

GUILHERME DIAGONEL

**Efeito de herbicidas a base de glifosato sobre as respostas
fotossintéticas de macrófitas de ecossistemas lóticos tropicais**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, para a obtenção do título de Mestre em Biociências (Área de Conhecimento: Caracterização e Aplicação da Diversidade Biológica)

Orientador: Prof. Dr. Ciro Cesar Zanini Branco

ASSIS

2019

D536e

Diagonel, Guilherme

Efeitos de herbicidas a base de glifosato sobre as respostas fotossintéticas de macrófitas de ecossistemas lóticos tropicais / Guilherme Diagonel.

-- Assis, 2019

61 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual

1. Fotossíntese. 2. Herbicidas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências e Letras, Assis. Dados fornecidos pelo autor(a).

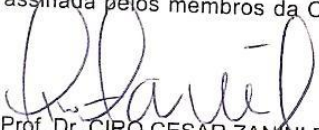
Essa ficha não pode ser modificada.

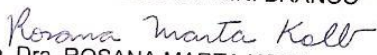


ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE Mestrado de Guilherme Diagonel, discente do Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Faculdade de Ciências e Letras - Câmpus de Assis.

Aos 17 dias do mês de abril do ano de 2019, às 08:30 horas, no(a) Centro de Estudos da PPG em Biociências, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa Pública, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. CIRO CESAR ZANINI BRANCO - Orientador(a) do(a) Departamento de Ciências Biológicas / UNESP/Assis, Profa. Dra. ROSANA MARTA KOLB do(a) Departamento de Ciências Biológicas / UNESP/Assis, Prof. Dr. RÉGIS DE CAMPOS OLIVEIRA do(a) Mogi Guaçu / SP, sob a presidência do primeiro, a fim de proceder a arguição pública da DISSERTAÇÃO DE Mestrado de GUILHERME DIAGONEL, intitulada **Efeito de herbicidas a base de glifosato sobre as respostas fotossintéticas de macrófitas de ecossistemas lóticos tropicais**. Após a exposição, o discente foi arguido oralmente pelos membros da Comissão Examinadora, tendo recebido o conceito final: _____

APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelos membros da Comissão Examinadora.


Prof. Dr. CIRO CESAR ZANINI BRANCO


Profa. Dra. ROSANA MARTA KOLB

(participação não presencial)
Prof. Dr. RÉGIS DE CAMPOS OLIVEIRA

Agradecimentos

Ao prof. Dr. Ciro Cesar Zanini Branco, por toda a ajuda e ensinamentos para a realização deste trabalho. Agradeço também, pelas palavras de incentivo que me fez continuar seguindo em frente.

Aos meus pais, Edgar Diagonel e Márcia Marucci Diagonel que sempre me incentivaram a continuar estudando e tiveram paciência para isso.

Aos meus grandes amigos de São Carlos, Guilherme Triques Haddad e Orlando Duarte Figueiredo Neto, por todos esses vinte anos de amizade.

Agradeço ao Régis de Campos Oliveira, Lucas Kortz Vilas Boas e Lucas Henrique de Almeida por me ajudarem no desenvolvimento deste estudo e a todos integrantes do LABIA.

Aos integrantes, ex-integrante, e agregados da República Calango: Aron Restani, Lucas Henrique de Almeida, Márcio Albuquerque da Silva, João Victor Longhi Monzoli, Layni Praxedes Nobre, Guilherme Ribeiro, Caio Komori, Felipe Ribeiro Pereira Sarmento, Ingrid Guandalin Samogin, Gustavo Ferreira Beloti, Renato Justo Coymbra, Orlando Aparecido Carriel, Lucas Bassi Costa, Paulo Naoto Taniguti.

Aos integrantes do time MITOSe que sempre me proporcionaram mais derrotas do que vitórias, mas nunca deixarei de acreditar.

Ao porteiro Sivaldo, que sempre me recebeu com alegria e com conversas sobre de como tratar as pessoas com humildade.

A todos funcionários da UNESP Assis, principalmente os funcionários do Restaurante Universitário pelos almoços deliciosos.

Diagonel, Guilherme. **Efeito de herbicidas a base de glifosato sobre as respostas fotossintéticas de macrófitas de ecossistemas lóticos tropicais**. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências). – Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis, 2019.

Resumo

Vários estudos observacionais sobre macrófitas de ecossistemas lóticos têm contribuído com o aumento do conhecimento ecológico destes organismos nestes ambientes. Entretanto, ainda persistem lacunas importantes neste conhecimento, entre as quais estão as relações de causa e efeito que potencialmente existem entre perturbações provocadas pela atividade antrópica e aspectos da fisiologia e da ecologia destes organismos. Com o objetivo de superar, obviamente em parte, esta lacuna, o presente estudo propõe, através de experimentos laboratoriais, avaliar os efeitos de resíduos de herbicidas usados nas lavouras agrícolas, em especial aqueles a base de glifosato (Roundup®) e seu metabólito (AMPA), sobre parâmetros fotossintéticos de espécies de angiospermas aquáticas típicas de ecossistemas lóticos tropicais. As avaliações das taxas fotossintéticas e de respiração no escuro foram realizadas através da evolução do oxigênio dissolvido, aplicando-se a técnica das garrafas claras e escuras e da fluorescência de clorofila *a*, que foi avaliada com o fluorômetro subaquático Diving-PAM. Os valores dos parâmetros fotossintéticos medidos/calculados para cada tratamento avaliado foram submetidos à estatística descritiva e as eventuais diferenças entre eles foram avaliadas através da análise de variância utilizando o teste de Scott-Knott e o *t*-Student. Foram observados alguns poucos efeitos fitotóxicos associados às espécies de macrófitas estudadas, porém, quase nenhuma diferença estatisticamente significativa foi efetivamente encontrada, tanto positivas quanto negativas, entre os tratamentos e o grupo controle. Apesar deste padrão global, as espécies responderam de modo espécie-específico à exposição ao Roundup® e ao AMPA, sendo que *Egeria densa* foi aquela que registrou maior susceptibilidade para a perda de eficiência fotossintética sob influência destas substâncias, enquanto que *Myriophyllum aquaticum* tendeu a aumentar a sua produtividade fotossintética, especialmente em presença de AMPA. Do ponto de vista ecológico, este resultado merece atenção, já que estas espécies de macrófita estão entre as mais bem distribuídas em ambientes aquáticos tropicais e subtropicais do Brasil.

Palavras-chave: Macrófitas, Fotossíntese, Herbicida, Glifosato.

Diagonal, Guilherme. **Effect of herbicides based on glyphosate on the photosynthetic responses of macrophytes from topical lotic ecosystems.** Dissertation (Masters in Biosciences). – São Paulo State University (UNESP), School of Sciences, Humanities and Languages, Assis, 2019.

Abstract

Even with many observational studies regarding lotic ecosystems, macrophytes that have contributed with great knowledge about the ecology of these organisms in these environments. However, there are still important gaps in this knowledge, among which are the cause and effect relationships that potentially exist between disturbances caused by anthropic activity and aspects of the physiology and ecology of these organisms. With the objective of overcoming, in part, this gap, the present study proposes, through laboratory experiments, to evaluate the effects of herbicide residues used in agricultural crops, especially those based on glyphosate (Roundup®) and your metabolite (AMPA) on photosynthetic parameters of aquatic angiosperm species typical of tropical lotic ecosystems. The evaluation of photosynthetic rates and respiration in the dark were performed through the evolution of dissolved oxygen, applying the light and dark bottle technique and chlorophyll a fluorescence, which was evaluated with the Diving-PAM underwater fluorometer. The values of the photosynthetic parameters measured / calculated for each evaluated treatment were submitted to descriptive statistics and any differences between them were evaluated through analysis of variance using the Scott-Knott and *t*-Student test. In spite of this global pattern, species responded specifically to exposure to Roundup® and AMPA, and *Egeria densa* was the one that registered the greatest susceptibility to the loss of photosynthetic efficiency under the influence of these substances, whereas *Myriophyllum aquaticum* tended to increase their photosynthetic productivity, especially in the presence of AMPA. From an ecological point of view, this result deserves attention, as these macrophyte species are among the best distributed in tropical and subtropical aquatic environments in Brazil.

Keyword: Macrophytes. Photosynthesis, Herbicide, Glyphosate.

INTRODUÇÃO	7
Contexto histórico	7
Contexto histórico brasileiro	7
Ação fisiológica do glifosato.....	8
O glifosato em ambientes aquáticos	9
Uso de macrófitas na ecotoxicologia	11
Referências bibliográficas	12
Artigo	18
Resumo	18
Resumen	19
Introdução	20
Métodos	22
Resultados	26
i) Efeitos da exposição ao herbicida Roundup®	26
i.i) Técnica da curva de evolução do oxigênio	26
i.ii) Técnica da fluorescência da clorofila <i>a</i>	28
ii) Efeitos da exposição ao AMPA	29
ii.i) Técnica da curva de evolução do oxigênio	29
ii.ii) Técnica da fluorescência da clorofila <i>a</i>	30
Discussão	31
Referências bibliográficas	36
Figuras e tabelas	41

Introdução

Contexto histórico

Desde que o homem começou a plantar, as ervas daninhas sempre foram um problema e com o passar dos anos e com o processo da industrialização, as pessoas migraram para grandes centros urbanos, fazendo com que a força de trabalho na lavoura diminuísse. Uma das soluções para a queda na disponibilidade de mão de obra na agricultura comercial passou a ser a utilização de métodos mecânicos/químicos/biológicos para a retirada das plantas indesejadas que competem por recursos com as plantas de interesse agrônomo, como por exemplo, o uso de ferramentas, animais puxando rastelos, tratores e o controle biológico. Neste sentido, a partir do final do século XX, o uso de produtos químicos para o controle de pestes cresceu vertiginosamente passando a ser uma técnica agrícola largamente difundida. Os principais produtos químicos desta natureza são inseticidas, fungicidas e herbicidas, tendo estes últimos ação, sobretudo, em ervas daninhas (JURADO *et al.*, 2011).

Atualmente, o mercado consumidor demanda uma grande quantidade de produtos alimentícios agrícolas que, por conseguinte, aumenta a quantidade de práticas intensivas para garantir uma maior produtividade em uma menor área (GALLI; MONTESUMA, 2005; KLEIJN *et al.*, 2009). Para uma melhor produtividade agrícola é preciso que nas lavouras mundiais ocorra a máxima, se possível completa, eliminação de plantas indesejáveis (p.ex., ervas daninhas) capazes de estabelecer um processo de competição, tanto por espaço quanto por nutrientes, com as culturas de interesse comercial. Neste contexto, o uso de herbicidas tornou-se uma prática mundial, justamente porque estas substâncias químicas são capazes de eliminar as plantas competidoras, garantindo as melhores condições de desenvolvimento às plantas alvo do interesse econômico agrícola (GALLI; MONTESUMA, 2005; KLEIJN *et al.*, 2009).

Contexto histórico brasileiro

Em território nacional, o herbicida Metribuzin® foi amplamente utilizado nas lavouras de soja, nos anos 70, para o controle de ervas daninhas dicotiledôneas, porém, já existia aqui uma espécie de planta tolerante a este herbicida, popularmente conhecida como leiteiro (*Euphorbia heterophylla*). Nos anos 80, para combater o leiteiro, foi amplamente utilizado o herbicida Imazaquin®, o qual é altamente

específico e inibe a enzima ALS (Aceto Lactato Sintase). No entanto, o uso indiscriminado deste herbicida, culminou em biótipos de leiteiro e picão-preto (*Bidens pilosa*) resistentes a ele (VARGAS *et al.*, 2016). Já nos anos 90, o amplo uso do glifosato, se deu por conta da introdução da soja resistente a essa substância, e até hoje este herbicida ainda é muito utilizado em plantações brasileiras (VARGAS *et al.*, 2016). Entretanto, o uso exacerbado do Roundup®, formulação comercial que possui o glifosato como princípio ativo, está gerando o mesmo problema que foram observados para o herbicida Metribuzin® no passado, com o surgimento de variedades de plantas tolerantes e resistentes (VARGAS *et al.*, 2016). Além da descoberta do glifosato propriamente dita, a engenharia genética também teve importante papel na expansão do uso dessa substância, uma vez que, como o glifosato não é um herbicida seletivo, a modificação genética foi capaz de criar variedades de plantas de interesse agrônomo resistentes a este princípio ativo.

Ação Fisiológica do Glifosato

O glifosato, ou N-(fosfonometil) glicina, é o ingrediente ativo do Roundup® e muitas outras marcas de herbicidas que controlam o crescimento de um amplo espectro de plantas. O glifosato quando em contato com a planta, penetra pelas folhas, sendo transportado pelo floema até ser distribuído por toda a planta, principalmente nas regiões meristemáticas. Este processo de distribuição do herbicida ao longo da planta pode ser mais lento ou mais rápido dependendo da idade da planta, da espécie em questão e da quantidade de herbicida e surfactante aplicados (YAMADA; CASTRO, 2007). O mecanismo de ação do glifosato visa a inibição competitiva da enzima EPSPs (5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato sintase), afetando a síntese metabólica dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano (SÁENZ; Di MARZIO, 2009). Destaca-se que a EPSPs é uma enzima encontrada, de forma genérica, em plantas e também em algumas bactérias (DILL, 2005). Por atuar de modo universal sobre as plantas, o glifosato é considerado não-seletivo e, por isso, tem sido muito utilizado nas lavouras para o controle de ervas daninhas e outras espécies invasoras (PAPCHENKOVA *et al.*, 2009). As plantas submetidas ao glifosato demonstraram sintomas como clorose foliar, seguido de necrose e malformação em áreas de rebrotamento, com os efeitos podendo durar dias, ou até semanas, para a morte completa da planta invasora (YAMADA; CASTRO, 2007).

Do ponto de vista da ação sobre o processo fotossintético, estudos mais detalhados têm mostrado que o glifosato influencia indiretamente a EPSPs, diminuindo a síntese do arogenato, o inibidor alostérico da enzima 3-deoxi-D-arabino-heptulose-7-fosfato sintase (DAHPs). Com o declínio da produção do arogenato, ocorre uma diminuição na inibição da DAHPs e, por conseguinte, o acúmulo de ácido chiquímico e um desvio da eritrose-4-fosfato, que seria utilizado na regeneração da ribulose-1,5-bifosfato (RUBISCO) no ciclo de Calvin, para a síntese exacerbada do ácido chiquímico (SHIEH *et al.*, 1991). Adicionalmente, o glifosato reduz o teor de clorofila *a* nos vegetais, por conta de uma inibição da síntese de ácido 5-aminolevulínico (ALA) (MESCHEDE *et al.*, 2011).

O processo de biodegradação do glifosato pode ocorrer, dependendo do microrganismo envolvido, via desfosforilação, onde é gerada a glicina, ou via descarboxilação, que gera o ácido aminometilfosfônico, conhecido pela sigla AMPA. Certamente, o AMPA se constitui como o principal metabólito intermediário resultante da degradação do glifosato e, segundo dados experimentais, pode apresentar efeitos negativos sobre a fotossíntese das plantas a ele expostas (GIESY *et al.*, 2000). Neste sentido, o AMPA, pode interromper a biossíntese de clorofila *a*, fazendo com que ocorra uma redução na taxa fotossintética (GOMES *et al.*, 2016).

O Glifosato em ambientes aquáticos

Nas últimas décadas, a utilização de herbicidas a base de glifosato vem aumentando progressivamente, porém poucos estudos têm sido realizados levando-se em consideração os efeitos destas substâncias sobre os chamados organismos não-alvo (GALLI; MONTESUMA, 2005). Um estudo realizado no Vale do Ribeira, local onde se encontra o Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR), buscou analisar rios da região, para averiguar a presença de pesticidas nesta área de preservação ambiental. Neste estudo, foram encontrados rastros de 27 pesticidas e seus metabólitos (MORAES *et al.*, 2003). Já se sabe, por conta de resultados de alguns estudos prévios que, potencialmente, a presença de herbicidas pode modificar o funcionamento de ecossistemas aquáticos (MATTHAEI *et al.*, 2010). Neste sentido, os ecossistemas lóticos devem ser cuidadosamente analisados, pois são considerados altamente frágeis, uma vez que recebem grandes quantidades dessas substâncias que são carregadas pelas águas das chuvas a partir de áreas de cultivo agrícola intenso (MATTHAEI *et al.*, 2010).

Os herbicidas a base de glifosato têm sido considerados supostamente seguros para o ambiente, visto que microrganismos do solo, em tese, degradam o excesso da substância que não foi absorvida pela planta alvo, prevenindo sua ação em organismos não-alvo e/ou seu escoamento para águas subterrâneas e superficiais (GIESY *et al.*, 2000, SOLOMON; THOMPSON, 2003). A presença de matéria orgânica no solo, níveis de precipitação, características do solo, são, entretanto, fatores que podem influenciar a taxa de incorporação do glifosato pelo solo. Este fato sugere que, de fato, a incorporação do glifosato pelo solo pode ser mais ou menos eficiente de acordo com variações das condições locais (BORGGAARD; GIMSING, 2008), deixando sérias dúvidas sobre a sua pretensa segurança ambiental.

