



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA

Efeito dos herbicidas diuron, glifosato e paraquat e curvas de distribuição de sensibilidade de espécies (CDSE) para a proteção da diversidade de macrófitas aquáticas da região Amazônica.

PAOLA SOUTO CAMPOS

Manaus, Amazonas

Março de 2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA

Efeito dos herbicidas diuron, glifosato e paraquat e curvas de distribuição de sensibilidade de espécies (CDSE) para a proteção da diversidade de macrófitas aquáticas da região Amazônica.

PAOLA SOUTO CAMPOS
Orientadora: ANDREA VIVIANA WAICHMAN

Tese apresentada ao curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Diversidade Biológica, Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Diversidade Biológica, área de concentração Conservação e Manejo Biológico.

Manaus, Amazonas

Março de 2015

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

C198e Campos, Paola Souto
Efeito dos herbicidas diuron, glifosato e paraquat e curvas de distribuição de sensibilidade de espécies (CDSE) para a proteção da diversidade de macrófitas aquáticas da região Amazônica. / Paola Souto Campos. 2014
77 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Andrea Viviana Waichman
Tese (Doutorado em Diversidade Biológica) - Universidade Federal do Amazonas.

1. macrófitas aquáticas. 2. sensibilidade de espécies. 3. padrão de qualidade ambiental. 4. ecotoxicologia. 5. Amazônia. I. Waichman, Andrea Viviana II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

AGRADECIMENTOS

À Andrea Waichman pela orientação e pelo apoio. Por todos os ensinamentos passados, pela grande amizade que construímos e por toda a contribuição à minha formação.

Ao Sérgio Rodrigues por todo o apoio e ajuda ao lidar com os obstáculos que surgiram ao longo deste projeto e por ter tanta paciência em me ensinar o programa estatístico R que foi essencial para a fase final da construção da tese.

Ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica da Universidade Federal do Amazonas pelo apoio a mim dispensado ao decorrer do projeto.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia, Adriana Oliveira, Gisele Vilarinho, Thayana Cruz e Ana Júlia que acompanharam e contribuíram com toda a ajuda possível.

Ao professor Thierry Gasnier por todo o apoio dispensado nas horas das dúvidas mais persistentes.

À Erika Portela pelo auxílio em campo e no laboratório. Agradeço pela sua amizade e por estar sempre disposta a ajudar em tudo o que fosse possível.

Ao Marcos Makiyama do Inpa pela doação de todas as amostras de *Cabomba aquatica* que utilizei durante todos os experimentos do projeto.

Ao professor Jefferson Cruz por permitir acompanhar algumas coletas do seu grupo, tornando a ida ao campo mais animada.

Às professoras Maria Anete Rubim e Maria Teresa Piedade pela ajuda com a identificação das espécies.

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado do Amazonas pela bolsa concedida.

À minha querida família Socorro, Ivan e Paula que tanto amo. Agradeço pelo apoio, segurança e compreensão incondicionais. Obrigada por não me deixarem desistir.

Ao Alexandre Campos pelo incentivo, força, compreensão e muita paciência em todos os momentos que precisei nesta longa caminhada.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CE₅₀: Concentração de um composto que causa efeito em 50% dos organismos expostos

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

DSE: Distribuição da sensibilidade de espécies

EPA: Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América

HC₅: Concentração que afeta apenas 5% dos organismos expostos.

HC: Concentração de risco

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

OECD: Organização pela Cooperação Econômica e Desenvolvimento das Nações Unidas

SINDAG: Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola

SISBIO: Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

VMP: Valor Máximo Permitido

UFAM: Universidade Federal do Amazonas

WHO: World Health Organization

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| INTRODUÇÃO GERAL | 14 |
| REFERÊNCIAS..... | 19 |
| OBJETIVO GERAL..... | 24 |
| HIPOTESES | 25 |
| CAPÍTULO 1 | 26 |
| EFEITO DOS HERBICIDAS DIURON, GLIFOSATO E PARAQUAT EM SETE ESPÉCIES DE MACROFITAS AQUÁTICAS DE GRANDE OCORRÊNCIA NA REGIÃO AMAZÔNICA..... | 26 |
| 1. INTRODUÇÃO | 28 |
| 2. MATERIAL E MÉTODOS | 30 |
| 2.1 ESPÉCIES TESTADAS..... | 30 |
| 2.2 HERBICIDAS TESTADOS | 36 |
| 2.2.1 Paraquat..... | 36 |
| 2.1.2 Glifosato..... | 37 |
| 2.1.2 Diuron | 38 |
| 2.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL..... | 39 |
| 2.4 PERÍODOS DE ACLIMATAÇÃO..... | 41 |
| 2.5 DURAÇÃO DOS EXPERIMENTOS..... | 42 |
| 2.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS | 44 |
| 3. RESULTADOS | 44 |
| 3.2 CONCENTRAÇÕES DE EFEITO MEDIANAS (CE_{50})..... | 44 |
| 4. DISCUSSÃO..... | 48 |
| 5. REFERÊNCIAS | 51 |
| CAPÍTULO 2 | 56 |
| CURVAS DE DISTRIBUIÇÃO DE SENSIBILIDADE DE ESPÉCIES PARA OS HERBICIDAS DIURON, GLIFOSATO E PARAQUAR E A PROTEÇÃO DA DIVERSIDADE DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS AMAZÔNICAS. | 57 |
| 1. INTRODUÇÃO | 58 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS..... | 60 |
| 2.1 DISTRIBUIÇÕES DE SENSIBILIDADE DAS ESPÉCIES - DSES..... | 60 |
| 2.2 CÁLCULO DO VALOR MÁXIMO PERMITIDO DOS HERBICIDAS DIURON, GLIFOSATO E PARQUAT (PADRÃO DE QUALIDADE DA ÁGUA)..... | 61 |
| 3. RESULTADOS | 62 |
| 3.1. CURVA DE DISTRIBUIÇÃO DE SENSIBILIDADE DE ESPÉCIES | 62 |

| | |
|---|----|
| 3.2 CÁLCULO DOS VALORES MÁXIMOS DE HERBICIDAS (PADRÕES DE QUALIDADE DA ÁGUA)..... | 66 |
| 4. DISCUSSÃO | 67 |
| 4.1 DISTRIBUIÇÃO DE SENSIBILIDADE DE ESPÉCIES..... | 67 |
| 4.2 PADRÃO DE QUALIDADE DA ÁGUA PARA MACRÓFITAS AQUÁTICAS AMAZÔNICAS..... | 69 |
| 5. REFERENCIAS | 72 |
| CONCLUSÕES GERAIS | 75 |
| APÊNDICES | 76 |

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

| | |
|--|----|
| FIGURA 1: AREA DE COLETA: (A) LAGO ILHA DA PACIÊNCIA; (B) LAGO DA FELICIDADE | 32 |
| FIGURA 2. <i>AZOLLA FILICULLOIDES</i> | 32 |
| FIGURA 3. <i>SALVINIA AURICULATA</i> | 33 |
| FIGURA 4. <i>SPIRODELA POLYRHIZA</i> | 33 |
| FIGURA 5. <i>PISTIA STRATIOTES</i> | 34 |
| FIGURA 6. <i>PHYLLANTHUS FLUITANS</i> | 34 |
| FIGURA 7. <i>LIMNOBIUM LAEVIGATUM</i> | 35 |
| FIGURA 8. <i>CABOMBA AQUATICA</i> | 35 |
| FIGURA 9. FÓRMULA ESTRUTURAL DO PARAQUAT..... | 37 |
| FIGURA 10. FÓRMULA ESTRUTURAL DA GLIFOSATO | 38 |
| FIGURA 11. FÓRMULA ESTRUTURAL DO DIURON | 39 |
| FIGURA 12. ACLIMATAÇÃO DAS MACRÓFITAS ANTES DO INICIO DOS TESTES ECOTOXICOLÓGICOS. | 42 |
| FIGURA 13. RECIPIENTES DOS TESTES COM 2 E 1 LITRO DE CAPACIDADE DE ARMAZENAMENTO. | 43 |
| FIGURA 14. CONCENTRAÇÃO DE EFEITO (CE_{50}) DO DIURON PARA OS DIFERENTES PARÂMETRO TOXICOLÓGICOS AVALIADOS NAS 7 ESPÉCIES TESTADAS. | 45 |
| FIGURA 15 CONCENTRAÇÃO DE EFEITO (CE_{50}) DO HERBICIDA GLIFOSATO PARA OS DIFERENTES PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS AVALIADOS NAS 6 ESPÉCIES TESTADAS. | 46 |
| FIGURA 16. CONCENTRAÇÃO DE EFEITO (CE_{50}) DO HERBICIDA PARAQUAT PARA OS DIFERENTES PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS AVALIADOS NAS 7 ESPÉCIES TESTADAS. | 47 |

Capítulo 2

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 DISTRIBUIÇÃO DE SENSIBILIDADE DE ESPÉCIES DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS DA AMAZÔNIA PARA O DIURON. A MEDIANA DA CONCENTRAÇÃO PERIGOSA PARA 5% DAS ESPÉCIES (HC_5) É APRESENTADA JUNTAMENTE COM O INTERVALO SUPERIOR (5%) E INFERIOR (95%) DE CONFIANÇA ENTRE PARÊNTESES..... | 63 |
| FIGURA 2. DISTRIBUIÇÃO DE SENSIBILIDADE DE ESPÉCIES DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS DA AMAZÔNIA PARA O GLIFOSATO. A MEDIANA DA CONCENTRAÇÃO PERIGOSA PARA 5% DAS ESPÉCIES (HC_5) É APRESENTADA JUNTAMENTE COM O INTERVALO SUPERIOR (5%) E INFERIOR (95%) DE CONFIANÇA ENTRE PARÊNTESES..... | 64 |
| FIGURA 3. DISTRIBUIÇÃO DE SENSIBILIDADE DE ESPÉCIES DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS PARA O PARAQUAT. A MEDIANA DA CONCENTRAÇÃO PERIGOSA PARA 5% DAS ESPÉCIES (HC_5) É APRESENTADA JUNTAMENTE COM O INTERVALO SUPERIOR (5%) E INFERIOR (95%) DE CONFIANÇA ENTRE PARÊNTESES..... | 65 |

FIGURA 4. DISTRIBUIÇÃO DA SENSIBILIDADE DE ESPÉCIES DAS MACRÓFITAS AQUÁTICAS AMAZÔNICAS CONSTRUÍDA COM A CE50 (MG/L) PARA GLIFOSATO (AZUL), PARAQUAT (VERDE), DIURON (VERMELHO)..... 66

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

| | |
|---|----|
| TABELA 1. GRUPO TAXONÔMICO, COMPRIMENTO E PESO (MÉDIA ± DP; N = 54) DAS ESPÉCIES DE MACRÓFITAS. | 31 |
| TABELA 2. NOMES COMERCIAIS, PUREZA DA SUBSTÂNCIA ATIVA, INGREDIENTES INERTES, NÚMERO DO LOTE E CLASSIFICAÇÃO QUANTO À PERICULOSIDADE AO MEIO AMBIENTE DOS PRODUTOS TESTADOS. | 36 |
| TABELA 3. CONCENTRAÇÕES NOMINAIS DOS AGROTÓXICOS (µG/L) USADAS NOS TESTES DE TOXICIDADE CRÔNICA COM ESPÉCIES DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS. * ESPÉCIE NÃO COLETADA PARA TESTE COM GLIFOSATO. | 41 |

Capítulo 2

| | |
|--|----|
| TABELA 1. VALORES DE CE50 UTILIZADOS PARA A CONSTRUÇÃO DA CURVA DE SENSIBILIDADE DE ESPÉCIES DE MACRÓFITAS REFERENTES AOS PARÂMETROS MAIS SENSÍVEIS PARA TODAS AS ESPÉCIES E HERBICIDAS AVALIADOS..... | 60 |
| TABELA 2. VALORES MÁXIMOS PERMITIDOS DOS HERBICIDAS NO AMBIENTE AQUÁTICO AMAZÔNICO, CALCULADOS PARA AS MACRÓFITAS AQUÁTICAS UTILIZANDO A ABORDAGEM DE DISTRIBUIÇÃO DE SENSIBILIDADE DE ESPÉCIES. HC5 É A CONCENTRAÇÃO DE RISCO PARA 5% DAS ESPÉCIES E QUE PROTEGE 95% DAS ESPÉCIES; O PERCENTIL DE 5% CORRESPONDE AO LIMITE INFERIOR DE CONFIANÇA (5%) DO HC5. O VALOR MÁXIMO FOI CALCULADO DIVIDINDO O PERCENTIL DE 5% POR UM FATOR DE SEGURANÇA DE 10..... | 67 |

LISTA DE APÊNDICES

| | |
|---|----|
| APÊNDICE A. MÉDIA E DESVIO PADRÃO DOS PARÂMETROS AMBIENTAIS DOS TESTES CRÔNICOS (21 DIAS) REALIZADOS COM HERBICIDAS DIURON, GLIFOSATO E PARAQUAT. | 77 |
|---|----|

RESUMO

O ecossistema aquático da Amazônia vem sendo alvo de contaminação ambiental pelo uso indiscriminado de herbicidas, colocando em risco a diversidade e abundância das macrófitas aquáticas da região. Pouco se sabe a respeito dos efeitos dos herbicidas em espécies de macrófitas aquáticas amazônicas, sendo a maioria dos estudos ecotoxicológicos desenvolvidos com a espécie *Lemna* sp., que é utilizada como representativa dos efeitos dos agrotóxicos sobre a comunidade de macrófitas. Além disso, os valores máximos permitidos para os herbicidas em uso no Brasil não estão estabelecidos em lei. O presente trabalho teve como proposta investigar a toxicidade crônica do diuron, glifosato e paraquat em sete espécies de macrófitas aquáticas de ocorrência na Amazônia (*Azolla filiculoides*, *Cabomba aquatica*, *Limnobium laevigatum*, *Pistia stratiotes*, *Phyllanthus fluitans*, *Salvinia auriculata*, *Spirodela polyrhiza*), permitindo delinear estratégias para sua proteção com base na utilização do método de distribuição de sensibilidade de espécies, e sugerir valores máximos permitidos para cada herbicida. Primeiramente, foi determinada a concentração de efeito mediana (CE₅₀) dos herbicidas, testados individualmente para as sete espécies. Em seguida foram determinadas as concentrações de risco que afetam 5% das espécies (HC₅) utilizando o conceito de distribuição de sensibilidade de espécies (DSE). Os valores máximos permitidos para cada herbicida em ambientes aquáticos na Amazônia foram propostos. Com base nos resultados da CE₅₀, o paraquat se mostrou mais tóxico, seguido do glifosato e diuron, e as espécies *S. auriculata* e *A. filiculoides* foram às espécies mais sensíveis à exposição dos herbicidas, enquanto que *C. aquatica* apresentou uma menor sensibilidade. Os valores de HC₅ evidenciaram que as espécies amazônicas são mais sensíveis que a espécie padrão *Lemna* sp. Os valores de HC₅ gerados com a construção das DSEs foram propostos para a formulação dos padrões de qualidade de água, no que diz respeito ao grupo das macrófitas aquáticas, sendo os valores máximos sugeridos para 0,06 µg/L, 0,18 µg/L, 0,33 µg/L para glifosato, paraquat e diuron, respectivamente. Este trabalho é um dos pioneiros na realização de testes de toxicidade em macrófitas aquáticas da região amazônica com herbicidas. Ele contribui para ampliar o número de dados ecotoxicológicos e serve como ponto de partida para as discussões envolvendo a determinação de valores máximos permitidos de herbicidas para o ambiente aquático da Amazônia que visem proteger este grupo.

Palavras-chave: macrófitas aquáticas, herbicidas, sensibilidade de espécies, padrão de qualidade ambiental, Amazônia.

ABSTRACT

The aquatic ecosystem of the Amazon has been the target of environmental contamination by the indiscriminate use of herbicides, endangering diversity and abundance of aquatic macrophytes in the region. Little is known about the effects of herbicides on species of aquatic macrophytes occurring in the Amazon, most ecotoxicological studies are conducted with *Lemna* sp. species which is used as representative of the effects of pesticides on the community of macrophytes. In addition, the maximum permissible values for the herbicides in use in Brazil are not established by law. This work aimed to investigate the chronic toxicity of diuron, glyphosate and paraquat in seven species of Amazonian aquatic macrophytes (*Azolla filiculoides*, *Cabomba aquatica*, *Limnobium laevigatum*, *Pistia stratiotes*, *Phyllanthus fluitans*, *Salvinia auriculata*, *Spirodela polyrhiza*), allowing to outline strategies for their protection based on the use of the method of distribution of species sensitivity and suggest maximum allowable values for each herbicide. First, the median effect concentration (EC₅₀) of the herbicides tested individually for the seven species was determined, followed by the calculation of the concentrations of risk affecting 5% of species (HC₅) using the concept of species sensitivity distribution (SSD). The maximum allowable values for each herbicide in aquatic environments in the Amazon have been proposed. Based on the results of EC₅₀, paraquat was more toxic, followed by glyphosate and diuron, and the species *S. auriculata* e *A. filiculoides* were more sensitive to exposure to the herbicide, whereas *C. aquatica* showed lower sensitivity. HC₅ values showed that the Amazonian species are more sensitive than the standard species *Lemna* sp.. HC₅ values generated with the construction of the SSD have been proposed for formulating standards for water quality, with respect to the group of aquatic macrophytes, being the maximum values suggested of 0.06 µg/L, 0.18 µg/L e 0.33 µg/L to glyphosate, paraquat and diuron, respectively. Therefore, this work is one of the pioneers in performing toxicity tests on aquatic macrophytes with herbicides in the Amazon region, thus contributing to increase the number of ecotoxicological data. It also serves as a starting point for discussions involving the determination of maximum allowable values herbicide to the aquatic environment of the Amazon aimed at protecting this group.

Keywords: aquatic macrophytes, herbicides, sensitivity of species, environmental quality standard, Amazon.

INTRODUÇÃO GERAL

A Amazônia hoje se constitui na mais importante área tropical do planeta, contendo aproximadamente 40% da floresta tropical remanescente, e concentrando uma enorme diversidade de espécies da flora e da fauna (LAURANCE *et al.* 2001). É considerada uma região de alta relevância econômica, social e ambiental, possuindo uma das maiores frações da biodiversidade terrestre e aquática de água doce do planeta (PERES & SCHEIDER, 2012). Entretanto, este enorme capital natural vem sendo ameaçado principalmente pela intensificação da agricultura, que busca promover a modernização do setor agrícola com a implantação de pacotes tecnológicos baseados na adoção de agrotóxicos como estratégia de aumento de produtividade (KAGEYAMA, 2003; MIRANDA *et al.*, 2007). Além disso, o governo ofereceu incentivos para a instalação da indústria de agrotóxicos no país e seu amplo uso nas lavouras foi promovido ao condicionar a obtenção do crédito rural à aquisição de agrotóxicos (SOARES; PORTO, 2009; PORTO; SOARES, 2012).

