

## **Análise de toxicidade do herbicida glifosato em *Artemia salina* (Linnaeus, 1758)**

### **Toxicity analysis of glyphosate herbicide in *Artemia salina* (Linnaeus, 1758)**

DOI: 10.34188/bjaerv5n3-051

Recebimento dos originais: 06/05/2022

Aceitação para publicação: 30/06/2022

#### **Júlio César Rodrigues Pereira**

Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
Av. Frei Paulino, 30. Uberaba - MG, Brasil. CEP 38025-180  
E-mail: julio.pereira@uftm.edu.br

#### **Maria Isabel Arcanjo Dias**

Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
Av. Frei Paulino, 30. Uberaba - MG, Brasil. CEP 38025-180  
E-mail: mabelarcanjo@gmail.com

#### **Alessandra Soares Vieira**

Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
Av. Frei Paulino, 30. Uberaba - MG, Brasil. CEP 38025-180  
E-mail: d201920689@uftm.edu.br

#### **Joecy Martinez Santos**

Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
Av. Frei Paulino, 30. Uberaba - MG, Brasil. CEP 38025-180  
E-mail: d201920687@uftm.edu.br

#### **Giovanna Almeida Lenza**

Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
Av. Frei Paulino, 30. Uberaba - MG, Brasil. CEP 38025-180  
E-mail: giovannalenzaa@gmail.com

#### **Paula Pereira Baptista Ferreira dos Santos**

Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
Av. Frei Paulino, 30. Uberaba - MG, Brasil. CEP 38025-180  
E-mail: baptiistapaula@yahoo.com.br

#### **Lauro Osiro**

Doutor em Engenharia de Produção pela Universidade de São Paulo  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
Av. Frei Paulino, 30. Uberaba - MG, Brasil. CEP 38025-180  
E-mail: lauro.osiro@gmail.com

**Afonso Pelli**

Doutor em Aquicultura pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro  
Av. Frei Paulino, 30. Uberaba - MG, Brasil. CEP 38025-180  
E-mail: afonso.pelli@uftm.edu.br

**RESUMO**

Atualmente, o Brasil é um dos maiores produtores agrícolas do mundo. Concomitante ao aumento da produção agrícola, observa-se crescente comercialização e uso de insumos agrícolas, incluindo no espectro de produtos o herbicida a base de glifosato. Este estudo teve como objetivo investigar o eventual efeito toxicológico do glifosato nos estágios iniciais de *Artemia salina*. Foi verificada a sobrevivência do organismo, em meio com acréscimo do herbicida, em diferentes concentrações após 24, 48 e 72 horas e 30 dias de exposição. Foram utilizados aquários com capacidade de 10 ml, com 5 indivíduos cada. Os resultados mostraram que o glifosato é uma substância tóxica a *Artemia salina* e eventualmente ao meio ambiente também.

**Palavras-chave:** Bioindicador, Poluição hídrica, Integridade ambiental.

**ABSTRACT**

Currently, Brazil is one of the largest agricultural producers in the world. Concomitant with the increase in agricultural production, there is a growing commercialization and use of agricultural inputs, including the herbicide based on glyphosate in the spectrum of products. This study aimed to investigate the possible toxicological effect of glyphosate in the early stages of *Artemia salina*. The survival of the organism was verified, in medium with the addition of the herbicide, in different concentrations after 24, 48 and 72 hours and 30 days of exposure. Aquariums with a capacity of 10 ml were used, with 5 individuals each. The results showed that glyphosate is a toxic substance to *Artemia salina* and eventually to the environment as well.

**Keywords:** Bioindicator, Water pollution, Environmental integrity.

**1 INTRODUÇÃO**

A poluição dos mananciais hídricos é agravada pela agroindústria, devido ao uso de insumos, muitas vezes aplicados de forma a permitir o escoamento superficial e vertical, constituindo-se em ameaça aos ecossistemas aquáticos (MORGAN *et al.*, 2019).