O que se tem observado é que, de fato, a incompleta adsorção do glifosato pelo solo permite que este seja efetivamente encontrado em águas superficiais (BATTAGLINET *et al.*, 2005; LAITINEN *et al.*, 2009; PUÉRTOLAS *et al.*, 2010). Em um estudo na região centro-oeste dos EUA foi demonstrado que boa parte das amostras de água dos riachos analisados mostraram quantidades significativas de glifosato (36% das amostras coletadas) (BATTAGLIN *et al.*, 2005). Em águas de ecossistemas lóticos de regiões florestais dos EUA (NEWTON *et al.*, 1994), do Canadá (COUTURE *et al.*, 1995; FENG *et al.*, 1990) e na região dos pampas argentinos (PERUZZO *et al.*, 2008) também foram encontradas elevadas concentrações deste herbicida. Em um estudo feito em Pelotas, RS, foram coletadas 15 amostras de água de riachos pertencentes à microbacia do arroio Passo do Pilão, das quais 46,7% registraram quantidades de glifosato em concentrações na ordem de 20 a 30 ppb (SILVA *et al.*, 2003). Prata *et al.* (2002) coletaram amostras de água em açudes, canais de irrigação e drenagem em uma granja orizícola no litoral sul do Rio Grande do Sul, onde foram encontrados resíduos de AMPA em 30, 90 e 120 dias após a aplicação do glifosato.

Para o Brasil, os resultados destes estudos são ainda mais preocupantes, já que o país é um dos grandes consumidores mundiais de glifosato. Para se ter uma ideia do volume de uso deste herbicida no país, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) divulgou um relatório sobre a venda de agrotóxicos mostrando que o glifosato foi o herbicida mais vendido no país no ano de 2012, com mais de 187 mil toneladas comercializadas (IBAMA, 2013).

Outro grande problema sobre o uso de herbicidas, é a sua utilização sem qualquer controle. Como apresentado por Waichman *et al.* (2002), com a ocupação

da região amazônica no fim dos anos 60, criaram-se lavouras familiares para suprir o mercado local das cidades ali existentes, porém, os agricultores não receberam instruções ou treinamentos sobre a utilização de pesticidas, manuseando estas substâncias de forma errada e em quantidades excessivas, sem preocupação em relação à sua saúde e ao meio ambiente. Um outro estudo realizado em Viçosa, MG, observou que os agricultores não consideravam o Roundup® com sendo um agrotóxico e 100% deles utilizavam de forma equivocada o Equipamento de Proteção Individual (EPI) durante a aplicação do herbicida (MIGUEL *et al.*, 2018).

Uso de macrófitas na ecotoxicologia

Como a presença de glifosato em ambientes aquáticos é um dado da realidade, alguns estudos têm tentado avaliar as possíveis influências desta substância em produtores primários destes ecossistemas. Neste contexto, alguns estudos desta natureza já avaliaram os possíveis efeitos ecotoxicológicos do glifosato em algumas espécies de macrófitas aquáticas, (p.ex., ISSA *et al.*, 2013; SÁENZ; Di MARZIO, 2009). Sobrero *et al.* (2007), por exemplo, mostraram que para a espécie de angiosperma *Lemna gibba* houve uma diminuição na taxa de crescimento quando esta planta foi exposta a uma solução com concentração de 1 mg.L⁻¹ de glifosato. A literatura ainda reporta que em experimentos contendo altas concentrações de glifosato no meio foi constatado uma forte diminuição na riqueza e abundância de espécies de briófitas lóticicas (NEWMASER *et al.*, 1999). Este mesmo estudo mostrou que mesmo após 4 anos de interrupção da aplicação do herbicida os efeitos sobre a comunidade de briófitas ainda eram percebidos. Em outros estudos, foi evidenciado que a exposição ao glifosato induz uma série de efeitos negativos sobre a fisiologia/desenvolvimento de macrófitas aquáticas, tais como aqueles observados em *Salix miyabeana* (angiosperma), na qual verificou-se a diminuição da taxa fotossintética (Gomes *et al.*, 2017), e nas espécies *Azolla filiculoides*, *Cabomba aquática*, *Limnobium leavigatum*, *Pistia stratiotes*, *Phyllanthus fluitans*, *Salvinia auriculata*, *Spirodela polyrhiza*, nas quais registraram-se efeitos inibitórios em suas taxas de crescimento (CAMPOS, 2015).

Um ponto importante para estudos ecotoxicológicos, é que a grande maioria deles foram conduzidos em regiões temperadas, com poucos estudos semelhantes realizados em regiões tropicais. Este tipo de comparação latitudinal é altamente recomendado já que pode mostrar as diferenças nos padrões das respostas

ecofisiológicas das plantas submetidas ao tratamento com o herbicida, justamente por conta das diferenças nas condições ambientais subjacentes ao tratamento (p.ex., diferenças na sazonalidade existente entre essas regiões) (CAMPOS, 2015). Outro ponto importante é que a grande maioria dos estudos nessa área, utilizam espécies flutuantes de *Lemna* sp., organismo eleito como representante das macrófitas aquáticas em testes ecotoxicológicos internacionais (p.ex., norma da OECD, 2002). A aplicação apenas de espécies de algumas poucas espécies de macrófitas flutuantes permite indagar, se é possível estender os resultados de toxicidade obtidos para estes organismos para toda a comunidade de macrófitas (LEWIS, 1995; TURGUT; FOMIN, 2002).

Com base no contexto apresentado acima, o presente estudo foi conduzido com a pretensão de contribuir com a ampliação do conhecimento científico a respeito dos potenciais efeitos da exposição de produtores primários de ambientes aquáticos continentais a herbicidas a base de glifosato. Mais especificamente, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da exposição a diferentes doses do herbicida Roundup® e ao AMPA sobre as respostas fotossintéticas de espécies de macrófitas de ambientes lóticos tropicais.

A seguir serão apresentados os resultados obtidos a partir da condução deste estudo experimental sob a forma de um artigo científico intitulado: “Respostas fotossintéticas de quatro espécies de macrófitas aquáticas tropicais sob exposição ao herbicida Roundup® e seu principal produto de degradação”. Este artigo será submetido à publicação junto ao periódico “*Limnetica*”, ISSN: 0213-8409; Fator de Impacto (2107): 0,736 e Qualis CAPES (Biodiversidade): B2. As normas editoriais para artigos a serem publicados no referido periódico estão disponíveis no endereço eletrônico, sobre o título “*Instrucciones para los Autores*”, no seguinte endereço eletrônico: http://www.limnetica.net/documentos/normasLIMNETICA_mayo2017.pdf.

Referências

BATTAGLIN, W. A.; KOLPIN, D. W.; SCRIBNER, E. A.; KUIVILA, K. M.; SANDSTROM, M. W. Glyphosate, other herbicides, and transformation products in Midwestern streams. **Journal of the American Water Resources Association**, v. 41, p. 323-332, 2005.

BONNET, J. L.; BONNEMOY, F.; DUSSER, M.; BOHATIER, J. Assessment of the potential toxicity of herbicides and their degradation products to non target cells using two microorganisms, the bacteria *Vibrio fischeri* and the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. **Environmental Toxicology**, v. 22, p. 78–91, 2007.

BORGGAARD, O. K.; GIMSING, A. L. Fate of glyphosate in soil and the possibility of leaching to ground and surface waters: a review. **Pest Management Science**, v. 64, p. 441-456, 2008.

CAMPOS, P. S. **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**. Tese de Doutorado. 2015. Universidade Federal do Amazonas.

COUTURE, G.; LEGRIS, J.; LANGEVIN, R. **Evaluation des impacts du glyphosate utilise dans le milieu forestier**. Ministere des Ressources Naturelles, Quebec, 1995.

DILL, G. M. Glyphosate-resistant crops: history, status and future. **Pest Management Science**, v. 61, p. 219-224, 2005.

FENG, J.; THOMPSON, D.; REYNOLDS, P. Fate of glyphosate in a Canadian forest watershed. Aquatic residues and off-target deposit. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 38, p. 1110-1118, 1990.

GALLI, A. J.; MONTESUMA, M. C. **Alguns Aspectos da Utilização do Herbicida Glifosato na Agricultura**. Editora Acadcom, Santo André, 2005.

GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 167, p. 35-120, 2000.

GOMES, M. P.; LE MANAC'H, S. G.; MACCARIO, S.; LABRECQUE, M.; LUCOTTE, M.; JUNEAU, P. Differential effects of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) on photosynthesis and chlorophyll metabolism in willow plants. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 130, p. 65-70, 2016.

GOMES, M. P.; LE MANAC'H, S. G.; HÉNAULT-ETHIER, L.; LABRECQUE, M.; LUCOTTE, M.; JUNEAU, P. Glyphosate-Dependent Inhibition of Photosynthesis in Willow. **Frontiers in Plant Science**, v. 8: 207, p. 1-13, 2017.

IBAMA, 2013. **Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins.** Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/areas-tematicas-qa/relatorios-decomercializacao-de-agrotoxicos/pagina-3> (acesso em: 23/04/2014 às 18:00 horas).

ISSA, A. A. E. S.; ADAM, M. S.; FAWZY, M. A. Alterations in some metabolic activities of *Scenedesmus quadricauda* and *Merismopedia glauca* in response to glyphosate herbicide. **Journal of Biology and Earth Science**, v. 3, p. 17-23, 2013.

JURADO, A.; FERNANDES, M.; VIDEIRA, R.; PEIXOTO, F.; VICENTE, J. **Herbicides: the face and the reverse of the coin. An in vitro approach to the toxicity of herbicides in nontarget organisms.** In: KORTEKAMP, A. (Ed.), *Herbicides and Environment*. Rijeka: Intech Open Access Publisher, 2011, p. 3-44.

KLEIJN, D.; KOHLER, F.; BALDI, A.; BATARY, P.; CONCEPCION, E. D.; CLOUGH, Y.; DIAZ, M.; GABRIEL, D.; HOLZSCHUH, A.; KNOP, E.; KOVACS, A.; MARSHALL, E. J. P.; TSCHARNTKE, T.; VERHULST, J. On the relationship between farmland biodiversity and land-use intensity in Europe. **Proceedings of the Royal Society**, v. 276, p. 903-909, 2009.

LAITINEN, P.; RAMO, S.; NIKUNEN, U.; JAUHAINEN, L.; SIIMES, K.; TURTOLO, E. Glyphosate and phosphorus leaching and residues in boreal sandy soil. **Plant and Soil**, v. 323, p. 267-283, 2009.

LEWIS, A. L. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review. **Environmental Pollution**, v. 87, p. 319–336, 1995.

MATTHAEI, C. D.; PIGGOTT, J. J.; TOWNSEND, C. R. Multiple stressors in agricultural streams: interactions among sediment addition, nutrient enrichment and water abstraction. **Journal of Applied Ecology**, v. 47, p. 639-649, 2010.

MESCHEDE, D. K.; VELINI, E. D.; CARBONARI, C. A.; SILVA, J. R. M. Alteração fisiológica da canade-açúcar pela aplicação de Glyphosate e Sulfometuron-Methyl. **Planta Daninha**, v. 29, p. 413-419, 2011.

MIGUEL, E. S.; LOPES, S. O.; JUÁREZ, I. P.; TRIVELLATO, P. T.; PRIORE, S. E. Avaliação do uso de agrotóxicos por agricultores familiares de uma comunidade rural de Viçosa-MG. **Cadernos de Agroecologia**, v. 13, 2018.

MORAES, R.; Elfvendahl, H. K.; Molander, S. Pesticide residues in rivers of a Brazilian Rain Forest Reserve: assessing potential concern for effects on aquatic life and human health. **Ambio**, v. 32, p. 258-263, 2003.

NEWMASTER, S. G.; BELL, F. W.; VITT, D. H. The effects of glyphosate and triclopyr on common bryophytes and lichens in northwestern Ontario. **Canadian Journal of Forest Research**, v. 29, p. 1101-1111, 1999.

NEWTON, M.; HORNER, L. H.; COWELL, J. E.; WHITE, D.E.; COLE, E. C. Dissipation of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in North American forests. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 42, p. 1795-1802, 1994.

OLIVEIRA, R. C.; BOAS, L. K. V.; BRANCO, C. C. Z. Assessment of the potencial toxicity of glyphosate-based herbicides on the photosynthesis of *Nitella microcarpa* var. *wrightii* (Charophyceae). **Phycologia**, v. 55, p. 577-584, 2016.

OLIVEIRA, R. C. 2018. **Respostas fotossintéticas de macroalgas lólicas do filo chlorophyta submetidas à herbicidas à base de glifosato**. Tese de Doutorado. 2018. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

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

PAPCHENKOVA, G. A.; GOLOVANOVA, I.L.; USHANKOVA, N.V. The parameters of reproduction, sizes and activities of hydrolases in *Daphnia magna* Straus of successive generation affected by Roundup herbicide. **Inland Water Biology**, v. 2, p. 286-291, 2009.

PERUZZO, P. J.; PORTA, A. A.; RONCO, A.E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. **Environmental Pollution**. v. 156, p. 61-66, 2008.

PRATA, F., CAMARGO, L., MATTOS, M. L. T., PERALBA, M. C. R.; DIAS, S. L. P. Monitoramento ambiental do glifosato e do seu metabólito (ácido aminometilfosfônico) na água de lavoura de arroz irrigado. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 12, p. 145–154, 2002.

PUÉRTOLAS, L., DAMÁSIO, J., BARATA, C., SOARES, A. M. V. M.; PRAT, N. Evaluation of side-effects of glyphosate mediated control of giant reed (*Arundodonax*) on the structure and function of a nearby Mediterranean river ecosystem. **Environmental Research**, v. 110, p. 556-564, 2010.

SÁENZ, M. E.; Di MARZIO, W. D. Ecotoxicidad del herbicida glifosato sobre cuatro algas clorófitas dulceacuícolas. **Limnetica**, v. 28, p. 149-158, 2009.

SHIEH, W. J., GEIGER, D. R.; SERVIATES, J. C. Effect of N-(phosphonomethyl)glycine on carbon assimilation and metabolism during a simulated natural day. **Plant Physiology**, v. 97, p. 1109-1114, 1991.

SILVA, M. D., PERALBA, M. C. R.; MATTOS, M. L. T. Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do arroio Passo do Pilão. **Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p.19-28, 2003.

SOBRERO, M. C., RIMOLDI, F.; RONCO, A. E. Effects of the glyphosate active ingredient and a formulation on *Lemna gibba* L. at different exposure levels and assessment endpoints. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 79, p. 537-543, 2007.

SOLOMON, K. R.; THOMPSON, D. G. Ecological risk assessment for aquatic organisms from overwater uses of glyphosate. **Journal of Toxicology Environmental Health, Part B**, v. 6, p. 289-324, 2003.

TURGUT, C.; FOMIN, A. Sensitivity of the rooted macrophyte *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdcourt to seventeen pesticides determined on the basis of EC50. 2002. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.69, p. 601–608, 2002.

VARGAS, L.; ADEGAS, F.; GAZZIERO, D.; KARAM, D.; AGOSTINETTO, D.; SILVA, W. T. Resistência de plantas daninhas a herbicidas no Brasil: Histórico, distribuição, impacto econômico, manejo e prevenção. In: GRAZZIERO, D. L. P.;

ADEGAS, F. S.; MESCHEDE, D. K.; VARGAS, L.; KARAM, D; MACIEL, C. D. G; FORNAROLLI, D; GOMES, M. M. (Eds), A era glyphosate. Brasília: Embrapa Soja, 2016, p. 219-239.

WAICHMAN, A. V.; ROMBKE, J.; RIBEIRO, M. O. A.; NINA, N. C. S. Pesticide use in the Amazon State, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 9, p. 423-428, 2002.

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

ARTIGO

Respostas fotossintéticas de quatro espécies de macrófitas aquáticas tropicais sob exposição ao herbicida Roundup® e seu principal produto de degradação.

GUILHERME DIAGONEL¹ & CIRO CESAR ZANINI BRANCO².

1 *Laboratório de Biologia Aquática, Departamento de Ciências Biológicas, FCLA, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Assis, SP, Brasil.*

2 *Programa de Pós-Graduação em Biociências, FCLA, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Assis, SP, Brasil.*

Resumo

Muitos estudos acerca de macrófitas de ecossistemas lóticos têm ajudado a elucidar o entendimento sobre estes organismos e seu ambiente. Porém, ainda existem lacunas sobre esta relação ecológica, por exemplo, a relação entre a atividade antrópica e aspectos fisiológicos e ecológicos destes organismos. O presente estudo, têm como propósito, sanar algumas dúvidas existentes sobre estes aspectos, através de experimentos laboratoriais avaliando efeitos de herbicidas a base de glifosato utilizados nas lavouras agrícolas (Roundup® e AMPA). Para isso, parâmetros fotossintéticos foram avaliados utilizando macrófitas aquáticas típicas de ecossistemas lóticos tropicais. As avaliações das taxas fotossintéticas e de respiração no escuro foram realizadas através da evolução do oxigênio dissolvido, aplicando-se a técnica das garrafas claras e escuras e da fluorescência de clorofila *a*, que foi avaliada com o fluorômetro subaquático Diving-PAM. Foram observados alguns poucos efeitos fitotóxicos associados às espécies de macrófitas estudadas, porém, quase nenhuma diferença estatisticamente significativa foi efetivamente encontrada, tanto positivas quanto negativas, entre os tratamentos e o grupo controle. A despeito deste padrão global, as espécies responderam de modo espécie-específico à exposição ao Roundup® e ao AMPA, sendo que *Egeria densa* foi aquela que registrou maior susceptibilidade para a perda de eficiência fotossintética sob influência destas substâncias, enquanto que *Myriophyllum aquaticum* tendeu a aumentar a sua produtividade fotossintética, especialmente em presença de AMPA. Do ponto de vista ecológico, este resultado merece atenção, já que estas espécies de macrófita estão entre as mais bem distribuídas em ambientes aquáticos tropicais e subtropicais do Brasil.

