i>	0,00	0,00	0,00	4,00
<i>Botryococcus</i> sp.	0,00	2,40	0,00	16,00
<i>Botryococcus braunii</i>	1,92	0,16	0,00	0,00
<i>Coelastrum sphaericum</i>	1,92	0,00	0,00	0,00
<i>Caloneis</i> sp.	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Calothrix</i> sp.	0,00	1,60	0,00	0,00
<i>Chlorella</i> sp.	0,00	34,40	0,00	32,00
<i>Chroococcus</i> sp.	0,00	7,20	0,00	0,00
<i>Cocconeis</i> sp.	0,00	0,00	0,00	4,00
<i>Crucigenia</i> sp.	0,00	0,80	0,00	0,00
<i>Cryptomonas</i> sp.	3,84	33,28	247,58	88,85
<i>Cyclotella</i> sp.	7,68	0,00	0,00	0,00
<i>Cymbella</i> sp.	0,00	0,00	0,00	6,00
<i>Desmodesmus opoliensis</i>	0	5,60	0	22,00
<i>Desmodesmus communis</i>	0,00	4,00	1,92	4,48
<i>Desmodesmus spinosus</i>	0,00	0,00	0,00	2,00
<i>Dictyosphaerium</i> sp.	0,00	0,80	0,00	0,00
<i>Dictyosphaerium pulchellum</i>	0,00	1,76	0,00	0,00

F – Resultados de densidade de fitoplâncton em organismos por mL para *Salvinia* sp. (continuação)

Organismo	Controle <i>Salvinia</i> sp. (antes)	Tratamento <i>Salvinia</i> sp. (antes)	Controle <i>Salvinia</i> sp. (final)	Tratamento <i>Salvinia</i> sp. (final)
<i>Encyonema</i> sp.	0,00	0,64	0,00	0,00
<i>Euastrum</i> sp.	0,00	1,60	0,00	0,00
<i>Euglena</i> sp.	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Eunotia lunaris</i>	0,00	0,80	0,00	0,00
<i>Eunotia</i> sp.	1,92	13,28	13,43	30,79
<i>Eunotia</i> sp.2	0,00	0,80	0,00	0,00
<i>Fragilaria</i> sp.	0,00	0,80	0,00	178,00
<i>Gleiterinema</i> sp.	0,00	0,00	0,00	2,00
<i>Gomphonema gracile</i>	0,00	2,56	0,00	2,96
<i>Gomphonema</i> sp.	0,00	2,40	0,00	0,00
<i>Gomphonema</i> sp.2	0,00	0,00	0,00	2,00
<i>Merismopedia</i> sp.	0,00	12,00	0,00	98,00
<i>Micrasterias laticeps</i>	0,00	0,80	0,00	0,00
<i>Monoraphidium arcuatum</i>	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Mougeotia</i> sp.	0,00	0,80	0,00	0,00
<i>Kirchneriella obesa</i>	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Komvophoron</i> sp.	0,00	0,00	0,00	0,48
<i>Lepocinclis cf. salina</i>	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Lepocinclis</i> sp.	0,00	0,16	0,00	0,00
<i>Microcystis</i> sp.	0,00	2,40	0,00	0,00
<i>Monoraphidium</i> sp.	255,25	164,09	0,00	0,96
<i>Monoraphidium</i> sp.2	3,84	1,76	0,00	0,00
<i>Monoraphidium</i> sp.3	5,76	2,88	0,00	0,00

F – Resultados de densidade de fitoplâncton em organismos por mL para *Salvinia* sp. (continuação)