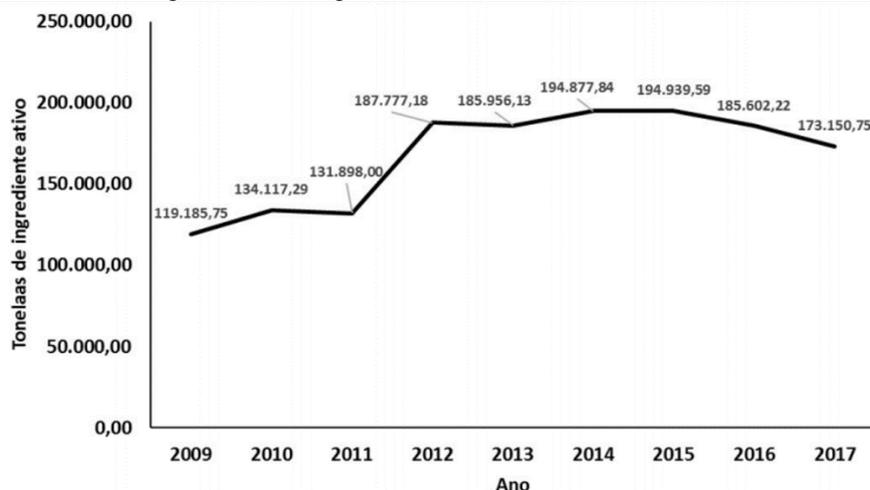
O uso crescente de insumos tem contribuído para a atual crise na biodiversidade, uma vez que, além de impactar as populações das espécies-alvo, geram impactos em outras espécies (JANSSENS; STOKS, 2017).

O herbicida glifosato, N-(fosfometil) glicina, começou a ser introduzido na produção agrícola, no ano de 1974, para controle de plantas daninhas (VAN BRUGGEN *et al.*, 2018; HAO *et al.*, 2019).

No Brasil, o Glifosato é o ingrediente ativo mais utilizado, sendo comercializado, em 2017, 173.150,75 toneladas, devido sua elevada eficiência na eliminação de ervas daninhas

monocotiledôneas e dicotiledôneas. A Figura 1 apresenta a evolução do uso do herbicida glifosato entre os anos de 2009 e 2017 (ANVISA, 2018).

Figura 1. Toneladas do ingrediente ativo glifosato comercializada no Brasil, nos anos de 2009 a 2017.



Fonte: Anvisa, 2018.

Em áreas urbanas o uso principal do glifosato é para o controle de ervas daninhas em superfícies que oferecem dificuldades para a capina mecanizada; isso faz com que o herbicida alcance águas superficiais por meio de lixiviação e também pelo sistema de esgoto (HANKE *et al.*, 2010; KRISTOFFERSEN *et al.*, 2008).

Uma das razões para o sucesso do desenvolvimento do glifosato é a tolerância de plantas como soja, canola e milho. Sendo utilizado antes e após o plantio de culturas tradicionais (CARLES *et al.*, 2019; HANKE *et al.*, 2010).

Esse agroquímico a base de glifosato tem em sua fórmula vários adjuvantes, em particular podemos citar os surfactantes como o polioxietileno amina (POEA), que aumenta a absorção e translocação do ingrediente nas plantas. O produto formulado com POEA mais conhecido é o Roundup® (VAN BRUGGEN *et al.*, 2018; JANSSENS; STOKS, 2017).

Os herbicidas tem em suas formulações comerciais maior toxicidade, representando maior risco a biodiversidade. Os surfactantes, principalmente os não iônicos, como o POEA, têm como característica a facilidade em penetrar a camada cutânea, perturbando as superfícies respiratórias de alguns organismos aquáticos (GOMES *et al.*, 2019; JANSSENS; STOKS, 2017). Vários estudos indicam que o glifosato causa efeitos deletérios, como perda de peso, distúrbios intestinais, baixo crescimento em cães, ratos, peixes e abelhas (MORGAN *et al.*, 2019).

O monitoramento de ambientes aquáticos pode ser realizado baseando-se em princípios diferentes, sendo estes: parâmetros físico-químicos, comunidades biológicas e bioindicadores, que

são organismos capazes de indicar, através da presença/ausência e abundância absoluta e relativa o bem estar dos ecossistemas (MORGAN *et al.*, 2019; MANFRA *et al.*, 2016).

A *Artemia salina* é um Crustáceo Branchiopoda da Ordem Anostraca que possui características que permitem viver em ambientes salgados, além de serem abundantes e comuns, economicamente viáveis e fornecem as respostas a estresse ambiental, se tornando assim um bom indicador (LIBRALATO *et al.*, 2016; MANFRA *et al.*, 2016).

