UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de São José do Rio Preto

Taís Cristina Bunioto

Agrotóxicos e cairomônios de peixe no ambiente aquático:
efeitos sobre diferentes parâmetros do ciclo de vida de cladóceros

São José do Rio Preto
2024

Taís Cristina Bunioto

Agrotóxicos e cairomônios de peixe no ambiente aquático:

efeitos sobre diferentes parâmetros do ciclo de vida de cladóceros

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto.
Financiadora: CAPES

Orientador: Profª. Drª. Maria Stela Maioli Castilho-Noll
Coorientador: Prof. Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva

São José do Rio Preto
2024

B942a

Bunioto, Taís Cristina

Agrotóxicos e cairomônios de peixe no ambiente aquático: efeitos sobre diferentes parâmetros do ciclo de vida de cladóceros / Taís Cristina Bunioto. -- São José do Rio Preto, 2024

123 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Maria Stela Maioli Castilho-Noll

Coorientador: Danilo Grünig Humberto da Silva

1. Biologia. 2. Ecotoxicologia. 3. Zooplâncton. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Taís Cristina Bunioto

Agrotóxicos e cairomônios de peixe no ambiente aquático:

efeitos sobre diferentes parâmetros do ciclo de vida de cladóceros

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Profaª Drª Maria Stela Castilho-Noll
UNESP – São José do Rio Preto

Profaª Drª Eneida M. Eskinazi Sant´Anna
UFOP – Ouro Preto

Profaª Drª Juliane S. Freitas
UNESP – Bauru

Profaª Drª Raquel Aparecida Moreira
FURG – Rio Grande

Profaª Drª Ana Letícia M. Sanches
UNESP – Registro

São José do Rio Preto
08 de março de 2024

Para minha sobrinha, Tayla,
com todo o meu amor.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento: 001.

À minha orientadora, prof. Dra Maria Stela Castilho-Noll, pela orientação, colaboração, gentileza e apoio.

Ao meu coorientador, prof. Dr. Danilo Grünig Humberto da Silva, pela orientação, colaboração, gentileza e apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências (UNESP/ São José do Rio Preto – SP).

Ao professor Dr. Daniel Clemente Vieira Rego da Silva, pela parceria e colaboração.

Aos professores Dr. Luis Henrique Zanini Branco e Dr. Fernando Barbosa Noll, pela parceria no uso da estrutura laboratorial.

À professora Dra Marlene Sofia Arcifa, pela doação da cepa de *Chlorella* sp.

Ao Dr. Bruno Barretto de Souza e à Dra Bruna Buch pelas orientações no cultivo das algas. Ao

professor Dr. Aloysio da Silva Ferrão-Filho, pelas contribuições.

À Dra. Laís Conceição Menezes da Silva, pelas contribuições.

Ao professor, Dr. Luiz Alberto Beraldo de Moraes, pela estrutura laboratorial e auxílio geral para a realização das análises químicas.

Ao técnico, Dr. Eduardo José Crevelin, pelo suporte na realização das análises químicas.

Aos estagiários do Laboratório de Limnologia da Universidade Federal de Itajubá – MG, pela amizade, carinho e grande auxílio na manutenção das culturas de dafinídeos. Vocês são incríveis!

A Matheus Batista Figueiredo, pelo auxílio no cultivo dos peixes.

À Geovana Fernandes Paes e à Ana Esther de Paula Porfírio, pelo auxílio na manutenção e manipulação dos peixes.

À Seção de Pós-Graduação, em especial ao Erick Cursino Vivan, pelo profissionalismo, eficiência e cortesia. Obrigada por tudo, Erick!

