

Toxicidade Aguda do Herbicida Glifosato (Roundup®) para *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae), em Condições Tropicais

Rebeca Silva de Araújo

Marcos Vinicius Bastos Garcia

Terezinha Batista Garcia

Resumo

O Glifosato é um herbicida de amplo espectro, muito usado para eliminar várias plantas de ciclos anuais e perenes. O uso de herbicida é freqüente na agricultura praticada nas várzeas amazônicas, sobretudo naquelas mais próximas aos centros urbanos. Diagnósticos sobre a utilização de agrotóxicos nas várzeas mostraram que o uso inadequado destes aumenta o perigo para o ambiente. Recentemente, os efeitos dos herbicidas do ambiente aquático têm sido alvo de grande preocupação, devido ao alto risco de contaminação de rios e lagos próximos dos cultivos agrícolas. Alguns herbicidas à base de Glifosato (e.g. Roundup®), embora não sejam recomendados para tal fim, têm sido utilizados diretamente no ambiente aquático para controle de plantas emergentes. Diante deste cenário, avaliou-se, neste estudo, o potencial toxicológico do herbicida Roundup® para peixes. Testes de toxicidade aguda foram realizados em laboratório para a espécie de peixe *Danio rerio*, considerada como um dos organismos indicadores em ensaios toxicológicos para água. Resultados preliminares dos ensaios de toxicidade mostraram que a letalidade do Roundup® para peixes pode variar muito, conforme as condições do teste, tais como espécie-teste, temperatura e características físico-químicas da água. Vários produtos à base do herbicida Glifosato são fabricados com surfactantes, produtos que auxiliam o Glifosato a penetrar no tecido celular das plantas. Este adjuvante tem sido considerado altamente tóxico para peixes e outros organismos. Portanto, testes de toxicidade devem ser feitos também com as formulações dos agrotóxicos.

Termos para indexação: ecotoxicologia, pesticidas, várzeas amazônicas.

Acute toxicity of herbicide Glyphosate (Roundup®) to *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae), under tropical conditions

Abstract

Glyphosate is a non-selective and systemic herbicide frequently used to control most annual and perennial plants. The herbicides, like the glyphosate-based formulations, are often used in agriculture practiced in Amazonian floodplains, mainly in the vicinity of urban areas. Surveys about the use of agrochemicals in floodplains showed that the inadequate use might increase the hazard for environment. Recently, the effects of herbicides for aquatic compartment has become an issue of concern due to the high risk of contamination of lakes and rivers near cultivated areas. Some glyphosate-based herbicides (e.g. Roundup®), despite are not recommended for such purpose, have been used directly in water to control emergent plants. In the present work, acute toxicity tests were performed in laboratory for *Danio rerio*, a standard test organism used as indicator for aquatic toxicological assays. First results indicated that the toxicity of Roundup® for fish might varies according to the test conditions, such as the test-species, temperature and physico-chemical characteristics of water. Different glyphosate-based products are formulated with a surfactant, a substance that facilitates the uptake of glyphosate by the plant. This adjuvant has been related as high toxic for fish and other organisms. Therefore, toxicity tests should be also performed for product formulations.

Index terms: ecotoxicology, pesticides, Amazonian floodplains.

Introdução

A avaliação ecotoxicológica de pesticidas, realizados através de testes de toxicidade aguda em laboratórios, é de grande utilidade para a elaboração de uma análise de risco ambiental.

No Brasil, a toxicidade de pesticidas para o ambiente aquático e principalmente para peixes, tem sido investigada em estudos recentes (CRUZ et al., 2004; RESGALLA JUNIOR et al., 2002; PATRÍCIO et al., 2002). Embora os pesticidas sejam usados principalmente no meio terrestre, em áreas agrícolas, aplicados diretamente sobre plantas ou no

solo, o potencial de risco de contaminação de rios, lagos e águas subterrâneas, tem sido motivo de preocupação. Os herbicidas representam a maior parte do volume total de pesticidas aplicados na agricultura. Em algumas regiões da Amazônia, os herbicidas consistem 88,6% do total de pesticidas aplicados (OLIVEIRA; TONIATO, 1995). Dentre os herbicidas, o Glifosato (N-(fosfometil) glicina), é um dos mais aplicados em cultivos agrícolas e atualmente representa 60% do mercado mundial de herbicidas não seletivos (AMARANTE JUNIOR et al., 2002). O uso de Glifosato tem sido crescente em áreas de várzeas da Amazônia, nas proximidades de Manaus (WAICHMAN et al., 2002) e, em recente diagnóstico realizado nestas áreas, foi observado que equipamentos de aplicação e outros utensílios usados com herbicidas e outros defensivos são lavados diretamente nos rios e igarapés por 70% dos produtores (WAICHMAN et al., 2003).