Palavras-chave: Macrófitas aquáticas, Respostas fotossintéticas, Fluorescência da clorofila *a*, Herbicidas, Glifosato, AMPA.

Resumen

Muchos estudios sobre macrófitas de ecosistemas lóticos han ayudado a dilucidar el entendimiento sobre estos organismos y su ambiente. Sin embargo, todavía existen lagunas sobre esta relación ecológica, por ejemplo, la relación entre la actividad antrópica y aspectos fisiológicos y ecológicos de estos organismos. El presente estudio, tiene como propósito, subsanar algunas dudas existentes sobre estos aspectos, a través de experimentos de laboratorio evaluando efectos de herbicidas a base de glifosato utilizados en las labranzas agrícolas (Roundup® y AMPA). Para ello, los parámetros fotosintéticos se evaluaron utilizando macrófitas acuáticas típicas de los ecosistemas lóticos tropicales. Las evaluaciones de las tasas fotosintéticas y de respiración en la oscuridad se realizaron a través de la evolución del oxígeno disuelto, aplicando la técnica de las botellas claras y oscuras y de la fluorescencia de clorofila *a*, que fue evaluada con el fluorómetro subacuático Diving-PAM. Se observaron unos pocos efectos fitotóxicos asociados a las especies de macrófitas estudiadas, pero casi ninguna diferencia estadísticamente significativa fue efectivamente encontrada, tanto positivas como negativas, entre los tratamientos y el grupo control. A pesar de este patrón global, las especies respondieron de modo específico a la exposición al Roundup® y al AMPA, siendo que *Egeria densa* fue aquella que registró mayor susceptibilidad para la pérdida de eficiencia fotosintética bajo influencia de estas sustancias, mientras que *Myriophyllum aquaticum* tendió a aumentar su productividad fotosintética, especialmente en presencia de AMPA. Desde el punto de vista ecológico, este resultado merece atención, ya que estas especies de macrófita están entre las más bien distribuidas en ambientes acuáticos tropicales y subtropicales de Brasil.

Palabras clave: Macrófitas acuáticas, Respuestas fotosintéticas, Fluorescencia de la clorofila *a*, Herbicidas, Glifosato, AMPA.

Introdução

Na atualidade, se faz necessário uma grande produtividade nas lavouras mundiais para assegurar alimentos para a população e se possível, que essa produção ocupe uma menor área (Galli & Montesuma, 2005; Kleijn *et al.*, 2009). Por isso, produtos químicos (pesticidas em geral), são utilizados em larga escala para a eliminação de plantas indesejáveis, (as chamadas ervas daninhas), que competem por recursos com plantas de interesse agrônômico. Atendendo a este contexto, o glifosato tem sido um dos herbicidas mais usados, mundialmente, na tentativa de reduzir, se possível eliminar completamente, a frequência de ocorrência de plantas daninhas em área de cultivo agrícola comercial (Galli & Montesuma, 2005; Kleijn *et al.*, 2009).

A expansão do uso do glifosato na última década sustenta-se no desenvolvimento e comercialização de variedades de plantas geneticamente modificadas que, diferentemente das plantas daninhas, são tolerantes ao glifosato (Annett *et al.*, 2014). Nesta configuração, a aplicação de glifosato sobre culturas de interesse comercial de variedades resistentes a este herbicida tende a eliminar apenas as plantas competidoras indesejáveis, garantindo assim maior produtividade por unidade de área plantada. Outro ponto que auxiliou a expansão mundial do uso de herbicidas a base de glifosato, foi a constatação do aumento de produtividade, e de lucratividade, com a sua aplicação quando comparada com métodos mecânicos de eliminação de ervas daninhas competidoras, melhorando a eficiência e a viabilidade econômica com sua aplicação (Gazzeiro *et al.*, 2004).

O glifosato é considerado um herbicida seletivo, pois, age especificamente na enzima EPSPs (5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintase), inibindo sua ação (Sáenz & Di Marzio, 2009). A enzima EPSPs participa da via metabólica responsável pela síntese de aminoácidos aromáticos (Sáenz & Di Marzio, 2009) e, portanto, apresenta grande importância fisiológicas para o metabolismo das plantas de modo geral. A exposição das plantas ao glifosato determina uma redução direta da síntese da EPSPs, levando, conseqüentemente, a uma diminuição da produção de certos aminoácidos indispensáveis para o metabolismo vegetal (Sáenz & Di Marzio, 2009). Além disso, a exposição das plantas ao glifosato também pode reduzir a concentração de clorofila *a*, de fitoalexinas (importante na defesa da planta contra herbivoria, por exemplo) e de lignina (importante componente estrutural da biomassa vegetal)

(Yamada & Castro, 2007; Gomes *et al.*, 2017). Outros efeitos da exposição das plantas ao glifosato, consistem na redução da produção de proteínas essenciais para o centro de reação do fotossistema II e o desvio de carbono do Ciclo de Calvin pelo contínuo consumo da eritrose-4-fosfato na via metabólica dos aminoácidos aromáticos (Yanniccari *et al.*, 2012).

É sabido que, de modo geral, os ambientes aquáticos continentais acabam por receber uma grande quantidade de herbicidas, de todas as naturezas químicas, que são carregados pelas chuvas a partir de plantações próximas. Ao atingir estes ambientes, parte do glifosato é adsorvida por componentes minerais do solo, como óxidos de alumínio e ferro (Colombo, 2012), enquanto que outra parte é quebrada, via ação microbiana, gerando moléculas de ácido aminometilfosfônico (AMPA), seu principal produto de degradação (Bonnet *et al.*, 2007). Assim como o glifosato, parte do AMPA também se encontra imobilizado no solo em associação com óxidos específicos (Colombo, 2012).

A literatura tem sugerido que também o AMPA pode ser uma substância potencialmente tóxica para os vegetais. Gomes (2016) demonstrou, por exemplo, que o AMPA possui efeitos fitotóxicos, uma vez que diminui a fotossíntese e o rendimento quântico do fotossistema II, além de reduzir a biossíntese de clorofila *a*.

Considerando, então, o enorme potencial ecotoxicológico dos herbicidas a base de glifosato, e de seu principal produto de degradação, em ambientes aquáticos, é que o presente estudo foi proposto. O objetivo principal deste estudo experimental foi avaliar se a exposição de macrófitas aquáticas ao herbicida Roundup®, uma das formulações comerciais a base de glifosato mais utilizadas no Brasil, e ao AMPA, é capaz de produzir efeitos fitotóxicos significativos nestas plantas, utilizando como marcadores alguns parâmetros relacionados às suas respostas fotossintéticas.

Baseado nas informações da literatura, como apontado anteriormente, espera-se que, por apresentar as mesmas vias metabólicas nas quais o glifosato atua como inibidor, as espécies de macrófitas aquáticas testadas apresentem respostas fotossintéticas significativamente prejudicadas pela exposição ao Roundup® e ao AMPA. Adicionalmente, espera-se que a magnitude dos efeitos danosos sobre as respostas fotossintéticas das macrófitas aquáticas seja tanto maior quanto maior for a dose de herbicida utilizada nos tratamentos experimentais.

Métodos

Para este estudo, foram utilizados espécimes de quatro espécies de macrófitas aquáticas, a saber: *Egeria densa* Planchon, *Mayaca fluviatilis* Aublet, *Mayaca sellowiana* Kunth e *Myriophyllum aquaticum* (Vellozo) Verdcourt. O material botânico utilizado nos experimentos, que é representado por espécies de ocorrência comum em rios e riachos de regiões tropicais e subtropicais, foi coletado em riachos de pequeno porte localizados na região sudeste do Brasil, particularmente na bacia do Rio do Cervo, situada no município de Assis, região centro-oeste do Estado de São Paulo. Após serem coletados, os espécimes foram colocados em recipientes contendo água do próprio riacho, e levados "in vivo" para o laboratório, onde foi procedida a limpeza, pesagem e, posteriormente, o procedimento experimental propriamente dito.

Durante o processo de limpeza, onde foram retirados os sedimentos e organismos epifíticos associados ao talo e raízes, utilizou-se um microscópio estereoscópico, pincel de cerdas duras e jatos de água destilada. Após a limpeza, os organismos foram transferidos para frascos do tipo Erlenmeyers de 250 mL contendo 100 mL de meio básico de Bold (Watanabe, 2005, modificado) e mantidos por um período de aclimatação de 24 horas em estufas tipo B.O.D. (marca Nova Ética, modelo 411/FDP355), nas mesmas condições de temperatura ($20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5$), irradiância ($140\text{ }\mu\text{mol.m}^{-2}\text{ s}^{-1} \pm 15$) e fotoperíodo (12/12 horas) que foram utilizadas nos experimentos propriamente ditos. A irradiância dentro das estufas B.O.D foi aferida com um quantômetro, marca Li-Cor, modelo LI-189, acoplado ao sensor de quantum esférico, modelo LI-193 SA.

Depois do período de aclimatação, os organismos foram transferidos para frascos do tipo Erlenmeyers contendo um novo meio de cultura, acrescido do herbicida Roundup® nas seguintes concentrações: i) $0,28\text{ mg.L}^{-1}$ de ingrediente ativo (Tratamento 0,28); ii) $3,5\text{ mg.L}^{-1}$ (Tratamento 3,5) e iii) $6,0\text{ mg.L}^{-1}$ (Tratamento 6,0). Estas concentrações foram selecionadas por representarem, respectivamente, a concentração máxima permitida pela lei brasileira (Resolução CONAMA n°357/05) para águas utilizadas em irrigação e consumo animal (as chamadas águas de classe III), a concentração recomendada pelo fabricante para o controle de pragas aquáticas e terrestres (Vera *et al.*, 2012; Giesy *et al.*, 2000) e a maior concentração já encontrada em ambientes aquáticos naturais (Edwards *et al.*, 1980).

Considerando-se o AMPA, foi utilizada nos testes experimentais a concentração de $0,03 \text{ mg.L}^{-1}$ (tratamento AMPA), a qual representa o valor médio das concentrações desta substância reportado para ecossistemas lóticos (Oliveira *et al.*, 2016).

A concentração de exposição para os tratamentos de Roundup® foram calculados com base nos valores de ácido equivalente (a.e.) (360 g.L^{-1}) (Oliveira *et al.*, 2016). Neste sentido, as preparações das formulações correspondentes a cada concentração experimental obedeceram às seguintes diluições (conforme Oliveira *et al.*, 2016): i) adição de $0,77 \mu\text{L}$ de Roundup® em um litro de meio básico de Bold para obter a concentração de $0,28 \text{ mg a.e. L}^{-1}$; ii) adição de $9,7 \mu\text{L}$ de Roundup® em um litro de meio básico de Bold para obter a concentração de $3,5 \text{ mg a.e. L}^{-1}$; iii) adição de $16,6 \mu\text{L}$ de Roundup® em um litro de meio básico de Bold para obter a concentração de $6,0 \text{ mg a.e. L}^{-1}$. Para a preparação do meio experimental contendo o AMPA, adicionou-se 1 mg de AMPA 99% a 1 litro de água destilada e, após essa diluição, retirou-se uma alíquota de 30 mL da solução aquosa de AMPA 1% que, então, foi incorporada a 1 litro de meio básico de BOLD.

Para cada experimento com as concentrações apresentadas acima, houve um grupo controle, onde as plantas foram submetidas ao mesmo meio de cultura, porém sem o herbicida. As amostras utilizadas tanto nos grupos controle como nos frascos com os tratamentos contaram com peso fresco (biomassa vegetal) inicial de $150 \text{ mg} \pm 10$.

O manuseio do herbicida durante a realização dos experimentos foi realizado por operadores trajando os devidos equipamentos individuais de segurança e de proteção respiratória, conforme recomendação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Chaim *et al.*, 1999).

Após um dia de exposição, o meio de cultura foi renovado para que uma eventual depreciação no estoque de nutrientes não tivesse qualquer influência sobre o desenvolvimento dos espécimes. As respostas fotossintéticas das plantas submetidas aos tratamentos com o herbicida e o grupo controle foram mensurados após sete dias do início dos experimentos de exposição (T7) (adaptado a partir de Vera *et al.*, 2012).

Para avaliação dos efeitos do herbicida Roundup® e do AMPA sobre a resposta fotossintética das espécies avaliadas foram utilizadas duas técnicas analíticas: i) curva de evolução do oxigênio dissolvido e ii) fluorescência da clorofila *a*. Os experimentos

realizados com a técnica da curva de evolução do oxigênio dissolvido seguiram os procedimentos gerais relatados por Necchi Júnior (2004a; 2004b) e Oliveira *et al.*, (2016). A partir destes procedimentos, aplicou-se a metodologia das garrafas claras e escuras de modo a avaliar as mudanças nas concentrações de oxigênio no meio após um período de incubação ao final do período experimental, ou seja, em T7 (Littler & Arnold, 1985; Thomas, 1988; Necchi Júnior, 2004a; 2004b) e, a partir destes dados, calcular as taxas fotossintética líquida e de respiração no escuro.

Considerando a avaliação da taxa fotossintética líquida, as mensurações realizadas no T7 contaram com cinco réplicas de cada grupo experimental (incluindo os diferentes tratamentos e o grupo controle) que foram transferidas para frascos de tereftalato de polietileno, com capacidade de 110 mL, com 98,5% de transparência (garrafas claras), contendo meio com as respectivas condições de tratamento e mantidas sob condições constantes de temperatura ($20 \pm 0,5^\circ\text{C}$), irradiância ($140 \pm 15 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$) e agitação ($100 \pm 2,5$ r.p.m.) por um período de incubação de uma hora em incubadoras do tipo B.O.D., marca Nova Ética, modelo 411/FDP355. Para evitar possíveis diferenças nas respostas fotossintéticas devido ao posicionamento dos frascos em relação à fonte de luz, as garrafas contendo as amostras foram constantemente reposicionadas dentro da incubadora, de modo que cada frasco ocupou todas as posições por um mesmo período de tempo. Neste estudo, as amostras tiveram suas concentrações de oxigênio dissolvido quantificadas no início (concentração inicial ou [I]) e no final (concentração final ou [F]) do período de incubação com o auxílio de um oxímetro de bancada equipado com uma sonda com auto agitação (Yellow Springs Instruments, modelo 5100).

Considerando a avaliação da taxa de respiração no escuro, foram repetidos os mesmos procedimentos descritos acima para a taxa fotossintética, porém neste caso as amostras de macrófitas aquáticas foram incubadas em frascos âmbar (garrafas escuras), em condições de ausência completa de iluminação. A avaliação da taxa de respiração no escuro foi realizada em triplicata. Para os cálculos das taxas fotossintéticas e de respiração no escuro das amostras analisadas, foram utilizados os cálculos de acordo com o proposto por Littler & Arnold (1985), através das seguintes fórmulas: (i) $FL = ([F]-[I])\times V/T_i/PS$ e (ii) $R = ([I]- [F])\times V/T_i/OS$, onde FL é a fotossíntese líquida; R é a respiração no escuro; [F] é a concentração final de oxigênio dissolvido após o período de incubação; [I] é a concentração inicial de oxigênio

dissolvido antes do período de incubação; V é o volume do meio no frasco; T_i é o tempo de incubação e PS é o peso seco da amostra.

Para a aplicação da técnica da fluorescência da clorofila a utilizou-se o fluorômetro subaquático Diving-PAM (Walz, Effeltrich, Germany). A técnica foi aplicada após o período de aclimação no escuro de 30 minutos, no dia T7. Para estas análises, oito réplicas de cada tratamento foram posicionadas sobre a fibra óptica do equipamento e, então, iniciada a realização de uma Curva de Indução (Schreiber *et al.*, 1995), utilizando a opção “*Inductive Curve*”. A curva de indução foi realizada com luz actínica com intensidade de $285 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e pulso de saturação a cada 15 segundos, com duração de 0,8 segundos e intensidade de $2.000 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Os parâmetros analisados a partir deste procedimento foram os seguintes:

- 1) Rendimento quântico efetivo do fotossistema II (effective quantum yield), ΦPSII . Este parâmetro indica a eficiência fotoquímica (eficiência de captura de energia) dos centros de reação abertos do PSII de uma planta adaptada a luz. Este parâmetro é calculado a partir da fórmula $\Delta F/F_m'$, onde $\Delta F = F_m' - F_t$, sendo que F_m' é a fluorescência máxima de uma amostra adaptada à luz e F_t é a fluorescência transitória (Genty *et al.*, 1989; Necchi, 2005; Schreiber *et al.*, 1995).
- 2) Rendimento quântico da perda de energia não fotoquímica não regulada no PSII (quantum yield of non-regulated non-photochemical energy loss in PSII), $Y(\text{NO})$. Este parâmetro reflete a fração de energia que é passivamente dissipada nas formas de calor e fluorescência, principalmente devido aos centros de reação do PSII estarem fechados (Klughammer & Schreiber, 2008). Este parâmetro é calculado como $F_t * F_m'^{-1}$.
- 3) Rendimento quântico da perda de energia não fotoquímica regulada no fotossistema II (quantum yield of regulated non-photochemical energy loss in PSII), $Y(\text{NPQ})$. Este parâmetro corresponde à fração de energia dissipada na forma de calor por meio de mecanismos de fotoproteção (NPQ) (Klughammer & Schreiber, 2008). Este parâmetro é calculado como $F_t * F_m'^{-1} - Y(\text{NO})$. Os dois parâmetros apresentados, $Y(\text{NPQ})$ e $Y(\text{NO})$, representam, portanto, componentes da energia total dissipada.