Aos familiares, amigos e todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Em seu ambiente natural os organismos vivos encontram-se expostos a uma série de substâncias químicas. No meio aquático os cairomônios são substâncias químicas liberadas por predadores e que atuam sobre a vida das presas, podendo alterar aspectos importantes de sua biologia. Não obstante da ação de agentes naturais, organismos dulcícolas encontram-se ainda expostos à ação de agentes antrópicos, como é o caso da contaminação por agrotóxicos. O uso intensivo de compostos químicos nas lavouras e os processos lixiviatórios acabam por carrear grande parte dessas substâncias para dentro dos corpos d´água, prejudicando os organismos que ali se encontram, bem como de gerações subsequentes. Diante disso, considerando que no ambiente natural cairomônios e agrotóxicos acabam por agir sobre os organismos, tanto isoladamente quanto em conjunto, o presente trabalho teve como objetivo investigar, experimentalmente, os prejuízos causados pelo herbicida glifosato e pelo fungicida tebuconazol, sobre duas gerações do cladócero *Ceriodaphnia dubia*, além de investigar a influência de cairomônios e do herbicida glifosato sobre a relação presa-predador existente entre os cladóceros *Daphnia magna* e *Daphnia similis* e os peixes *Astyanax lacustris* e *Danio rerio*. No caso de *C. dubia*, ambos os químicos prejudicaram a longevidade, a reprodução e parâmetros da tabela de vida; chama a atenção o fato de que o tebuconazol inibiu por completo a reprodução do microcrustáceo. *D. magna*, por sua vez, não apresentou alterações com relação ao tamanho do elmo e do espinho caudal, mas a presença dos cairomônios ocasionou aumento do comprimento e largura do corpo dos indivíduos com 25 dias. *D. magna* não apresentou alterações na longevidade, idade da primeira reprodução e total de indivíduos da primeira cria e a Taxa reprodutiva líquida (R_0) foi maior no tratamento contendo ambos os químicos, mostrando interação entre o herbicida e o cairomônio. No caso de *D. similis*, houve antecipação da idade da primeira reprodução para as fêmeas expostas ao cairomônio em relação ao controle e os adultos com 14 dias expostos ao cairomônio apresentaram maior comprimento e largura do corpo quando comparados àqueles cultivados nos tratamentos controle e glifosato. Maior tamanho do espinho caudal aos 14 dias foi apresentado por *D. similis* cultivada na presença do cairomônio e R_0 aumentou em todos os tratamentos quando comparados ao controle, mostrando uma possível tentativa de acelerar a produção de prole na presença dos agentes estressores; aparentemente, porém, não houve interação entre os compostos. Em geral, os dados mostram que a presença de agrotóxicos na água pode afetar negativamente o crescimento e a reprodução, bem como alterar parâmetros importantes da tabela de vida dos cladóceros, inclusive ao longo de gerações. Além disso, a presença de cairomônios de peixes levou ao aumento do Tamanho e Largura do corpo em microcrustáceos, fato que necessita de mais investigações. Por último, a presença conjunta de cairomônios e glifosato na água afetou a R_0, podendo, potencialmente, ocasionar alterações da estrutura populacional. Em suma, o presente estudo deve servir como base para políticas que busquem maior controle e fiscalização com relação à presença de agrotóxicos nos ambientes aquáticos.

Palavras–chave: Ecotoxicologia. Cladocera. Tabela de vida. Toxicidade. Zooplâncton

ABSTRACT

In their natural environment, living organisms can be exposed to a range of chemical substances. Kairomones in the aquatic environment are chemical substances released by predators that act on prey, potentially altering important aspects of their biology. Despite the action of natural agents, freshwater organisms are still exposed to the action ofanthropogenic agents, such as contamination by pesticides. The intensive use of chemical compounds in crops and leaching processes end up carrying a large part of these substances into water bodies, harming the organisms, even over generations. Considering that in natural environment kairomones and pesticides end up acting on organisms, both individually and together, the presente work aimed to investigate: 1. the damage causedby the herbicide glyphosate and the fungicide tebuconazole on two generations of cladoceran *Ceriodaphnia dubia*;
2. the influence of kairomones and the herbicide glyphosate on the prey-predator interaction, considering the cladoceran *Daphnia magna* and the fish *Astyanax lacustris* and 3. the influence of kairomones and the herbicide glyphosate on the prey-predator interaction, considering the cladoceran *Daphnia similis* and the fish *Danio rerio.* In the case of *C. dubia* both chemicals impaired the longevity, reproduction and life table parameters; the fact that tebuconazole completely inhibited the reproductions of microcrustaceans is noteworthy. *D. magna* did not present changes in relation to the size of helmet and caudal spine, but the presence of kairomones caused an increase in the lenght and width of the body of individuals 25 days aged. *D. magna* showed no changes in longevity, age at first reproduction and total number of individuals in first offspring, but the net reproductive rate (R_0) was higher in the treatment containing both chemicals, showing an interaction between kairomone and herbicide. In case of *D. similis*, the age of first reproduction was brought forward for females exposed to kairomone in relatio to the control and adults 14 days old, exposed to kairomone had greater body length and width when compared those cultivated in control and glyphosate treatments. Greater size of the caudal spine at 14 days was presented by *D. similis* cultivated in the presence of kairomone and R_0 increased in all treatments when compared to the control, showing a possible attempt to accelerate offspring production in presence of stressors. In case of *D. similis*, ther was no interaction between the compounds. In general, data confirm that the presence of pesticides in water can negatively affect growth and reproduction, as well as alter important parameters of the cladoceran life table, including over generations. Furthermore, the presence of fish kairomones led to an increase in body size and width in microcrustaceans, a fact that requires further investigation. Finally, the joint presence of kairomones and glyphosate in the water affected R_0, potencially causing changes in the population structure. In short, the present study should serve as a basis for policies that seek greater control and inspection regarding the presence of pesticides in aquatic environments.