Essas mudanças trouxeram ganhos para a agricultura e a economia, mas também perdas incalculáveis, dados os impactos das práticas agrícolas no ecossistema onde a área agrícola está inserida e também no seu entorno. Não apenas a prática agrícola leva à redução da biodiversidade, por converter áreas naturais em monoculturas, mas também deve ser considerada a perda de espécies pela contaminação das áreas de cultivo e corpos de água próximos com agrotóxicos. Em se tratando de ecossistemas tropicais, como é o caso da Amazônia, a possível perda de biodiversidade pode ser ainda maior em termos absolutos, dado que nestes sistemas, não só existem mais espécies, mas eles podem conter também maior número de espécies relativamente mais sensíveis, vulneráveis ou espécies endêmicas (SCHIESARI *et al.*, 2013).

Desde 2008, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo. Neste contexto as vendas anuais de agrotóxicos e afins no Brasil tiveram um crescimento de 194 % nos últimos dez anos, passando de 162.461,96 toneladas em 2000 para 477.792,44 toneladas de ingredientes ativos comercializados em 2012 (IBAMA, 2012).

Sabe-se que o uso de agrotóxicos na região do Amazonas tem aumentado significativamente nas últimas décadas. Entre os anos de 2005 e 2013 a utilização dessas substâncias no Estado do Amazonas passou de 78 para 151 toneladas por ano, segundo dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG, 2014).

Esse crescimento, segundo Waichman *et al.* (2002; 2007), foi ocasionado por dois motivos: o rápido crescimento populacional nas áreas urbanas, que resultou no aumento da demanda por frutas e hortaliças e a introdução de cultivos não adaptados às condições da região, sendo mais suscetíveis às pragas e à competição com a vegetação nativa, levando os agricultores a um uso intenso de agrotóxicos em diversos municípios do Estado do Amazonas.

Embora a “Lei dos Agrotóxicos” (Lei nº. 7.802/89) exija uma receita agrônômica para a venda e técnicos treinados para a aplicação, os agrotóxicos são livremente comercializados e utilizados nas principais áreas agrícolas do Estado (WAICHMAN *et al.* 2002 e 2007; RÖMBKE *et al.*, 2008). Além disto, foi reportado pelos autores acima citados que os agricultores, por falta de conhecimento e de acompanhamento técnico, fazem, na maioria das vezes, um uso incorreto destas substâncias, utilizando dosagens maiores que as recomendadas, aplicando os produtos com alta frequência e menores intervalos de tempo entre aplicações, e descartando resíduos e embalagens em locais inapropriados. Desta forma, o não cumprimento do disposto na lei e o uso incorreto de agrotóxicos por parte dos agricultores concorrem para a contaminação dos ecossistemas aquáticos da região, colocando não só em risco a biodiversidade e abundância de organismos aquáticos, mas o funcionamento e sustentabilidade desses ecossistemas.

Ecossistemas aquáticos são particularmente vulneráveis aos efeitos da poluição por agrotóxicos, os quais podem alcançar corpos de água por diversas rotas, incluindo a aplicação direta para controle de pragas, dispersão aérea, deriva, escoamento superficial e lixiviação, sendo estes últimos processos favorecidos em regiões tropicais dada a alta intensidade de precipitações (KOOPE *et al.*, 2005; CASTILLO, *et al.*, 1997). Na Amazônia, a extensa malha hídrica característica da região também pode ser responsável pelo transporte destes contaminantes para além da área onde os agrotóxicos foram aplicados, atingindo diversos ecossistemas e espécies não-alvo, podendo alcançar inclusive áreas destinadas à proteção da biodiversidade (HENRIQUES *et al.*, 1997). Evidências sobre o transporte de agrotóxicos para áreas adjacentes às terras agrícolas, inclusive para dentro de áreas de conservação foram apresentadas por Moraes e colaboradores (2003) que amostrando os corpos de água, sedimentos e peixes dentro de uma reserva de Mata Atlântica demonstraram a presença de 27 agrotóxicos, com significativo acúmulo das substâncias mais persistentes em peixes.

O estudo realizado por Campos (2009) mostra que lagos e igarapés das áreas agrícolas de Manaus e arredores já apresentam concentrações de agrotóxicos acima do permitido,

colocando em risco a biota desses corpos de água. Entretanto o conhecimento dos efeitos dos agrotóxicos sobre as espécies aquáticas amazônicas ainda é muito limitado. O efeitos dos agrotóxicos sobre as espécies amazônicas e a comparação da sensibilidade interespecífica com espécies da região temperada somente foi avaliada para os agrotóxicos parationa metílica, malationa e carbendazim, considerando peixes e invertebrados (RICO *et al.*, 2009, 2011), e deltametrina, imidacloprido, glifosato e diuron considerando peixes (SOUZA, 2014). Os efeitos destes 4 agrotóxicos também foi avaliado para uma espécie de anuro (MACEDO, 2014), mas nenhum estudo foi realizado até o momento com macrófitas aquáticas.

As macrófitas aquáticas são plantas vasculares de grande relevância ecológica, uma vez que são importantes elementos estruturais e funcionais dos sistemas aquáticos (SCHEFFER, 1998). Formam a maioria da biomassa dos ecossistemas aquáticos, e têm importante papel na ciclagem e no controle da disponibilidade de nutrientes e nos processos físico-químicos desse sistema, sendo fonte de alimento e fornecendo habitat e refúgio para um sem-número de espécies de aves, peixes, anfíbios e invertebrados (FAIRCHILD *et al.*, 1998; ROESSINK, *et al.*, 2005). Desta forma, podem ser consideradas espécies-chave nos ecossistemas aquáticos, de forma que mudanças na comunidade de macrófitas aquáticas podem ter maiores conseqüências, alterando a estrutura e funcionamento destes ecossistemas. Especificamente na Amazônia, as macrófitas aquáticas são os produtores primários mais abundantes das várzeas, constituindo 52% do total da produção primária dessas áreas (JUNK & HOWARD-WILLIAMS, 1984, JUNK 1985).

A comunidade de macrófitas aquáticas das áreas alagáveis amazônicas apresenta uma alta diversidade, sendo reportadas na Amazônia Central aproximadamente 400 espécies pertencentes aos mais diferentes grupos taxonômicos (PIEDEDE *et al.*, 2010). Apesar desta grande diversidade de plantas aquáticas não há estudos na região que mostrem os efeitos de agrotóxicos, principalmente herbicidas, nestes organismos. Poucos estudos têm sido realizados mundialmente sobre os efeitos dos agrotóxicos nas macrófitas aquáticas (FAIRCHILD *et al.*, 1994; FRANKART *et al.*, 2003; LYTLE & LYTLE, 2002, 2005; WENDT-RASCH *et al.*, 2004; MALTBY *et al.*, 2005; BELGERS *et al.*, 2007; ARTS *et al.*, 2008; SOBRERO *et al.*, 2007; SOOD *et al.*, 2011), sendo todos eles em regiões temperadas e nenhum realizado em regiões tropicais.

Em todas as regiões do mundo, a importação, fabricação e comercialização de agrotóxicos devem ser feitas mediante o registro destes produtos em órgãos governamentais

específicos. No Brasil o registro e controle do uso e comercialização desses produtos é da responsabilidade da ANVISA, que se encontra sob a inteveniência de 3 ministérios, o Ministério da Saúde, o Ministério de Meio Ambiente e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Para este registro é necessária a realização de testes ecotoxicológicos com o intuito de determinar se o agrotóxico a ser registrado coloca em risco o ambiente onde será utilizado (Lei nº. 7.802/89). Entretanto, com a justificativa de reduzir os custos de produção dos agrotóxicos e, conseqüentemente, os custos da produção agrícola e evitar o monopólio do mercado nacional por empresas estrangeiras foi adotado o critério de equivalência, que simplifica o processo de registro (WAICHMAN, 2012). Neste sentido, não é exigida uma avaliação completa, sendo incentivado o uso de produtos cujas patentes estão vencidas, sendo esses produtos obsoletos, em geral, de maior toxicidade e persistência no ambiente.

A realização de teste ecotoxicológicos é considerada um processo caro e lento, que levaria a demoras desnecessárias no registro dos produtos. Por este motivo, é comum a extrapolação dos resultados realizados com espécies e em condições das regiões temperadas para as condições tropicais, podendo levar a erros, uma vez que diferenças nas condições ecossistêmicas, na composição de espécies (tanto em diversidade como abundância) e na sensibilidade das plantas não são levadas em consideração (CASTILLO *et al.* 1997; KWOK *et al.* 2007; RÖMBKE *et al.* 2008; DYER *et al.* 1997; MALTBY *et al.* 2005; RICO *et al.*, 2009).

Especificamente no caso das macrófitas aquáticas, a maior parte dos testes é realizada com a espécie flutuante *Lemna* sp. (norma OECD 2002), sendo questionado se a toxicidade determinada para essa espécie pode ser utilizada como representativa dos efeitos dos agrotóxicos sobre a comunidade de macrófitas aquáticas em geral (FLETCHER, 1990; LEWIS, 1995; HANSON & ARTS, 2007; TURGUT & FOMIN, 2002). Além disto, poucos estudos estão focados na diferença de sensibilidade das espécies de macrófitas aos agrotóxicos (ARTS *et al.*, 2008; KNAUER *et al.*, 2008). Estes estudos recomendam que pesquisas comparando a sensibilidade de várias espécies de macrófitas aquáticas sejam realizadas, de forma a se construir e consolidar uma base de dados para o melhor entendimento dos potenciais efeitos dos agrotóxicos no ambiente.

Assim, para garantir a proteção da macrófitas aquáticas e dos serviços ecossistêmicos que elas fornecem, há necessidade de desenvolver ferramentas de avaliação de risco para os sistemas tropicais, em especial o amazônico, estabelecendo critérios de qualidade da água,

permitindo o monitoramento e controle dos impactos das atividades humanas. Isso requer a compreensão de como esse grupo torna-se vulnerável com a dispersão dos contaminantes. Para isto, é preciso, em um primeiro momento, a realização de testes ecotoxicológicos que avaliem o efeito dos agrotóxicos sobre espécies de macrófitas aquáticas em particular.

Apesar da existência da Resolução CONAMA Nº 430/2011, na qual, complementa parcialmente a Resolução Nº 357/2005, que determina os valores máximos permitidos de diversas substâncias nas águas do Brasil, a maior parte dos agrotóxicos ainda não tiveram seus valores máximos permitidos estabelecidos na legislação. Nesse contexto, a ausência desses valores cria um cenário onde se torna quase impossível implementar ações para a proteção da biodiversidade aquática e para o uso correto de agrotóxicos.

Para resolver o impasse da extrapolação realizada a partir de uma ou duas espécies para inferir efeitos no conjunto das espécies do ecossistema foi proposto o método de avaliação da Distribuição de Sensibilidade de Espécies (DSE), considerando que estas variam consideravelmente na sua sensibilidade aos contaminantes ambientais, e essa variação pode ser descrita através da construção de uma distribuição da sensibilidade de espécies (NEWMAN, 2000). Este método leva em consideração a diversidade de espécies representando de forma mais abrangente o comportamento de determinada substância no ambiente, pois se utiliza de dados de sensibilidade de diferentes organismos e assim determina qual a fração afetada de espécies para cada composto estudado. Com base nessas informações pode ser proposto um valor máximo da substância no ambiente de acordo com a proporção de espécies que se quer proteger (MALTBY *et al.*, 2005; DAAM; VAN DEN BRINK, 2010).

Um aparente entrave na utilização do método DSE para definir padrões de qualidade de água para herbicidas na Amazônia se dá por conta da escassez de dados ecotoxicológicos com espécies da região, dada a ausência de resultados provenientes de testes com espécies locais ou endêmicas e em situações que reflitam as condições locais de exposição da biodiversidade aos agrotóxicos (KRULL *et al.*, 2011). Desta forma, estudos sobre a toxicidade de herbicidas na Amazônia são de suma importância e necessários, de forma a validar se os padrões de qualidade ambiental baseados em valores de toxicidade para as espécies *Lemna* spp. podem ser utilizados na Amazônia, protegendo também a biodiversidade de macrófitas aquáticas dessa região.

Referências

ARTS, G.H.P. *et al.* 2008. Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests. *Environ. Pollut.* 153, 199–206.

BELGERS, J.D.M. *et al.* 2007. Effects of the herbicide 2,4-D on the growth of nine aquatic macrophytes. *Aquat. Bot* 86, 260e268.

BRASIL. Presidência da República. Lei nº 7.802, de 11.07.89. 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. 1989.

CAMPOS, P. S., 2009. Destino Ambiental dos Agrotóxicos e Avaliação de risco ambiental e Humano nos Municípios de Manaus, Iranduba e Careiro da Várzea, no Estado do Amazonas. 77p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências do Ambiente e Sustentabilidade da Amazônia. Universidade Federal do Amazonas.

CASTILLO, L. E.; DE LA CRUZ, E.; RUEPERT, C. 1997. Ecotoxicology and pesticides in tropical aquatic ecosystems of Central America. *Environ Toxicol Chem*, 16: p.41–51.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA. 2005. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. 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.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA. 2011. Resolução nº 430, de 31 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA.

DAAM, M. A.; VAN DEN BRINK, P. J. 2010. Implications of differences between temperate and tropical freshwater ecosystems for the ecological risk assessment of pesticides. *Ecotoxicology* v. 19, p. 24-37.

DYER, S.D.; BELANGER, S.E. E CARR, G.J., 1997. An initial evaluation of the use of Euro/North American fish species for tropical effects assessments. *Chemosphere* 35: 2767 – 2781.

FAIRCHILD, J.F., LAPOINT, T.W., SCHWARTZ, T.R., 1994. Effects of an herbicide and insecticide mixture in aquatic mesocosms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 27, 527–533.

FAIRCHILD, J.F., RUESSLER, D.S., CARLSONS, A.R., 1998. Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor, and metolachlor. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1830–1834.

FLETCHER, J.S., 1990. Use of algae versus vascular plants to test for chemical toxicity. In: Wang, W., Gorsuch, J.W., Lower, W.R. (Eds.), *Plants for Toxicity Assessment*, ASTM STP 1091. American Society for Testing of Materials, Philadelphia, pp. 33-39.

FRANKART, C., EULLAFFROY, P., VERNET, G. 2003. Comparative effects of four herbicides on non- photochemical fluorescence quenching in *Lemna minor*. *Environmental and Experimental Botany* 49, 159-168.

HANSON, M., ARTS, G., 2007. Improving regulatory risk assessment e using aquatic macrophytes. In:Chapman,P.M.(Ed.),*Learned Discourses. Integr. Environ. Assess. Manag.* 3, 466–467.

HENRIQUES, W.; JEFFERS, R. D.; LACHER, T.; KENDALL, R. J. 1997. Agrochemical use on banana plantations in Latin America: perspectives on ecological risk. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 16, pp. 91–99.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. 2012. Boletim de comercialização de agrotóxicos e afins. Histórico de vendas 2000-2012. Disponível em: < http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/boletim%-20de%20comercializacao_2000_2012.pdf> Acesso em 23 de set 2014.

JUNK. W. J. & C.; HOWARD-WILLIAMS, 1984. Ecology of aquatic macrophytes in Amazonia. In Sioli, H. (ed.), *The Amazon, limnology and landscape ecology of might tropical river and its basin*. Junk Publisher, The Hague, 296-293.

JUNK, W. J., 1985. The Amazon floodplain - a sink or source for organic carbon? *Mitt. Geol. Paliont. Inst. Univ. Hamburg. SCOPE/UNEP Sonderbd.* 58: 267-283.

KAGEYAMA, A. 2003. Produtividade e renda na agricultura familiar: efeitos do PRONAF-crédito. *Revista Agricultura em São Paulo*, São Paulo, v. 50, n. 2, p. 1-13.

KNAUER, K., MOHR, S., FEILER, U., 2008. Comparing growth development of *Myriophyllum* spp. in laboratory and field experiments for ecotoxicological testing. *Environmental Science and Pollution Research* 15, 322–331.

KOOPE, G.C.. 2005. *Agrotóxicos-mutações, reprodução e câncer*. Brasília: Editora Universidade de Brasília. 391p.

KRULL, M. *et al*, 2011. State of the art of Brazilian ecotoxicology. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 7, 690-691.

KWOK, K.W.H. *et al.*, 2007 Comparison of tropical and temperate freshwater species sensitivities to chemicals: implications for deriving safe extrapolation factors. *Integrated Environmental Assessment and Management* 3: pp 49 – 67.

LAURANCE WF, COCHRANE MA, BERGEN S, FEARNSIDE PM, DELAMONICA P, BARBER C, D'ANGELO S AND FERNANDES T., 2001. The Future of the Brazilian Amazon. *Science* 291: 438 – 439.

LEWIS, A.L., 1995. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. *Environ. Pollut.* 87, 319–336.

LYTLE, J.S., LYTLE, T.F., 2002. Uptake and loss of chlorpyrifos and atrazine by *Juncus effusus* L. in a mesocosm study with a mixture of pesticides. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 1817–1825.

LYTLE, T.F., LYTLE, J.S., 2005. Growth inhibition as indicator of stress because of atrazine following multiple toxicant exposure of the freshwater macrophyte, *Juncus effusus* L. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24, 1198–1203.

MACEDO, A.J. P. 2014. Avaliação da toxicidade dos herbicidas diuron e glifosato e dos inseticidas imidacloprido e deltametrina na espécie de anuro amazônico *Scinax ruber*. Manaus, 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente e Sustentabilidade da Amazônia), Universidade Federal do Amazonas.

MALTBY, L. *et al.* 2005. Insecticide species sensitivity distributions: The importance of test species selections and relevance to aquatic ecosystems. *Environ Toxicol Chem* 24:379–388.

MIRANDA, A. C., *et al.* 2012. Neoliberalismo, uso de agrotóxicos e a crise da soberania alimentar no Brasil. *Rev. bras. Saúde ocup.*, São Paulo, 37 (125): p. 17-50.

MORAES, R. *et al.*, 2003. Pesticide Residues in Rivers of a Brazilian Rain Forest Reserve: Assessing Potential Concern for Effects on Aquatic Life and Human Health. *Ambio* Vol. 32 No. 4. p. 258-263.

NEWMAN, M. C. *et al.*, 2000. Applying species sensitivity distributions in ecological risk assessment: assumptions of distribution type and sufficient number of species. *Environ Toxicol Chem*, v. 19, n. 2, p. 508–515.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2002. *Lemna sp.* growth inhibition test. Revised proposal for a new guideline 221. Paris, France.

PERES, C.A.; SCHNEIDER, M. 2012. Subsidized agricultural resettlements as drivers of tropical deforestation. *Biol Conserv*, v.151, p.65-68.