Por fim, os espécimes utilizados no estudo foram mantidos à 70°C em uma estufa de secagem com circulação de ar forçada, marca Tecnal, modelo TE-394/2, até

que fosse obtida a massa constante para determinação da massa seca das amostras. As pesagens das amostras após a secagem foram realizadas com balança analítica, marca Shimadzu, modelo AUW220D.

Os resultados obtidos nos experimentos envolvendo a exposição das espécies de macrófitas testadas às diferentes concentrações de Roundup® foram inicialmente avaliados considerando suas variações nominais (positiva ou negativa) em relação ao grupo controle. A seguir, os dados foram submetidos à estatística descritiva, seguido da aplicação da Análise de Diferenças de Médias de Scott & Knott (Scott & Knott, 1974), utilizando o programa Sisvar (Ferreira, 2000). Do mesmo modo, os resultados obtidos nos experimentos envolvendo a exposição das macrófitas aquáticas ao AMPA foram, inicialmente, avaliados considerando a variação nominal do grupo tratado em relação ao grupo controle. Logo após os dados foram submetidos à estatística descritiva e, então, aplicado o teste *t* Student. A fim de se identificar diferenças estatisticamente significativas, foi adotado como limite qualquer valor de *p* superior a 0,05.

Resultados

A seguir serão apresentados, de forma individual, os resultados dos experimentos de exposição das espécies de macrófitas aquáticas investigadas ao Roundup® e ao AMPA.

i) Efeitos da exposição ao herbicida Roundup®

i.i) Técnica da curva de evolução do oxigênio dissolvido

Em relação à técnica da curva de evolução de oxigênio dissolvido, dois parâmetros foram testados, a taxa fotossintética líquida e a respiração no escuro, para todas as espécies investigadas.

Para a espécie *Egeria densa*, todos tratamentos (0,28, 3,5 e 6,0) mostraram diminuição na taxa fotossintética em relação ao grupo controle, com variação nos valores de -33%, -73% e -94%, respectivamente. A taxa de respiração no escuro, por sua vez, apresentou uma diminuição nos valores em relação ao grupo controle para o tratamento 0,28 (-40%), ao passo que para os tratamentos 3,5 e 6,0 foram registrados

aumentos de +118% e +306%, respectivamente (Fig. 1; Tabela 1). Estatisticamente, não foram encontradas diferenças significativas para o parâmetro da taxa fotossintética entre o tratamento 0,28 e grupo Controle, porém entre os tratamentos 3,5 e 6,0 ocorreu diferença estatística significativa, enquanto que para o parâmetro respiração no escuro não foram encontradas diferenças significativas entre tratamentos e grupo controle (Fig. 1; Tabela 1).

A espécie de macrófita aquáticas, *Mayaca fluviatilis*, exibiu, em relação ao grupo controle, um aumento na taxa fotossintética de +32% no tratamento 0,28, diferentemente do observado para o tratamento 3,5 que mostrou redução de -22% (Fig. 2; Tabela 1). Quanto à respiração no escuro, essa mesma espécie de macrófita aquática, registrou uma diminuição em relação ao grupo controle no tratamento 0,28 (-7%), enquanto que no tratamento 3,5 foi reportado aumento no valor relativo de +28% (Fig. 2; Tabela 1). No experimento envolvendo o tratamento 6,0 para esta espécie houve perda de amostra, de modo que os dados obtidos não foram considerados confiáveis e, por isso, não estão apresentados.

Os dados das análises estatísticas mostram que não houve diferença estatisticamente significativa em relação à taxa fotossintética entre os tratamentos e o grupo controle. Por sua vez, para os valores obtidos para o parâmetro respiração no escuro observou-se que o tratamento 3,5 apresentou diferença estatisticamente significativa em comparação ao grupo controle (Fig. 2; Tabela 1).

Considerando os dados da espécie *Mayaca sellowiana*, registra-se que todos os tratamentos sob exposição ao herbicida Roundup® (0,28, 3,5 e 6,0) apresentaram diminuição na taxa fotossintética, da ordem de -104%, -8% e -113% respectivamente. Em relação à taxa de respiração no escuro, os tratamentos 0,28 e 3,5 mostraram diminuição de -38% e -212% nos seus valores em relação ao grupo controle, respectivamente, enquanto que o tratamento 6,0 revelou aumento da ordem de +1.053% em relação ao grupo controle. Destaca-se que para este último resultado houve a perda de uma das três amostras testadas. A partir dos testes estatísticos realizados observou-se que não foram encontradas diferenças significativas, tanto para os dados referentes à taxa fotossintética, quanto para os dados relativos à taxa de respiração no escuro (Fig. 3; Tabela 1).

A espécie *Myriophyllum aquaticum*, apresentou aumento em relação ao grupo controle para os dois parâmetros analisados. Para a taxa fotossintética, os tratamentos 0,28, 3,5 e 6,0 aumentaram seus valores na proporção de +23%, +56%

e +53%, respectivamente, enquanto que para a taxa de respiração no escuro, estes mesmos tratamentos registraram aumento de +38%, +25% e +63%, respectivamente. Para os dados referentes à esta espécie de macrófita também não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para nenhuma dos dois parâmetros testados (Fig. 4; Tabela 1).

i.ii) Técnica da fluorescência da clorofila a

Em relação a fluorescência da clorofila *a*, três parâmetros experimentais foram testados, YII (rendimento quântico efetivo do PSII - Φ PSII); Y(NO) (dissipação de calor pelo centro de reação do PSII) e Y(NPQ) (dissipação de calor no complexo antena do PSII).

Considerando a espécie *Egeria densa*, o parâmetro YII, para todos tratamentos testados (0,28, 3,5 e 6,0), apresentou aumento nos seus valores em relação ao grupo controle. Estes aumentos foram da ordem de +67%, +63% e +90% respectivamente (Fig. 5; Tabela 2). Este mesmo padrão de aumento nos valores dos tratamentos em relação ao grupo controle também foi reportado para o parâmetro Y(NPQ) (+42%, +54% e +28%, respectivamente) (Fig. 5; Tabela 2). Já para o parâmetro Y(NO) foi observada uma diminuição nos valores em relação ao grupo controle para todos tratamentos de exposição ao herbicida Roundup® testados (-37% para 0,28, -40% para 3,5 e -40% para 6,0).

A partir desses dados, foram constatadas diferenças estatisticamente significativas para todos tratamentos (0,28 3,5 e 6,0) em relação ao grupo controle, para todos os três parâmetros analisados (Fig. 5; Tabela 2).

A espécie *Mayaca fluviatilis*, também apresentou para o parâmetro YII aumento nos valores dos tratamentos experimentais 0,28 e 3,5 em relação ao grupo controle: +5% e +10%, respectivamente. Quanto ao parâmetro Y(NO), foram registrados aumentos em relação ao grupo controle de +11% para o tratamento 0,28, contudo para o tratamento 3,5 os experimentos revelaram uma redução de -2% (Fig. 6; Tabela 2). Por fim, para o parâmetro Y(NPQ), a espécie *M. fluviatilis* registrou diminuição nos valores em relação ao grupo controle, da ordem de -29% e -10% para os tratamentos 0,28 e 3,5, respectivamente.

Para esta espécie de macrófita não foram registradas diferenças estatisticamente significativas para nenhum tratamento (0,28 e 3,5), para nenhum dos parâmetros estudados (Fig. 6; Tabela 2).

Considerando a espécie *Mayaca sellowiana*, o parâmetro YII mostrou aumento de valores em relação ao grupo controle para todos os tratamentos experimentais (0,28, 3,5 e 6,0), da ordem de +40%, +99% e +83%, respectivamente, enquanto que o parâmetro Y(NO) registrou-se diminuição, em relação ao grupo controle, de -10% para o tratamento 0,28, de -15% para o tratamento 3,5 e de -4% para o tratamento 6,0 (Fig. 7; Tabela 2). Assim como observado para Y(NO), para o parâmetro Y(NPQ), foram registradas diminuições nos valores em relação ao grupo controle: -11% para o tratamento 0,28, -44% para o tratamento 3,5 e -54% para o tratamento 6,0.

As análises estatísticas realizadas com os parâmetros oriundos da técnica da fluorescência da clorofila *a* para esta espécie de macrófita mostraram diferenças estatisticamente significativas entre os valores de YII, do tratamento 3,5 e do grupo controle (Fig. 7; Tabela 2) e entre os valores de Y(NPQ) dos tratamentos 3,5 e 6,0 em relação ao grupo controle (Fig. 7; Tabela 2).

O parâmetro YII relativo aos experimentos envolvendo a espécie *Myriophyllum aquaticum* registrou aumento de +0,63% ao comparar os valores obtidos no tratamento 0,28 e no grupo controle, enquanto que para os tratamentos 3,5 e 6,0 esta mesma comparação com o grupo controle revelou diminuição de valores em ambos os casos: -8% e -5%, respectivamente. Por sua vez, a comparação do parâmetro Y(NO) entre os tratamentos experimentais e o grupo controle mostrou incremento nos valores em todas as concentrações testadas: +36% para o tratamento 0,28, +19% no tratamento 3,5 e +35% para o tratamento 6,0. Por fim, os valores do parâmetro Y(NPQ) diminuiram nos tratamentos 0,28, 3,5 e 6,0 quando comparados ao grupo controle: -44%, -12% e -36% respectivamente.

Para esta espécie de macrófita não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros experimentais associados à fluorescência da clorofila *a* (Fig. 8; Tabela 2).

ii) Efeitos da exposição ao AMPA

ii.i) Técnica da curva de evolução do oxigênio dissolvido

Assim como realizado para o herbicida Roundup®, a partir da técnica da curva de evolução do oxigênio dissolvido, foram investigados dois parâmetros fotossintéticos sob efeitos da exposição ao AMPA, a taxa fotossintética líquida e a taxa de respiração no escuro, para as quatro espécies investigadas neste estudo.

A espécie *Egeria densa* apresentou, sob exposição ao AMPA na concentração experimental, uma diminuição de -135% na taxa fotossintética líquida e um aumento de +139% na taxa de respiração no escuro, quando comparado aos valores registrados pelo grupo Controle (Fig. 9; Tabela 3). O teste *t* Student identificou diferenças estatisticamente significativas entre o grupo experimental (sob exposição ao AMPA) e o grupo controle tanto para a taxa fotossintética líquida, quanto para a taxa de respiração no escuro (Fig. 9; Tabela 3).

Para a espécie *Mayaca fluviatilis*, foi registrada uma diminuição nos valores associados ao tratamento sob exposição ao AMPA para os dois parâmetros testados quando comparados ao grupo controle: -38% para a taxa fotossintética líquida e -8% para a taxa de respiração no escuro (Fig. 10; Tabela 3). No caso desta espécie de macrófita, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo experimental e o grupo controle para ambos parâmetros (Fig. 10; Tabela 3).

Os dados experimentais relativos à espécie de macrófita *Mayaca sellowiana* mostraram uma diminuição de -19% na taxa fotossintética líquida e um aumento de +99% na taxa de respiração no escuro em relação ao grupo controle (Fig. 11; Tabela 3). Para esta espécie também não foram encontradas diferenças estatísticas significativas para os parâmetros testados entre os grupos experimental e controle (Fig. 11; Tabela 3).

Por fim, a espécie *Myriophyllum aquaticum* apresentou um aumento, em relação ao grupo controle, nos valores dos dois parâmetros testados, sendo de +75% para a taxa fotossintética líquida e de +37% na taxa de respiração no escuro (Fig. 12; Tabela 3). O teste *t* Student revelou diferença estatística significativa entre o grupo tratado com AMPA e o grupo controle apenas para a taxa fotossintética líquida (Fig. 12; Tabela 3).

ii.ii) Técnica da fluorescência da clorofila *a*

Para a fluorescência da clorofila *a*, assim como observado para Roundup®, três parâmetros foram testados, agora, sob efeito da exposição ao AMPA: YII, Y(NO) e Y(NPQ).

A espécie *Egeria densa*, apresentou um aumento de +4% e +28% nos valores de YII e de Y(NPQ), respectivamente, em relação ao grupo controle, enquanto que para Y(NO) foi verificada uma diminuição de -13%. Apesar das diferenças numéricas observadas não foram registradas quaisquer diferenças estatisticamente significativas entre os valores dos parâmetros testados (Fig. 13; Tabela 4).

A espécie *Mayaca fluviatilis*, diferentemente do observado para *E. densa*, mostrou uma diminuição nos valores de YII (-23% em relação ao grupo controle) e Y(NPQ) (-21%) (Fig. 14; Tabela 4). Já para o parâmetro Y(NO), houve o registro de um aumento para o tratamento com AMPA em relação ao grupo controle (+25%) (Fig. 14; Tabela 4). Para a espécie *M. fluviatilis* também não foram encontradas diferenças estatísticas significativas de qualquer natureza (Fig. 14; Tabela 4).

Considerando a espécie *Mayaca sellowiana*, observou-se a ocorrência de uma diminuição nos valores de YII no grupo tratado com AMPA (-11% em relação ao grupo controle), assim como nos valores de Y(NPQ) (-14%) (Fig. 15; Tabela 4). Para o parâmetro Y(NO), entretanto, registrou-se um aumento (+10% em relação ao grupo controle) nos valores associados ao grupo tratado com AMPA. Novamente, não foram registradas diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros testados entre os grupos tratados com AMPA e controle (Fig. 15; Tabela 4).

Finalmente, os dados experimentais relativos à espécie *Myriophyllum aquaticum* mostraram que houve diminuição, da ordem de -4%, nos valores de parâmetro YII no grupo tratado com AMPA em relação ao grupo controle (Fig. 16; Tabela 4). Resposta da mesma natureza, ou seja, uma redução nos valores, também foi observada para o parâmetro Y(NPQ) do grupo tratado com AMPA (-44%) (Fig. 16; Tabela 4). Já para o parâmetro Y(NO), observou-se um aumento de +41% no grupo tratado com AMPA. O teste *t* Student revelou a ocorrência de diferenças estatisticamente significativas para os valores de Y(NO) e Y(NPQ) entre o grupo tratado com AMPA e o grupo controle (Fig. 16; Tabela 4).

Discussão

Os resultados dos experimentos envolvendo a análise de parâmetros fotossintéticos de quatro espécies de macrófitas submetidas à exposição a diferentes concentrações de herbicidas à base de glifosato, Roundup® e AMPA, sugerem, em regra, a ocorrência de poucos efeitos significativos, positivos ou negativos, sobre a resposta fotossintética das espécies testadas. Entretanto, embora não se concretize como um padrão geral, os resultados também mostraram que houve, eventualmente, registros de efeitos significativos para alguns parâmetros em algumas espécies. Um padrão de resposta espécie-específico como este indica, em última análise, que há diferenças no processamento metabólico destas substâncias entre as espécies de macrófitas estudadas. Por esta razão, os efeitos produzidos pela exposição aos herbicidas, e concentrações, testados serão discutidos individualmente para cada espécie.

A espécie de macrófita *Egeria densa*, quando exposta ao herbicida Roundup®, apresentou redução na taxa fotossintética líquida, particularmente para as maiores concentrações (3,5 e 6,0 mg.L⁻¹). Estes resultados sugerem que *E. densa* foi, entre as quatro espécies estudadas, aquela que, evidentemente, sofreu efeitos negativos significativos sob exposição a este herbicida, com clara perda de eficiência fotossintética. A perda de eficiência fotossintética sob exposição ao Roundup® já foi observada para outros produtores primários de riachos, entre os quais, um claro exemplo é a espécie de carófitas *Nitella moccrocarpa* ver. *Wrightii* (Charophyceae, Chlorophyta) (Oliveira *et al.*, 2016). Neste estudo, os autores mostraram que, de modo igual ao observado para *E. densa* no presente estudo, a taxa fotossintética líquida diminuiu, enquanto que a respiração no escuro aumentou à medida que os exemplares algais foram expostos às concentrações de 3,5 e 6,0 mg.L⁻¹ de Roundup®. Do mesmo modo, o aumento significativo tanto de YII como de Y(NPQ) observado para *E. densa* em todas as concentrações testadas de Roundup® revelam que esta espécie teve um aumento no seu metabolismo (também indicado pelo aumento nos valores de respiração no escuro, embora não tenha sido registrada diferença significativa para este parâmetro, em relação ao grupo controle), sugerindo que os espécimes poderiam, potencialmente, estar experimentando um estresse fisiológico quando expostos ao herbicida (Kramer *et al.*, 2004; Klughammer & Schreiber, 2008; Vilas Boas *et al.*, 2018).

É preciso observar estes resultados à luz do fato que a espécie *E. densa* é uma das espécies de macrófitas mais bem distribuídas em águas continentais tropicais e subtropicais do Brasil. Neste sentido, esta macrófita se distribui desde Minas Gerais, Espírito Santo até o sul do país, invadindo o Uruguai e Argentina (Cook & Urmi-konig, 1984). Nestes ambientes, *E. densa* representa um dos principais produtores primários, respondendo por uma parte significativa da produção fotossintética, o que impõe um potencial problema ambiental quando da presença do herbicida Roundup® em concentrações superiores a 3,5 mg.L⁻¹ na coluna d'água.

Como observado por Tanaka *et al.* (2002), *E. densa* pode apresentar injúria leve ou moderada quando exposta a uma quantidade de 10 mg.L⁻¹ de herbicida Roundup®, ao passo que uma outra espécie do mesmo gênero, *E. najas*, nesta mesma condição, pode apresentar injúria severa e até morte da planta.