Keywords: Ecotoxicology. Cladocera. Life table. Toxicity. Zooplankton.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1 16

Figura 1 46
Figura 2 47
Figura 3. 48
Figura 4. 49

Capítulo 2 59

Figura 1. 79
Figura 2. 80
Figura 3 81
Figura 4. 82

Capítulo 3 90

Figura 1. 109
Figura 2. 110
Figura 3. 111
Figura 4. 112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1..... 50

SUMÁRIO

PRÓLOGO 13
INTRODUÇÃO GERAL 14
OBJETIVOS 14

CAPÍTULO 1 16
ABSTRACT 18
INTRODUCTION 18
METHODS 21
RESULTS 26
DISCUSSION 28
CONCLUSIONS 33
REFERENCES 34
SUPLEMENTARY MATERIAL 51
CAPÍTULO 2 59
RESUMO 59
1. INTRODUÇÃO 60
2. MATERIAL E MÉTODOS 62
3. RESULTADOS 65
4. DISCUSSÃO 66
5. CONCLUSÕES 69
REFERÊNCIAS 70
MATERIAL SUPLEMENTAR 83
CAPÍTULO 3 90
RESUMO 90
1. INTRODUÇÃO 91
2. MATERIAL E MÉTODOS 93
3. RESULTADOS 96
4. DISCUSSÃO 98
5. CONCLUSÕES 101
REFERÊNCIAS 102
MATERIAL SUPLEMENTAR 113

CONCLUSÃO GERAL 121
REFERÊNCIAS 121

Prólogo

A presente tese está estruturada conforme Instrução normativa número 07 do programa de Pós-graduação em Biociências, vigente na data de 20/12/2023. O modelo encontra-se disponível em https://www.ibilce.unesp.br/#!/biblioteca/servicos-oferecidos/consulte-a-estrutura-do-trabalho-academico/ (acesso em dezembro de 2023).

Segundo tal normativa, um dos capítulos do documento deve constar de um manuscrito, formatado e submetido à publicação em revista indexada, e os demais devem seguir as normas vigentes da ABNT. Assim, o **Capítulo 1** consta de manuscrito submetido à revista **Environmental Science and Pollution Research**, e os **Capítulos 2 e 3** estão formatados conforme normas da **ABNT**.

Introdução geral

A degradação dos ambientes naturais é um dos temas mais preocupantes para a Ciência atualmente. Diversos são os fatores que podem causar a destruição de habitats como desmatamento, agricultura, pecuária, poluição, dentre outros (Cheevaporn; Menasveta, 2003; Fan *et al.* 2023; Hazwan *et al.* 2022; Sui, 2023). Em se tratando do ambiente aquático, a contaminação por agrotóxicos, metais pesados, efluentes e outros compostos têm causado inúmeros prejuízos aos seres vivos (Brovini *et al*. 2023; Häder *et al.* 2020; Masud; Cable, 2023; Sarker *et al*. 2023), sendo necessário que mais estudos sejam realizados no sentido de averiguar e mitigar a magnitude dos impactos decorrentes de ações antrópicas.

Além dos compostos químicos decorrentes da poluição, os organismos aquáticos encontram-se também expostos a elementos químicos naturalmente presentes no ambiente; tratam-se de compostos, por exemplo, derivados da decomposição, excreção e também ligados à mediação química (Chen; Wang, 2019; Ruano *et al.* 2019; Wang; Tan, 2019). Muitos elementos podem ser liberados pelos organismos para a comunicação entre indivíduos, tanto entre indivíduos da mesma espécie como entre indivíduos de espécies diferentes. Segundo Brown, Eisner e Whittaker (1970), os organismos produzem uma ampla gama de substâncias que agem como estimulantes, inibidores ou sinais comportamentais, sendo que os mediadores interespecíficos podem ser divididos em dois grandes grupos funcionais: alomônios (trazem benefícios ao organismo emissor) e cairomônios (beneficiam o organismo receptor).