PIEDADE, M. T.F. *et al.*, 2010. Aquatic herbaceous plants of the Amazon floodplains: state of the art and research needed. *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 22, 2, p. 165-178.

PORTO, M. F.; SOARES, W. L. 2012. Modelo de desenvolvimento, agrotóxicos e saúde: um panorama da realidade agrícola brasileira e propostas para uma agenda de pesquisa inovadora. *Rev. bras. Saúde ocup.*, São Paulo, v. 37, n. 125, p. 17-50.

RICO, A. *et al.*, 2009. Effect of parathion-methyl on Amazonian fish and freshwater invertebrates: a comparison of sensitivity with temperate data. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 58, p. 765-771.

RICO, A. *et al.*, 2011. Effects of malathion and carbendazim on Amazonian freshwater organisms: comparison of tropical and temperate species sensitivity distributions. *Ecotoxicology*, 20: p. 625-634.

ROESSINK, I., *et al.*, 2005. Effects of lambda-cyhalothrin in two ditch mesocosm systems of different trophic status. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24 pp. 1684-1696.

RÖMBKE, J.; WAICHMAN, A.V.; GARCIA, M.B., 2008. Risk Assessment of Pesticides for Soils of the Central Amazon, Brazil: Comparing Outcomes with Temperate and Tropical Data. *Integr. Environ. Assess. Manag.* Vol 4, nº. 1, p. 94–104.

SCHEFFER, M., 1998. *Ecology of shallow lakes*. Chapman & Hall, London.

SCHIESARI L.; Waichman, A.; BROCK, T.; ADAMS, C.; GRILLITSCH, B. 2013. agricultural frontier Pesticide use and biodiversity conservation in the Amazonian. *Phil. Trans. R. Soc.B.* 368. 1471-2970.

SINDICATO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS-SINDAG. 2014. VENDAS DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS POR ESTADOS E CLASSES - 2010/13. Disponível em: <<http://www.sindag.com.br>> Acesso: 22 mar de 2014.

SOARES, W. L.; PORTO, M. F. S. 2009. Estimating the social cost of pesticide use: an assessment from acute poisoning in Brazil. *Ecological Economics*, v. 68, n. 10, p. 2721-2728.

SOBRERO, M.C.; RIMOLDI, F.; RONCO, A. E. 2007. Effects of the Glyphosate Active Ingredient and a Formulation on *Lemna gibba* L. at Different Exposure Levels and Assessment End-Points. *Bull Environ Contam Toxicol.* 79:537–543.

SOOD, A.; PABBI, S.; UNİYAL, P.L. 2011. Effects of Paraquat on Lipid Peroxidation and Antioxidant Enzymes in Aquatic Fern *Azolla microphylla*. *Russian Journal of Plant Physiology*, 2011, Vol. 58, No. 4, pp. 667–673.

SOUZA, T.C. 2014. Toxicidade aguda de agrotóxicos e Curva de Sensibilidade de espécies para peixes amazônicos. Manaus, 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente e Sustentabilidade da Amazônia), Universidade Federal do Amazonas.

TURGUT, C., FOMIN, A., 2002. Sensitivity of the rooted macrophyte *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verd court to seventeen pesticides determined on the basis of EC50. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 69, 601–608.

WAICHMAN, A. V. et al., 2002. Pesticide use in the Amazon State, Brazil. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 9, n. 6. p. 423-428.

WAICHMAN, A.V.; EVE, E.; NIINA, N.C.S., 2007. Do farmers understand the information displayed on pesticide product labels? A question to reduce pesticides exposure and risk of poisoning the Brazilian Amazon. *Crop Protection*, 26(4): p. 576-583.

WAICHMAN, A.V. 2012. A problemática do uso de agrotóxicos no Brasil: a necessidade de construção de uma visão compartilhada por todos os atores sociais *Rev. bras. Saúde ocup.*, São Paulo, 37 (125): 17-50.

WENDT-RASCH, L., VAN DEN BRINK, P.J., CRUM, S.J.H., WOIN, P., 2004. The effects of a pesticide mixture on aquatic ecosystems differing in trophic status: responses of the macrophyte *Myriophyllum spicatum* and the periphytic algal community. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 57, 383–398.

OBJETIVO GERAL

Investigar se os principais herbicidas utilizados na região podem causar efeitos tóxicos nas macrófitas aquáticas, podendo interferir na estrutura e funcionamento do ecossistema aquático.

OBJETIVOS ESPÉCIFICOS

- Determinar a Concentração de Efeito Mediana (CE₅₀) dos herbicidas diuron, glifosato e paraquat em sete espécies de macrófitas aquáticas amazônicas *Azolla filiculoides*, *Cabomba aquatica*, *Limnobium laevigatum*, *Pistia stratiotes*, *Phyllanthus fluitans*, *Salvinia auriculata*, *Spirodela polyrhiza* testadas individualmente.
- Determinar a concentração de risco que afeta 5% das espécies e protege 95% (HC 5%), por meio da construção de curva de sensibilidade das espécies estudadas para cada herbicida.
- Sugerir ajustes nos padrões de qualidade da água para o uso seguro dos herbicidas estudados e desta forma proteger a diversidade de macrófitas aquáticas da região amazônica;

HIPOTESES

1. O uso dos herbicidas diuron, glifosato e paraquat causam efeitos tóxicos nas macrófitas aquáticas amazônicas, podendo provocar alterações na estrutura e funcionamento do ecossistema aquático.

2. As concentrações de efeito determinadas para a espécie padrão *Lemna* spp. são equivalentes ou semelhantes às das espécie amazônicas, e portanto a definição de um padrão de qualidade da água a partir dessa espécie é extrapolável para as espécies amazônicas.

3. Os padrões de qualidade de água existentes, portanto, os valores máximos permitidos do diuron, glifosato e paraquat no meio aquático protegem a comunidade de macrófitas aquáticas.

CAPÍTULO 1

**EFEITO DOS HERBICIDAS DIURON, GLIFOSATO E PARAQUAT EM SETE
ESPÉCIES DE MACROFITAS AQUÁTICAS DE GRANDE OCORRÊNCIA NA
REGIÃO AMAZÔNICA.**

Efeito dos herbicidas diuron, glifosato e paraquat em sete espécies de macrofitas aquáticas da região amazônica.

Paola Souto Campos^{1,2}; Andrea Viviana Waichman¹, Sérgio Luis Rodrigues da Silva¹.

¹Laboratório de Ecotoxicologia, Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas.

Endereço eletrônico:

PSC: pscampos@gmail.com

AVW: awaichman@gmail.com.br

1. INTRODUÇÃO

Os herbicidas são os agrotóxicos mais comercializados no Brasil (IBAMA, 2010). Entre os anos de 2009 e 2013 a utilização de herbicidas somente no Estado do Amazonas passou de 39 para 113 toneladas por ano, segundo dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG). Somente entre os anos de 2009 a 2012, o uso no Brasil dos herbicidas que foram avaliados na presente pesquisa aumentou significativamente. No caso do diuron, se observou um aumento de 400% passando de 2 para 8 toneladas. Já para o glifosato o aumento no mesmo período foi de 57% passando de 118 para 186 toneladas. O paraquat, herbicida de menor uso no Brasil, apresentou um aumento de comercialização de 273%, com 1,9 toneladas utilizadas em 2009 e 5,2 toneladas comercializadas em 2012 em todo o País (IBAMA, 2012).

Há uma razoável expectativa de que as taxas de uso dos agrotóxicos devam aumentar ao longo do tempo com o aumento da agricultura no estado (SCHIESARI *et al.*, 2013). Levando em consideração que a agricultura intensiva depende de terras férteis perto de corpos de água naturais, a biota aquática está vulnerável a contaminação destes tóxicos (VIDAL *et al.*, 2011)

Os herbicidas são agentes biológicos ou substâncias químicas capazes de matar ou suprimir o crescimento de espécies vegetais e algas e, para serem seletivos, eles devem atingir somente as plantas daninhas e não toda a cultura (ROMAN *et al.*, 2007). Quando atingem os sistemas aquáticos por meio de várias rotas como de escoamento superficial e lixiviação (DAVIES *et al.*, 2003), os agrotóxicos podem causar alterações destes ecossistemas, uma vez que ao afetar os organismos vivos, alteram a composição das comunidades aquáticas, interferindo nas relações tróficas e nos ciclos biogeoquímicos, portanto, modificando a estrutura e o funcionamento dos ecossistemas aquáticos (ARTS *et al.*, 2008). As macrófitas aquáticas desempenham importante função na manutenção e equilíbrio dos ambientes aquáticos, sendo consideradas como a principal fonte produtora de matéria orgânica. Servem de abrigo e/ou alimentação para diversos tipos de organismos, atuam na despoluição dos ambientes aquáticos, na produção de biomassa, no controle de erosão hídrica, no melhoramento físico e nutricional do solo, e na ciclagem de nutrientes, entre outros (SILVA, 2011).

Não há evidências de estudos na região do Amazonas que tenham avaliado a toxicidade de agrotóxicos em plantas aquáticas, visto que para estas avaliações são necessários testes ecotoxicológicos. Diversas normas para testes de efeitos toxicológicos vêm sendo implementadas no Brasil, sendo que nenhuma para plantas aquáticas. Somente a Diretriz 91/414/EEC (EU 1997) da União Europeia, que está em revisão, possui um requerimento para proteção das macrófitas, e nela são exigidos testes com uma única espécie, *Lemna* spp. Porém existe uma preocupação no que diz respeito às avaliações de riscos baseadas nos parâmetros da *Lemna* sp., pois estas avaliações podem não ser aplicáveis para outras espécies de macrófitas aquáticas (MALTBY *et al.*, 2010).

Para Esteves (2011), as macrófitas são classificadas quanto ao seu biótopo, que são denominados genericamente de grupos ecológicos e são divididas em: i) *macrófitas aquáticas emersas* - plantas enraizadas no sedimento e com folhas acima da lâmina de água; ii) *macrófitas aquáticas com folhas flutuantes* - plantas enraizadas no sedimento e que se desenvolvem com folhas flutuantes na lâmina da água; iii) *macrófitas aquáticas submersas enraizadas* - plantas enraizadas no sedimento, que crescem totalmente submersas; iv) *macrófitas aquáticas submersas livres* - plantas que apresentam raízes pouco desenvolvidas e que flutuam submersas em águas de pouca turbulência; v) *macrófitas aquáticas flutuantes* - plantas que se desenvolvem flutuando livremente no espelho de água.

Se existem diversos modos de vida diferentes, há dúvidas se os testes realizados com *Lemna* sp. que é a espécie padrão dos estudos ecotoxicológicos, podem ser representativos para as espécies da região Amazônica. Por exemplo, o ciclo de vida curto da *Lemna* spp. não é comparável àquele das espécies de macrófitas submersas, cujo crescimento é mais lento (CEDERGREEN *et al.*, 2005). Além disso, as folhas de *Lemna* spp. estão expostas ao ar e à água e podem ser diretamente influenciadas pela deriva de agrotóxicos. Macrófitas submersas enraizadas, pelo contrário, estão expostas pela entrada de agrotóxicos tanto por meio de escoamento, drenagem ou derramamentos acidentais como pelo sedimento (ARTS *et al.* 2008).

Assim, para garantir a proteção das plantas aquáticas e dos serviços ecossistêmicos que elas fornecem, há uma necessidade de compreender, por meio de testes ecotoxicológicos, a vulnerabilidade desse grupo de plantas e seus diferentes hábitos quando da dispersão de contaminantes. Como não há evidências de testes ecotoxicológicos realizados com espécies da região, a presente pesquisa tem o intuito de investigar os efeitos dos herbicidas diuron,

glifosato e paraquat que são amplamente utilizados no Estado do Amazonas, por meio de testes crônicos em laboratório com sete espécies de macrófitas aquáticas da região Amazônica, podendo assim gerar conhecimentos para construír uma base de dados em ecotoxicologia, a qual, ainda é inexistente.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Espécies testadas

As espécies *Azolla filiculoides*, *Cabomba aquatica*, *Limnobium laevigatum*, *Pistia stratiotes*, *Phyllanthus fluitans*, *Salvinia auriculata*, *Spirodela polyrhiza* foram as macrófitas testadas para avaliar a toxicidade dos herbicidas diuron, glifosato e paraquat, por meio de ensaios padronizados (tabela 1).

As plantas foram escolhidas tendo em conta a facilidade de serem encontradas nos ambientes aquáticos da região e sua fácil adaptação às condições de experimentação em laboratório.

Tabela 1. Grupo taxonômico, comprimento e peso (média \pm DP; n = 54) das espécies de macrófitas.

| Ordem, família, gênero, espécies | Comprimento (cm) | Peso (g) |
|----------------------------------|------------------|-----------------|
| Alismatales | | |
| Araceae | | |
| Spirodela | | |
| <i>Spirodela polyhiza</i> | 1,57 \pm 0,15 | 0,09 \pm 0,07 |
| Pistia | | |
| <i>Pistia stratiotes</i> | 7,08 \pm 1,80 | 5,96 \pm 3,16 |
| Hydrocharitaceae | | |
| Limnobium | | |
| <i>Limnobium laevigatum</i> | 6,68 \pm 3,08 | 2,64 \pm 2,55 |
| Salviniales | | |
| Azzolaceae | | |
| Azolla | | |
| <i>Azolla filliculoides</i> | 1,49 \pm 0,33 | 0,17 \pm 0,11 |
| Salviniaceae | | |
| Salvinia | | |
| <i>Salvinia auriculata</i> | 5,25 \pm 0,77 | 1,80 \pm 0,95 |
| Euphorbiales | | |
| Euphorbiaceae | | |
| Phyllanthus | | |
| <i>Phyllanthus fluitans</i> | 4,29 \pm 0,87 | 0,48 \pm 0,28 |
| Nymphaeales | | |
| Cabombaceae | | |
| Cabomba | | |
| <i>Cabomba aquatica</i> | 19 \pm 1,05 | 1,27 \pm 0,39 |

As macrófitas para a realização dos testes foram coletadas no lago da Ilha da Paciência e no lago da Felicidade na costa do Xiborena ambos localizados no município de Iranduba (Fig.1). A espécie *Cabomba aquatica* foi cedida pelo Dr. Marcos Makiyama da Coordenação de Pesquisas em Aqüicultura (CPAQ/ INPA). Todas as coletas e transporte das macrófitas aquáticas foram realizadas com autorização do IBAMA sob o N° 29386-2 do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO).



Figura 1: Area de coleta: (A) Lago Ilha da Paciência; (B) Lago da Felicidade

Azolla filiculloides, possui forma de filícula, tem hábito flutuante livre, quando jovem é verde, depois se torna avermelhada e parda. Vive em águas calmas e não cresce em águas ácidas pobres em fósforo. Possui intensa propagação vegetativa, podendo duplicar-se a cada 3-6 dias (POTT & POTT, 2000). Possui ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrada em ecossistemas aquáticos tropicais, subtropicais e em regiões de clima temperado (SCULTHORPE, 1985) (Fig. 2).



Figura 2. *Azolla filiculloides*

Salvinia auriculata, possui forma de aurícula ou forma semelhante à orelha-de-onça, tem hábito flutuante livre e possui raíz com uma estrutura em forma de U. Possui folhas que repelem água e raízes que servem como esponja retendo água e sedimentos. São plantas que requerem muita luz sua ocorrência é ampla em todo o Brasil (POTT & POTT, 2000) (Fig. 3).



Figura 3. *Salvinia auriculata*

A espécie *Spirodela polyrhiza* tem hábito flutuante livre, vive em águas calmas com pouca perturbação. As folhas são verdes na parte superior e avermelhadas/roxas na parte inferior, normalmente apresentam de 6 a 12 raízes por folha (EMERICH, 2009). Sua reprodução se dá por meio de propagação vegetativa intensa a partir da folha mãe (WANG *et al.*, 2014) (Fig.4).



Figura 4. *Spirodela polyrhiza*

Pistia stratiotes vive em águas paradas ou pouco correntes, possui folha esponjosa e seu tamanho varia conforme o ambiente; necessita de muita luz. Sobrevive semi-enraizada em lama úmida; é polinizada por insetos e sua semente é dispersada pela água. Não tolera muito bem a sombra, sendo colonizadora, pois avança rapidamente e se adensa no local. Sua distribuição se dá principalmente do sul dos Estados Unidos à Argentina e em todo o Brasil (POTT & POTT, 2000) (Fig.5).



Figura 5. *Pistia stratiotes*

A espécie *Phyllanthus fluitans* é uma planta flutuante livre que vive em águas ricas em nutrientes. As folhas variam de verde a amareladas dependendo das condições do ambiente, e são ocas embaixo o que favorece sua flutuação. As raízes servem de abrigo para os alevinos (NOTARE, 1992) e sua distribuição ocorre no Brasil, Paraguai, Equador e Peru (POTT & POTT, 2000) (Fig.6).



Figura 6. *Phyllanthus fluitans*

A *Limnobium laevigatum* é uma espécie flutuante livre que prefere águas calmas, possui folhas esponjosas no lado inferior; quando enraizada possui folhas eretas. A espécie é exigente quanto à quantidade de luz e prefere águas de pH próximo do neutro. Distribuiu-se pela América tropical e subtropical (POTT & POTT, 2000; DIMITRI, 1972) (Fig 7).



Figura 7. *Limnobium laevigatum*

Cabomba aquatica, é uma planta que pode se apresentar na cor verde ou vermelha, possui folhas submersas opostas cruzadas ou verticiladas com geralmente 2 folhas por nó, lâmina multipartida, reniforme a quase circular no contorno. Possui folhas emersas flutuantes e flores individuais intensamente amarelas e são muito exigentes na quantidade de luz (AUBLET, 1775). Sua distribuição se dá na América Central e do Sul até o Rio Amazonas (RATAJ & HOREMA, 1977) (Fig 8).



Figura 8. *Cabomba aquatica*

2.2 Herbicidas testados

No presente trabalho foram utilizados os herbicidas mais comercializados e usados no estado do Amazonas, que foram selecionados previamente segundo consultas realizadas nas lojas comerciais de vendas de agrotóxicos da cidade de Manaus.

Foram testados três herbicidas: glifosato (Gliz 480g/L), diuron (Diuron Nortox 500g/L) e paraquat (Gramaxone 200g/L). A Tabela 2 mostra os nomes comerciais, pureza da substância ativa, ingredientes inertes, número de registro, fabricante e a classificação quanto à periculosidade dos produtos utilizados neste estudo.

Nos testes ecotoxicológicos realizados não foram utilizados os ingredientes ativos puros dos herbicidas, uma vez que na agricultura do Amazonas são utilizadas as formulações comerciais.