O Glifosato é considerado de baixo risco para o ambiente aquático devido a sua baixa mobilidade no solo, sendo este fortemente adsorvido pelas partículas do solo, o que restringe sua lixiviação para águas subterrâneas. Entretanto, este pode ser carreado ao ambiente aquático através da erosão do solo. Há relatos de que os surfactantes, substâncias adicionadas ao produto para aumentar a eficiência de absorção pela planta, são muitas vezes mais tóxicos que o próprio ingrediente ativo Glifosato. Por isto formulações de herbicidas que não contêm surfactantes são mais recomendadas para o controle de plantas aquáticas. Estudos sobre a toxicologia de produtos formulados (e não apenas do ingrediente ativo), raramente são desenvolvidos. Além disto, a influência dos fatores ambientais sobre a toxicidade tem sido pouco considerada nos estudos. Nas regiões tropicais, fatores como baixo pH, alta temperatura, presença de ácidos húmicos e baixa dureza da água podem influenciar fortemente a toxicidade de substâncias químicas para peixes.

Material e Métodos

Seleção da espécie e procedimentos de cultivo

A espécie *Danio rerio* Hamilton-Buchanan, 1822, um peixe tropical originário da Índia, é conhecido como “paulistinha” no Brasil e “zebra fish” no exterior. Atualmente é utilizado em vários países como organismo modelo em estudos toxicológicos. Neste estudo foram utilizados exemplares de *D. rerio* criados em um tanque escavado no

setor de piscicultura da Embrapa Amazônia Ocidental, provenientes de um lote adquirido no comércio em Manaus. Os peixes destinados aos ensaios foram retirados do tanque, selecionados por comprimento de 2 a 3 cm e aclimatados em aquários com água natural (coletada no Rio Solimões).

Seleção do pesticida

Testes de toxicidade foram feitos a seguinte formulação de herbicida:

Roundup Original® - herbicida de largo espectro, não seletivo, sistêmico muito utilizado em diversos cultivos agrícolas e florestais, agindo principalmente como pós-emergente. Sua formulação contém 480g/L do ingrediente ativo (i.a.) Glifosato (N-(fosfonometil) glicina), e o surfactante poli-oxi-etilamina (POEA).

Procedimento experimental

A determinação da toxicidade aguda de herbicidas para *D. rerio* foi baseada no protocolo nacional NBR 15088 (ABNT, 2004) e internacionais OECD no. 203 (OECD, 1992) e ISO 7346-1/2 (ISO, 1996a, b). Estes descrevem o método para a determinação de toxicidade aguda para *D. rerio*, em ensaios estático e semi-estático. No ensaio estático, os organismos são expostos a diferentes concentrações da substância, sem renovação da solução. No ensaio semi-estático os organismos são expostos com renovação da solução a cada 24 h, sendo apropriado para testar substâncias que causam redução de oxigênio, voláteis ou instáveis em água. Neste estudo foi utilizado o ensaio estático. Os indivíduos utilizados mediam entre 2,5 a 3,5 cm, conforme a norma ISO 7346. O teste foi realizado em laboratório com temperatura ambiente, sob iluminação normal de laboratório de 12 a 16h por dia. As avaliações das características físico-químicas da água foram feitas a cada 24 horas, através de aparelhos medidores de pH, oxigênio e temperatura (tabela 2). Para se definir uma faixa de concentrações, testes preliminares foram realizados em cinco concentrações e controle em apenas uma réplica com três indivíduos por concentração. Nestes ensaios, pretendeu-se apenas estimar uma faixa de concentrações onde a mortalidade varia de 0 a 100%, não havendo, portanto, a necessidade de repetições. Com base no resultado dos testes preliminares, foi definida a faixa de concentrações a ser usada no teste definitivo.