Dentre os espécimes que habitam os ambientes límnicos, os cladóceros são importantes componentes em lagos e reservatórios, devido ao seu papel significativo no funcionamento desses ecossistemas, onde atuam como elos na cadeia trófica (Geraldes; Boavida, 2004). Devido à sua importância ecológica, bem como ao fato de serem sensíveis a diversos agentes químicos, esses organismos têm sido amplamente utilizados em inúmeros estudos na área de ecotoxicologia nos últimos tempos (Matsumoto *et al*. 2023; Pashaei et al, 2023; Rajewicz et al 2023), contribuindo amplamente para o desenvolvimento científico.

Assim, considerando-se tais fatos, os **objetivos** do presente estudo foram:

1) Verificar os efeitos multigeracionais do herbicida glifosato e do fungicida tebuconazol, em quantidades ambientalmente relevantes, sobre aspectos

individuais e populacionais do cladócero *Ceriodaphnia dubia*, cultivada em laboratório.

2) Verificar os efeitos de cairomônios de peixe e, de quantidade ambientalmente relevante do herbicida glifosato, sobre aspectos da morfologia e do ciclo de vida do cladócero *Daphnia magna*, cultivada em laboratório.
3) Verificar os efeitos de cairomônios de peixe e, de quantidade ambientalmente relevante do herbicida glifosato, sobre aspectos da morfologia e do ciclo de vida do cladócero *Daphnia similis*, cultivada em laboratório.

Capítulo 1

Glyphosate and Tebuconazole jeopardize both individual traits and population parameters of *Ceriodaphnia dubia* over generations

Taís Cristina Bunioto, Maria Eduarda Turcato, Luiz Alberto Beraldo de Moraes, Eduardo José Crevelin, Danilo Grünig Humberto da Silva, Maria Stela Castilho-Noll

Manuscrito submetido à Environmental Science and Pollution Research, formatado conforme normas da revista, disponíveis em:

https://link.springer.com/journal/11356/submission-guidelines

(acesso em janeiro 2024)

Glyphosate and Tebuconazole jeopardize both individual traits and population parameters of *Ceriodaphnia dubia* over generations

Taís Cristina Bunioto[1], Maria Eduarda Turcato[1], Luiz Alberto Beraldo de Moraes[2], Eduardo José Crevelin[2], Danilo Grünig Humberto da Silva[3], Maria Stela Castilho-Noll[1*],

*stela.noll@unesp.br

*Phone: 55 (17) 3221 2372

[1] Department of Biological Sciences, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences – São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), 2265 Cristóvão Colombo Street, São José do Rio Preto, SP, Brazil, 15.054-000.

[2] Department of Chemical - University of São Paulo, 3900 Bandeirantes Avenue, Ribeirão Preto, SP, Brazil, 14.040-900.

[3] Federal University of Mato Grossso do Sul, 3484 Ranulpho Marques Leal Avenue, Três Lagoas, MS, Brazil, 79.613-000.

Abstract

Agricultural activities and the use of pesticides have been widely expanded over time. Pesticides applied to plantations spread across the most varied ecosystems and can contaminate different regions and living beings. Throughout this study, we exposed two consecutive generations of cladoceran *Ceriodaphnia dubia* to commercial formulations based on glyphosate (500 µg/L) and tebuconazole (180 µg/L). Both pesticides caused detrimental effects on all analyzed parameters. Longevity of organisms exposed to glyphosate decreased in parental and F1 generations. The tebuconazole concentration inhibited the reproduction of *C. dubia*, while glyphosate caused a significant drop in the number of neonates produced in both generations. Tebuconazole caused a delay in the primiparous age in the parental generation, while glyphosate caused a delay in the primiparous age for the F1 generation. Both generations exposed to glyphosate also revealed primiparous decreases in size and weight. Individual growth decreased due to both toxicants. Parental generation exposed to glyphosate increased in population growth rate (r) while F1 generation presented a drop in the same parameter. Generation time (G) and net rate (R_0) decreased in treatments with glyphosate when compared to control. Data points out the importance of developing long-term and multigenerational toxicity studies.