Seu ciclo de vida é de vinte e um dias, atingindo a maturidade sexual em quatorze dias. A reprodução da artêmia salina pode ser sexual, onde o machos e fêmeas copulam, fertilizando os ovos no ovissaco; ou de forma partenogenética, quando as fêmeas conseguem deixar descendência. Além disso podem ser ovovivíparos ou ovíparos. A ovoviviparidade é quando o ambiente é favorável, e as fêmeas dão à luz a larva náuplios, que nadam livremente, já a oviparidade ocorre quando as condições ambientais são inadequados, assim as fêmeas produzem ovos de resistência ou cistos (VINATEA, 1994).

Dado a importância do assunto e o impacto causado ao meio ambiente, o objetivo do presente estudo foi verificar eventual efeito de diferentes concentrações do glifosato no comportamento e sobrevivência de *Artemia salina*.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido pela formulação do Glifosato 480 o qual foi adquirida comercialmente. A água de cultivo foi preparada da seguinte forma: para cada 90 litros de água acrescentou-se 1,5 kg de cloreto de sódio (NaCl); 0,3 kg de sulfato de magnésio (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O); 0,2 kg de Cloreto de potássio (KCl); 0,2 kg de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O); 0,1 kg de cloreto de cálcio (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) e bicarbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) até que o pH superar a marca de 7,5.

As características finais da água utilizada no experimento foram: Temperatura: 27°; pH: 7,82; ORP: 78; Condutividade elétrica: 83,8ms/cm; Turbidez: 75,0 NTU; Oxigênio dissolvido: 6,2mg/l; Sólidos totais: 50,3 g/l; Salinidade: 5,91%. A temperatura da sala foi climatizada, permanecendo entre 20 e 28°C. Experimentos foram realizados em triplicatas. Os náuplios foram alimentados com fermento biológico previamente dissolvido em água durante o período de exposição.

A preparação da solução de Glifosato foi feita adicionando 10 µl em uma proveta de 10 ml completando-a com solução salina. Após foram distribuídas para quatro concentrações (Tab. 1).

Tabela 1. Concentrações de glifosato para cada tratamento, nos testes de toxicidade conduzidos no Laboratório de Ecologia & Evolução, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, em Uberaba/MG.

| Tratamento | Concentrações  |
|------------|----------------|
| T1         | 1.000 µl / L   |
| T2         | 10 µl / L      |
| T3         | 0,2 µl / L     |
| T4         | 0,00004 µl / L |

Fonte: Elaborada pelos autores, 2022.

Pela facilidade e disponibilidade de incubação dos cistos, a *Artemia salina* é muito utilizada em ensaios de toxicidade. A metodologia proposta por Meyer et al., 1982; Mclaughlin et al., 1995, foi adaptada para a realização dos ensaios.

Placas de Petri de vidro foram utilizadas contendo 10 ml de água de diluição (SORGELOOS; WIELEN; PERSOONE, 1978). Cada placa foi inoculada com 5 indivíduos na fase náuplio I. Após a separação, foram utilizadas provetas de 10 ml contendo 9 ml de solução salina, com 5 indivíduos. Esses indivíduos foram coletados com auxílio de pipetas de Pasteur e colocados nas provetas. Posteriormente o volume foi completado para 10 ml.

Os ensaios toxicológicos foram realizados no laboratório de Ecologia & Evolução da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. O teste consistiu em controle e quatro concentrações em triplicata.

Os ensaios foram realizados seguindo o procedimento descrito na literatura (Meyer et al., 1982; Mclaughlin et al., 1995). A mortalidade foi registrada determinando o número de indivíduos mortos sem movimento de apêndices, observando-os na proveta por um período de 60 segundos. A porcentagem de mortalidade foi calculada a partir do número total de indivíduos mortos para cada concentração.