Tabela 2. Nomes comerciais, pureza da substância ativa, ingredientes inertes, número do lote e classificação quanto à periculosidade ao meio ambiente dos produtos testados.

| Nome Comercial | Ingrediente Ativo | Ingredientes Inertes | Número de Registro* | Periculosidade ao Meio Ambiente |
|----------------------|---|----------------------|---------------------|---------------------------------|
| Gramoxone 200 | bipiridílio dicloreto, íon (Paraquat) 20% | 87,6% | 01518498 | Classe II - Muito perigoso |
| Gliz 480 SL | Glifosato Sal Isopropilamina 48% | 69,20% | 0438898 | Classe III – Perigoso |
| Diuron Nortox 500 SC | Diuron 50% | 69,4% | 08895 | Classe II - Muito perigoso |

*Número de registro no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)

2.2.1 Paraquat

É um herbicida pertencente ao grupo químico dos bipiridílio e tem sua classificação toxicológica I – extremamente tóxico e classificação do potencial de periculosidade ambiental II – muito perigoso ao meio ambiente, conhecido como paraquat com nomenclatura química de 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium, fórmula bruta com $C_{12}H_{14}N_2$ e fórmula estrutural (Fig.9).

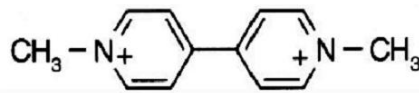


Figura 9. Fórmula Estrutural do Paraquat
Fonte: ANVISA, 2005

Este herbicida é um sal solúvel em água que desseca rapidamente todo o tecido verde com o qual entra em contato. Amplamente utilizado em agricultura, não é volátil, explosivo ou inflamável em solução aquosa (PERON *et al.*, 2003). Geralmente é comercializado como Gramoxone®, Gramocil®, Agroquat®, Gramuron®, Paraquat®, Paraquol® e também em misturas com outros princípios ativos, como o Secamato®.

O Paraquat age na presença de luz, desidratando as partes verdes de todas as plantas com as quais entra em contato; após a aplicação a penetração ocorre quase imediatamente. O local de ação do Paraquat é o cloroplasto contendo os sistemas fotossintéticos das plantas que absorvem a energia luminosa usada para produzir açúcares (MARTINS, 2013). Este herbicida é conhecido por agir no Fotossistema I.

2.1.2 Glifosato

O Glifosato pertence ao grupo glicina substituída e é classificado como um produto extremamente tóxico - Classe III (ANVISA, 2007) para a saúde humana, e pouco tóxico para o meio ambiente - classe IV. É um herbicida não seletivo, de ação sistêmica de pós-emergência, com nomenclatura química: N-(phosphonomethyl) glycine, fórmula bruta: $C_3H_8NO_5P$ e fórmula estrutural (Fig. 10). Pode ser encontrado em forma de sais, sendo sal de isopropilamina (glyphosate-isopropylammonium), sal de potássio (glyphosate-potassium) e sal de amônio (glyphosate-ammonium).

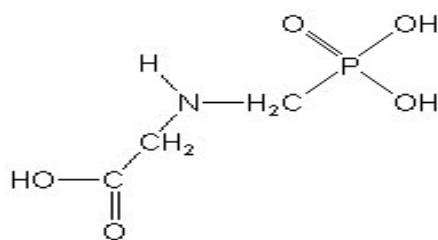


Figura 10. Fórmula Estrutural da Glifosato
Fonte: ANVISA, 2007.

Hoje o glifosato é principal herbicida utilizado no mundo, tendo participação de 10% do total de defensivos agrícolas consumidos (MOURA, 2009). Em condições ambientais, o glifosato apresenta estabilidade na presença de luz, inclusive em temperaturas superiores a 60°C (AMARANTE *et al.*, 2002). É altamente solúvel em água e sua meia-vida pode variar de 7 a 70 dias dependendo das condições ambientais (GIESY *et al.*, 2000).

O glifosato inibe especificamente a enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfatossintase (EPSPS), que catalisa a condensação do ácido chiquimico e do fosfato piruvato, inibindo, assim, a síntese de três aminoácidos essenciais – triptofano, fenilalanina e tirosina (JAWORSKI, 1972; ZABLOTOWICZ & REDDY, 2004).

Quando o glifosato é aplicado sobre as plantas, ocorre a penetração ou absorção, cuja velocidade vai depender de numerosos fatores, incluindo espécie, idade, condições ambientais e concentração do glifosato e surfactante. O glifosato é móvel no floema e é rapidamente translocado por todas as partes da planta, mas tende a se acumular nas regiões meristemáticas (YAMADA & CASTRO, 2007).

2.1.2 Diuron

É um herbicida pertencente ao grupo químico da uréia, com classificação III – medianamente tóxico e classificação do potencial de periculosidade ambiental – II – produto muito perigoso ao meio ambiente.

Esse herbicida é conhecido quimicamente por 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea, fórmula bruta: C₉H₁₀C₁₂N₂O e fórmula estrutural é apresentada na figura 11.

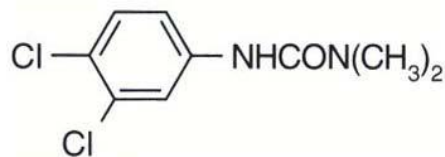


Figura 11. Fórmula Estrutural do Diuron
Fonte: ANVISA, 2003.

Apresenta-se sob a forma de pó molhável com ação sistêmica pré e pós-emergente, usado no controle de ervas daninhas, agindo na planta por absorção, principalmente pelas raízes, de onde é deslocado através do xilema (MONCADA, 2012). Seu mecanismo de ação é a destruição do Fotossistema II e, conseqüente, a interrupção da fotossíntese. Por ele ser um herbicida de alta persistência ele pode ser encontrado em muitos ambientes, incluindo solos, sedimento e água (GIACOMAZZI & COCHET, 2004).

O diuron é considerado como sendo um dos herbicidas mais perigosos para o ambiente, uma vez que é muito persistente não biodegradável e bioacumulável (KUMAR *et al.*, 2011; BARBIERI, 2009; MHADHBI & RICARDO BEIRAS, 2012). A sua persistência é atribuída principalmente à combinação de três fatores: sua estabilidade química, baixa solubilidade em água e forte sorção do solo (WONG *et al.*, 2013).

2.3. Protocolo experimental

Para determinar a toxicidade do diuron, glifosato e paraquat nas espécies selecionadas, foram realizados experimentos com testes crônicos para o cálculo da CE₅₀ (Concentração Efeito Mediana), que representa a concentração de uma substância tóxica que promove algum efeito em 50% das plantas expostas durante os ensaios.

Os testes foram baseados com as orientações da OECD 221 (2006) para teste com a *Lemna* sp., incluindo algumas adaptações, como tamanho dos recipientes, número de plantas por replicata e duração do teste.

Pré-testes foram realizados para cada herbicida, baseados nas concentrações de efeito (CE₅₀) existentes para a espécie padrão *Lemna* spp. (EPA; AERU, 2014), a fim de determinar o intervalo de concentrações que se aproxima da CE₅₀, uma vez que os dados disponíveis com

os herbicidas selecionados em espécies amazônicas são inexistentes. Após análise dos pré-testes, as concentrações para os testes crônicos foram definidas.

Para determinar a CE_{50-21} dias, os testes crônicos foram realizados em um sistema estático sem troca ou adição de água. A fim de chegar o mais próximo possível do que acontece na realidade no campo, os herbicidas foram aplicados somente no início dos testes em cinco concentrações crescentes (C1, C2, C3, C4, C5) e um controle (C0), e com 3 repetições por nível de tratamento ($n = 3$). As concentrações nominais utilizadas nos testes de toxicidade estão apresentadas na tabela 3.

As soluções estoque utilizadas nos testes de toxicidade crônica foram preparadas por diluição dos herbicidas em água destilada. Os meios de ensaio foram preparados por diluição da solução estoque em metade água do local de coleta das espécies, que foi previamente filtrada e metade da água de origem artesiana coletada na UFAM.

Tabela 3. Concentrações nominais dos agrotóxicos ($\mu\text{g/L}$) usadas nos testes de toxicidade crônica com espécies de macrófitas aquáticas. * espécie não coletada para teste com glifosato.

| Espécies | Diuron | Glifosato | Paraquat |
|-----------------------------|--------|-----------|----------|
| <i>Azolla filiculoides</i> | 8 | 5 | 4 |
| | 12 | 10 | 7 |
| | 16 | 15 | 10 |
| | 20 | 20 | 13 |
| | 24 | 25 | 16 |
| <i>Cabomba aquática</i> | 20 | 25 | 10 |
| | 24 | 35 | 15 |
| | 28 | 45 | 20 |
| | 32 | 55 | 25 |
| | 36 | 65 | 30 |
| <i>Limnobium laevigatum</i> | 12 | 15 | 5 |
| | 16 | 20 | 10 |
| | 20 | 25 | 15 |
| | 24 | 30 | 20 |
| | 28 | 35 | 25 |
| <i>Pistia stratiotes</i> | 12 | 5 | 4 |
| | 16 | 10 | 7 |
| | 20 | 15 | 10 |
| | 24 | 20 | 13 |
| | 28 | 25 | 16 |
| <i>Phyllanthus fluitans</i> | 16 | 5 | 4 |
| | 20 | 10 | 7 |
| | 24 | 15 | 10 |
| | 28 | 20 | 13 |
| | 32 | 25 | 16 |
| <i>Salvinia auriculata</i> | 8 | 5 | 4 |
| | 12 | 10 | 7 |
| | 16 | 15 | 10 |
| | 20 | 20 | 13 |
| | 24 | 25 | 16 |
| <i>Spirodela polyrhiza</i> | 12 | * | 5 |
| | 16 | * | 10 |
| | 20 | * | 15 |
| | 24 | * | 20 |
| | 28 | * | 25 |

2.4 Períodos de aclimação

Os testes laboratoriais de toxicidade foram realizados no Laboratório de Ecologia da UFAM. As macrófitas foram coletadas uma semana antes do início dos experimentos e foram

previamente lavadas e aclimatadas em aquários de 30 litros contendo metade da água do local e metade da água de poço de origem artesiana da UFAM.

As macrófitas ficaram no mínimo cinco dias em sala aclimatizada com iluminação apropriada de 20 watts (aproximadamente 2500 lux) até o início do experimento (Fig.12).



Figura 12. Aclimação das macrófitas antes do início dos testes ecotoxicológicos.

2.5 Duração dos experimentos

Os testes foram conduzidos em aquários de 2L para espécies maiores e 1L para as espécies menores (Fig. 13). Os testes com *Cabomba aquatica*, por ser uma macrófita enraizada, foram realizados utilizando areia como sedimento, adquirida em loja de materiais de construção que foi previamente lavada e secada na estufa a 90 °C.

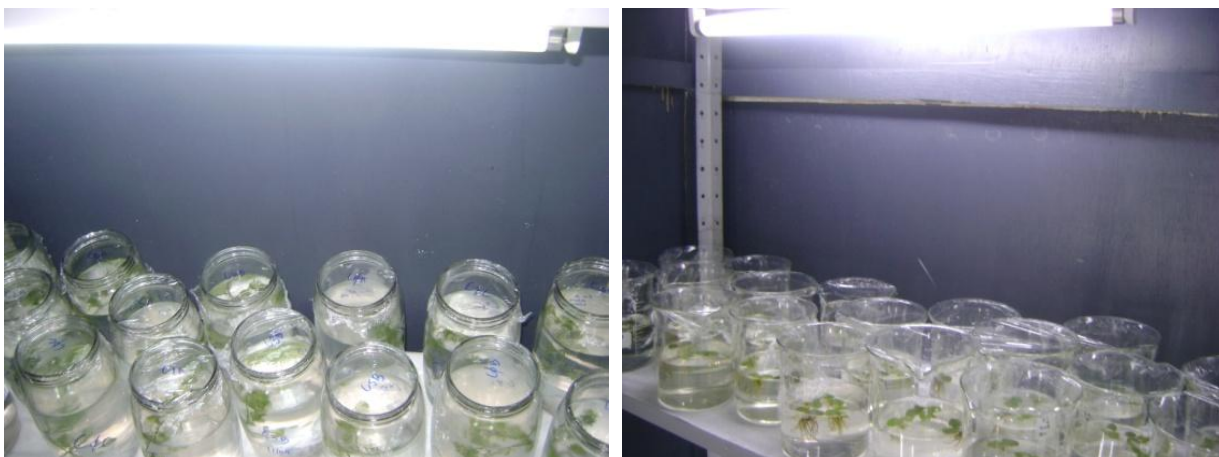


Figura 13. Recipientes dos testes com 2 e 1 litro de capacidade de armazenamento.

Todas as plantas selecionadas para os testes foram lavadas com água destilada para retirada de qualquer material e foram selecionados os indivíduos com condições saudáveis e de tamanhos semelhantes. Em cada recipiente foram adicionadas plantas individuais, e logo em seguida os recipientes foram cobertos com filme plástico com alguns furos para passagem de ar para impedir a rápida evaporação da água.

Os testes foram realizados em ambiente com temperatura que variou de 23 a 25 °C, e ciclo de iluminação de 12h de luz e 12 h escuridão, utilizando iluminação fluorescente em um local fechado com entrada permitida apenas pelo condutor do experimento. As macrófitas foram expostas aos herbicidas pelo período de 21 dias, baseados em testes realizados com *Lemna* spp.

No total foram avaliados 5 parâmetros para determinar a toxicidade dos herbicidas, a saber: (1) tamanho da planta (cm), (2) tamanho da folha (cm), (3) tamanho da raiz (cm), (4) número de folhas e (5) peso fresco (g). Os efeitos foram monitorados no início do experimento ($t=0$) e no 7^o, 14^o e 21^o dias. Além disso, alterações visuais nas plantas foram registradas ao longo do experimento

As concentrações de oxigênio dissolvido, pH, condutividade elétrica e temperatura foram avaliadas no início do experimento ($t=0$) e nos 7^o, 14^o e 21^o dias com o uso de um aparelho multiparamétrico (Thermo Orion Five Star, Thermo Scientific, USA). Os valores dos parâmetros físicos se encontram no apêndice A.

2.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas para obtenção das estimativas das concentrações de efeito (CE₅₀) e correspondentes curvas dose-resposta, foram realizadas no software R (R CORE TEAM, 2014), empregando o pacote drc – “dose response curves” (RITZ & STREIBIG, 2005), que utiliza modelos de distribuição de probabilidade log-logística. A análise de variância (ANOVA-1 via) foi empregada como teste de adequação das curvas dose-resposta aos modelos de distribuição log-logístico.

3. RESULTADOS

3.2 Concentrações de Efeito Medianas (CE₅₀)

Os resultados dos testes de toxicidade crônicos das sete espécies de macrófitas aquáticas de ocorrência comum na região amazônica, com os valores da CE₅₀-21dias para todos os parâmetros avaliados estão apresentados nas figuras 14 (diuron), figura 15 (glifosato) e figura 16 (paraquat).

Na avaliação dos efeitos dos testes crônicos após adição dos herbicidas (diuron, glifosato e paraquat) as espécies de macrófitas aquáticas testadas mostraram diferentes respostas dos parâmetros de sensibilidade testados.

Os valores da CE₅₀-21dias do diuron variaram de 7,7 a 30,4 µg/L (Fig. 14). *C. aquatica* apresentou a maior de CE₅₀ (30,4 µg/L) e a *Salvinia auriculata* o menor valor de CE₅₀ (7,7 µg/L). As espécies *Azolla filiculoides* e *S. auriculata* se apresentaram como as mais sensíveis para a maioria dos parâmetros avaliados, e a espécie *Cabomba aquatica* como a mais resistente a este herbicida. O parâmetro que melhor representou a sensibilidade das espécies testadas ao herbicida diuron foi o peso fresco, onde das 7 espécies testadas 4 (*Salvinia auriculata*, *Azolla filiculoides*, *Phyllanthus fluitans* e *Cabomba aquatica*) mostraram respostas com menores valores de CE₅₀, em comparação aos demais parâmetros avaliados. Para as demais espécies o parâmetro toxicológico mais sensível ao diuron foi tamanho da planta (*Pistia stratiotes*), tamanho da raiz (*Limnobium laevigatum*) e número de folhas (*Spirodela polyrhiza*).

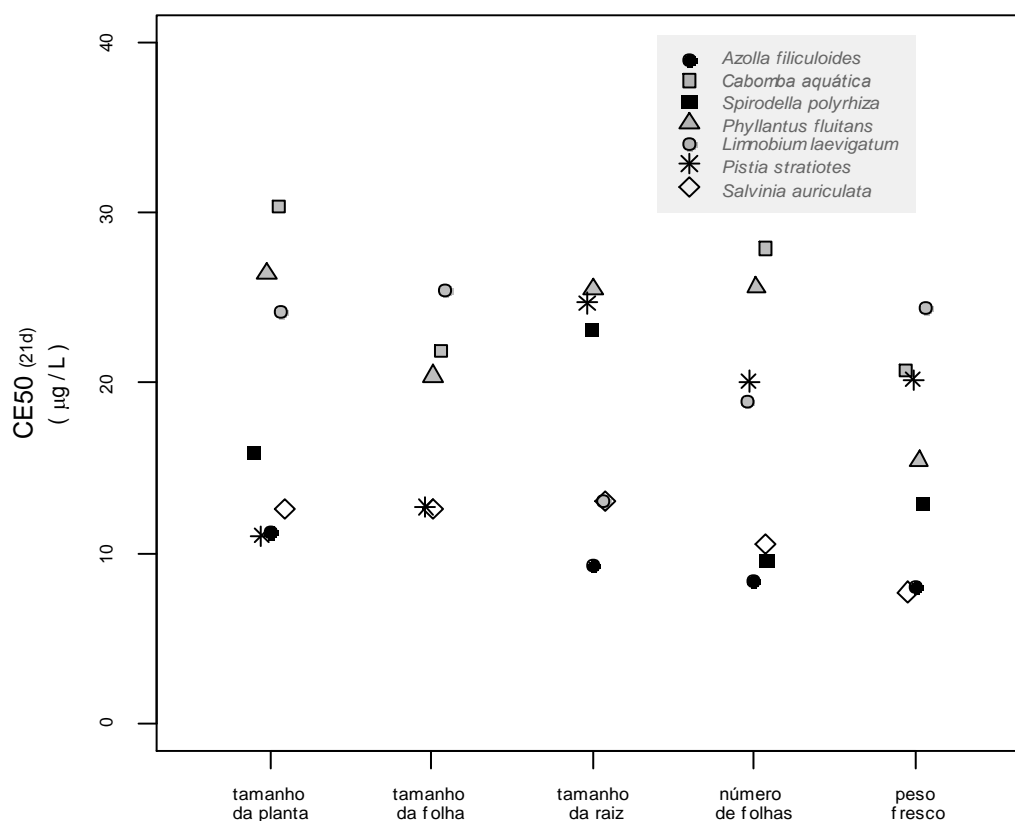


Figura 14. Concentração de efeito (CE₅₀) do diuron para os diferentes parâmetro toxicológicos avaliados nas 7 espécies testadas.