Keywords: Environmental pollution. Freshwater. Life cycle. Life table. Multigenerational. Toxicity.

Introduction

Accompanying population and socioeconomic growth, agricultural activities have expanded across the planet, changing more and more ecosystems and natural landscapes (Patel et al. 2019; Stenchly et al. 2019; Demissie et al. 2022). The agriculture growth, with techniques modernization and optimization, has also caused the intensification of pesticides application (García et al. 2022; Guo et al. 2022; Haggblade et al. 2022 and others). Once in the environment, the chemicals used in crops spread

randomly through the different ecosystems, contaminating soil (Plaza-Bolaños 2012; Grafkina and Pitryuk 2022), water (Albuquerque et al. 2016; Zhou et al. 2020; Silva-Madera et al. 2021) and air (De Souza Guida et al. 2018; Woodrow et al. 2018).

With regard to water contamination, several studies have reported a worrying situation: there are several pesticides that have been frequently detected in aquatic environments, sometimes above the amounts allowed by the local legislation (Carazo-Rojas 2018; Brovini et al. 2021; Merga et al. 2021; Kalantary et al. 2022). This fact can threaten the balance of populations of living beings, leadingto serious environmental misfits.

Among the pesticides used around the world, the herbicide glyphosate stands out for its wide and growing use (Grandcoin et al. 2017; Sharma et al. 2019; Van Bruggen et al. 2021), being present in a series of different commercial formulations, and being also, in general, the most sold herbicide in several countries (Brovini et al. 2021; USEPA 2017). Due to its relatively high solubility, glyphosate has a higher probability of being carried by rain or irrigation, reaching water bodies, when compared to less soluble pesticides, such as atrazine (Milhome et al. 2009).

According to Lares et al. (2022), despite the large number of existing studies dealing with the toxicity of glyphosate on aquatic organisms, there are still several gaps, especially regarding cladocera. According to the review of this study, in sublethal concentrations, glyphosate is capable of causing changes in the swimming and growth of microcrustaceans, in addition to causing damage apparently related to their fecundity.

The negative impacts of glyphosate on freshwater systems have been widely documented. However, most of these studies involve a single generation with little data for multi- and transgenerational effects on aquatic biota. Considering that these changes in the parental generation can modify the behavior and health of individuals in future generations, multigenerational exposure constitutes a new approach to determining the long-term impact of pollutants on populations (Rodriguez-Miguel et al. 2021).

Papchenkova et al. (2009), studying four generations of *Daphnia magna* exposed to sublethal concentrations of herbicide Roundup® (aqueous solution composed of 36% glyphosate, produced by Monsanto company, USA), verified not only the non-adaptation of subsequent generations to the toxic effects of the compound, but alsoa decrease in pesticide tolerance over generations. Herbicide Faena® (based on glyphosate) influenced

the reproduction and body size of individuals of the F1 generation of *Daphnia exilis* (Rodriguez-Miguel et al. 2021), alerting them cumulative toxic effects over time in populations.

Tebuconazole is a triazole fungicide that has been very frequently detected, both on surface and in groundwater (Pinheiro et al. 2010; Metcalfe et al. 2019; Goessens et al. 2022; Machate et al., 2022; Stefano et al., 2022). Like other fungicides, tebuconazole is often used in a number of crops, such as cerealcrops, ornamental plants and fruit orchards; it can also be applied to protect seeds, as a foliar spray or even directly on the soil. Given its supposed persistence in the environment (Kahle et al. 2008), as well as its wide and frequent use (due to its common reapplications), tebuconazole - as well as other azole fungicides - deserves special attention from researchers and authorities that uphold the legislation regarding environmental protection (Cuco et al. 2020).

Studies about the tebuconazole impacts on freshwater systems are scarcer when compared to studies that investigate the glyphosate impacts, and considering cladocerans, *Daphnia magna* seems to be the most studied organism can cause delay and failure in reproduction (Qi et al. 2018), decrease in reproduction, changes in body length, survival and population growth (Sancho et al. 2016), as well as serious damage to the metabolism and feeding (Sancho et al. 2009).