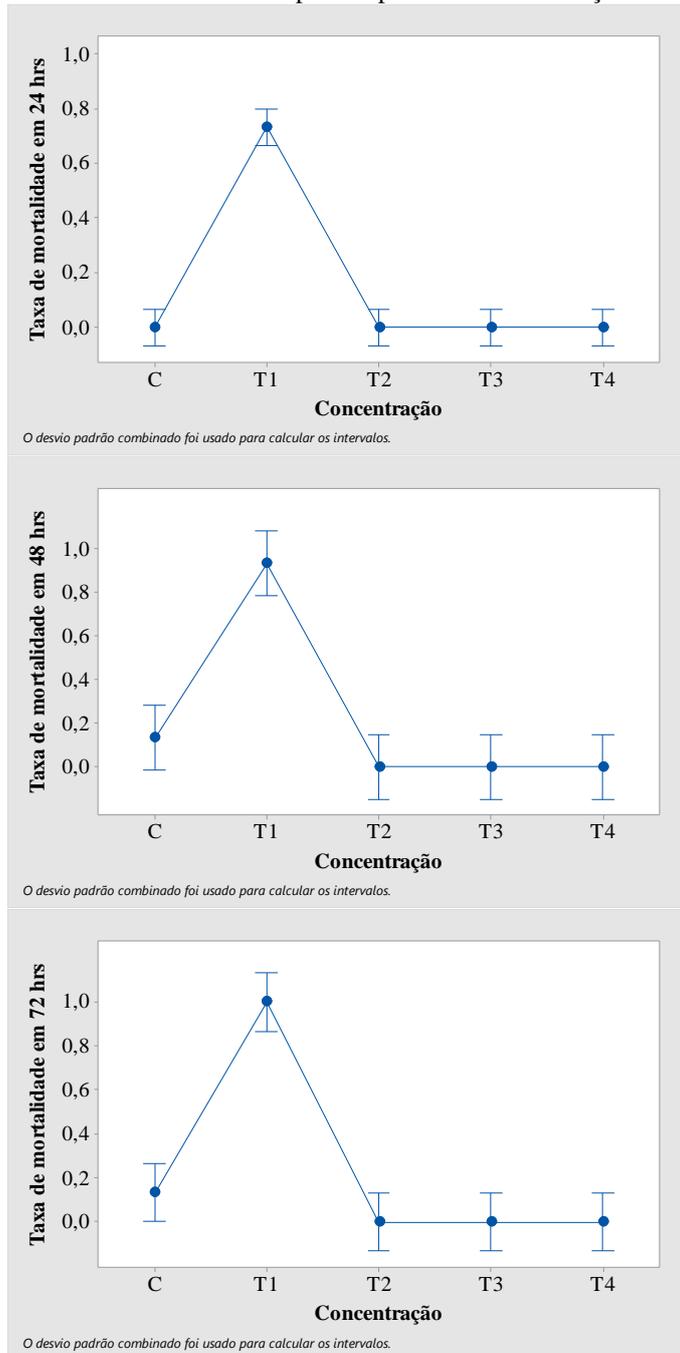
Após 72 horas de observação os sobreviventes foram utilizados para verificar eventual efeito nos animais, como capacidade de natação e reprodução.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para comparar os valores percentuais de mortalidade. Com o período de exposição de 30 dias, segundo o Método de Tukey, foi observado efeito significativo ( $P < 0,05$ ).

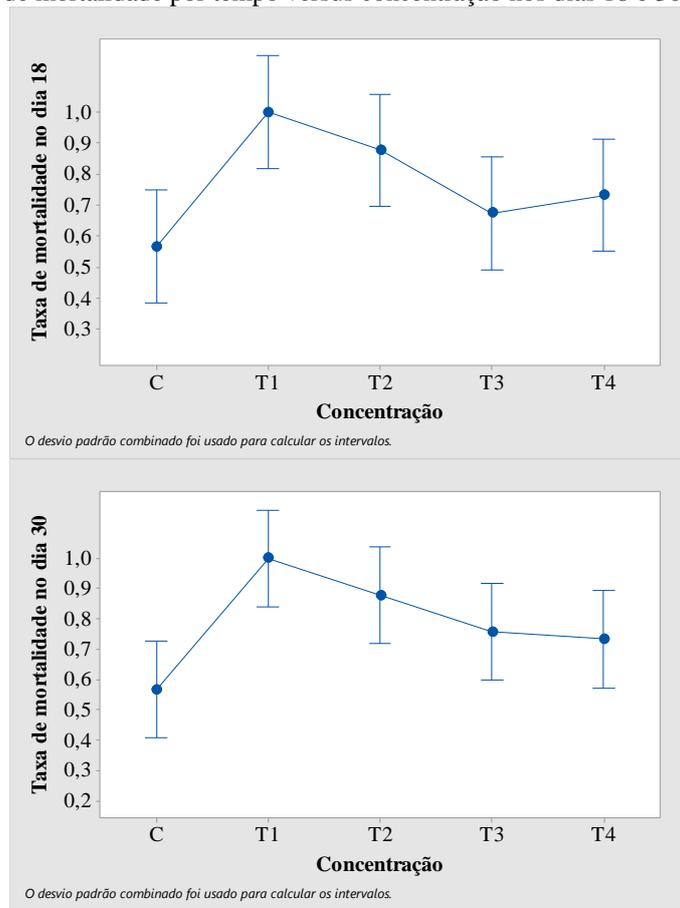
Um dos cinco grupos foi nomeado controle e não recebeu dose de herbicida. Após a aplicação de 1ml de cada diluição nas amostras, observou-se a morte de indivíduos na concentração T1. No entanto, as demais concentrações apresentaram uma menor mortandade no decorrer do tempo de 72 horas (Fig. 2).