Outros estudos também têm demonstrado efeitos negativos variados em outras espécies de macrófitas aquáticas expostas ao glifosato, quer sob a forma da substância pura quer sob a forma de formulações comerciais. Campos (2015), por exemplo, investigou seis espécies de macrófitas aquáticas coletadas na região amazônica, entre elas *Cabomba aquatica* (uma espécie de macrófita aquática muito frequente reportada em regiões tropicais e subtropicais do Brasil), e registrou para todas, efeitos negativos sobre vários parâmetros morfológicos e fisiológicos testados (p.ex., tamanho da planta, tamanho da folha, tamanho da raiz, número de folhas, peso fresco e CE50).

As similaridades, fisiológicas e bioquímicas, entre algas verdes (Chlorophyta) e plantas terrestres sugerem que este filo algal pode, assim como observado para *E. densa* no presente estudo e para outras espécies na literatura, ser particularmente suscetíveis à herbicidas a base de glifosato (Annett *et al.*, 2014). Oliveira *et al.* (2016) corroboram esta tendência ao mostrar que as algas verdes *Desmidium grevillei* e *Spirogyra sp.* sofreram uma queda significativa na taxa fotossintética líquida quando expostas a concentrações de 3,5 mg.L⁻¹ e 6,0 mg.L⁻¹ de glifosato grau técnico.

Os resultados observados para as espécies *Mayaca sellowiana*, *Mayaca fluviatilis* e *Myriophyllum aquaticum*, por sua vez, não mostraram, como regra, diferenças estatísticas significativas em relação ao grupo controle para os parâmetros fotossíntese líquida e respiração no escuro (Tabela 1) quando expostas ao herbicida Roundup®, com exceção do aumento significativo da respiração no escuro observado em *M. fluviatilis* sob exposição a uma concentração de 3,5 mg.L⁻¹. Como exposto

acima para a espécie *E. densa*, aumento na taxa de respiração no escuro sugere que esta espécie esteja experimentando um estresse fisiológico pela presença do herbicida no meio (Kramer *et al.*, 2004; Klughammer & Schreiber, 2008; Vilas Boas *et al.*, 2018). Entretanto, como a taxa fotossintética líquida não apresentou correspondente efeito negativo, aparentemente, para esta espécie o potencial estresse fisiológico produzido pelo herbicida não foi capaz de comprometer a sua eficiência fotossintética.

Do mesmo modo, para os parâmetros calculados a partir da técnica de fluorescência da clorofila *a* nas amostras expostas ao Roundup®, a regra geral para estas três espécies foi a não observância de diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle (Tabela 2). Uma exceção, entretanto, merece um destaque específico. Para a espécie *M. sellowiana* foi observada redução significativa dos valores de $Y(NPQ)$ (nas concentrações de 3,5 mg.L⁻¹ e 6,0 mg.L⁻¹) associada a um aumento significativo nos valores de YII (3,5 mg.L⁻¹) em relação ao grupo controle. Considerando que $Y(NPQ)$ representa perda regulada de energia não-fotoquímica e que o YII representa aumento na conversão de energia fotoquímica, estes resultados sugerem que esta espécie respondeu de forma altamente adaptada ao potencial “estresse” produzido pela presença do Roundup® no meio.

No estudo feito por Cedergreen & Olesen (2009), utilizando cevada e pequenas quantidades de glifosato, foi constatado um crescimento da planta associado a um aumento na taxa respiratória quando a planta foi exposta a este herbicida. Isso pode ser explicado pelo aumento na atividade metabólica desta espécie que, provavelmente, estaria relacionado a algum processo de desintoxicação, inativação ou compartimentação do glifosato dentro da planta. No presente estudo não foram realizados testes fisiológicos capazes de identificar processos semelhantes aos apontados por Cedergreen & Olesen (2009) nas espécies aqui investigadas, porém, fenômenos desta natureza poderiam estar relacionados com os resultados para *M. fluviatilis*, *M. aquaticum* e, principalmente, para *M. sellowiana*.

A análise dos resultados experimentais relativos aos tratamentos com AMPA permite observar que para a maioria das espécies e parâmetros, tanto os oriundos da técnica da curva de evolução do oxigênio dissolvido como aqueles associados à fluorescência da clorofila *a*, quase nenhuma diferença estatisticamente significativa foi registrada. Neste sentido, aparentemente, o AMPA, assim como o Roundup®, afeta apenas marginalmente a resposta fotossintética das espécies testadas. Resultados

semelhantes já foram reportados para outros produtores primários de ecossistemas lóticos tropicais. Um exemplo relaciona-se com a espécie de macroalga do filo Chlorophyta *Desmidium grevillei*. Esta espécie não registrou diferença estatística significativa em amostras expostas à esta substância, em relação ao seu grupo controle, para nenhum dos parâmetros fotossintéticos analisados por Oliveira *et al.* (2018).

A despeito do padrão geral de aparente indiferença à exposição ao AMPA, *E. densa* e *M. aquaticum* registraram alguns desvios em relação à esta regra. Para *E. densa*, por exemplo, a presença de AMPA no meio produziu uma redução da taxa fotossintética líquida, associada a um grande aumento na taxa de respiração no escuro. Destaca-se, entretanto, que tais efeitos sobre a fotossíntese líquida e a respiração no escuro não foram acompanhados por efeitos significativos nos parâmetros relativos à fluorescência da clorofila *a*. Sugere-se, portanto, que o AMPA afeta, de modo geral, processos ecofisiológicos desta espécie que, eventualmente, não passam necessariamente por processos relacionados à fixação do Carbono. Neste contexto, há, portanto, a real possibilidade de a redução na taxa fotossintética líquida ter sido determinada por efeito de um balanço produção/respiração desfavorável relacionado ao aumento do estresse ambiental.

Para *M. aquaticum*, por sua vez, os resultados mostraram que houve aumento significativo na taxa fotossintética líquida desta espécie quando exposta ao AMPA. Este aparente contrassenso também tem sido reportado para outras espécies de produtores primários (Oliveira *et al.*, 2016). Sugere-se, nestes casos, que a degradação fotolítica e hidrolítica do AMPA seja capaz de produzir fósforo livre no meio (Giesy *et al.*, 2000), o qual é utilizado pela planta como fonte primária para o aumento da sua taxa fotossintética.

Considerando, portanto, os resultados obtidos através dos experimentos de exposição de quatro espécies de macrófitas aos herbicidas à base de glifosato, Roundup® e AMPA, é possível indicar as seguintes conclusões:

- 1) As respostas fotossintéticas dos espécimes sob exposição aos herbicidas testados, no geral, registraram poucas diferenças estatisticamente significativas, positivos ou negativos, em relação às respostas fotossintéticas observadas para os espécimes do grupo controle;

- 2) Embora, tenham sido observados poucos efeitos significativos nas respostas fotossintéticas das espécies testadas, aqueles que assim foram não registraram um

padrão global geral para as macrófitas como um todo, sendo, de todo modo, espécie-específico. Neste sentido, a espécie que demonstrou maior grau de influência na sua resposta fotossintética foi *Egeria densa*. Para esta espécie, tanto os dados oriundos da técnica da curva de evolução do oxigênio dissolvido como da fluorescência da clorofila *a*, sugerem que o Roundup® e AMPA conduzem a uma perda de eficiência fotossintética. Do ponto de vista ecológico, é preciso levar este resultado em consideração, uma vez que esta espécie de macrófita é uma das mais bem distribuídas em ambientes aquáticos tropicais e subtropicais do Brasil.

3) Em contraposição à *E. densa*, aparentemente, a espécie *Myriophyllum aquaticum* tende a aumentar sua produtividade fotossintética quando exposta a um meio com AMPA. Assim como observado para *E. densa*, este efeito pode produzir desequilíbrios ecológicos nos ambientes onde *M. aquaticum* está entre as espécies dominantes em termos quantitativos.

4) Os eventuais efeitos da exposição ao Roundup® e ao AMPA sobre as espécies estudadas não guardam relação quantitativa direta com as concentrações experimentais utilizadas. Porém, nenhum resultado significativo foi observado para os experimentos que utilizaram as concentrações de 0,28 mg/L, a concentração máxima permitida pela legislação brasileira, exceto para os parâmetros oriundos da técnica da fluorescência da clorofila *a* (YII, Y(NO) e Y(NPQ)) para a espécie *E.densa*.

Referências Bibliográficas

- ANNETT, R., H. R. HABIBI & A. HONTELA. 2014. Impact of glyphosate and glyphosatebased herbicides on the freshwater environment. *Journal of Applied Toxicology*, 34: 458-479.
- BAKER, N. R. & E. ROSENQVIST. 2004. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of Experimental Botany*, 55: 1607-1621.
- BONNET, J. L., F. BONNEMOY, M. DUSSER & J. BOHATIER. 2007. Assessment of the potential toxicity of herbicides and their degradation products to non-target cells using two microorganisms, the bacteria *Vibrio fischeri* and the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *Environmental Toxicology*, 22: 78–91.

- CAMPOS, P. S. 2015. 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. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Amazonas. Brasil.
- CEDERGREEN, N. & C. F. OLESEN. 2009. Can glyphosate stimulate photosynthesis? *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 96: 140-148.
- CHAIM, A., R. T. S. FRIGHETTO & P. J. VALARINI. 1999. Manual de manejo de agrotóxico e qualidade ambiental. Embrapa Meio Ambiente, Brasília.
- COLOMBO, S. M. 2012. Glifosato e ácido aminometilfosfônico: desenvolvimento de metodologias de análise por injeção sequencial e investigação sobre processos adsorptivos e fisiológicos de interesse ambiental. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. Brasil.
- COOK, C. D. K & K. URMI-KONIG. 1984. A revision of the genus *Egeria* (Hydrocharitaceae). *Aquatic Botany*, 19: 73-96.
- DEMMIG ADAMS, B., W. W. ADAMS III, D. H. BARKER, B. A. LOGAN, D. R. BOWLING & A. S. VERHOEVEB. 1996. Using chlorophyll fluorescence to assess the fraction of absorbed light allocated to thermal dissipation of excess excitation. *Physiologia Plantarum*, 98: 253-264.
- DILL, G. M. 2005. Glyphosate-resistant crops: history, status and future. *Pest Management Science*, 61: 219-224.
- EDWARDS, W. M., G. B. TRIPLETT & R. M. KRAMER. 1980. A watershed study of glyphosate transport in runoff. *Journal of Environmental Quality*, 9: 661-665.
- FERREIRA, D. F. 2000 Análises estatísticas por meio do Sisvar para Windows 4.0. Reunião Anual Brasileira da Sociedade Internacional de Biometria, São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 258p
- GALLI, A. J. & M. C. MONTESUMA. 2005. Alguns Aspectos da Utilização do Herbicida Glifosato na Agricultura. Editora Acadcom, Santo André.
- GAZZIERO, D. L. P.; VARGAS, L.; ROMAN, E. S. 2004. Manejo e controle de plantas daninhas na cultura da soja. In: Vargas, L.; Roman, E. S. (Eds.). Manual de manejo

e controle de plantas daninhas. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. p.595-635.

GENTY, B., J. M. BRIANTAIS & N. R. BAKER. 1989. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 990: 87-92.

GIESY, J. P., S. DOBSON & K. R. SOLOMON. 2000. Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 167: 35-120.

GOMES, M. P., S. G. LE MANAC'H, S. MACCARIO, M. LABRECQUE, M. LUCOTTE & P. JUNEAU. 2016. Differential effects of glyphosate and aminomethylphosphonic acid (AMPA) on photosynthesis and chlorophyll metabolism in willow plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 130: 65-70.

GOMES, M.CP., S. G. LE MANAC'H, L. HÉNAULT-ETHIER, M. LABRECQUE, M. LUCOTTE & P. JUNEAU. 2017. Glyphosate-Dependent Inhibition of Photosynthesis in Willow. *Frontiers in Plant Science*, 8: 207.

KITTLE III, R. P. & K. J. McDERMID. 2016. Glyphosate herbicide toxicity to native Hawaiiin macroalgal and seagrass species. *Journal of Applied Phycology*, 28: 2597- 2604.

KLEIJN, D., F. KOHLER, A. BALDI, P. BATARY, E. D. CONCEPCION, Y. CLOUGH, M. DIAZ, D. GABRIEL, A. HOLZSCHUH, E. KNOP, A. KOVACS, E. J. P. MARSHALL, T. TSCHARNTKE & J. VERHULST. 2009. On the relationship between farmland biodiversity and land-use intensity in Europe. *Proceedings of the Royal Society*, 276: 903-909.

KLUGHAMMER, C. & U. SCHREIBER. 2008. Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the saturation pulse method. *PAM Application Notes*, 1: 27 – 35.

KRAMER D. M, G. JOHNSON, O. KIIRATS & G. E. EDWARDS. 2004. New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. *Photosynthetic Research*, 79: 209–218.

- LITTLER, M. M. & K. E. ARNOLD. 1985. Electrodes and chemicals. In: Little, M.M. & Little, D.S. (eds). Handbook of phycological methods. Ecological field methods: Macroalgae. Cambridge University Press, Cambridge, 349 - 375.
- MACHADO, C. & F. ROCHA. 1998. Control of *Myriophyllum aquaticum* in drainage and irrigated channels of the Mondego river valley, Portugal. In: Management and ecology of aquatic plants. Proceedings of the 10th EWRS International Symposium on Aquatic Weeds, Lisbon, Portugal.
- NECCHI JÚNIOR, O. 2004a. Photosynthetic response to temperature in tropical lotic macroalgae. *Phycological Research*, 52: 140-148.
- NECCHI JÚNIOR, O. 2004b. Light-related photosynthetic characteristics of lotic macroalgae. *Hydrobiologia*, 525: 139-155.
- NECCHI JÚNIOR, O. 2005. Light-related photosynthetic characteristics of freshwater rhodophytes. *Aquatic Botany*, 82: 193-209.
- OLIVEIRA, R. C., L. K. VILAS BOAS & C. C. Z. BRANCO. 2016. Assessment of the potencial toxicity of glyphosate-based herbicides on the photosynthesis of *Nitella microcarpa* var. *wrightii* (Charophyceae). *Phycologia*, 55: 577-584.
- OLIVEIRA, R. C. 2018. Respostas fotossintéticas de macroalgas lóticadas do filo chlorophyta submetidas à herbicidas à base de glifosato. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista. Brasil
- SÁENZ, M. E. & W. D. DI MARZIO. 2009. Ecotoxicidad del herbicida glifosato sobre cuatro algas clorófitas dulceacuícolas. *Limnetica*, 28: 149-158.
- SCHREIBER, U., W. BILGER & C. NEUBAUER. 1995. Chlorophyll fluorescence as a nonintrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze, E.D. & M. M. Caldwell (eds.): Ecophysiology of Photosynthesis. Springer-Verlag, Berlin, 49-70.
- SCOTT, A. J. & M. A. KNOTT. 1974. A Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, 30: 507-12.
- THOMAS, M. L. H. 1988. Photosynthesis and respiration of aquatic macro – flora using the light and dark bottle oxygen method and dissolved oxygen analyser. In: LOBBAN, C. S., D. J. CHAPMAN & B. P. KREMER (eds.): Experimental

Phycology: A laboratory Manual. Cambridge University Press, Cambridge, 64 - 77.

- TANAKA, R. H., E. D. VELINI, D. MARTINS, A. A. BRONHARA, M. A. S. SILVA, A. L. CAVENAGHI & M. S. TOMAZELA. 2002. Avaliação de herbicidas para o controle de *Egeria* em laboratório, caixa d'água e represa sem fluxo de água. *Planta Daninha*, 20: 73-81.
- TURGUT, C. & A. FOMIN, A., 2002. Sensitivity of the rooted macrophyte *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdcourt to seventeen pesticides determined on the basis of EC50. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 69: 601–608.
- VAN KOOTEN, O. & J. F. H. SNEL. 1990. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. *Photosynthesis Research*, 25: 147 – 150.
- VERA, M. S., E. DI FIORI, L. LAGOMARSINO, R. SINISTRO, R. ESCARAY, M. M. IUMMATO, A. JUÁREZ, M C. R. MOLINA, G. TELL & H. PIZARRO. 2012. Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor® on freshwater microbial communities. *Ecotoxicology*, 21: 1805-1816.
- VILAS BOAS, L. K. 2018. Efeitos das variações de temperaturas relacionadas às mudanças climáticas globais sobre as respostas fotossintéticas de macroalgas lóxicas tropicais. Tese de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. Brasil.
- YANNICCARI, M., E. TAMBUSI, C. ISTILART & A. M. CASTRO. 2012. Glyphosate effects on gas exchange and chlorophyll fluorescence responses of two *Lillium perenne* L. biotypes with differential herbicide sensitivity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 57: 210-217.
- YAMADA, T. & P. R. C. CASTRO. 2007. Efeitos do glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agronômicas. *International Plant Nutrition Institute*, 119: 1-32.
- WATANABE, M. M. 2005. Freshwater Culture Media. In: Andersen, R.A. (ed.). *Algal Culture Techniques*. Elsevier, Amsterdam, 13-20.