Multigenerational studies involving cladocerans and fungicide tebuconazole were not found in the literature. Cuco et al. (2020) carried out a multigenerational study with *D. magna* and tebuconazole, evaluating the impact of this fungicide not on the cladoceran, but on the non-target yeast *Metschnikowia bicuspidata*, which lives in the body cavity of water fleas, parasitizing them. This study showed that fungicide affected the fitness of the yeast over the course of exposure of four generations of *D. magna* to the tebuconazole, being that this worsening performance was verified even after the compound was removed, confirming a certain transgenerational toxic effect (although this effect proved transient, so that the lineage recovered over time). In a multigenerational study involving the nematode *Caenorhabditis elegans*, Lu et al. (2020) observed that tebuconazole is capable of affecting the animal's both reproductive and development aspects, even at low concentrations, having observed the same transgenerational trend verified by Cuco et al. (2020).

Thus, considering the exposed scenario, and considering the gaps in our current

knowledge about multigenerational effects of pesticides on freshwater organisms, this study proposed to verify glyphosate tebuconazole impacts, at concentrations environmentally relevant, on individual and population aspects of two generations of the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*, cultivated in the laboratory.

Methods

Chemicals

Glyphosate

The commercial formulation used was Roundup® Original DI, produced by Monsanto. The compound contains 445 g/L (44.5 %m/v) of N-(phosphonomethyl) glycine diammonium salt (glyphosate), 370 g/L (37.0 %m/v) of the acid equivalent of N-(phosphonomethyl) glycine (glyphosate) and 751 g/L (75.1%m/v) of "other ingredients". Throughout the experiment, a stock solution containing 1000 mg/L of glyphosate was prepared daily.

Tebuconazole

The commercial formulation used was Rival® 200EC, produced by Nufarm. The compound contains 200 g/L (20% m/v) of (RS)-1p-chlorophenyl-4, 4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1- ylmethyl)pentan-3-ol (tebuconazole) and 800 g/L (80% m/v) of "other ingredients". Throughout the experiment, a stock solution containing 1000 mg/L of tebuconazole was prepared daily. We did not use any vehicle in the control group, since no difference has been found between the blank and solvent-containing controls in the literature (Nørgaard & Cedergreen, 2010; Sancho et al 2009).

Cladoceran and algae cultures

A monoclonal population of *Ceriodaphnia dubia*, obtained from specimens collected in Três Irmãos reservoir, Pereira Barreto/SP, on July 15, 2019, was cultivated in the laboratory for several generations. The animals were raised in 500 ml bottles, at a maximum density of 70 individuals.L^{-1} (NBR 13373/ ABNT, 2017) using water collected from a dam, in the city of São José do Rio Preto - SP, filtered with fiberglass membrane and aerated for at least 12 hours. As food, the chlorophycea *Chlorella sp.* were offered at a non-limiting concentration of 1 x 10^4 cells/ml organisms (previous pilot tests showed

that this was the ideal concentration of food for the maintenance of cultures – unpublished data). A complementary food, based on TetraMin® fish food and dry biological yeast, always at a dosage of 1 ml/L (NBR 13373/ABNT, 2017), was also added to the diet. The water hardness was maintained between 40 and 48 CaCO3/L (NBR 13373/ ABNT, 2017), and the pH was maintained between 7.0 and 7.8.

The quality of the water was attested with acute sensitivity tests using NaCl as a reference substance and a Control Chart was drawn up prior to carrying out the experiment (attached).

The algae used as food were cultivated in an MBL medium (Stemberger, 1981), under artificial light. Both algae cultures and cladoceran cultures were maintained at a temperature of 25 ± 1 ^{o}C, 12h light / 12h dark.

Experiment

Neonates (6 - 24 h) were placed individually inside disposable polystyrene containers with 50 ml capacity and 30 ml solution test. The organisms were exposed to the following treatments: control (without pesticides), glyphosate (500 µg/L) and tebuconazole (180 µg/L).