Os valores da CE₅₀-21dias para o herbicida glifosato variaram de 5,1 a 48,7 µg/L para as espécies de macrófitas testadas (Fig. 16) A sensibilidade a este herbicida variou entre os parâmetros e entre as espécies testadas. *Cabomba aquática* apresentou a maior CE₅₀ (48,7 µg/L) e além disso mostrou ser a espécie menos sensível a todos os parâmetros avaliados para este herbicida. A *Phyllanthus fluitans* apresentou o menor valor de CE₅₀ (5,1 µg/L) para o glifosato, sendo que as espécies *Azolla filiculoides* e *Salvinia auriculata* também se mostraram mais sensíveis a este herbicida (Fig. 15).

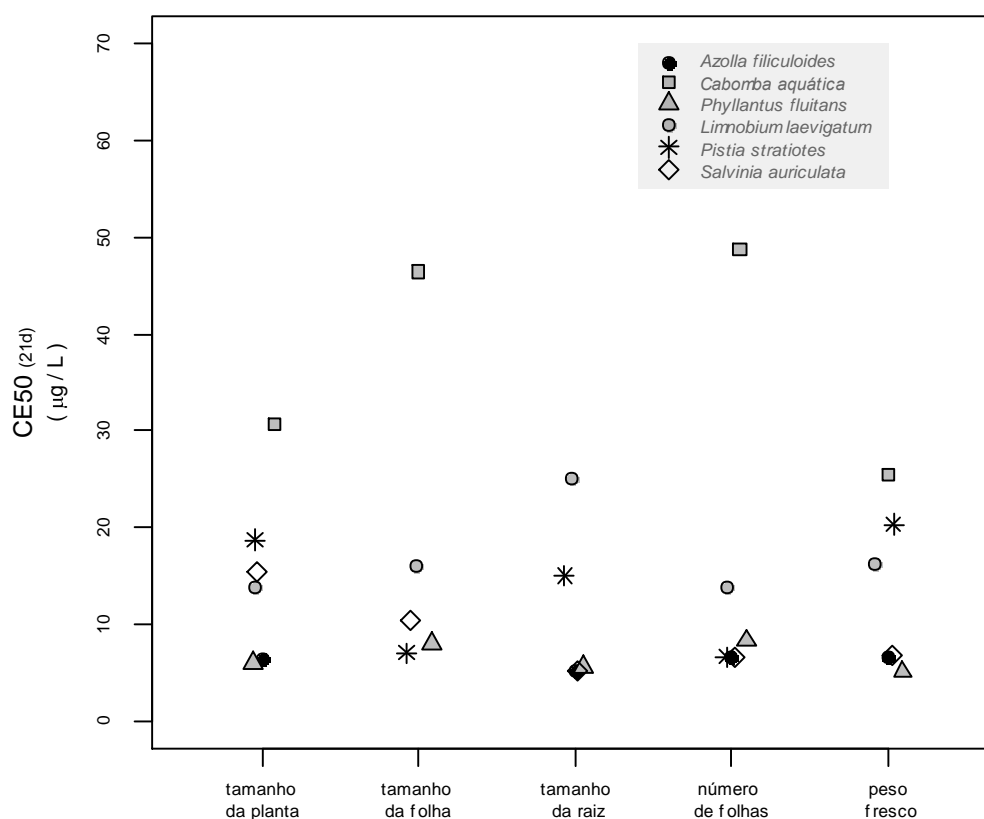


Figura 15 Concentração de efeito (CE₅₀) do herbicida glifosato para os diferentes parâmetros toxicológicos avaliados nas 6 espécies testadas.

O herbicida paraquat foi o mais tóxico para as macrófitas com os valores da CE₅₀-21dias variando de 4,1 a 21,8µg/L (Fig. 176). Novamente, *Cabomba aquática* foi a espécie menos sensível, com os maiores valores de CE₅₀ para todos os parâmetros toxicológicos avaliados, sendo as espécies *Azolla filiculoides* e *Phyllanthus fluitans* as espécies mais sensíveis.

Das 7 espécies testadas 3 delas, *Salvinia auriculata*, *Phyllanthus fluitans*, *Limnobium laevigatum* apresentaram o número de folhas como o parâmetro mais afetado pela presença do herbicida paraquat. Já para as espécies *Azolla filiculoides* e *Spirodela polyrhiza* o parâmetro que melhor representou o efeito do paraquat na planta foi o tamanho da raiz e para as espécies *Pistia stratiotes* e *Cabomba aquatica* o tamanho da planta.

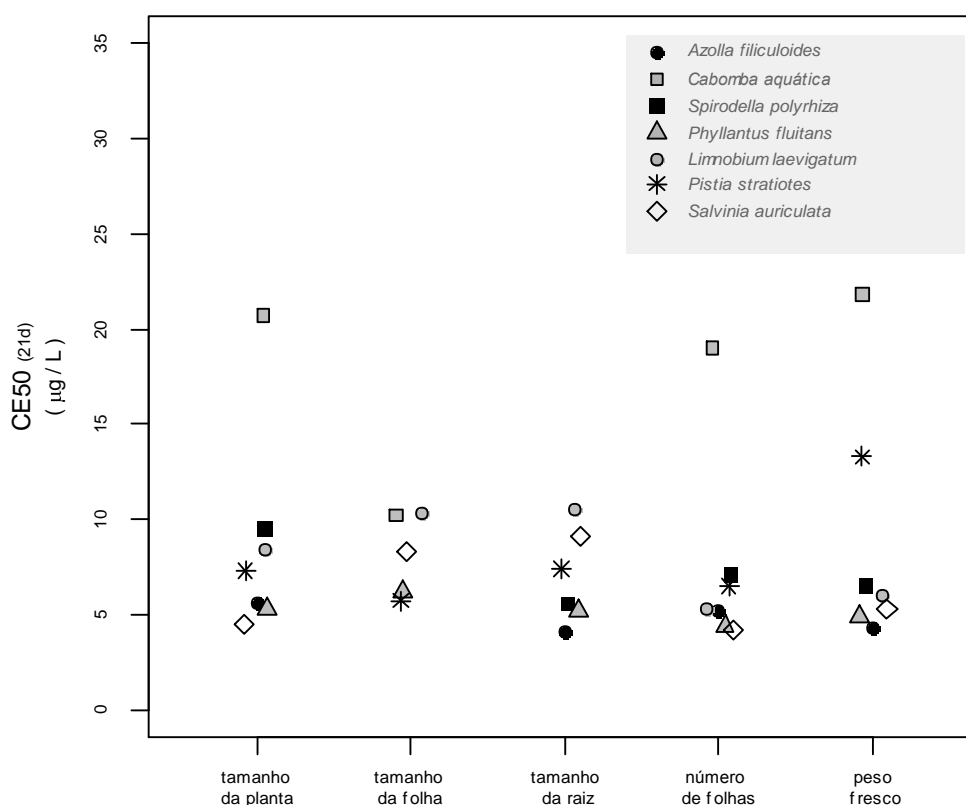


Figura 16. Concentração de efeito (CE₅₀) do herbicida paraquat para os diferentes parâmetros toxicológicos avaliados nas 7 espécies testadas.

A partir dos resultados acima apresentados pode se observar que o glifosato foi o herbicida menos tóxico para as macrófitas aquáticas estudadas e o paraquat o mais tóxico. Apesar dos diferentes níveis de toxicidade entre as espécies quanto a alguns sintomas resultantes da exposição aos três herbicidas, esses efeitos foram mais evidentes quando as maiores concentrações de herbicidas foram aplicadas.

Nos testes realizados com diuron, em todas as plantas observaram-se sintomas a partir da concentração 3 com aparecimento de folhas escurecidas e enrugadas. As espécies *Phyllanthus fluitans*, *Spirodela polyrhiza* e *Azolla filiculoides* tiveram suas raízes desprendidas do resto da planta ao final do experimento.

O amarelamento das folhas foi outro sintoma comum que se observou a partir da concentração 3 nas plantas nos testes com os 3 herbicidas. No caso do paraquat, as folhas das plantas, em especial a *Pistia stratiotes* ficaram com manchas na cor marrom e com necrose.

4. DISCUSSÃO

Embora sejam conhecidos os mecanismos de ação dos herbicidas testados, pouco se sabe acerca de sua reação específica em decorrência de um determinado herbicida (ROMAN *et al.*, 2007). Em relação às espécies, *A. filiculoides* foi à espécie mais sensível para todos os herbicidas testados, e *C. aquatica* a menos sensível.

Os parâmetros toxicológicos avaliados permitiram identificar quais podem ser mais adequados e úteis para a caracterização de limiares tóxicos e níveis de efeitos dos herbicidas nas espécies amazônicas, ou seja aqueles herbicidas que promovem efeitos mesmo nas menores concentrações. Neste sentido, pode ser observado que o peso fresco e o número de folhas foram os parâmetros mais sensíveis para a maior parte das espécies avaliadas.

Estudos semelhantes ao nosso realizado por Kumar & Han (2010) utilizando os agrotóxicos atrazina, diuron, simazina e glifosato, revelaram que o diuron foi o herbicida mais tóxico (CE₅₀ 0,016 µg/L), enquanto glifosato (CE₅₀ 16 µg/L) foi o menos tóxico para *Lemna* spp., quando foram avaliados CE₅₀s para o parâmetro número de folhas e peso fresco. Isso corrobora com os nossos resultados, onde quatro das sete espécies testadas se mostraram mais sensíveis a este parâmetro, em relação ao herbicida diuron.

Knauert *et al.* (2010) em pesquisa realiza com atrazina e diuron em plantas submersas, mostraram que *Myriophyllum spicatum* foi a espécie mais sensível para o diuron em testes laboratoriais. De forma semelhante, no trabalho Lambert *et al.* (2006) se observou que concentrações da ordem de 5µg de diuron/L induziram uma redução de 50% da biomassa de *Myriophyllum Spicatum* obtida pelo parâmetro peso fresco depois de 14 dias exposta ao herbicida. Os resultados acima apresentados contrariam o que foi observado neste estudo, que mostrou que a espécie *Cabomba aquatica*, também de forma de vida submersa, foi a espécie menos sensível ao diuron, quando comparadas as demais 6 espécies testadas, todas flutuantes de vida livre.

Em relação aos sintomas apresentados pelas plantas expostas ao diuron, outros autores também reportaram o escurecimento das folhas, seguido de clorose ou amarelamento e posterior necrose (RIZZARDI *et al.*, 2004, SEVERINO *et al.*, 2004). O escurecimento pode estar relacionado a um incremento da clorofila como resposta a interferência deste herbicida no fotossistema II, de forma a compensar a redução na eficiência da fotossíntese. Após essa

resposta para compensar a perda de eficiência fotossintética, a destruição do fotossistema II leva à clorose pela perda da clorofila e, finalmente, à necrose da folha (ROMAN *et al.*, 2007).

Comparando os valores de CE₅₀ para diuron obtidos nesse estudo com valores determinados para a espécie padrão *Lemna* sp. e tidos como referência para a proteção da comunidades de macrófitas aquáticas podemos mencionar que o valor fornecido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (Environmental Protection Agency- EPA), é de CE₅₀ 15 µg/L para *Lemna perpusilla*. Desta forma essa espécie é menos sensível que *Azolla filiculoides*, *Salvinia auriculata*, *Spirodela polyrhiza*, *Limnobium leavigatum* e *Pistia stratiotes*.

Os valores de CE₅₀ encontrados por Turgut & Formin (2002) em testes realizados com a espécie *Myriophyllum* sp. para o glifosato variaram de 222 µg/L a 2.040 µg/L entre os parâmetros mensurados na pesquisa, sendo de 5 a 50 vezes maiores que os valores encontrados neste trabalho. Valores mais próximos aos deste estudo foram estabelecidos por Michel *et al.* (2004) que observaram para *Lemna paucicostata*, outra espécie de lemnácea, um valor de CE₅₀ para a taxa de crescimento, baseado no tamanho da folha de 66 µg/L, em 7 dias de exposição.

As CE₅₀ referentes aos parâmetros utilizados para mostrar a toxicidade do glifosato encontradas neste trabalho, que variaram de 5,1 a 48,7 µg/L, evidenciam que de 6 espécies testadas 5 delas se mostraram mais sensíveis quando comparadas com a espécie padrão *Lemna gibba*, cuja CE₅₀ segundo valor fornecido pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (Environmental Protection Agency- EPA), é 21,5 µg/L para o herbicida glifosato.

Para Gruyz & Sikorski (1990), os sintomas comuns observados após a aplicação de glifosato são clorose foliar seguida de necrose. Outros sintomas foliares são: enrugamento ou má formação. Nas plantas, o glifosato é muito estável, com pequena degradação detectável ocorrendo em longo período de tempo. Herbicidas Inibidores da EPSPs como o glifosato promovem uma redução acentuada nos níveis dos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina e triptofano), e as plantas tratadas com esses herbicidas param de crescer (HAC, 2003). Isso mostra a semelhança com os efeitos apresentados no presente trabalho, que mostrou a inibição do crescimento das plantas em relação a todos os parâmetros avaliados.

Estudos realizados por Frankart *et al.*, (2003) sobre os efeitos dos herbicidas com diferentes modos de ação em processos fotossintéticos evidenciaram que o paraquat foi o mais tóxico entre os herbicidas avaliados na pesquisa. Em concentração de 10 µg/L mostrou efeitos inibidores no crescimento da espécie *Lemna minor*.

Em relação ao paraquat, os valores de CE₅₀ fornecidos pela agência Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (Environmental Protection Agency- EPA) para a espécie padrão *Lemna minor* é 98,0 µg/L, e de 51,0 µg/L para *Lemna gibba*. Isto permite afirmar que as espécies de macrófitas aquáticas estudadas neste trabalho são mais sensíveis em relação a espécie padrão utilizada nos testes ecotoxicológicos dos Estados Unidos e da União Europeia. As menores CE₅₀ obtidas no presente estudo variaram de 4,1 a 10,2 µg/L, valores muito abaixo dos apresentados pela EPA, ou seja, as 7 espécies se mostraram mais sensíveis ao paraquat que a espécie padrão *Lemna sp.*

Roman *et al.*, (2007) observaram sintomas como amarelecimento e necrose das folhas quando submetidas a concentrações de paraquat. Da mesma forma como aconteceu no presente estudo, em poucas horas após a aplicação surgiram os primeiros sintomas na forma de manchas amarelas que logo progrediram para necrose. Herbicidas inibidores do Fotossistema I como o paraquat, quando aplicados na presença de muita luz, provocam severa injúria nas folhas das plantas tratadas (HAC, 2003). Os efeitos causados nas macrófitas aquáticas quando expostas a esse herbicida já apareceram na primeira semana do experimento, com as folhas mostrando necrose, amarelecimento e rugosidade nas extremidades.

É difícil prever o comportamento da comunidade de macrófitas na presença de herbicidas, principalmente a partir de testes individuais como os aqui apresentados. Em condições naturais, a composição e diversidade da comunidade de macrófitas de água doce são governadas por vários fatores ambientais, como distúrbios hidráulicos, riqueza de nutrientes ou disponibilidade de luz (Piedade & Junk, 2000), bem como pelas interações bióticas como competição e herbivoria (COURTIS *et al.*, 2010). Entretanto, a contaminação dos ambientes aquáticos por herbicidas pode modificar a estrutura da comunidade.

Diversos estudos mostraram que as concentrações dos herbicidas normalmente encontrados em sistemas de água doce têm um efeito inibidor baixo sobre o crescimento da comunidade de macrófitas (JONES & WINCHELL, 1984; JONES *et al.*, 1985). No entanto,

por causa da variação de sensibilidade aos herbicidas entre as espécies, não podemos excluir os efeitos sobre toda a comunidade como mudanças na dominância de algumas espécies ou grupos funcionais de macrófitas (CEDERGREEN *et al*, 2004a, 2004b;. FAIRCHILD *et al*, 1998;. LAMBERT *et al*, 2006.). Tais mudanças podem ser difíceis de prever, uma vez que podem resultar de efeitos diretos de herbicidas sobre espécies individuais e de efeitos indiretos através da modificação das interações bióticas envolvendo macrófitas (ROHR *et al.*, 2006). Por exemplo, a competição interespecífica poderia ser afetada por herbicidas, devido a diferenças de sensibilidade entre as espécies. Se a espécie dominante é mais sensível, sua redução ou eliminação poderá levar a um aumento da diversidade de espécies ou ao desaparecimento de espécies que dela dependem para alimentação e abrigo.

Embora não se disponha de estudos demonstrando as concentrações dos agrotóxicos aqui avaliados nos ambientes aquáticos da região, ficam evidentes os efeitos tóxicos dos herbicidas, o que pode em longo prazo afetar não apenas a comunidade de macrófitas aquáticas, como também a sobrevivência dos outros organismos do ecossistema aquático próximos das áreas de cultivo.

5. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Índice monográfico – Diuron. 2003. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1145da0047-458fc-598e0dc3fbc4c6735/d25.pdf?MOD=AJPERES>> Acesso em 10 de Janeiro de 2013.

_____. Índice monográfico – Paraquat. 2005. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B11607-1-0%5D.PDF>> Acesso em 10 de Janeiro de 2013.

_____. Índice monográfico – Glifosato 2007 Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B19554-1-0%5D.PDF>> Acesso em 10 de Janeiro de 2013.

AGRICULTURE & ENVIRONMENT RESEARCH UNIT (AERU). 2014. Pesticide Properties Database (PPDB). University of Hertfordshire. Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>>, acessada em setembro de 2014.

AMARANTE Jr, O. P. *et al.*. 2002. Glifosato: Propriedades, toxicidade, uso e legislação. Quím. Nova 25, 589–593.