Figura 2. Intervalo da taxa de mortalidade por tempo versus concentrações em 24, 48 e 72 hrs.



Após 24 horas de ensaio observou-se mortalidade média de 75% dos indivíduos em T1, entretanto não foi observada mortalidade nas demais concentrações. Em 48 horas observou-se que em média 93% dos indivíduos da concentração T1 morreram e as demais concentrações continuaram estáveis, ressalta-se que houve mortalidade de cerca de 10% no controle. O ensaio foi estendido pelo período de 30 dias, no dia 7 do experimento foi observada média de mortalidade de 6% na concentração de glifosato administrado em T2.

Figura 3. Taxa de mortalidade por tempo versus concentração nos dias 18 e 30 do experimento.



No decorrer do ensaio as amostras T3 e T4 apresentaram uma menor mortandade de indivíduos até o dia 16, entretanto, observou-se em T2 do dia 16 para o dia 18 um aumento da taxa de mortalidade de indivíduos de 40% para 90%. Também foram observadas alterações em T4 nesse mesmo intervalo de tempo, apresentando aumento de taxa de mortalidade de 30% para 70%. T3 apresentou variação de taxa de mortalidade inferior aos tratamentos T1 e T2 e pouco superior à menor concentração (T4).

No dia 30 foi possível observar que T2 possui a menor média de indivíduos e apenas um animal com saco de ovos. Nas demais concentrações em todos os recipientes haviam indivíduos com sacos de ovos.

Sabendo que a *Artemia salina* possui ciclo de vida de vinte e um dias e atinge a maturidade sexual em quatorze dias, foi possível observar no dia 30 a presença de fêmeas com sacos de ovos.

São sugeridos distúrbios metabólicos nos náuplios. Foi observada baixa produção de ovos em baixas concentrações de diluição do glifosato na última leitura, 30 dias após o início do experimento. Em análises de caracterização e metabolomas, foram encontrados metabolitos endógenos e exógenos que sugerem perturbações bioquímicas (MORGAN et al., 2019). Outro fator que pode interferir no processo, é o reduzido número de animais. Os autores desconhecem a razão

sexual na espécie e se existe alteração nesta em virtude de estresse ambiental (RELYEA & RICKLEFS, 2021. VINATEA, 1994).

Em estudos com outros herbicidas observou-se a possibilidade de compostos como a atrazina ser responsável por desregulações endócrinas em anfíbios (HAYES, et al., 2010) o que permite o questionamento sobre possíveis alterações fisiológicas nesse organismo em condições de stress.

#### 4 CONCLUSÃO

O uso do herbicida traz benefícios a agricultura, mas sua utilização indiscriminada e contínua, pode acarretar desequilíbrios nos ecossistemas. Por apresentar alta solubilidade em água, os praguicidas alcançam as águas superficiais por escoamento direto e lixiviação, onde menos de 0,1% do herbicida aplicado na cultura atinge seus objetivos específicos, uma questão preocupante em relação aos organismos não-alvos. Por isso, faz-se necessária a avaliação de riscos ambientais, pois possibilita o conhecimento dos efeitos tóxicos desses contaminantes a base de glifosato (RODRIGUES, 2016).

A artêmia mostra-se um bom bioindicador para testar toxicidade de produtos, apresentando baixo custo e fácil manipulação. Os resultados mostram que em concentrações de 1000  $\mu$ L (T1) o princípio ativo é altamente tóxico para a população de artêmias levando a morte de mais de 90% de indivíduos em menos de 48 horas e 100% em 72 horas.

Tem sido relatada a presença de glifosato em águas de superfície 60 dias após a aplicação da formulação, indicando que este composto é capaz de persistir no ambiente (SILVA; PERALBA; MATTOS, 2003; BENACHOUR; SÉRALINI, 2009). Consideramos que T2 ainda possui influência do composto pois apresenta elevada taxa de mortalidade, mesmo em menores concentrações.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **23**: NOTA TÉCNICA Nº 23/2018/SEI/CREAV /GEMAR/GGTOX/DIRE3/ANVISA. Brasília: Sei, 2018. 10 p.