We based our concentration level choices on three reasons:

1) These are sublethal concentration levels:

The Literature shows how variable the EC/LC50 values for *C. dubia* and herbicide glyphosate can be. While Reno et al. (2015), for example, found LC50 (48h) of 0.31 mg/L, Tsui and Chu (2003) cite LC50 (48h) of 415 mg/L for this same species. Most authors cited intermediate EC/LC50 (48h) values to those mentioned above for *C. dubia*, usually around 4 or 5 mg/L: Reno et al (2018), for example, found LC50 (48h) of 4.84mg/L for the pesticide Roundup Ultramax, while Trumbo (2005) found an LC50 (48h) of 5.7 mg/L for the commercial pesticide R-11. Tsui and Chu (2003) mention LC50 (48h) of 5.39 for Roundup®. Therefore, although it was not possible to carry out acute tests to define EC50, we can state that the value of 500 µg/L of glyphosate is certainly a sublethal concentration for *C. dubia.*

We did not find any studies in the literature that reported EC/LC50 values for *C. dubia* and fungicide tebuconazole. Regarding this compound, some EC/LC50 values were found only for the cladoceran *Daphnia magna*, and these data are also quite variable. Li et al. (2015) mention LC50 (48h) of 3631 mg/L, while Qi et al. (2015) cite EC50 (48h) of 3.53 mg/L for this species. For 24-hour tests, Sancho et al. (2009)found an EC50 (24h) of 56.83 mg/L, while Qi et al. (2018) cite an EC50(24h) of 7.08mg/L. In that regard, as in the case of glyphosate, it is inferred that, for *C. dubia* (a smaller species when compared to *D. magna*), 180 µg/L of tebuconazole is certainly asublethal concentration.

2) These are environmentally relevant concentration level

Although most studies have reported less than 500 µg/L of glyphosate and 180 µg/L of tebuconazole in the environment (Kahle et al., 2008; Tóth et al. 2022; Gomes et al., 2022; Van Opstal et al. 2022), Peruzzo et al. (2008) found glyphosate levels in water ranging between 100 and 700 µg/L in the region called Pampa Ondulada, north of Buenos Aires, known for its very high agriculturalproduction. In an experiment simulating the transport of glyphosate and its metabolite AMPA under presumed conditions of rain and soil erosion, Yang et al. (2015) found more than 2000 µg/L of glyphosate at the first moments of rainy condition reproduction.

The Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life (CCME 2012) indicate the value of 800 µg/L as a safe amount of glyphosate for preserving aquatic ecosystems. The United States Environmental Protection Agency (USEPA 2017) considers 700 µg/L as an acceptable concentration for surface water.

Concerning tebuconazole, Pinheiro et al. (2010) found 261.75 µg/L of this compound in surface waters during a study in Itajaí Basin, in Santa Catarina. Therefore, cladocerans from all over the world probably have already been exposed in their natural environment to concentrations of glyphosate and tebuconazole similar to those on the present study, legitimizing its importance.

3) These concentration levels match the maximum amounts allowed by our Brazilian legislation for drinking water

Although Conama resolution 357/2005 establishes 280 µg/L as the maximum limit of glyphosate for class 3 water bodies (used for human supply, irrigation, fishing, recreation

and animal watering), we chose to use the limit value of 500 µg/L (provided by ordinance 888/2021, of the Ministry of Health, which establishes the standards of drinking water for human consumption) since the focus of this work is more related to the multigenerational effects of pesticides on organisms than the environment itself. The use of very low concentrations could not bring clear results, masking potential damage generated to the animals and making it difficult to analyze the results. While Conama does not establish tebuconazole limits for Brazilian water bodies, the Ministry of Health ordinance 888/2021 (which establishes the standards for drinking water for human consumption, as mentioned above) also establishes the maximum limit for tebuconazole in drinking water of 180 µg/L (which is the value used in this).

Each treatment was performed with ten replicates (each one consisted in a single individual placed in a container, as mentioned). During the experimental period, containers remained covered with plastic wrap, at a constant temperature of 25 ± 1ºC, 12h light / 12h dark. The water hardness and pH in the experiment were daily measured (Supplementary material). All individuals were followed throughout their all lives, for 2 subsequent generations. The second generation (F1) consisted entirely of neonates obtained from the third offspring of the parental generation (P).

The culture water was changed on daily. The age of the primiparous was recorded in all experimental replicates because in the beginning of the experiment, animals were carefully placed on a slide and observed under an optical microscope. Six of the ten replicates had their body size recorded duringthe first 11 days of the experiment, which allowed estimating the biomass (µg of dry weight) of the organisms in the different treatments, using the equation found by Minto (2009).

$$DW = a \times L^b$$

where DW = dry weight (µg); L = lenght (mm) and a and b are constants. The biomass estimate made it possible to calculate the individual growth rate, using the following equation:

$$g = \ln(wt) - \ln(w0) / t$$

where wt = final weight; $w0$ = inicial weight; t = time.