- ARTS, G.H.P.; BELGERS, J.D.M.; HOEKZEMA, C.H.; THISSEN, J.T.N.M. 2008. Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests. *Environ. Pollut.* 153, 199–206.
- AUBLET, J. B. C. F. 1775. *Histoire des Plantes de la Guiane Française* 1: 321, pl. 124.
- BARBIERI, E. 2009. Effect of 2, 4-D herbicide (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) on oxygen consumption and ammonium excretion of juveniles of *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Osteichthyes, Cichlidae). *Ecotoxicology*, 18(1), 55–60.
- CEDERGREEN, N.; SPLIID, N.H.; STREIBIG, J.C. 2004a. Rapid communication. Species-specific sensitivity of aquatic macrophytes towards two herbicides. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58, 314-323.
- CEDERGREEN, N.; STREIBIG, J.C.; SPLIID, N.H. 2004b. Sensitivity of aquatic plants to the herbicide metsulfuron-methyl. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 153-161.
- CEDERGREEN, N. & STREIBIG, J. C. 2005. The toxicity of herbicides to nontarget aquatic plants and algae: Assessment of predictive factors and hazard. *Pest Manag. Sci.*, 61, 1152–1160.
- COSTA, C. R. *et al.* 2008. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 7, 1820-1830.
- DAVIES, J., *et al.* 2003. Herbicide risk assessment for non-target aquatic plants: sulfosulfuron – a case study. *Pest. Manag. Sci.* 59, 231–237.
- DIMITRI, M.J. 1972. *Enciclopédia Argentina de Agricultura e Jardineira*. 2 ed. Buenos Aires: ACME, v.2.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). ECOTOX Database. 2014. Disponível em: < <http://cfpub.epa.gov/ecotox/> > Acesso em: setembro de 2014.
- EMERICH, C. 2009. *Spirodela polyrhiza*. Sekai Scaping. Cintia Emerich. Disponível em: <<http://www.sekaiscaping.com/2009/09/spirodela-polyrhiza.html>> Acesso em: 17 julho 2014.
- ESTEVEES, F.A. 2011. *Fundamentos de Limnologia*. 3.ed. Rio de Janeiro: Editora Interciência.
- EU (1997). Council Directive 97/57/EC of September 21, 1997. Establishing annex VI to Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. *Official Journal of the European Communities* L265: 87-109
- FAIRCHILD, J.F., RUESSLER, D.S., CARLSONS, A.R., 1998. Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor, and metolachlor. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1830–1834.

FRANKART, C., EULLAFFROY, P., VERNET, G. 2003. Comparative effects of four herbicides on non- photochemical fluorescence quenching in *Lemna minor*. Environmental and Experimental Botany 49, 159-168.

GIACOMAZZI, S.; COCHET, N. 2004. Environmental impact of diuron transformation: a review. Chemosphere 56, 1021–1032.

GIESY, J. P., DOBSON, S., SOLOMON, K. R. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup herbicide. Rev. Environ. Contam. Toxicol. 167, 35–120.

GRUYS, K.J.; SIKORSKI, A. 1999. Inhibitors of tryptophan, phenylalanine, and tyrosine biosynthesis herbicides. In: SINGH, B.K. (Ed.). Plant amino acids-biochemistry and biotechnology. New York: Marcel Dekker, Inc., p.357-365.

HERBICIDE ACTION COURSE (HAC): an intensive course on the activity, selectivity, behavior, and fate of herbicides in plants and soils. 2003. West Lafayette. Purdue University, 975 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. 2010. Produtos tóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental/Rafaela Maciel Rebelo [et al.] Brasília: Ibama, 84 p.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS - IBAMA. 2012. Boletim de comercialização de agrotóxicos e afins. Histórico de vendas 2000-2012. Disponível em: < http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/boletim%-20de%20comercializacao_2000_2012.pdf> Acesso em 23 de set 2014.

KNAUERT, S. et al. 2010. Phytotoxicity of atrazine, isoproturon, and diuron to submersed macrophytes in outdoor mesocosms, Environmental Pollution, v. 158, Issue 1, Pages 167-174.

KUMAR, K. S.; K.S.; HAN, T. 2010. Physiological Response of Lemna Species to Herbicides and Its Probable Use in Toxicity Testing. Toxicol. Environ. Health. Sci. Vol. 2(1), 39-49.

LAMBERT, S.J.; THOMAS, K.V.; DAVY, A.J. 2006. Assessment of the risk posed by the antifouling booster biocides Irgarol 1051 and diuron to freshwater macro phytes. Chemosphere 63, 734–743.

JAWORSKI, E.G.1972. Mode of action of N-phosphonomethyl glycine: inhibition of aromatic amino acid biosynthesis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 20, n. 6, p. 1195-1198.

MHADHBI, L.; BEIRAS, R. 2012. Acute Toxicity of Seven Selected Pesticides (Alachlor, Atrazine, Dieldrin, Diuron, Pirimiphos-Methyl, Chlorpyrifos, Diazinon) to the Marine Fish (Turbot, *Psetta maxima*). Water Air Soil Pollut 223:5917–5930.

MALTBY et al. 2010. Aquatic macrophyte risk assessment for pesticides. CRC Press. Boca Raton, 135 p.

- MARTINS, T. 2013. Herbicida Paraquat: conceitos, modo de ação e doenças relacionadas. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*, Londrina, v. 34, n. 2, p. 175-186.
- MONCADA, A. 2012. Environmental fate of diuron. Environmental Monitoring Branch Department of Pesticide Regulation, CA 95812-4015.
- MOURA, E. E. S. DE. 2009. Determinação da toxicidade aguda e caracterização de risco ambiental do herbicida Roundup (glifosato) sobre três espécies de peixes. 45f. Dissertação (Mestrado em Bioecologia Aquática) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências Biológicas, Natal, Rio Grande do Norte.
- NOTARE, M. 1992. Plantas hidrófilas e seu cultivo em aquários. Rio de Janeiro: Sulamérica. 238p.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2006. *Lemna sp.* growth inhibition test. Revised proposal for a new guideline 221. Paris, France.
- PERON, A. P. *et al.* 2003. Ação tóxica do herbicida paraquat sobre o homem. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, v. 7, n. 3.
- PIEIDADE, M. T. F.; JUNK, W. J. 2000. Natural herbaceous plant communities in the Amazon floodplains and use: In: JUNK, W. J.; OHLY, J.; PIEIDADE, MTF; SOARES, M. G. M. (Eds.). *The Central Amazon Floodplain: Actual Use and Options for a Sustainable Management*. [S.l.]: Backhuys Publishers b.v. p., p. 269-290.
- POTT, V. J. & POTT, A. 2000. Plantas aquáticas do Pantanal. Brasília: EMBRAPA, 404 p. il.
- R CORE TEAM. 2014. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- RATAJ, K. HOREMAN, T.J. 1977. *Aquarium plants*. Hong Kong: T.F.H. Publications. 448p.
- RITZ, C. & STREIBIG, J. C. 2005. Bioassay Analysis using R. *J. Statist. Software*, Vol 12, Issue 5.
- RIZZARDI, M. A.; VARGAS, L.; ROMAN, E. S.; KISSMAN, K. Aspectos gerais do controle de plantas. In: VARGAS, L.; ROMAN, E. S. 2004. *Manual de manejo e controle de plantas daninhas*. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. p. 105-144.
- ROMAN, E. S. *et al.*, 2007. *Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação*. Passo Fundo. Editora Berthier, 152 p.
- SCHIESARI L. *et al.* . 2013. Agricultural frontier Pesticide use and biodiversity conservation in the Amazonian. *Phil. Trans. R. Soc.B.* 368. 1471-2970.
- SEVERINO, L. S. *et al.* 2004. Herbicida diuron aplicado em pré-emergência e sobre as folhas da mamoneira. *Revista Brasileira de Oleaginosas e Fibrosas*, v.8, n. 1, p. 785-787.

SILVA, S.S.L. 2011. Caracterização ecológica e estrutural de Macrófitas em reservatórios no estado de Pernambuco. Pernambuco. 108 f. (Programa de Pós-Graduação em Botânica–PPGB) Universidade Federal Rural de Pernambuco.

SINDICATO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS-SINDAG. 2014. VENDAS DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS POR ESTADOS E CLASSES - 2010/13. Disponível em: <<http://www.sindag.com.br> > Acesso: 22 mar de 2014.

SCULTHORPE, C.D. 1985. The Biology of Aquatic Vascular Plants. London: Edward Arnold. 610 p.

VELASQUEZ, J. 1994. Plantas acuáticas de Venezuela. Caracas: Universidad Central de Venezuela. 992p.

VIDAL, T. et al. 2011. Acute and Chronic Toxicity of Betanal® Expert and Its Active Ingredients on Nontarget Aquatic Organisms from Different Trophic Levels. Environmental Toxicology, v. 27, PP. 537–548.

WANG, W. *et al.*, 2014. The Spirodela polyrhiza genome reveals insights into its neotenus reduction fast growth and aquatic lifestyle. NATURE COMMUNICATIONS. DOI: 10.1038/ncomms4311.

WONG, A.; LANZA, M. R. V.; SOTOMAYOR, M. D. P.T. 2013. Sensor for diuron quantitation based on the P450 biomimetic catalyst nickel (II) 1,4,8,11,15,18,22,25-octabutoxy-29H,31H-phthalocyanine. Journal of Electroanalytical Chemistry. 690 83–88.

YAMADA, T.; CASTRO, P. R. C. 2007. Efeitos do glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agronômicas. INPI - International Plant Nutrition Institute, n.119, p. 1-32.

ZABLOTOWICZ, R.M. & REDDY, K.N. 2004. Impact of glyphosate and Bradyrhizobium japonicum symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean: a minireview. Journal of Environmental Quality, v. 33, p. 825-83.

CAPÍTULO 2

**CURVAS DE DISTRIBUIÇÃO DE SENSIBILIDADE DE ESPÉCIES PARA OS
HERBICIDAS DIURON, GLIFOSATO E PARAQUAR E A PROTEÇÃO DA
DIVERSIDADE DE MACRÓFITAS AQUÁTICAS AMAZÔNICAS.**

Curvas de distribuição de sensibilidade de espécies para os herbicidas diuron, glifosato e paraquar e a proteção da diversidade de macrófitas aquáticas Amazônicas.

Paola Souto Campos¹; Andrea Viviana Waichman¹

¹Laboratório de Ecotoxicologia, Departamento de Biologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas.

Endereço eletrônico:

PSC: pscampos@gmail.com

AVW: awaichman@gmail.com.br

1. Introdução

As plantas aquáticas são elementos de grande importância funcional e estrutural para o ecossistema aquático, com papéis muito diversificados dentro deste sistema (SCHEFFER, 1998). Uma dessas funções é converter energia solar e dióxido de carbono em matéria orgânica, contribuindo como fonte de alimento, habitat e refúgio para a fauna aquática (FAIRCHILD *et al.*, 1998). São importantes também por serem capazes de estabelecer uma forte ligação entre o sistema aquático e o ambiente terrestre que o circunda (JORGENSEN & LÖFFLER, 1990). As macrofitas enraizadas modificam o fluxo da água, estabilizam os sedimentos e promovem a retenção de matéria orgânica e nutrientes (SAND-JENSEN, 1997). Distúrbios antropogênicos, como a introdução de agentes tóxicos dentro do ecossistema aquático podem alterar a estrutura e função da comunidade de plantas do ecossistema (FAIRCHILD *et al.*, 1998).

A fim de proteger os ecossistemas aquáticos próximos à áreas agrícola, e para sustentar a biodiversidade e as funções ecológicas descritas acima, é vital entender quais os riscos que os herbicidas representam para macrófitas aquáticas. Além disso, há a necessidade de implementação de uma abordagem mais abrangente, pois os procedimentos de avaliação de risco ambiental para os agrotóxicos testados em macrófitas aquáticas somente são requeridos para o registro de herbicidas, sendo que os testes são realizados comumente com a espécie *Lemna* spp. (OECD, 2002). Outras espécies como, *Potamogeton* sp., *Myriophyllum* sp., *Ceratophyllum* sp., *Elodea* sp., e *Vallisneria americana* têm sido ocasionalmente avaliadas, mas comparações são complicadas devido a variação de condições experimentais, duração dos experimentos e pela escolha dos parâmetros avaliados e pelas respostas variáveis (WANG AND FREEMARK, 1995; SWANSON *et al.*, 1991).

O desafio enfrentado pelos avaliadores de risco ecológico é derivar concentrações iniciais para contaminantes ambientais que visem proteger a diversidade de espécies e os atributos funcionais naturais dos ecossistemas (MALTBY *et al.*, 2005). Baseado nas concentrações iniciais e no conhecimento disponível sobre o modo de ação tóxico dos compostos é possível identificar os grupos de organismos que são mais sensíveis a eles, como por exemplo, artrópodes para inseticidas e algas e plantas para herbicidas (MALTBY *et al.*, 2005; VAN DEN BRINK *et al.*, 2006).

Essa abordagem na definição das concentrações máximas de substâncias permitidas é falha, uma vez que o que se pretende proteger não é uma determinada espécie, mas as populações, as comunidades e os ecossistemas aquáticos de forma geral. As espécies variam muito na sua sensibilidade em relação a um dado herbicida ao qual são expostas (MALTBY *et al.*, 2005), e essa variação pode ser descrita através da construção de uma curva de Distribuição de Sensibilidade das Espécies (ALDENBERG *et al.*, 2002).

A Distribuição de Sensibilidade das Espécies - DSE (Species Sensibility Distribution - SSD) é um método utilizado para representar a variação da sensibilidade de múltiplas espécies em relação a um determinado componente tóxico, sendo representada por uma função estatística (ALDENBERG *et al.*, 2002). Essa curva de sensibilidade é obtida a partir da distribuição de sensibilidade de espécies que tenham tido sua aplicabilidade bem sucedida na sensibilidade a diferentes compostos e na comparação destas sensibilidades com outros grupos taxonômicos (BROCK *et al.*, 2004; CEDERGREEN *et al.*, 2004a; VAN DEN BRINK *et al.*, 2006).

A DSE, nos Estados Unidos já vem sendo utilizada em processos de análise de risco (SOLOMON *et al.*, 1996; NEWMAN *et al.*, 2000), e na Europa, em 2002, se previa a sua inclusão nos documentos técnicos da Comissão Europeia que dão indicações à análise de risco de novas substâncias químicas (WHEELER *et al.*, 2002). Ainda há uma grande escassez de informações de dados ecotoxicológicos referentes aos herbicidas, o que dificulta a construção de curvas de DSE, pois esta depende da quantidade e da qualidade de dados existentes (WHEELER *et al.*, 2002)

Deste modo, o presente estudo pretendeu gerar informações para determinar a concentração de risco que afeta 5% das espécies de macrofitas e protege 95% (HC₅), através da construção de curva de sensibilidade das sete espécies estudadas para os herbicidas diuron, glifosato e paraquat. A partir destes resultados pretende-se fornecer subsídios aos órgãos de proteção ambiental no que diz respeito à sensibilidade de plantas aquáticas expostas a concentrações de herbicidas na água, de forma a proteger a biodiversidade aquática da região amazônica.

2 Material e métodos

2.1 Distribuições de Sensibilidade das Espécies - DSEs

A DSE pode ser definida como uma função de distribuição cumulativa de determinado componente tóxico em relação a um conjunto de espécies que possuam características comuns, como taxonomia, habitat ou região geográfica. Por meio deste método é possível também calcular as concentrações de risco (HCs) - concentrações de um componente químico na água que é capaz de afetar uma proporção (p) de um grupo de espécies (HCp). Através destes cálculos é possível derivar quais concentrações de um determinado componente tóxico podem ser toleradas por diferentes grupos de espécies da fauna e da flora.

(1) Para a execução do método DSE foram necessárias duas fases: Seleção de dados toxicológicos

Estes dados foram obtidos a partir dos resultados das CE₅₀ encontrada nos testes crônicos, na qual foram utilizadas as CE₅₀ dos parâmetros que se mostraram mais sensíveis para cada espécie, referente a cada herbicida como mostrado na tabela 1.

Tabela 1. Valores de CE₅₀ utilizados para a construção da curva de sensibilidade de espécies de macrófitas referentes aos parâmetros mais sensíveis para todas as espécies e herbicidas avaliados.

| Espécies testadas | Diuron | | Glifosato | | Paraquat | |
|-----------------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------|
| | CE ₅₀ (µg/L) | Parâmetro Avaliado | CE ₅₀ (µg/L) | Parâmetro avaliado | CE ₅₀ (µg/L) | Parâmetro avaliado |
| <i>Salvinia auriculata</i> | 7,7 | Peso Fresco | 5,2 | Tamanho da raiz | 4,2 | Número de folhas |
| <i>Azolla filiculoides</i> | 8,0 | Peso Fresco | 5,2 | Tamanho da raiz | 4,1 | Tamanho da raiz |
| <i>Spirodela polyrhiza</i> | 9,5 | Número de folhas | - | - | 5,5 | Tamanho da raiz |
| <i>Pistia stratiotes</i> | 11,0 | Tamanho da planta | 6,6 | Número de folhas | 5,7 | Tamanho da folha |
| <i>Limnobium laevigatum</i> | 13,1 | Tamanho da raiz | 13,7 | Número de folhas | 5,3 | Número de folhas |
| <i>Phyllanthus fluitans</i> | 15,4 | Peso Fresco | 5,1 | Peso Fresco | 4,4 | Número de folhas |
| <i>Cabomba aquatica</i> | 20,7 | Peso Fresco | 25,4 | Peso Fresco | 10,2 | Tamanho da folha |

(2) Análise estatística dos dados

As curvas foram construídas utilizando os dados de CE₅₀ de cada parâmetro avaliado para cada herbicida em estudo, assumindo que os valores das diferentes CE₅₀ assumem uma distribuição log-normal de acordo com a seguinte fórmula:

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} \times \exp\left(\frac{-0.5 \times (x - \mu)^2}{\sigma^2}\right)$$

onde $x = \log(\text{EC}_{50} \text{ ou } \text{CL}_{50})$,

μ é a média do $\log(\text{EC}_{50} \text{ ou } \text{CL}_{50})$ e

σ é o desvio padrão do $\log(\text{EC}_{50} \text{ ou } \text{CL}_{50})$.

A construção das curvas foi realizada de acordo com Aldenberg & Jaworska (2000) utilizando o software ETX 2.0 (VAN VLAARDINGEN *et al.*, 2004). Esse software, além de construir a curva, permite o cálculo do valor da concentração de risco para 5% (HC₅) e 50% (HC₅₀) das espécies, com limite de confiança de 95%. Uma vez que o modelo assume uma distribuição log-normal dos dados, a log-normalidade foi testada com o teste de Anderson-Darling incluído no pacote do software ETX (VAN VLAARDINGEN *et al.*, 2004).. A normalidade dos dados de toxicidade foi estabelecida em $p \geq 0,05$.

As curvas foram construídas utilizando o menor valor de CE₅₀ dos parâmetros avaliados de cada espécie de macrófita aquática, para cada herbicida.

2.2 Cálculo do valor máximo permitido dos herbicidas diuron, glifosato e parquat (padrão de qualidade da água)

A Curva de Distribuição de Sensibilidade de Espécies tem sido usada durante as últimas décadas nos Estados Unidos e na Europa para determinar os padrões de qualidade da água para o uso seguro de agrotóxicos (SUTER II, 2002; VAN STRAALLEN & VAN LEEUWEN, 2002; BROCK *et al.*, 2006). Assim, para o cálculo do valor máximo permitido de cada herbicida avaliado (padrão de qualidade da água), foi calculada a concentração de

risco (HC₅ - concentração dos agrotóxicos que afeta 5% das espécies e protege 95%). O limite inferior do intervalo de confiança proporcionou a concentração que poderá ser recomendada para a definição de critério de qualidade da água que sejam protetores para espécies de plantas aquáticas da amazônica (MALTBY *et al.*, 2005).