Organismo	Controle <i>Salvinia</i> sp. (antes)	Tratamento <i>Salvinia</i> sp. (antes)	Controle <i>Salvinia</i> sp. (final)	Tratamento <i>Salvinia</i> sp. (final)
<i>Navicula</i> sp.	3,84	0,48	1,92	0,96
<i>Neidium</i> sp.	0,00	3,04	0,00	1,92
<i>Nitzschia</i> sp.	0,00	2,40	0,00	0,00
<i>Nitzschia</i> sp.2	0,00	0,80	0,00	0,00
Nostocaceae NI	0,00	1,60	0,00	2,00
<i>Oedogonium</i> sp.	0,00	1,60	0,00	14,39
<i>Peridinium pusillum</i>	3,84	3,84	0,00	0,00
<i>Peridinium</i> sp.	0,00	27,20	11,52	0,00
<i>Phacus</i> sp.	0,00	2,40	0,00	0,96
<i>Phacus tortus</i>	0,00	0,00	0,00	0,48
<i>Pinnularia</i> sp.	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Planktolyngbya</i> sp.	1,92	0,00	0,00	0,00
<i>Pleurotaenium trabecula</i>	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Pseudanabaenaceae</i> sp.	5,76	4,32	5,76	0,00
<i>Raphidiopsis</i> sp.	9,60	1,60	0,00	0,00
<i>Spirogyra</i> sp.	0,00	0,80	0,00	8,00
<i>Spirogyra</i> sp.2	0,00	0,80	0,00	2,00
<i>Staurastrum smith</i>	0,00	0,80	0,00	0,00
<i>Staurastrum tetracerum</i>	9,60	2,24	0,00	1,44
<i>Tetraedron caudatum</i>	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Trachelomonas volvocina</i>	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Treubaria</i> sp.	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Ulnaria ulna</i>	0,00	0,16	0,00	0,00

F – Resultados de densidade de fitoplâncton em organismos por mL para *E. crassipes*

Organismo	Controle <i>E. crassipes</i> (antes)	Tratamento <i>E. crassipes</i> (antes)	Controle <i>E. crassipes</i> (final)	Tratamento <i>E. crassipes</i> (final)
<i>Achnanthes</i> sp.	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Achnanthidium</i> sp.	3,84	11,12	0,00	16,00
<i>Achnanthidium</i> sp.2	0,00	1,00	0,00	33,00
<i>Ankistrodesmus</i> sp.	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Aphanothece</i> sp.	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Aulacoseira distans</i>	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Botryococcus</i> sp.	0,00	0,00	0,00	2,00
<i>Botryococcus braunii</i>	0,00	0,48	0,00	0,00
<i>Coelastrum sphaericum</i>	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Caloneis</i> sp.	0,00	1,00	0,00	0,00
<i>Calothrix</i> sp.	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Chlorella</i> sp.	0,00	42,00	0,00	25,00
<i>Chroococcus</i> sp.	0,00	1,00	0,00	0,00
<i>Cocconeis</i> sp.	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Crucigenia</i> sp.	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Cryptomonas</i> sp.	32,63	45,95	684,63	795,10
<i>Cyclotella</i> sp.	0,00	4,88	0,00	0,00
<i>Cymbella</i> sp.	0,00	3,00	0,00	0,00
<i>Desmodesmus opoliensis</i>	0	3,00	0	1,00
<i>Desmodesmus communis</i>	0,96	4,24	0,00	2,00
<i>Desmodesmus spinosus</i>	0,00	1,00	0,00	0,00
<i>Dictyosphaerium</i> sp.	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Dictyosphaerium pulchellum</i>	0,00	1,20	0,00	0,00

F – Resultados de densidade de fitoplâncton em organismos por mL para *E. crassipes* (continuação)

Organismo	Controle <i>E. crassipes</i> (antes)	Tratamento <i>E. crassipes</i> (antes)	Controle <i>E. crassipes</i> (final)	Tratamento <i>E. crassipes</i> (final)
<i>Encyonema</i> sp.	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Euastrum</i> sp.	0,00	1,00	0,00	2,47
<i>Euglena</i> sp.	1,92	0,00	0,00	0,00
<i>Eunotia lunaris</i>	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Eunotia</i> sp.	7,68	5,04	6,28	0,00
<i>Eunotia</i> sp.2	0,00	2,00	0,00	0,00
<i>Fragilaria</i> sp.	0,00	0,00	0,00	3,00
<i>Gleiterinema</i> sp.	0,00	1,00	0,00	0,00
<i>Gomphonema gracile</i>	13,43	4,80	43,97	0,00
<i>Gomphonema</i> sp.	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Gomphonema</i> sp.2	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Merismopedia</i> sp.	0,00	15,00	0,00	105,00
<i>Micrasterias laticeps</i>	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Monoraphidium arcuatum</i>	0,00	0,00	0,00	1,00
<i>Mougeotia</i> sp.	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Kirchneriella obesa</i>	0,96	0,00	0,00	0,00
<i>Komvophoron</i> sp.	0,00	0,24	0,00	0,00
<i>Lepocinclis cf. salina</i>	4,80	0,00	0,00	0,00
<i>Lepocinclis</i> sp.	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Microcystis</i> sp.	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Monoraphidium</i> sp.	110,35	68,37	6,28	0,00
<i>Monoraphidium</i> sp.2	2,88	0,24	0,00	0,00
<i>Monoraphidium</i> sp.3	1,92	2,16	0,00	0,00