Antes do início do ensaio, os peixes foram coletados no tanque de criação e aclimatados durante 5 a 7 dias nas mesmas condições do teste (água do Rio Solimões, temperatura e iluminação), em aquário de vidro (70 L) na relação de massa do organismo/volume de água de 1g/L. Durante a aclimatação, os peixes foram alimentados duas vezes ao dia (pela manhã e final da tarde), até 24 h antes do ensaio. Utilizou-se ração comercial para crescimento de tambaqui (*Colossoma macropomum*), com 28% de proteína bruta, passando antes por um processo de trituração fina. O teste definitivo foi feito com cinco tratamentos (concentrações de 30 a 70 mg) e o controle em três repetições. Foram utilizados recipientes contendo 2 L da solução teste, 8 peixes por diluição e exposição durante 96h. A transferência dos peixes para os recipientes de testes foi feita com puçás, iniciando no controle e, em ordem crescente de concentração das soluções-teste, colocados cuidadosamente nos recipientes de teste para minimizar o estresse. O oxigênio foi mantido por pipetas Pasteur conectadas a um sistema de aeração (cerca de três bolhas/segundo), com a função de fornecer oxigênio dissolvido para os peixes e promover estabilização do pH.

Desenho experimental e análises estatísticas

Os experimentos definitivos foram feitos em delineamento inteiramente casualizado com três repetições. Para a estimativa da concentração letal mediana (CL_{50}), foi utilizado o seguinte procedimento:

Nos experimentos onde houve respostas em pelo menos três concentrações, e o teste Chi-Quadrado foi significativo, utilizou-se o método de Probit. Nos casos em que o número de respostas foi inferior a três e o teste Chi-Quadrado não significativo, foi usado o método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON et al., 1977). Foram calculados os intervalos de confiança a 95% (IC-95%) associados a CL_{50} . Os programas para análises de Probit e pelo método Spearman-Kärber, estão disponíveis no servidor Internet da U.S. EPA (<http://www.epa.gov/nerleerd/stat2.htm>). O programa TOXRAT® (2003) foi usado para as análises de Probit e elaboração da curva de dose resposta.

Resultados e Discussão

A formulação do herbicida à base de glifosato, denominada Roundup tem sido relatada como 20 a 70 vezes mais tóxica para peixes que o próprio ingrediente ativo (glifosato) puro. A alta toxicidade deste

produto deve-se principalmente à presença do surfactante poli-oxi-etilamina (POEA) adicionado durante sua produção (FOLMAR, 1979). A toxicidade aguda (LC50) do Roundup para peixes varia de 2 a 55 mg/L (WHO, 1994) e parte desta variabilidade é devido à idade dos peixes: indivíduos jovens são mais sensíveis ao Roundup que os adultos (FOLMAR, 1979). Dados de mortalidade em cada concentração nos testes preliminares permitiram determinar uma amplitude de concentrações para o teste definitivo. Com base no valor da CL₅₀ preliminar, foram definidas as concentrações para uso no teste definitivo de toxicidade aguda. Neste estudo, a toxicidade de Roundup para *D. rerio* em condições naturais foi estimada a CL₅₀ de 71 mg / L (IC-95% = 69,4 a 72,4). Comparando com a toxicidade deste herbicida obtida em ensaios com espécies de peixes oriundas de regiões temperadas, verificou-se toxicidade mais baixa para as condições tropicais (Tabela 1) Aparentemente, as condições físico-químicas da água do Rio Solimões (dureza, pH e temperatura, argila em suspensão) aliadas à sensibilidade da espécie teste, influenciaram na toxicidade do Roundup.

Tabela 1. Toxicidade aguda de Roundup para *Danio rerio* (tropical) comparada a espécies originárias de outras regiões.

Espécie	Origem	pH	Dureza (mg CaCO ₃ /L)	Temp°C	CL ₅₀ (mg/L)	Referência
Lepomis	Temperado	6,4 – 7,5	40	22	46	WHO (1994)
Salmo	Temperado	6,6 – 7,6	40	12	36	WHO (1994)
Pimephales	Temperado	6,7 – 7,7	39 – 44	22	31	WHO (1994)
Oncorhynchus	Temperado	5,5 – 6,4	4,5	11	22	WHO (1994)
Ictalurus	Subtropical	6,3 – 7,2	24 – 40	22	52	WHO (1994)
Danio	Tropical	7,0 – 7,6	38 – 40	26	71	Este trabalho

Tabela 2. Condições físico-químicas da água durante o teste.