APHA, AWWA, WPCF. Standard methods for the examination of water and wastewater. 17 ed. Washington: APHA, 1989.

CARLES, Louis *et al.* Meta-analysis of glyphosate contamination in surface waters and dissipation by biofilms. **Environment International**, [s.l.], v. 124, p.284-293, mar. 2019. Elsevier BV.

GOLTERMAN, HL, CLYMO, RS; OHNSTAD, MAM. Methods for physical and chemical analysis of freshwaters. 2 ed. Oxford, Blackwell, 1978. International Biological Programme. Handbooks, 8.

GOMES, Marcelo Pedrosa *et al.* Enrofloxacin and Roundup® interactive effects on the aquatic macrophyte *Elodea canadensis* physiology. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 249, p.453-462, jun. 2019.

HANKE, Irene *et al.* Relevance of urban glyphosate use for surface water quality. **Chemosphere**, [s.l.], v. 81, n. 3, p.422-429, set. 2010.

HAO, Youwu *et al.* Roundup® confers cytotoxicity through DNA damage and Mitochondria-Associated apoptosis induction. **Environmental Pollution**, [s.l.], v. 252, p.917-923, set. 2019.

HAYES, T.B. et al. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs. PNAS, 2010. Disponível em: <https://pnas.org/content/107/10/4612>. Acesso em 26 nov. 2019.

IBRALATO, G. *et al.* A review of toxicity testing protocols and endpoints with *Artemia* spp. **Ecological Indicators**, [s.l.], v. 69, p.35-49, out. 2016.

JANSSENS, Lizanne; STOKS, Robby. Stronger effects of Roundup than its active ingredient glyphosate in damselfly larvae. **Aquatic Toxicology**, [s.l.], v. 193, p.210-216, dez. 2017.

KRISTOFFERSEN, P et al. A review of pesticide policies and regulations for urban amenity areas in seven European countries. *Weed Research*, [s.l.], v. 48, n. 3, p.201-214, jun. 2008.

MACKERRETH, FJH; HERON, J; TALLING, JF. Water Analysis: Some revised methods for limnologists. *Freshwater Biological*.

MANFRA, Loredana et al. Lethal and sublethal endpoints observed for *Artemia* exposed to two reference toxicants and an ecotoxicological concern organic compound. **Ecotoxicology And Environmental Safety**, [s.l.], v. 123, p.60-64, jan. 2016.

MINISTERIO DO MEIO AMBIENTE – MMA. **Resolução CONAMA nº 357, de 17 de março de 2005**. SIAM- SISTEMA INTEGRADO DE INFORMAÇÃO AMBIENTAL.

MORGAN, M.A. et al. Evaluating sub-lethal stress from Roundup® exposure in *Artemia franciscana* using <sup>1</sup>H NMR and GC-MS. *Aquat Toxicol. California. Biological Research*. Vol. 212. Pag. 77-87, 2019.

MORGAN, Melissa A. *et al.* Evaluating sub-lethal stress from Roundup® exposure in *Artemia franciscana* using 1H NMR and GC-MS. **Aquatic Toxicology**, [s.l.], v. 212, p.77-87, jul. 2019.

Nascimento, D. S., Santos, O. C. D. P., Sandoval, E. W. & Pelli, A. 2021. Parâmetros populacionais e tabela de vida estática em 2010 para Minas Gerais. **Conjecturas**, 21(3), 543–552. <https://doi.org/10.53660/CONJ-139-232>

OBREGON, B. Eduardo; VARGAS, Álvaro. **Chronic toxicity bioassay with populations of the crustacean *Artemia Salina* exposed to the organophosphate diazinon.** Santiago. Biological Research. Vol. 43 n° 3. Pag. 357-362, 2010.

REDAÇÃO GALILEU, 2018. **Aperta o cerco contra o Roundup, herbicida mais usado no mundo.**

Relyea, R., & Ricklefs, R. E. 2021. A Economia da Natureza. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.

RODRIGUES, Lais de Brito. **EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DO GLIFOSATO E FORMULAÇÕES EM DIFERENTES ORGANISMOS.** 2016. 79 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal do Goiás, Goiânia, 2016.

VAN BRUGGEN, A.H.C. *et al.* Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. **Science Of The Total Environment**, [s.l.], v. 616-617, p.255-268, mar. 2018.

VINATEA, J.E. Artêmia um ser vivo excepcional. Panorama da Aquicultura, 1994.