Como foi utilizado o valor de CE₅₀, o valor do limite inferior do intervalo de confiança do valor de HC₅ foi corrigido por um fator de segurança de 10, conforme indicado pela Diretriz EE91/417 da União Europeia (EU,1997).

3. Resultados

Na construção das curvas de sensibilidade de espécies deve ser considerado o modo de ação tóxica dos herbicidas, de forma a poder evidenciar qual espécie ou grupo de espécies são mais apropriadas para uma definição mais acurada das concentrações máximas. Desta forma, as curvas de sensibilidade de espécies e a determinação do HC₅ correspondente foram realizadas separadamente para cada herbicida, e em seguida foram comparados os três herbicidas estudados no presente trabalho (Figuras 1, 2, 3 e 4).

3.1. Curva de Distribuição de Sensibilidade de Espécies

A curva de distribuição de sensibilidade de espécies para as macrófitas aquáticas testadas referentes ao herbicida diuron foi contruída com os valores de CE₅₀ dos parâmetros que se mostraram mais sensíveis. O valor de HC₅ para o herbicida diuron para as espécies avaliadas foi de HC₅ 6,17 µg/L, (Fig. 1), evidenciando que as espécies com menor biomassa, como *A. filiculoides*, *S. auriculada* e *S. polyrhiza* se mostraram como as mais sensíveis ao diuron.

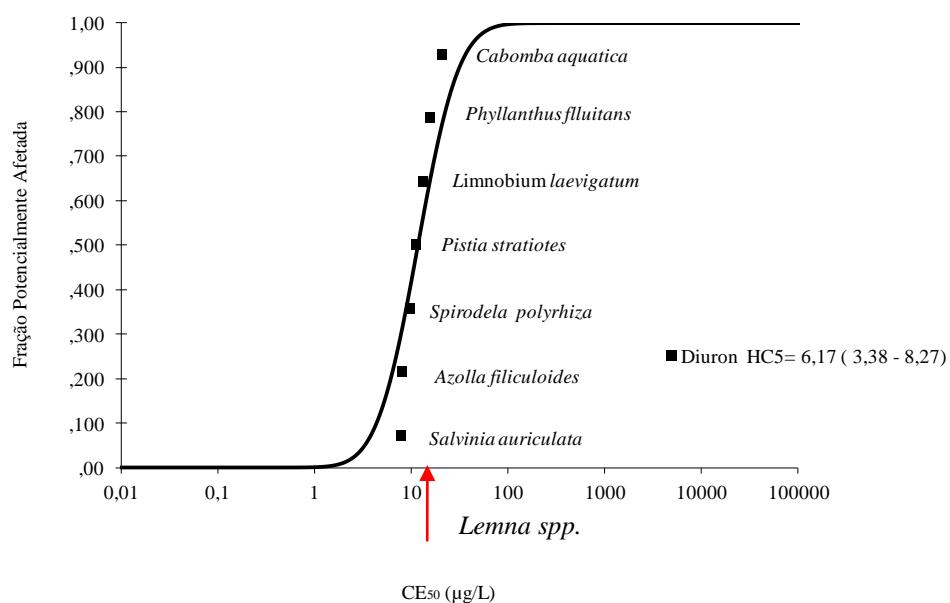


Figura 1 Distribuição de sensibilidade de espécies de macrófitas aquáticas da Amazônia para o diuron. A mediana da concentração perigosa para 5% das espécies (HC₅) é apresentada juntamente com o intervalo superior (5%) e inferior (95%) de confiança entre parênteses.

O valor de HC₅ para o herbicida glifosato para as espécies avaliadas foi de HC₅ 2,57 µg/L. Levando em consideração que esta curva foi calculada utilizando os valores dos parâmetros mais sensíveis para cada espécie, o glifosato se apresentou como sendo o herbicida mais tóxico em relação ao diuron e paraquat (Fig. 2).

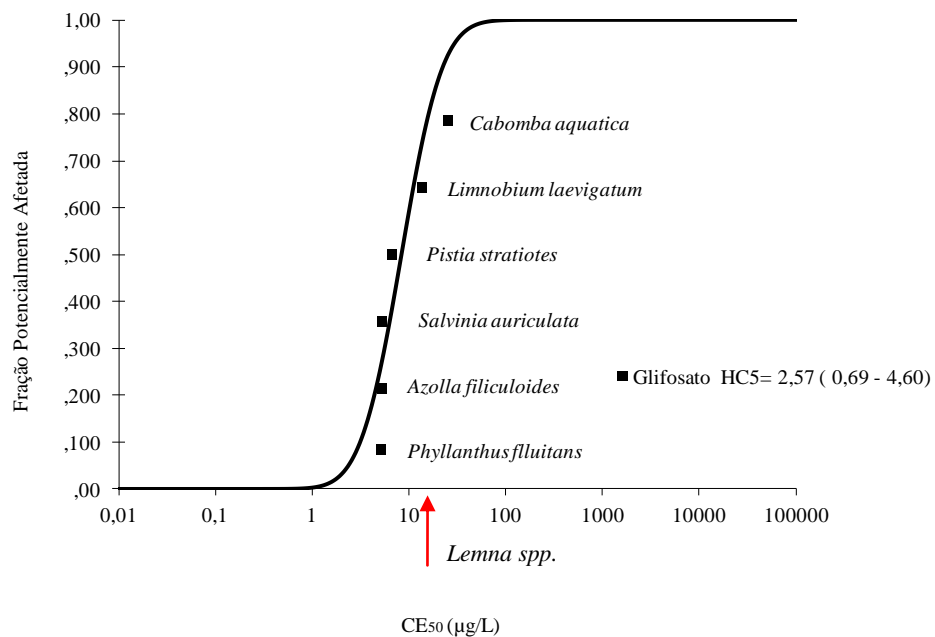


Figura 2. Distribuição de sensibilidade de espécies de macrófitas aquáticas da Amazônia para o glifosato. A mediana da concentração perigosa para 5% das espécies (HC₅) é apresentada juntamente com o intervalo superior (5%) e inferior (95%) de confiança entre parênteses.

Para o herbicida paraquat o valor médio de HC₅ 3,12 µg/L contruido pelo método de curva de distribuição de sensibilidade, mostrou que este herbicida se apresenta como muito tóxico para plantas da região amazônica, assim como o glifosato (Fig. 3).

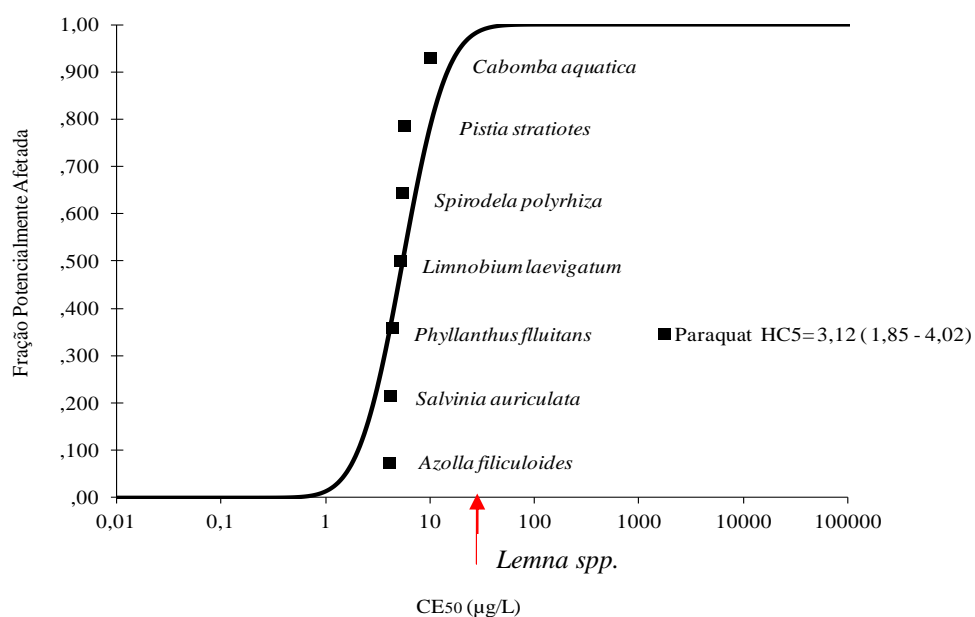


Figura 3. Distribuição de sensibilidade de espécies de macrófitas aquáticas para o paraquat. A mediana da concentração perigosa para 5% das espécies (HC_5) é apresentada juntamente com o intervalo superior (5%) e inferior (95%) de confiança entre parênteses.

A fim de analisar a aplicabilidade dos valores de HC_5 estimados na proteção das macrófitas aquáticas da Amazônia, foram comparados os valores medianos de HC_5 dos herbicidas com diferentes modos de ação (Fig. 4).

Ao se comparar as curvas de distribuição de sensibilidade do diuron, glifosato e paraquat, ficou evidente que há uma pequena diferença entre os valores médios de HC_5 para o glifosato e o paraquat, sendo que todos os herbicidas testados se mostraram tóxicos para as plantas.

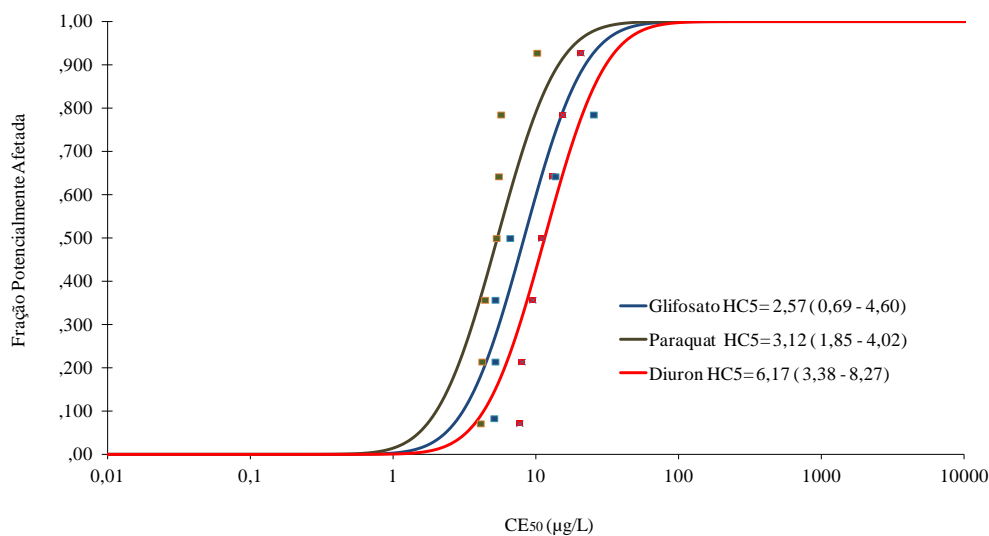


Figura 4. Distribuição da sensibilidade de espécies das macrófitas aquáticas amazônicas construída com a CE_{50} ($\mu\text{g/L}$) para Glifosato (azul), Paraquat (verde), Diuron (vermelho).

3.2 Cálculo dos valores máximos de herbicidas (padrões de qualidade da água)

Para o cálculo do padrão de qualidade da água foi utilizado o valor do limite inferior do intervalo de confiança (percentil de 5%) da HC_5 das espécies de macrófitas aquáticas amazônicas. Como no presente estudo foram utilizados dados de exposição aguda (CE_{50}), um fator de avaliação ou segurança foi aplicado, dividindo o valor do limite inferior do intervalo de confiança por 10 (EU,1997).

Utilizando os critérios acima explanados, os valores encontrados para servir de subsídio para definição dos padrões de qualidade da água do ecossistema amazônico para os herbicidas avaliados neste trabalho e levando em consideração o grupo de macrófitas aquáticas amazônicas, estão apresentados na Tabela 2.

Pode-se observar que os valores máximos permitidos, em ordem crescente, foram 0,06 $\mu\text{g/L}$, 0,18 $\mu\text{g/L}$, 0,33 $\mu\text{g/L}$ para glifosato, paraquat e diuron, respectivamente (Tabela2).

Tabela 2. Valores máximos permitidos dos herbicidas no ambiente aquático amazônico, calculados para as macrófitas aquáticas utilizando a abordagem de distribuição de sensibilidade de espécies. HC5 é a concentração de risco para 5% das espécies e que protege 95% das espécies; o percentil de 5% corresponde ao limite inferior de confiança (5%) do HC5. O valor máximo foi calculado dividindo o percentil de 5% por um fator de segurança de 10.

| Herbicidas | HC₅ (µg/L) | Percentil de 5% (µg/L) | Valor máximo permitido (µg/L) |
|-------------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
| Diuron | 6,17 | 3,38 | 0,33 |
| Glifosato | 2,57 | 0,69 | 0,06 |
| Paraquat | 3,12 | 1,85 | 0,18 |

4. DISCUSSÃO

4.1 Distribuição de Sensibilidade de Espécies

A abordagem DSE é representada por intervalos de confiança para o cálculo das concentrações de risco, especialmente para estimativas de HC₅. A incerteza dos resultados fornecidos pela abordagem DSE é altamente dependente do número de espécies testadas (tamanho da amostra) para gerar as curvas (NEWMAN *et al.*, 2000; WHEELER *et al.*, 2002; PENNINGTON, 2003). Neste caso a DSE foi baseada nos resultados para sete espécies, incluindo uma espécie enraizada, que também foram testadas na mesma forma padronizada que as espécies flutuantes. Consequentemente, para a construção da DSE com base nos valores dos parâmetros mais sensíveis para cada espécie, o número de espécies em uma Curva de distribuição de sensibilidade de espécies utilizando plantas aquáticas é limitado para o máximo de sete (CAMPBELL *et al.*, 1999).

Shuler & Rand (2008), avaliando a sensibilidade de algas e macrófitas em nove herbicidas, incluindo diuron, mostraram que em geral a avaliação de risco para os tóxicos foram relativamente baixas, variando de 0,7 a 0,28 µg/L, porém evidenciando que o diuron é o herbicida mais tóxico para as espécies testadas com a menor concentração de risco encontrada, a partir das curvas de sensibilidade. Ao contrário do que observamos neste estudo

onde o diuron não foi o herbicida mais tóxico para as espécies de macrófitas aquáticas da região Amazônica.

Um estudo realizado por Fairchild *et al.* (1997), que comparou a sensibilidade da alga *Selenastrum capricornutum* e a macrófita *Lemna minor* para 16 herbicidas (atrazina, metribuzin, simazina, cyanazina, alachlor, metolachlor, chlorsulfuron, metsulfuron, triallate, EPTC, trifluralin, diquat, paraquat, dicamba, bromoxynil e 2,4-D), que representavam nove classes químicas e diferentes modos de ação, mostrou que a *L. minor* foi mais sensível que a alga *Selenastrum capricornutum* em relação aos herbicidas diquat e paraquat. Estes mesmos autores indicam que ambas *S. capricornutum* e *L. minor* são universalmente mais sensíveis dentro destas classes de herbicidas estudados.

Quando se comparou os valores de HC5 dos herbicidas em estudo, o HC5 para o herbicida diuron mostrou que apenas as espécies *Phyllanthus fluitans* e *Cabomba aquatica* não foram mais sensíveis que a espécie padrão *Lemna* spp. para o glifosato so não a espécie *Cabomba aquatica* foi mais sensível e para o paraquat, todas foram mais sensíveis que a espécie *Lemna* spp. Diferentemente de Brock e colaboradores (2000), que investigaram os dados de toxicidade disponíveis para herbicidas e concluíram que o processo de avaliação de risco atual à base de algas e *Lemna* spp. parecia ser de proteção para a maioria das espécies testadas. Porém, Arts e colaboradores (2008) evidenciaram, quando compararam a sensibilidade de 5 espécies de macrófitas submersas com a espécies *Lemna* spp. testando 4 agrotóxicos, que as macrófitas submersas foram mais sensíveis que a espécie padrão quando avaliado o parâmetro tamanho da raiz.

Guiddings e colaboradores (2013) avaliaram a sensibilidade 6 espécies de macrófitas aquáticas em 11 herbicidas e 3 fungicidas com dados que foram retirados da base de dados da Agência de Proteção Ambiental (EPA), e mostraram que nem *Lemna gibba* nem *Myriophyllum spicatum* foram consistentemente entre as espécies de macrófitas mais sensíveis para todos os herbicidas e fungicidas, que no geral, estes resultados suportam a utilidade dos testes com *L.gibba* e *M. spicatum* para avaliar riscos de pesticidas para macrófitas aquáticas. Porém, dada a dificuldade de restrição de seleção de dados para a construção de curvas de sensibilidade com base em parâmetros iguais, são necessários mais estudos avaliando o mesmo parâmetro, com uma diversidade de macrófitas bem maior.

Dados para os 3 herbicidas estudados ainda são muito escassos, não apenas para a Amazônia, mas também para ambientes da região temperada, pois foram encontrados apenas estudos com 2 espécies de macrófitas submetidas ao paraquat, 3 espécies para o glifosato e 3 espécies para o diuron, sendo que nenhum dos testes realizados tiveram o mesmo tempo de exposição aos compostos avaliados no presente estudo (EPA, 2014) Para Cedergreen *et al.* (2004b), diferenças na sensibilidade de macrófitas podem ser explicadas pelo parâmetro crescimento, uma vez que plantas com crescimento mais rápido seriam mais sensíveis que as espécies com o crescimento mais lento.

Para Maltby *et al.* (2005), diversos fatores devem ser levados em consideração quando se avalia a sensibilidade de espécies, dentre eles o cenário de exposição, a duração do experimento, o modo de ação do composto e a relevância ecológica das espécies. Para Van den Brink *et al.* (2006) é preferível focar em uma menor diversidade de grupos de espécies, visto que alguns compostos podem ser particularmente seletivos para um determinado grupo. Todos esses parâmetros corroboram com os resultados da presente pesquisa, pois os testes foram similares para os compostos, porém, com diferentes modos de ação e critérios de periculosidade para o ambiente.

Levando em consideração que a investigação ecotoxicológica tem sido concentrada principalmente em regiões de clima temperado, pouco se sabe sobre o efeito e comportamento dos herbicidas em ecossistemas aquáticos tropicais, principalmente no que diz respeito à Amazônia (CASTILLO *et al.*, 1997; LACHER & GOLDSTEIN, 1997).

4.2 Padrão de qualidade da água para macrófitas aquáticas amazônicas

Para alcançar o terceiro objetivo deste trabalho de estabelecer parâmetros de qualidade ambiental que possam ser futuramente utilizados para proteger a produção primária da região amazônica foi necessário analisar a Resolução CONAMA N° 357/2005, que estabelece limites individuais para diversas substâncias para cada classe de água, mas que somente apresenta um valor para o herbicida glifosato de 65 µg/L.