Concentração	pH	Temperatura	Oxigênio
Controle	7,3 – 7,6	26,1 – 26,7	7,0 – 7,4
30 mg	7,3 - 7,6	25,9 – 26,7	6,8 – 7,3
40 mg	7,2 – 7,6	26,0 – 26,7	6,2 – 7,2
50 mg	7,3 – 7,6	25,9 – 26,7	6,9 – 7,3
60 mg	7,2 – 7,6	25,9 – 26,8	5,3 – 7,2
70 mg	7,0 – 7,6	26,2 – 26,8	4,4 – 7,2

Conclusões

A diferença de sensibilidade de *Danio rerio* ao glifosato (Roundup) em relação aos resultados encontrados na literatura para outras espécies de peixes deve-se, provavelmente, à influência das condições físico-químicas da água e da sensibilidade da própria espécie teste. Portanto, as informações toxicológicas produzidas para espécies de clima temperado devem ser interpretadas com cautela, caso sejam usadas para a avaliação de risco ambiental nas regiões tropicais. Sugere-se que dados toxicológicos sejam produzidos para espécies de peixes tropicais nativas e sob condições tropicais.

Referências

- ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 15088: Ecotoxicologia aquática: toxicidade aguda - método de ensaio com peixes. Rio de Janeiro, 2004.
- AMARANTE JUNIOR, O. P. et al. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. Química Nova, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.
- CRUZ, C.; MACHADO-NETO, J.; MENEZES, M. L. Toxicidade aguda do inseticida paration metílico e do biopesticida azadiractina de folhas de neem (*Azadirachta indica*) para alevino e juvenil de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente, v. 14, p. 93-102, 2004.
- FOLMAR, L. C.; SANDERS, H. O.; JULIN, A. M. Toxicity of the herbicide glyphosate and several of its formulations to fish and aquatic invertebrates. Arch. Environ. Contam. Toxicol., v. 8, p. 269-278, 1979.
- HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environmental Science and Technology, v. 11, p. 714-719, Correction (1978) 12, 417, 1997.
- ISO International Organization for Standardization. ISO-7346-1: Water quality: determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachidanio rerio* Hamilton: Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]: part 1: static method. Geneve, Switzerland, 1996a.

ISO International Organization for Standardization. ISO-7346-2: Water quality: determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachidanio rerio* Hamilton: Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]: part 2: semi-static method. Geneve, Switzerland, 1996b.

OECD Organisation for Economic Cooperation and Development: Guideline for testing of chemicals No. 203 "Fish, Acute Toxicity Tests". Paris, 1992.

OLIVEIRA, J. N. A.; TONIATO, A. O. The alarming use of agrochemicals in Rondonia, Brazil. *Pesticide News*, n. 27, p. 4-7, 1995.

PATRÍCIO, F. C. et al.. Toxicidade do inseticida-nematicida aldicarbe às espécies de peixes *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan, 1822) e *Orthospinus franciscensis* (Eigenmann, 1929). *Ciência e Agrotecnologia*, v. 26, n. 2, p. 385-391, 2002.

RESGALLA JUNIOR, C. et al. Toxicidade aguda de herbicidas e inseticida utilizados na cultura do arroz irrigado sobre juvenis de carpa (*Cyprinus carpio*). *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, v. 12, p. 59-68, 2002.

WAICHMAN, A. V.; RÖMBKE, J.; NINA, N. C. S. Agrotóxicos: elemento novo na Amazônia. *Ciência Hoje*, v. 32, n. 190, p. 70-73, 2003.

WAICHMAN, A.V. et al. Use and fate of pesticides in the Amazon state, Brazil: Risk to human health and the environment. *ESPR - Environmental Science and Pollution Research*, v. 9, n. 6, p. 423-428, 2002.

WHO Environmental Health Criteria 159: Glyphosate. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 1994.

TOXRAT® Software for the statistical analysis of biotests. Copyright: ToxRat Solutions GmbH, Alsdorf, Germany, 2003.