Figuras e Tabelas

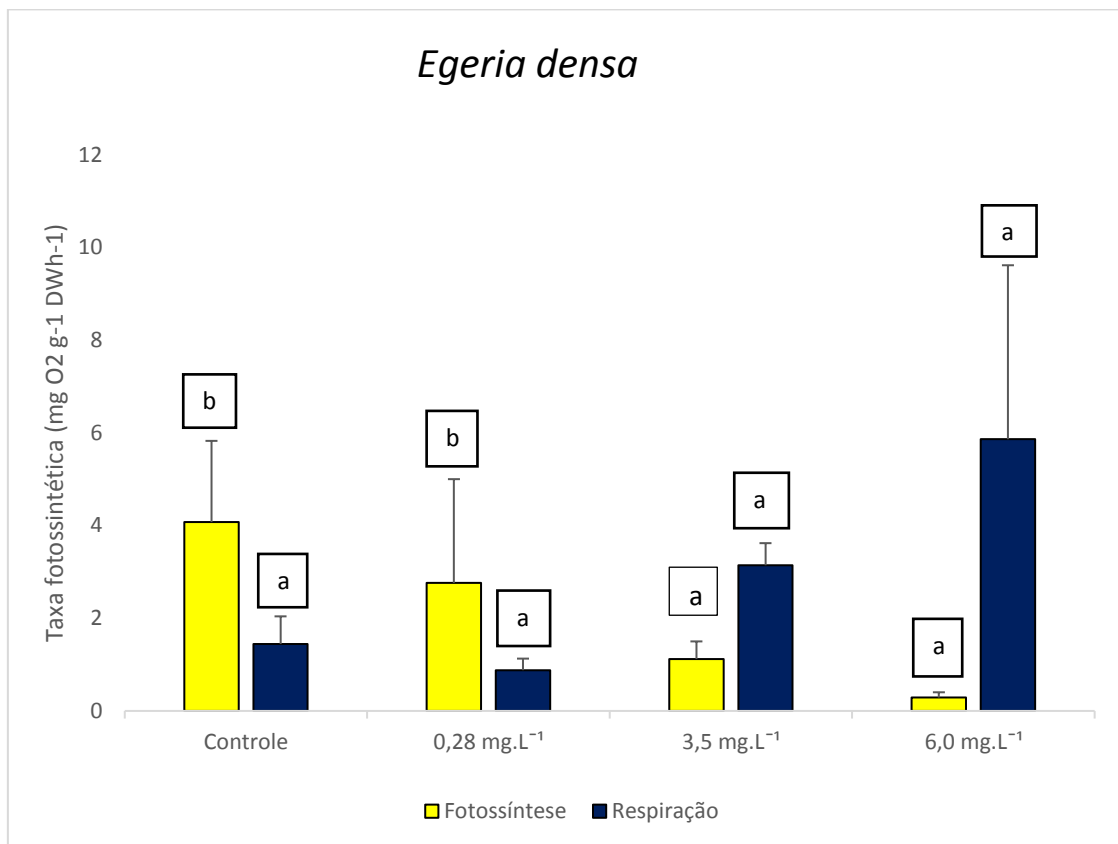


Figura 1. Taxa fotossintética líquida (amarelo) e taxa de respiração no escuro (azul) de *Egeria densa* em diferentes concentrações de herbicida Roundup®. As barras indicam as médias \pm desvio padrão e letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

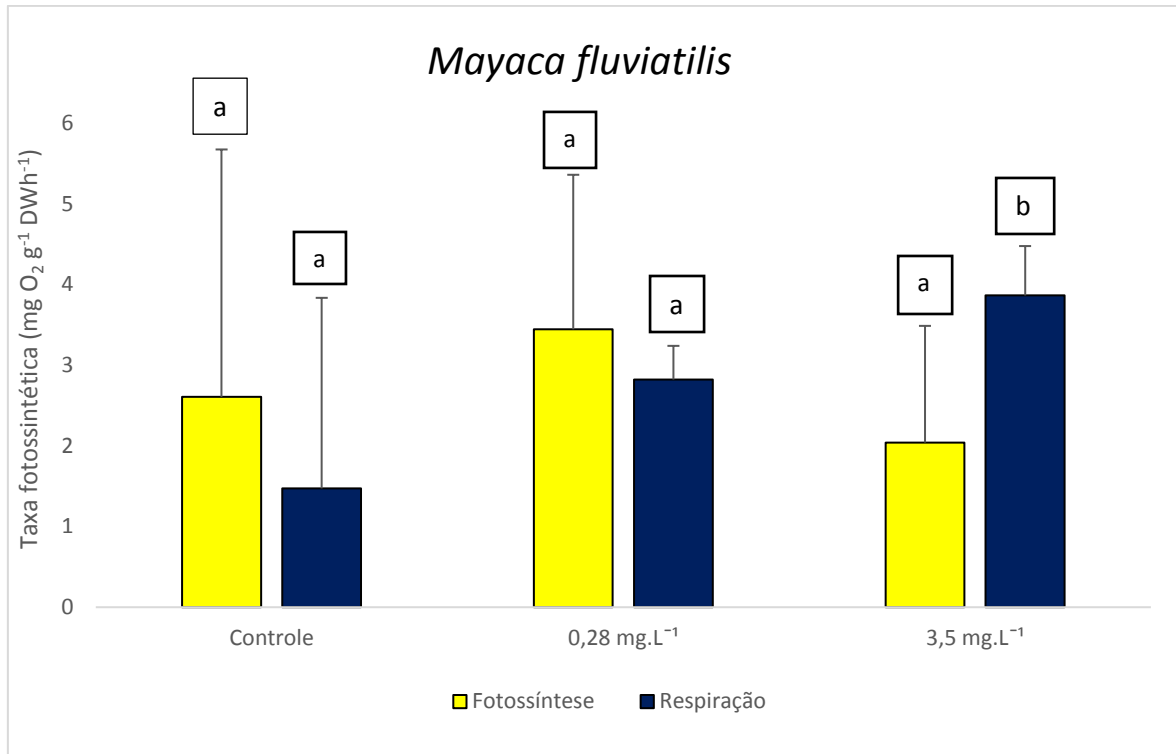


Figura 2. Taxa fotossintética líquida (amarelo) e taxa de respiração no escuro (azul) de *Mayaca fluviatilis* em diferentes concentrações de herbicida Roundup®. As barras indicam as médias \pm desvio padrão e letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

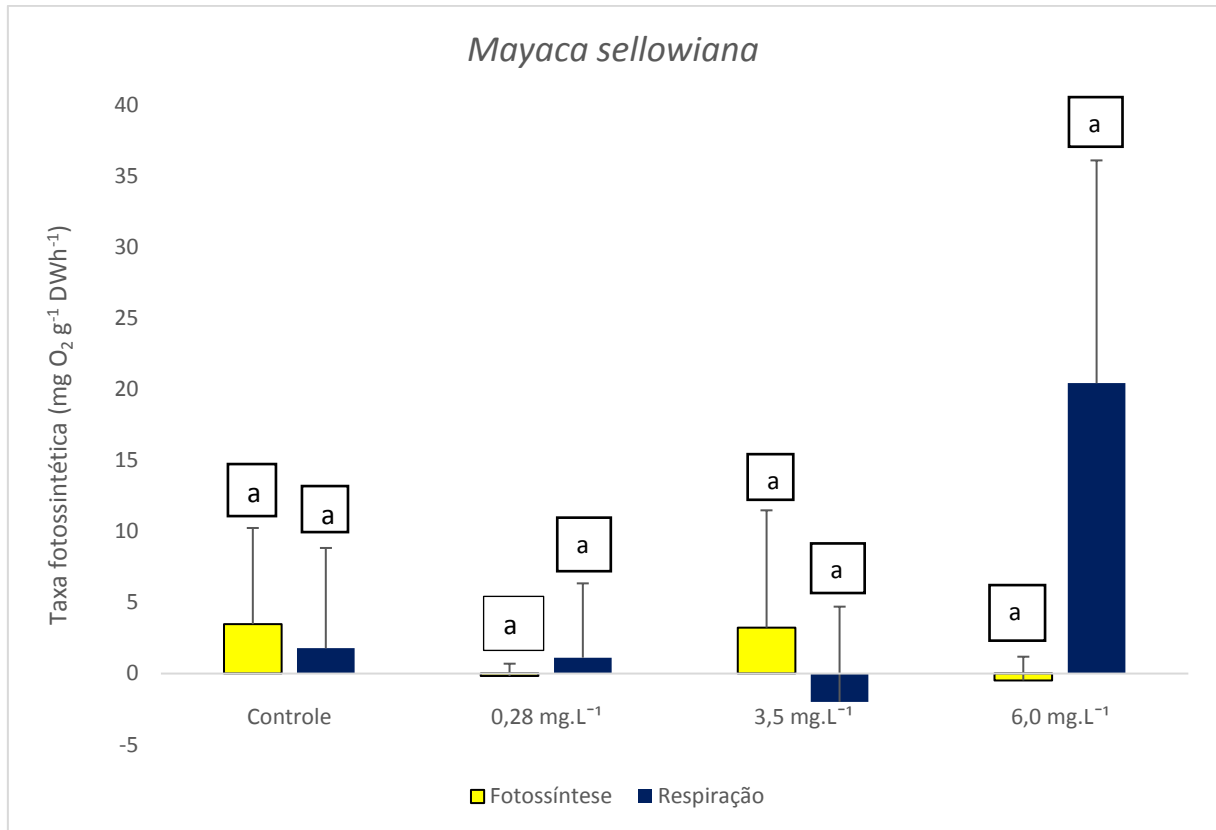


Figura 3. Taxa fotossintética líquida (amarelo) e taxa de respiração no escuro (azul) de *Mayaca sellowiana* em diferentes concentrações de herbicida Roundup®. As barras indicam as médias \pm desvio padrão e letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

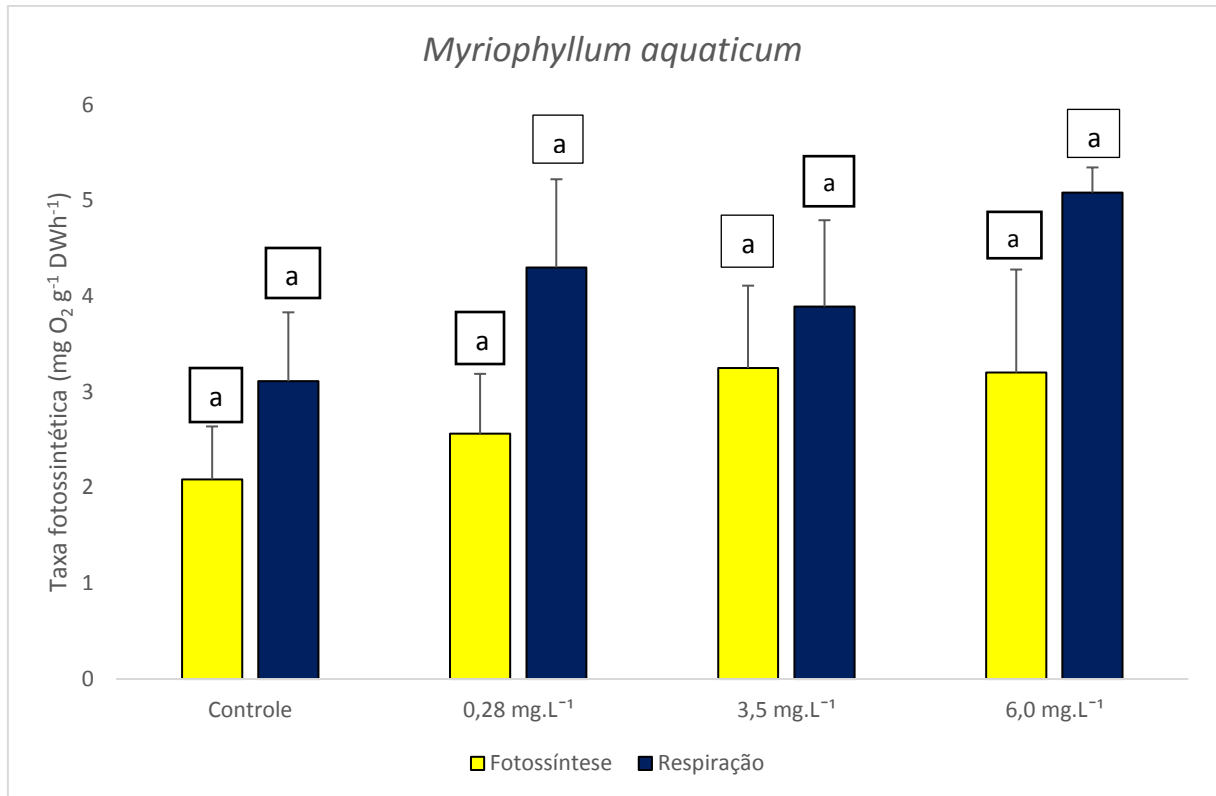


Figura 4. Taxa fotossintética líquida (amarelo) e taxa de respiração no escuro (azul) de *Myriophyllum aquaticum* em diferentes concentrações de herbicida Roundup®. As barras indicam as médias \pm desvio padrão e letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

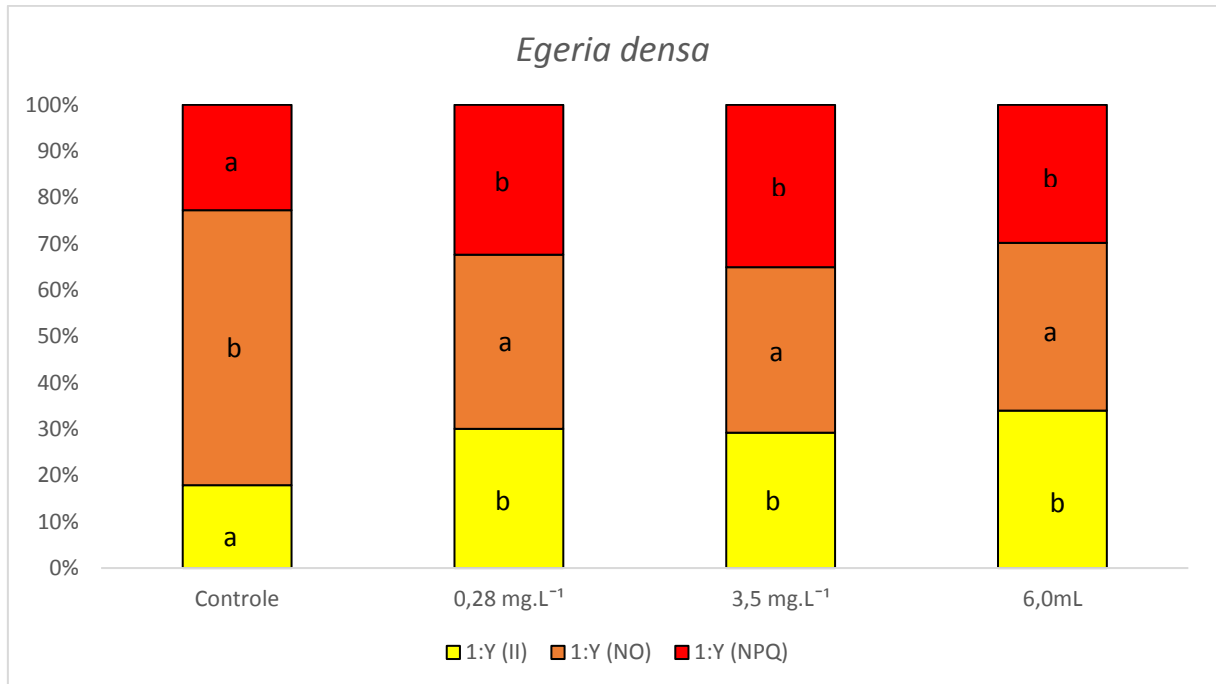


Figura 5. Percentual de luz absorvida (Y (II) = amarelo) e dissipada (Y(NO) = laranja; Y(NPQ) = vermelho) na fotossíntese pela espécie *Egeria densa* avaliada pela fluorescência da clorofila *a* nos tratamentos 0,28, 3,5 e 6,0 e no grupo controle. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

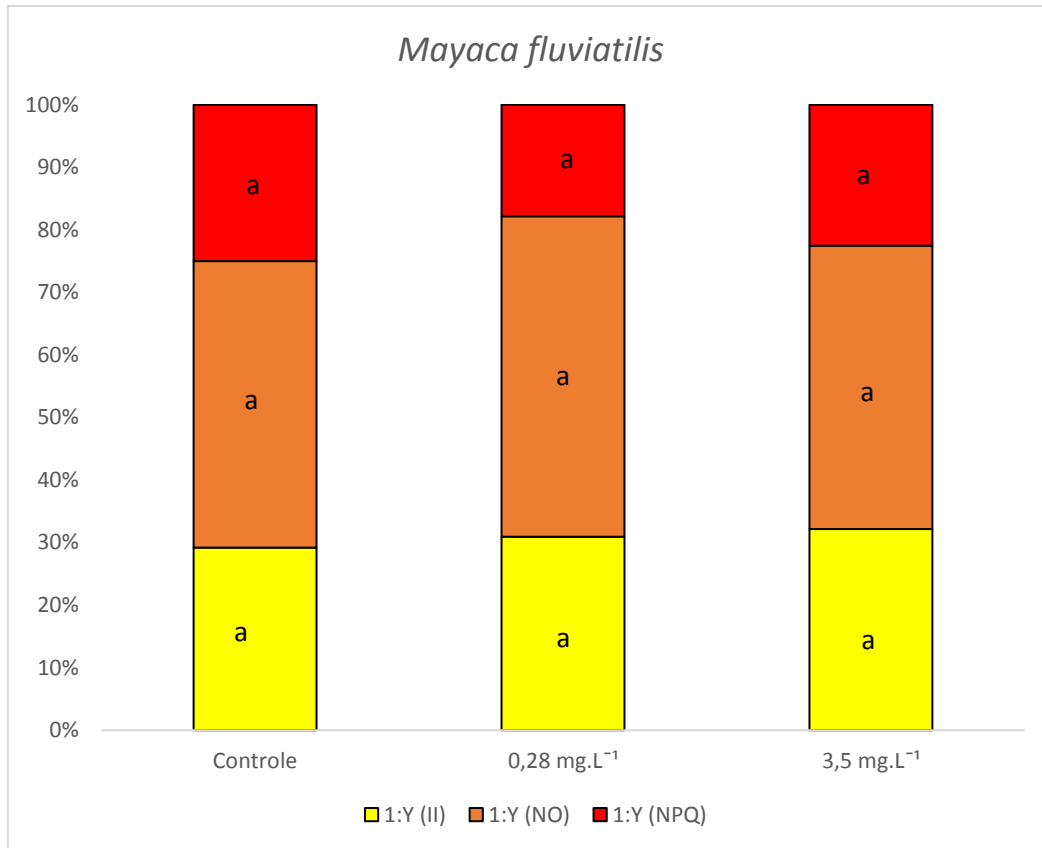


Figura 6. Percentual de luz absorvida (Y (II) = amarelo) e dissipada (Y(NO) = laranja; Y(NPQ) = vermelho) na fotossíntese pela espécie *Mayaca fluviatilis* avaliada pela fluorescência da clorofila *a* nos tratamentos 0,28, 3,5 e 6,0 e no grupo controle. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