F – Resultados de densidade de fitoplâncton em organismos por mL para *E. crassipes* (continuação)

Organismo	Controle <i>E. crassipes</i> (antes)	Tratamento <i>E. crassipes</i> (antes)	Controle <i>E. crassipes</i> (final)	Tratamento <i>E. crassipes</i> (final)
<i>Navicula</i> sp.	0,00	2,24	0,00	0,00
<i>Neidium</i> sp.	0,96	1,44	0,00	0,00
<i>Nitzschia</i> sp.	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Nitzschia</i> sp.2	0,00	1,00	0,00	0,00
Nostocaceae NI	0,00	1,00	0,00	0,00
<i>Oedogonium</i> sp.	0,96	0,24	0,00	1,00
<i>Peridinium pusillum</i>	0,00	1,00	0,00	0,00
<i>Peridinium</i> sp.	18,23	22,64	25,12	2,00
<i>Phacus</i> sp.	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Phacus tortus</i>	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Pinnularia</i> sp.	0,00	1,00	6,28	0,00
<i>Planktolyngbya</i> sp.	0,00	0,00	0,00	2,00
<i>Pleurotaenium trabecula</i>	0,00	0,00	0,00	2,47
<i>Pseudanabaenaceae</i> sp.	2,88	1,48	0,00	88,83
<i>Raphidiopsis</i> sp.	0,00	1,00	0,00	0,00
<i>Spirogyra</i> sp.	0,00	2,00	0,00	2,00
<i>Spirogyra</i> sp.2	0,00	1,00	0,00	0,00
<i>Staurastrum smith</i>	0,96	1,00	0,00	0,00
<i>Staurastrum tetracerum</i>	0,96	1,20	0,00	0,00
<i>Tetraedron caudatum</i>	0,96	0,00	0,00	0,00
<i>Trachelomonas volvocina</i>	0,00	2,44	0,00	0,00
<i>Treubaria</i> sp.	0,96	0,00	0,00	0,00
<i>Ulnaria ulna</i>	0,00	0,00	0,00	0,00

F – Resultados de densidade de perifiton em organismos por cm²

Organismo	Controle <i>E. crassipes</i>	Tratamento <i>E. crassipes</i>	Controle <i>Salvinia</i> sp.	Tratamento <i>Salvinia</i> sp.
<i>Encyonema</i> sp.	1,4	0,0	0,0	0,0
<i>Eunotia</i> sp.	55,6	107,7	116,9	286,2
<i>Gomphonema gracile</i>	79,8	112,5	0,5	1,8
<i>Hantzschia</i> sp.	0,5	0,0	0,0	0,0
<i>Navicula</i> sp.	0,5	0,4	0,4	0,0
<i>Neidium</i> sp.	6,2	6,3	9,3	3,4
<i>Pinnularia</i> sp.	0,8	2,0	0,5	1,1
<i>Komvophoron</i> sp.	0,5	1,0	0,0	0,3
<i>Phacus</i> sp.	2,2	2,7	0,0	0,6
<i>Trachelomonas volvocina</i>	0,3	2,2	0,0	0,0
<i>Cosmarium candianum</i>	0,3	0,0	0,0	0,0
<i>Pleurotaenium trabecula</i>	0,3	0,0	0,0	0,3
<i>Cryptomonas</i> sp.	0,6	4,0	0,9	0,0
<i>Achnanthidium</i> sp.	0,0	116,7	25,4	52,1
<i>Oedogonium</i> sp.	0,0	2,0	0,0	5,6
<i>Anabaena</i> sp.	0,0	0,2	0,0	0,0
<i>Gymnodinium</i> sp.	0,0	0,2	0,0	0,0
<i>Euglena</i> sp.	0,0	0,8	0,0	0,0
<i>Lepocinclis</i> sp.	0,0	1,4	0,0	0,0
<i>Desmodesmus communis</i>	0,0	0,2	0,0	0,0
<i>Monoraphidium contortum</i>	0,0	0,2	0,0	0,0
<i>Pseudanabaena</i> sp.	0,0	0,9	0,0	0,0
<i>Closterium</i> sp.	0,0	0,9	0,0	0,0
<i>Penium</i> sp.	0,0	0,9	0,0	0,0
<i>Pseudanabaenaceae</i> NI	0,0	0,0	0,0	1,1