O modelo de DSE tem sido usado durante as últimas décadas nos Estados Unidos e na Europa para determinar Critérios de Qualidade da Água para o uso seguro de agrotóxicos

(SUTER II, 2002; VAN STRAALLEN *et al.*, 2002). Esse método faz uma extrapolação a partir de um conjunto de dados disponíveis, assumindo que esses dados são uma amostra aleatória das espécies do ecossistema aquático, para derivar critérios de qualidade da água destinados a proteger a maior parte das espécies em um ecossistema (POSTHUMA *et al.*, 2002).

Embora não seja claro como foram determinados os valores estabelecidos na Resolução CONAMA N° 357/2005, sabe-se que os testes de concentração geralmente são realizados com espécies padrão, tais como o microcrustáceo *Daphnia*, peixes (normalmente *Oncorhynchus mykiss* e/ou *Danio rerio*) e macrófitas (*Lemna* sp.) que tentam representar o ecossistema (EU, 1997; ZAGATTO *et al.*, 2006).

Porém, acredita-se que o uso de espécies padrão originárias de ambientes temperados compromete a definição de padrões ambientais que sejam condizentes com a realidade local da Amazônia. Isto ficou evidente pela análise dos valores obtidos, que se apresentaram bem divergentes do determinado pelo método da curva de distribuição de sensibilidade das macrófitas aquáticas para o herbicida glifosato (VMP 0,06 µg/L), mostrando que o valor apresentado pela resolução do CONAMA não protege as plantas aquáticas da região.

Alguns países, como por exemplo, Canadá, Austrália e os Estados Unidos, definiram o valor máximo de diuron na água tratada com 150, 30 e 10 µg/L, respectivamente (WONG *et al.*, 2013). No caso do paraquat, apenas no Canadá foi definido o valor máximo permitido de 10 µg/L (BASTOS *et al.*, 2004). Os valores determinados pelo método da curva de sensibilidade (VMP 0,33 µg/L para o diuron e VMP 0,18 µg/L para o paraquat), mostram que as espécies de macrófitas aquáticas da região amazônica não estão sendo protegidas nem com os valores estabelecidos pelas agências ambientais internacionais.

Segundo Xing *et al.* (2013), essa abordagem para a determinação de padrões de qualidade da água utilizando a curva de sensibilidade de espécies apresenta algumas vantagens, dentre elas: a possibilidade de avaliar quais grupos taxonômicos são mais sensíveis; o valor estimado possuir menor incerteza; e a possibilidade de definir diferentes níveis de proteção estabelecidos para diferentes tipos de corpos de água, o que teria maior adequação com a finalidade da Resolução CONAMA n° 357/2005, que é o enquadramento dos corpos de água segundo seus principais usos.

Souza (2014) avaliou a sensibilidade de 5 espécies de peixes amazônicos para os herbicidas diuron e glifosato e apresentou os VMPs de 1,27 µg/L e 177 µg/L, respectivamente, e conseqüentemente mostrou que o valor do glifosato estabelecido pela

CONAMA é protetivo para as espécies de peixes. Vilarinho (2013), avaliando grupos como invertebrados pelo método de curvas de sensibilidade para os herbicidas glifosato e paraquate, a partir de dados de estudos já publicados, apresentou o VMP para o glifosato de 218,16 µg/L e para o paraquat o VMP 0,06 µg/L, mostrando que também o VMP de 65 µg/L do glifosato é protetivo para o grupo dos invertebrados.

Comparando com o único valor apresentado pelo CONAMA que é do herbicida glifosato com os VMP para peixes 177 µg/L apresentado por Souza (2014), ao VMP para invertebrados 218,16 µg/L apresentado por Vilarinho (2013) e ao VMP de macrófitas aquáticas apresentados no presente trabalho (0,06 µg/L), podemos avaliar em nível de ecossistema aquático que o VMP para o glifosato da resolução do CONAMA não é protetivo para as macrófitas aquáticas. Entretanto, o conhecimento sobre ecotoxicologia na Amazônia ainda é muito limitado e, portanto, recomenda-se a realização de mais modelos de estudos de ecossistemas com mais agrotóxicos em uma escala geográfica maior dentro da zona tropical.

É importante destacar que os padrões de qualidade da água são desenvolvidos para contaminantes individuais, enquanto na natureza, os organismos podem estar expostos a múltiplas substâncias tóxicas simultaneamente. Portanto, segundo RUBACH *et al.* (2010) testes com apenas um composto tóxico apresentam grandes diferenças na sensibilidade das espécies testadas e essas diferenças fazem parte da incerteza na avaliação de risco ambiental.

Sabendo que existem poucos dados referentes à toxicidade dos agrotóxicos para espécies de macrófitas aquáticas da Amazônia é preciso avaliar muito bem ao tentar definir até que ponto os dados ecotoxicológicos podem ser extrapolados de uma região geográfica para outra, pois a biodiversidade em regiões tropicais é maior do que aquela de outras regiões, portanto o número de espécies potencialmente afetadas pela exposição a um determinado agrotóxico pode ser bem maior.

Pode-se afirmar que é de suma importância o conhecimento dos efeitos dos herbicidas sobre a biodiversidade Amazônica para a definição de padrões de qualidade ambiental e para subsidiar o registro dos agrotóxicos no Brasil. Entretanto, a realização desta tarefa implica em primeira instância na construção de uma base de conhecimentos em ecotoxicologia para a região, com espécies locais ou endêmicas e em situações que reflitam as condições locais de exposição da biodiversidade aos herbicidas.

5. REFERENCIAS

- ALDENBERG, T.; JAWORSKA, J. S. 2000. Uncertainty of the hazardous concentration and fraction affected for normal species sensitivity distributions. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 46:1–18.
- ARTS, G.H.P.; BELGERS, J.D.M.; HOEKZEMA, C.H.; THISSEN, J.T.N.M. 2008. Sensitivity of submersed freshwater macrophytes and endpoints in laboratory toxicity tests. *Environ. Pollut.* 153, 199–206.
- BASTOS, R.X. *et al.* 2004. Legislação sobre controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano. A experiência brasileira comparada à Panamericana. In: Congresso Interamericano de Ingeniería Sanitária y Ambiental – AIDIS, San Juan, Porto Rico. Anais.
- BROCK TCM, LAHR J, VAN DEN BRINK PJ. 2000. Ecological risks of pesticides in freshwater ecosystems. Part 1: Herbicides. Alterra Report 088. The Netherlands: Wageningen. 124 p.
- BROCK, T.C.M. *et al.* 2004. Comparing aquatic risk assessment methods for the photosynthesis-inhibiting herbicides metribuzin and metamitron. *Environ.Pollut.* 130, 403-426.
- BROCK T, C. M.; ARTS G. H. P.; MALTBY, L.; VAN DEN BRINK, P. J. 2006. Aquatic risks of pesticides, ecological protection goals, and common aims in European Union legislation. *Integrated Environmental Assessment and Management*, v. 2, p. 20-46.
- CAMPBELL P. J. *et al.* 1999. Guidance document on Higher-tier aquatic risk assessment for pesticides (HARAP). Brussels (BE): SETAC-Europe, 179p.
- CASTILLO, L. E.; DE LA CRUZ, E.; RUEPERT, C. 1997. Ecotoxicology and pesticides in tropical aquatic ecosystems of Central America. *Environ Toxicol Chem*, 16: p.41–51. 1997.
- CEDERGREEN, N.; SPLIID, N.H.; STREIBIG, J.C. 2004a. Rapid communication. Species-specific sensitivity of aquatic macrophytes towards two herbicides. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 58, 314-323.
- CEDERGREEN, N.; STREIBIG, J.C.; SPLIID, N.H. 2004b. Sensitivity of aquatic plants to the herbicide metsulfuron-methyl. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57, 153-161.
- CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA. 2005. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. 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.
- EU (1997). Council Directive 97/57/EC of September 21, 1997. Establishing annex VI to Directive 91/414/EEC concerning the placing of plant protection products on the market. *Official Journal of the European Communities L265*: 87-109.

- FAIRCHILD, J. F.; RUESSLER, D. S.; HAVERLAND, P. S.; CARLSON, A. R. 1997. Comparative Sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to Sixteen Herbicides. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 32, 353–357.
- FAIRCHILD, J. F. *et al.* 1998. Comparative sensitivity of five species of macrophytes and six species of algae to atrazine, metribuzin, alachlor, and metolachlor. Environmental Toxicology and Chemistry, v.. 17, No. 9, pp. 1830–1834.
- GUIDDINGS, J. M. *et al.* 2013. The Relative Sensitivity of Macrophyte and Algal Species to Herbicides and Fungicides: An Analysis Using Species Sensitivity Distributions. Integrated Environmental Assessment and Management —Volume 9, Number 2—pp. 308–318.
- JORGENSEN, S. E. & LÖFFLER, H. 1990. Guidelines of Lake Management. International lake Environment Comittee. Unted Nations Envorounment Programme. (3): 174p.
- LACHER, T. E. Jr.; GOLDSTEIN, M. I. 1997. Tropical ecotoxicology: status and needs. Environ Toxicol Chem 16: p. 100–111.
- MALTBY, L. *et al.* 2005. Insecticide species sensitivity distributions: the importance of test species selection and relevance to aquatic ecosystems. Environ Toxicol Chem 24:379–388.
- NEWMAN, M.C. *et al.* 2000. Applying species sensitivity-distributions in ecological risk assessment: assumptions of distribution type and sufficient numbers of species. Ecotoxicology and Environmental Chemistry 19(2): 508-515.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT, 2002. Lemnasp. growth inhibition test. Revised proposal for a new guideline 221. Paris,France.
- PENNINGTON, D.W. 2003. Extrapolating ecotoxicological measures from small datasets. Ecotoxicology and Environmental Safety 56 (2): 238-250.
- POSTHUMA, L.; SUTER, G. W. II; TRAAS, T. P. 2002. Species sensitivity distributions in ecotoxicology. Lewis Publishers, Boca Raton. 587 p.
- RUBACH, M. N.; BAIRD, D. J.; VAN DER BRINK, P. J. 2010. A new method for ranking specific sensitivity freshwater arthropods to inseticides and its relation biological traits. Environ Toxicol Chem 29:476-487.
- SAND-JENSEN, K., 1997. Macrophytes as biological engineers in the ecology of Danish streams. In: Sand-Jensen, K., Pedersen, O. (Eds.), Freshwater Biology. Gad, Copenhagen, pp. 74–101.
- SCHEFFER, M., 1998. Ecology of Shallow Lakes. Chapman & Hall, London
- SCHULER, L.J; RAND, G.M. 2008. Aquatic risk assessment of herbicides in freshwater ecosystems of South Florida. Arch Environ Contam Toxicol 54:571–583.
- SOLOMON, K. R. *et al.* 1996. Ecological risk assessment of Atrazine in North American surface waters. Environmental Toxicology and Chemistry15 (1): 31-76.
- SOUZA, T.C. 2014. Toxicidade aguda de agrotóxicos e Curva de Sensibilidade de espécies para peixes amazônicos. Manaus, 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente e Sustentabilidade da Amazônia), Universidade Federal do Amazonas.

SUTER II, G. W. 2002. North American history of species sensitivity distributions. In: Posthuma L., Traas T.P., Suter G.W. (eds) The use of species sensitivity distributions in ecotoxicology. Lewis, Boca Raton, FL. Pp: 11-18.

SWANSON, S.M., RICKARD, C.P., FREEMARK, K.E., MACQUARRIE, P. 1991. Testing for pesticide toxicity to aquatic plants: Recommendations for test species. In: Gorsuch, J.W., Lower, W.R., Wang, W., Lewis, M.A. (Eds.), Plants for Toxicity Assessment: ASTM STP 1115. American Society for Testing and Materials, PA, pp. 77-97.

VAN DEN BRINK, P.J.; BLAKE, N.; BROCK, T.C.M.; MALTBY, L. 2006. Predictive value of species sensitivity distributions for effects of herbicides in freshwater ecosystems. *Hum. Ecol. Risk Assess* 12, 645-674.

VAN VLAARDINGEN, P. L. A.; TRAAS, T.P.; WINTERSEN, A. M.; ALDENBERG, T. 2004. ETX 2.0. A program to calculate hazardous concentrations and fraction affected, based on normally distributed toxicity data. Bilthoven, the Netherlands: National Institute for Public Health and the Environment (RIVM). Report no. 601501028/2004. 68 p.

VAN STRAALLEN, N. M.; VAN LEEUWEN, C. J. 2002. European history of species sensitivity distributions. In: Posthuma L., Traas T. P., Suter G. W. (eds) The use of species sensitivity distributions in ecotoxicology. Lewis, Boca Raton, FL. Pp: 19-35.

VILARINHO, G. C. C. 2013. Aplicação da Distribuição de Sensibilidade de Espécies a agrotóxicos para a definição de padrões de qualidade da água e proteção da biodiversidade aquática. Manaus, 65 f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente e Sustentabilidade da Amazônia), Universidade Federal do Amazonas.

WANG, W., FREEMARK, K., 1995. The use of plants for environmental monitoring and assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 30, 289-301.

WHEELER, J.R. *et al.* 2002. Species sensitivity distributions (data and model choice). *Marine Pollution Bulletin* 45: 192-202.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. 2006. Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações. São Carlos – RIMA, 478 p.

XING, L. *et al.* 2013. A comparison of statistical methods for deriving freshwater quality criteria for the protection of aquatic organisms. *Environ Sci Pollut Res*, in press, DOI 10.1007/s11356-013-1462-y.

CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho investigamos se os principais herbicidas utilizados na região podem estar causando efeitos tóxicos nas macrófitas aquáticas, interferindo na estrutura e funcionamento do ecossistema aquático.

Nossos dados corroboram com a hipótese 1, mostrando que a partir das concentrações de efeito medianas dos herbicidas encontrados podemos dizer que as macrófitas aquáticas da região Amazônica são afetadas pelo herbicida diuron, glifosato e paraquat. Os resultados deste trabalho contribuem com alguns dos primeiros dados ecotoxicológicos para espécies de macrófitas aquáticas da Amazônia.

Nossos dados não corroboram com a hipótese 2, mostrando que pelos valores de HC₅ apresentados no presente estudo estimados através do método de curvas de distribuição de sensibilidade das espécies para os três herbicidas, evidenciam que a CE₅₀ da espécie padrão *Lemna sp.* usada nos protocolos internacionais não é protetiva para as espécies de macrófitas aquáticas da região.

A hipótese C não é corroborada com os resultados encontrados, pois os valores máximos permitidos de substâncias tóxicas no meio aquático apresentados pela Resolução CONAMA 357/2005 e pelas Agências internacionais não protegem as espécies de macrófitas aquáticas amazônicas, conseqüentemente o ambiente aquático, visto que nossos valores de proteção são bem menores que os apresentados pelas resoluções.

Os valores máximos calculados para espécies de macrófitas aquáticas da Amazônia servem como ponto de partida para formulação de padrões de qualidade da água, uma vez que na Resolução CONAMA nº 357/2005 só é estabelecido valores para um dos 3 agrotóxicos avaliados nesse estudo.

Considerando que o Brasil é o maior detentor de biodiversidade do planeta, e que atualmente é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo é imperativo que padrões de qualidade da água para os agrotóxicos registrados no país sejam estabelecidos, de forma a proteger toda a biodiversidade aquática.

APÊNDICES

Apêndice A. Média e desvio padrão dos parâmetros ambientais dos testes crônicos (21 dias) realizados com herbicidas diuron, glifosato e paraquat.

| Diuron | | | | |
|-----------------------------|-----------------------------------|------------------------------|----------------|-----------------------------------|
| Espécies | O ₂ (mg/L) média±DP | Temperatura (°C) média±DP | pH média±DP | Condutividade (µS/cm) média±DP |
| <i>Azolla fliculoides</i> | 6,6 ± 0,7 | 23,7 ± 0,8 | 6,6 ± 0,7 | 262 ± 102,7 |
| <i>Cabomba aquatica</i> | 5,3 ± 0,3 | 23,5 ± 1 | 3,7 ± 0,1 | 326 ± 139,5 |
| <i>Limnobium laevigatum</i> | 5,7 ± 0,6 | 23,3 ± 0,5 | 6,9 ± 0,7 | 139,3 ± 19,9 |
| <i>Phyllanthus fluitans</i> | 5,8 ± 0,3 | 23,1 ± 0,5 | 6,6 ± 0,6 | 142,5 ± 127,3 |
| <i>Pistia stratiotes</i> | 5,2 ± 0,3 | 23,9 ± 0,9 | 6,3 ± 1,1 | 162,8 ± 33,8 |
| <i>Salvinia auriculata</i> | 4,5 ± 1,1 | 23,2 ± 1,4 | 6,4 ± 0,8 | 174 ± 22,9 |
| <i>Spirodela polyrhiza</i> | 6,6 ± 0,6 | 23,1 ± 1,1 | 6,3 ± 0,5 | 146,7 ± 13,6 |
| Glifosato | | | | |
| <i>Azolla fliculoides</i> | 5,6 ± 0,2 | 21,2 ± 1,2 | 6,6 ± 0,8 | 69 ± 15 |
| <i>Cabomba aquatica</i> | 5,9 ± 0,3 | 26,6 ± 0,7 | 6,5 ± 0,5 | |
| <i>Limnobium laevigatum</i> | 5,7 ± 0,5 | 22,4 ± 1 | 5,7 ± 0,8 | 45 ± 15,9 |
| <i>Phyllanthus fluitans</i> | 5,7 ± 0,6 | 22,4 ± 1,3 | 5,3 ± 0,5 | 44,5 ± 19,2 |
| <i>Pistia stratiotes</i> | 4,5 ± 0,6 | 23,4 ± 0,4 | 6,2 ± 0,1 | 21 ± 1,3 |
| <i>Salvinia auriculata</i> | 5,7 ± 0,5 | 22,1 ± 1,4 | 5,3 ± 0,5 | 46,5 ± 16,8 |
| Paraquat | | | | |
| <i>Azolla fliculoides</i> | 6,4 ± 0,7 | 25,2 ± 0,2 | 6,8 ± 0,3 | |
| <i>Cabomba aquatica</i> | 6,2 ± 0,5 | 24,3 ± 0,3 | 6,7 ± 0,2 | |
| <i>Limnobium laevigatum</i> | 5,9 ± 0,5 | 24,8 ± 0,6 | 6,7 ± 0,2 | |
| <i>Phyllanthus fluitans</i> | 6,4 ± 0,7 | 25,3 ± 0,1 | 6,8 ± 0,3 | |
| <i>Pistia stratiotes</i> | 6 ± 0,4 | 25,3 ± 0,1 | 6,8 ± 0,3 | |
| <i>Salvinia auriculata</i> | 6,4 ± 0,3 | 24,5 ± 2,1 | 6,6 ± 1 | |
| <i>Spirodela polyrhiza</i> | 6,4 ± 0,4 | 24,9 ± 0,9 | 7,3 ± 1 | |