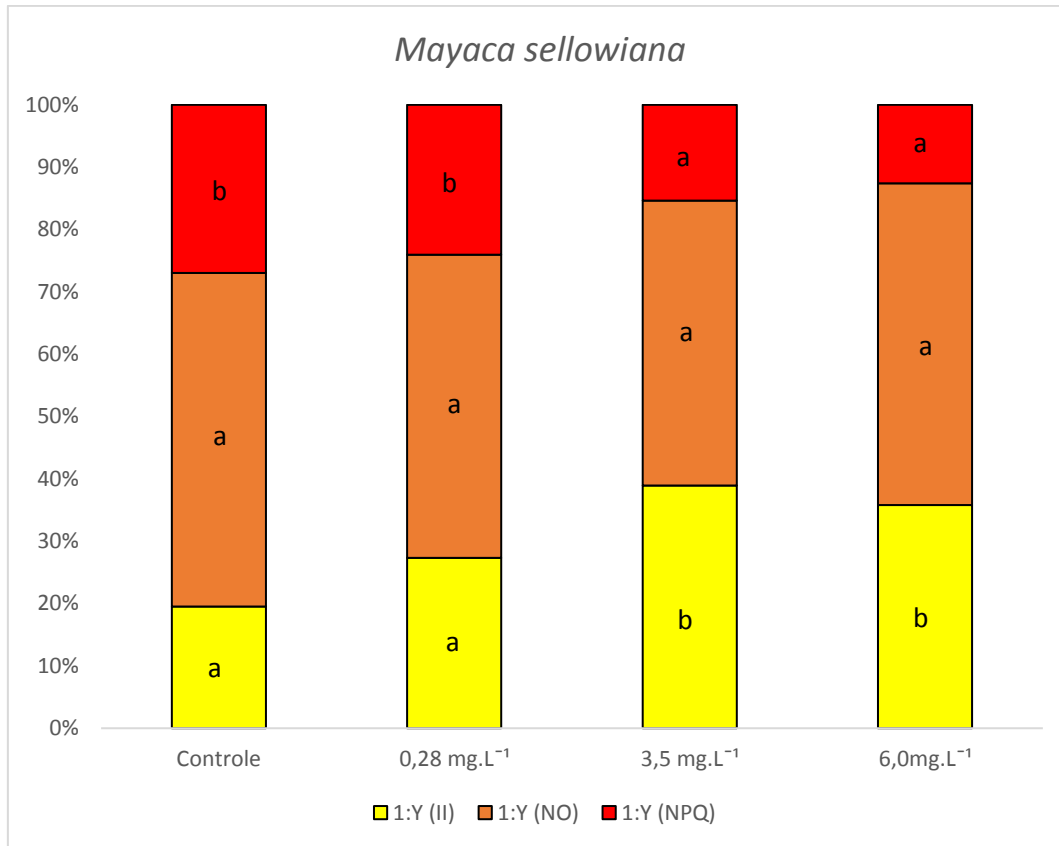


Figura 7. Percentual de luz absorvida (Y (II) = amarelo) e dissipada (Y(NO) = laranja; Y(NPQ) = vermelho) na fotossíntese pela espécie *Mayaca sellowiana* avaliada pela fluorescência da clorofila a nos tratamentos 0,28, 3,5 e 6,0 e no grupo controle. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

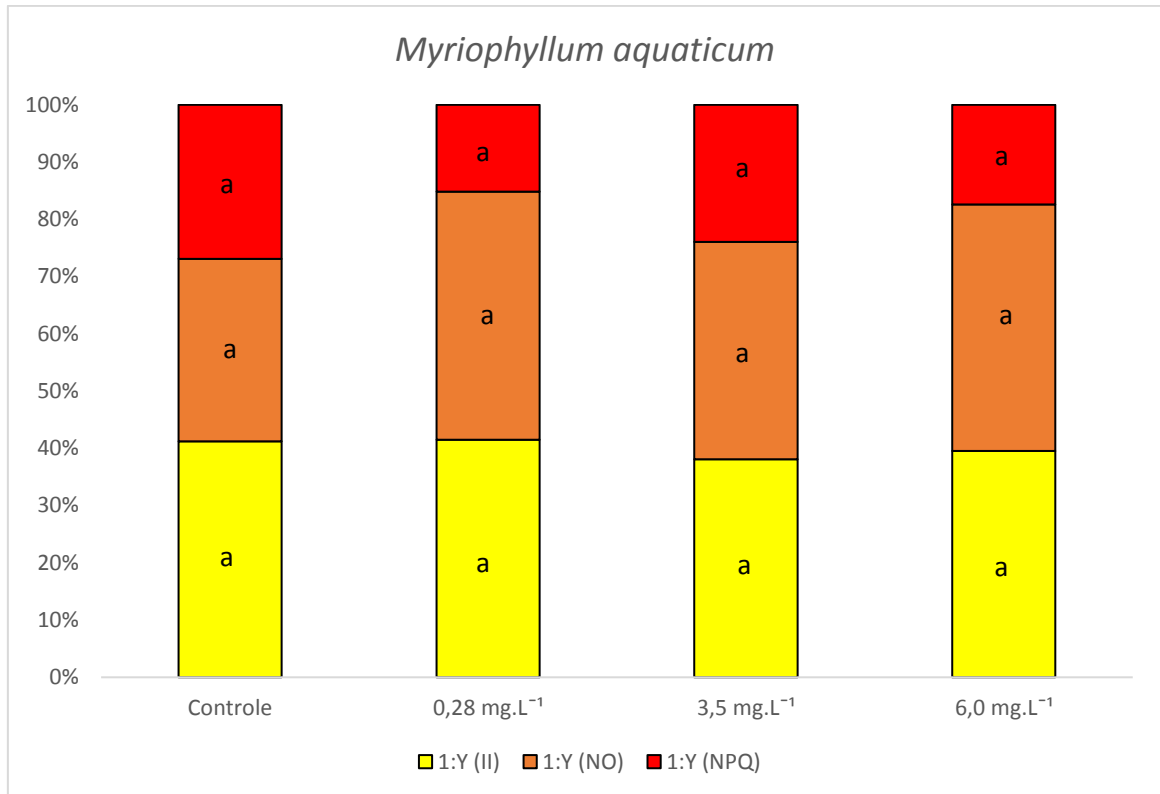


Figura 8. Percentual de luz absorvida (Y (II) = amarelo) e dissipada (Y(NO) = laranja; Y(NPQ) = vermelho) na fotossíntese pela espécie *Myriophyllum aquaticum* avaliada pela fluorescência da clorofila a nos tratamentos 0,28, 3,5 e 6,0 e no grupo controle. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

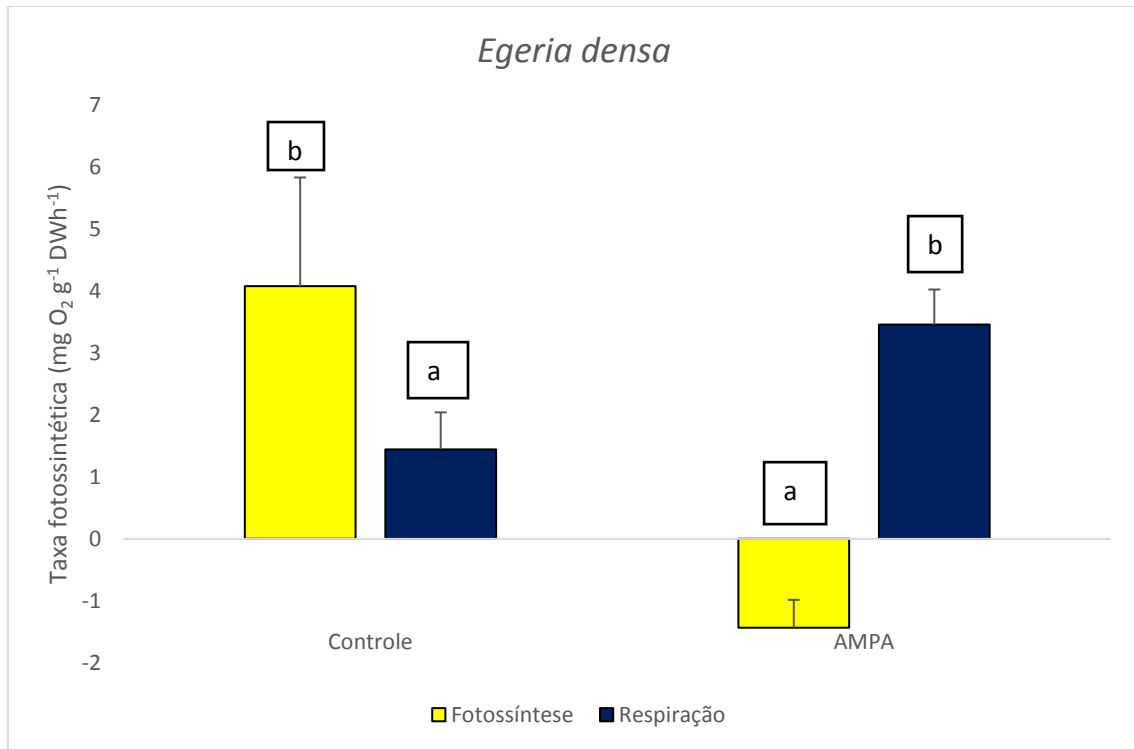


Figura 9. Taxa fotossintética líquida (amarelo) e taxa de respiração no escuro (azul) de *Egeria densa* sob exposição ao AMPA. As barras indicam as médias \pm desvio padrão e letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

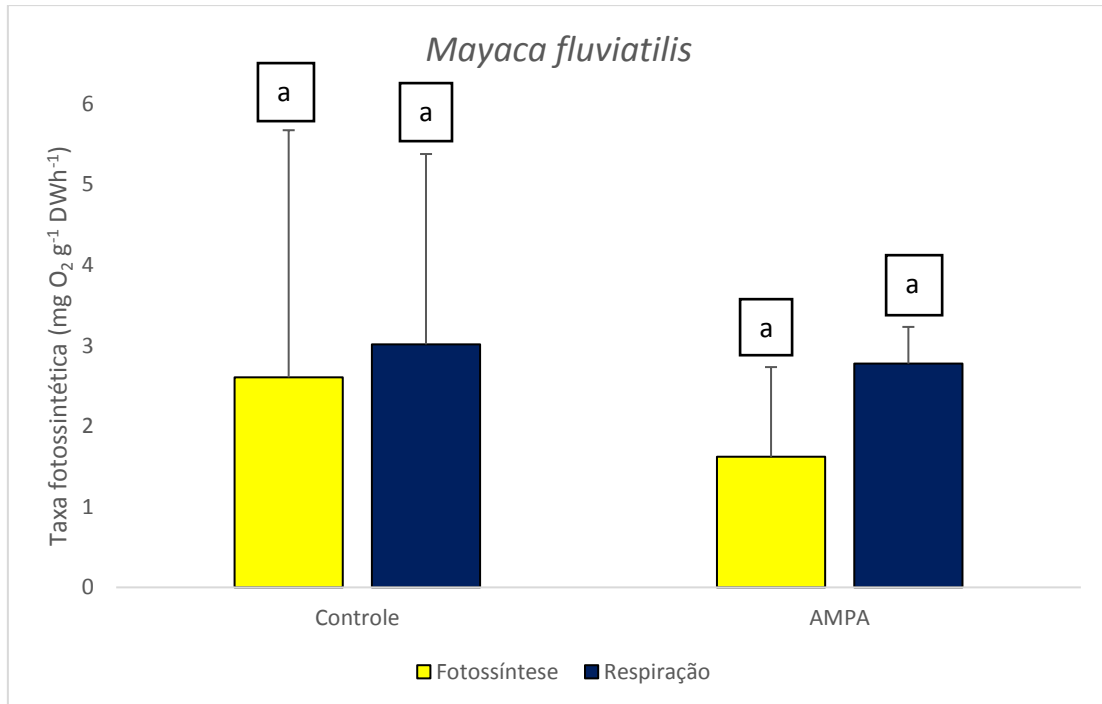


Figura 10. Taxa fotossintética líquida (amarelo) e taxa de respiração no escuro (azul) de *Mayaca fluviatilis* sob exposição ao AMPA. As barras indicam as médias \pm desvio padrão e letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

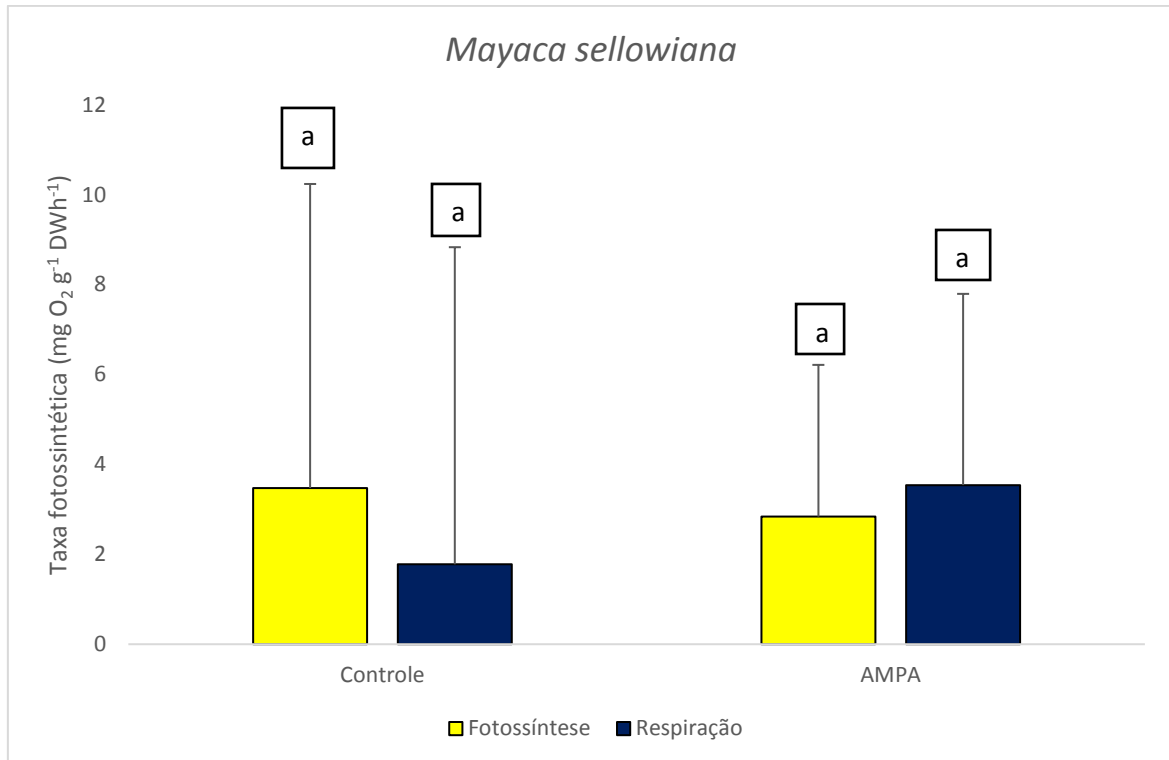


Figura 11. Taxa fotossintética líquida (amarelo) e taxa de respiração no escuro (azul) de *Mayaca sellowiana* sob exposição ao AMPA. As barras indicam as médias \pm desvio padrão e letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

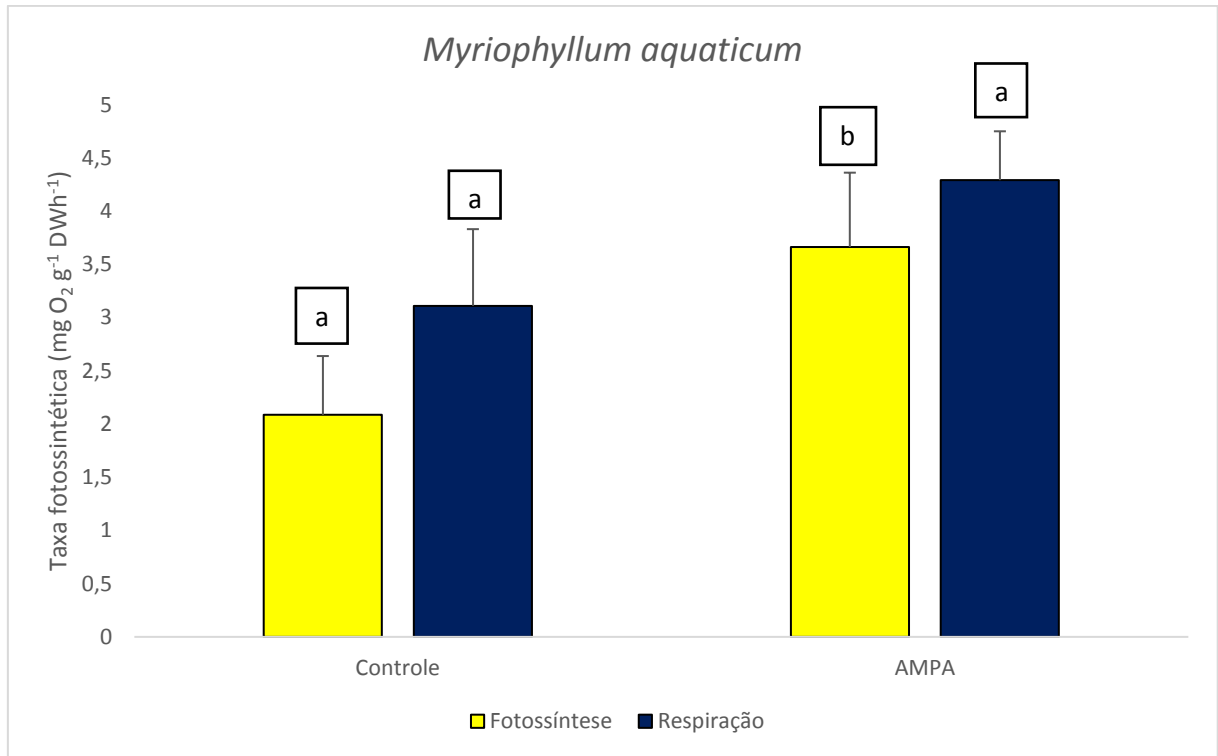


Figura 12. Taxa fotossintética líquida (amarelo) e taxa de respiração no escuro (azul) de *Myriophyllum aquaticum* sob exposição ao AMPA. As barras indicam as médias \pm desvio padrão e letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

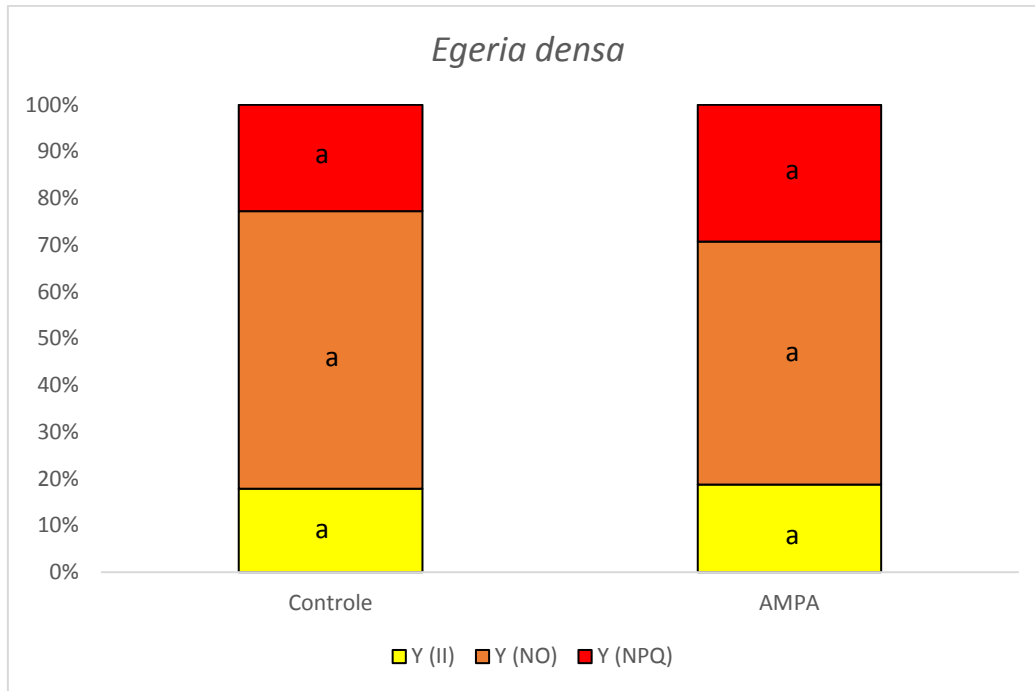


Figura 13. Percentual de luz absorvida (Y (II) = amarelo) e dissipada (Y(NO) = laranja; Y(NPQ) = vermelho) na fotossíntese pela espécie *Egeria densa* avaliada pela fluorescência da clorofila a nos tratamentos 0,28, 3,5 e 6,0 e no grupo controle. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

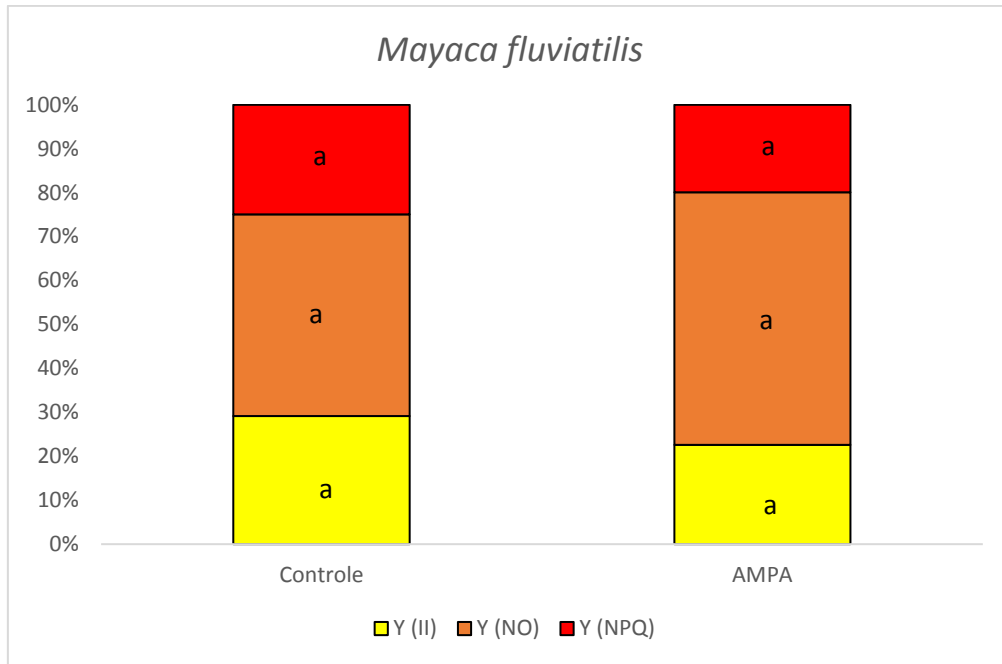


Figura 14. Percentual de luz absorvida (Y (II) = amarelo) e dissipada (Y(NO) = laranja; Y(NPQ) = vermelho) na fotossíntese pela espécie *Mayaca fluviatilis* avaliada pela fluorescência da clorofila a nos tratamentos 0,28, 3,5 e 6,0 e no grupo controle. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

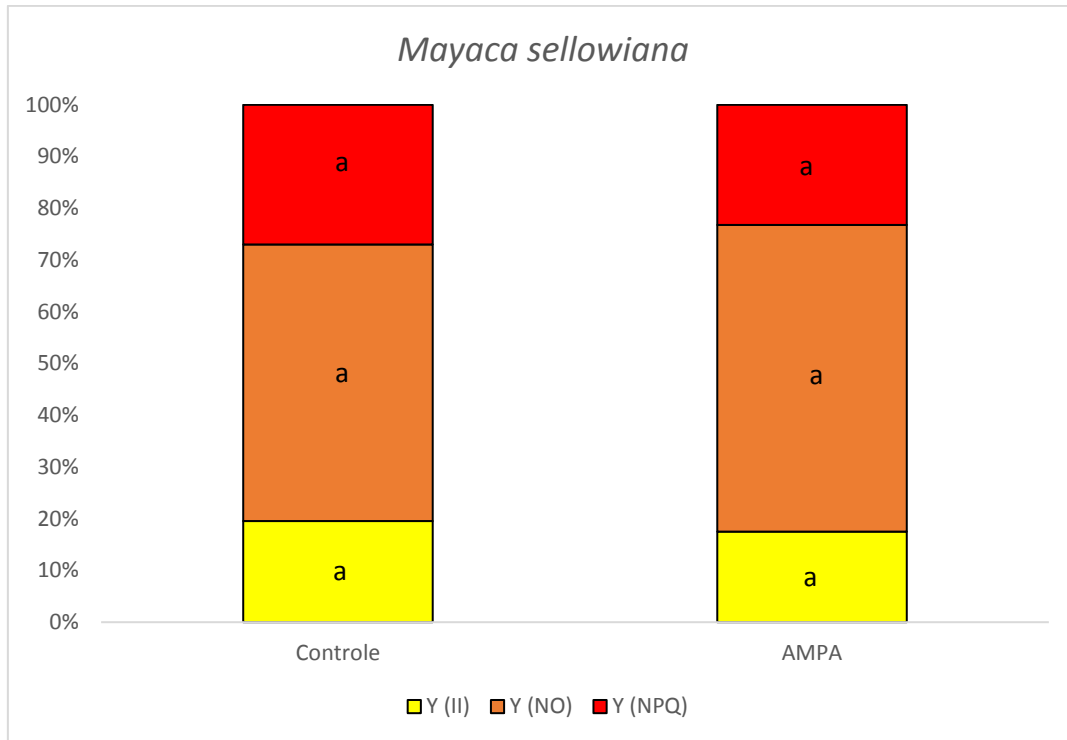


Figura 15. Percentual de luz absorvida (Y (II) = amarelo) e dissipada (Y(NO) = laranja; Y(NPQ) = vermelho) na fotossíntese pela espécie *Mayaca sellowiana* avaliada pela fluorescência da clorofila a nos tratamentos 0,28, 3,5 e 6,0 e no grupo controle. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

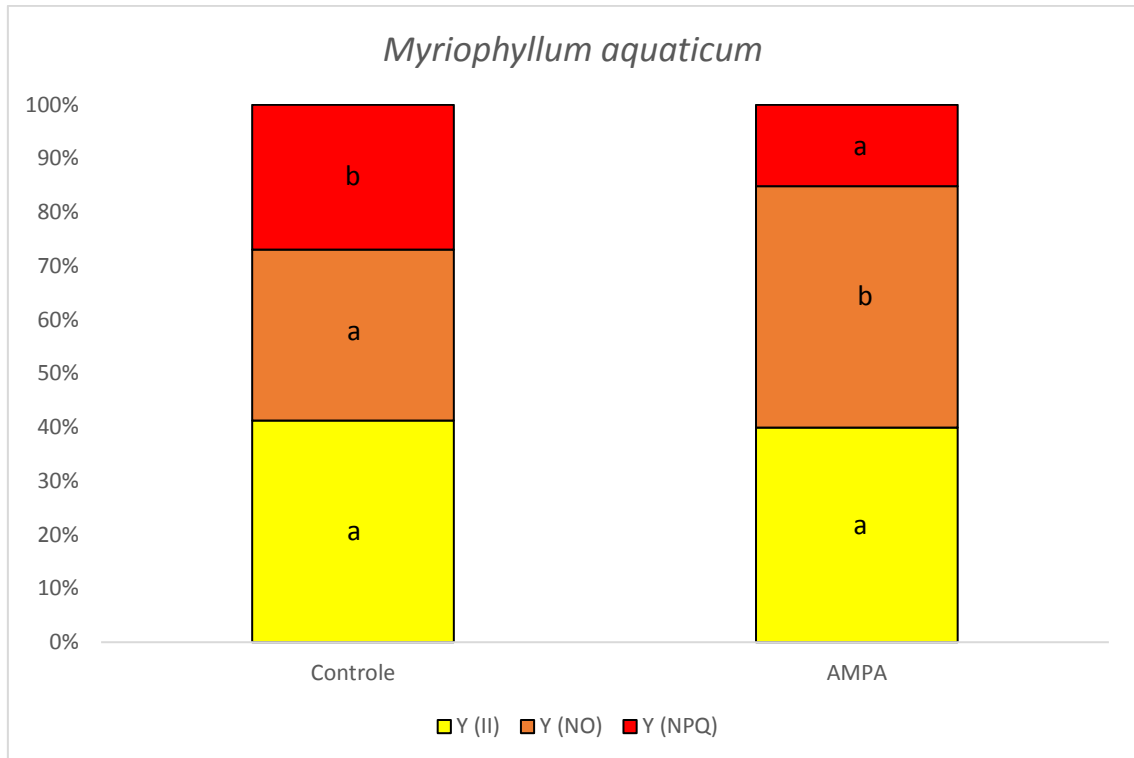


Figura 16. Percentual de luz absorvida (Y (II) = amarelo) e dissipada (Y(NO) = laranja; Y(NPQ) = vermelho) na fotossíntese pela espécie *Myriophyllum aquaticum* avaliada pela fluorescência da clorofila a nos tratamentos 0,28, 3,5 e 6,0 e no grupo controle. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabela 1: Parâmetros referentes à taxa fotossintética líquida e respiração no escuro em relação ao herbicida Rounup®. As doses testadas foram de 0,28mg/L⁻¹, 3,5mg/L⁻¹ e 6,0mg/L⁻¹ do herbicida e o grupo controle sem a adição do mesmo.

Espécies	Parâmetros	Controle	0,28	3,5	6,0
<i>Egeria densa</i>	Fot. Líq.	4,07b	2,76b	1,11a	0,28a
	Resp. Esc.	0,75a	0,87a	3,14a	5,86a
<i>Mayaca fluviatilis</i>	Fot. Líq.	2,60a	3,44a	2,04a	-
	Resp. Esc.	1,47a	2,82a	3,86b	-
<i>Mayaca sellowiana</i>	Fot. Líq.	3,47a	-0,16a	3,22a	-0,47a
	Resp. Esc.	-1,46a	1,11a	-1,99a	13,61a
<i>Myriophyllum aquaticum</i>	Fot. Líq.	2,08a	2,56a	3,25a	3,20a
	Resp. Esc.	3,11a	4,30a	3,89a	3,45a

*médias seguidas de pelo menos uma letra igual indica diferenças não significativas (p>0,05)

Tabela 2: Parâmetros referentes a fluorescência da clorofila *a*, em relação ao Roundup®. As doses testadas foram de 0,28mg/L⁻¹, 3,5mg/L⁻¹ e 6,0mg/L⁻¹ do herbicida e o grupo controle sem a adição do mesmo.

Espécies	Parâmetros	Controle	0,28	3,5	6,0
<i>Egeria densa</i>	Y(II)	0,17a	0,30b	0,29b	0,34b
	Y(NO)	0,59b	0,37a	0,35a	0,36a
	Y(NPQ)	0,22a	0,32b	0,35b	0,29b
<i>Mayaca fluviatilis</i>	Y(II)	0,29a	0,30a	0,32a	-
	Y(NO)	0,45a	0,51a	0,45a	-
	Y(NPQ)	0,24a	0,17a	0,22a	-
<i>Mayaca sellowiana</i>	Y(II)	0,19a	0,27a	0,38b	0,35b
	Y(NO)	0,53a	0,48a	0,45a	0,51a
	Y(NPQ)	0,26b	0,24b	0,15a	0,12a
<i>Myriophyllum aquaticum</i>	Y(II)	0,41a	0,41a	0,38a	0,39a
	Y(NO)	0,31a	0,43a	0,38a	0,43a
	Y(NPQ)	0,26a	0,15a	0,23a	0,17a

*médias seguidas de pelo menos uma letra igual indica diferenças não significativas ($p > 0,05$)

Tabela 3: Parâmetros referentes à taxa fotossintética líquida e respiração no escuro, mostrando a comparação do grupo controle, em relação ao AMPA.

	Controle	AMPA
<i>Egeria densa</i>		
Fotossíntese	4,07b	-1,43a
Respiração	1,44a	3,45b
<i>Mayca fluviatilis</i>		
Fotossíntese	2,60a	3,01a
Respiração	3,01a	0,45a
<i>Mayaca sellowiana</i>		
Fotossíntese	3,47a	2,84a
Respiração	1,77a	3,53a
<i>Myriophyllum aquaticum</i>		
Fotossíntese	2,08a	3,66b
Respiração	3,11a	4,29a

*médias seguidas de pelo menos uma letra igual indica diferenças não significativas ($p>0,05$)

Tabela 4: Parâmetros referentes a fluorescência da clorofila a, mostrando a comparação do grupo controle em relação ao AMPA.

	Controle	AMPA
Y (II)		
<i>Egeria densa</i>	0,17a	0,18a
<i>Mayaca fluviatilis</i>	0,29a	0,22a
<i>Mayaca sellowiana</i>	0,19a	0,17a
<i>Myriophyllum aquaticum</i>	0,41a	0,39a
Y (NO)		
<i>Egeria densa</i>	0,59a	0,51a
<i>Mayaca fluviatilis</i>	0,45a	0,57a
<i>Mayaca sellowiana</i>	0,53a	0,59a
<i>Myriophyllum aquaticum</i>	0,31a	0,44b
Y (NPQ)		
<i>Egeria densa</i>	0,22a	0,29a
<i>Mayaca fluviatilis</i>	0,24a	0,19a
<i>Mayaca sellowiana</i>	0,26a	0,23a
<i>Myriophyllum aquaticum</i>	0,26b	0,15a

*médias seguidas de pelo menos uma letra igual indica diferenças não significativas ($p > 0,05$)