Organisms were monitored throughout their lives and the following parameters were obtained: longevity, primiparous age and size, the total number of newborns produced per female throughout life, individual growth rate, net population growth rate (R0), time of generation (G) and intrinsic growth rate (r).

UPLC-MS (Ultra Performance Liquid Chromatography) ACQUITY UPLC H-Class, coupled to aMass Spectrometer Tandem Quadrupole XevoTM TQ-D (Waters Corporation), confirmed the nominal values of the pesticide concentrations used. The analysis details are in the Supplementary material.

Statistical analysis

Considering the fact that there was no F1 generation for Tebuconazole, we consider it to be suitable to compare data as follows:

1. Considering only Parental generation and therefore, the three treatments (control, glyphosate and tebuconazole);

2. Considering both generations, but only the Control and Glyphosate treatments.

Thus, we applied the most appropriate tests for each situation:

We verified the normality of the samples using the Shapiro-Wilk test and homoscedasticity using the Levene test for Parental generation analyses. According to results, we used one-way ANOVA or Kruskal-Wallis tests. *Post hoc* comparisons were made using Tukey´s and Dunn´s tests, respectively.

Data from both generations (which included only the Control and Glyphosate treatments, as we mentioned) were analyzed using factorial ANOVA and Tukey´s test for *post hoc* comparisons.

Life table parameters (intrinsic population growth rate (r), generation time (G) and net reproductive rate (R0) were calculated with Bootstrap technique (Meyer 1986). The normality of the samples was verified using Shapiro-Wilk test. Data were analyzed in pairs; differences between treatments were verified using Mann-Whitney test and

differences between generations were compared using Wilcoxon test.

Significant diferences were considered when $p < 0.05$.

Results

Parental generation: Control vs. Glyphosate vs. Tebuconazole

Longevity of organisms in parental generation did not presented any difference concerning glyphosate, tebuconazole and control treatments ($p = 0.06054$) (Fig 1a).

Parental generation exposed to tebuconazole did not produce neonates; although we could observe egg formation inside incubation chamber of animals, no organism could release the hatchlings. While animals cultured in the control treatment had an average offspring of approximately 50 neonates per female, those exposed to glyphosate had an offspring of about 15 individuals, i.e., about three times less. ($p = 0.00500$) (Fig. 1b).

There was significant difference between the individual growth rates of organisms cultivated through three tested treatments ($p < 0.001$) (Fig. 1c). In this case we found a significant decrease in the individual growth rate of the organisms exposed to glyphosate in relation to control ($p = 0.00395$), as wellas in the individual growth rate of organisms exposed to tebuconazole in relation to control ($p < 0.001$). There was no difference between the growth rate of those organisms exposed to tebuconazole in relation to those cultivated in glyphosate ($p = 0.07073$).

Considering parental generation, there was no difference regarding the age of primiparous (Fig. 2a) in control and glyphosate treatments ($p = 1.00000$). However, there was a delay in the age of primiparous females that remained in tebuconazole, when compared to both control ($p < 0.001$) and glyphosate ($p = 0.00012$).

Primiparous size was significantly smaller in the glyphosate treatment compared to the control ($p = 0.04381$) (Fig. 2b). Females exposed to tebuconazole showed no difference primiparous size, in relation to both control and glyphosate ($p=0.47111$ and $p = 0.33389$, respectively).

We found no difference for primiparous dry weight concerning females cultivated

in different treatments (p = 0.06210) (Fig. 2c).

Parental generation and F1 generation: Control vs. Glyphosate

There was a decrease in longevity of the organisms exposed to glyphosate in relation to the control group, in both generations (p < 0.0001) (Fig. 3a). There was no statistical difference between Parental and F1 generations of control and glyphosate treatments (p = 0.53111). There was no interactionbetween Treatments and Generations (p = 0.53111).

There was a decrease in offspring when organisms were exposed to glyphosate in relation to control, in both analyzed generations (p < 0.0001) (Fig. 3b). There was no statistically significant difference between the offspring produced by the Parental Generation and the one produced by F1 Generation, in both analyzed treatments (p = 0.15990). There was no interaction between Treatments and Generations (p=0.45928).

A significant decrease in the growth rate of organisms exposed to glyphosate was observed in relation to those grown in control treatment (p < 0.0001) (Fig. 3c), both in Parental and F1 generations. Difference between the growth presented by organisms of Parental and F1 generation was also observed, both for control and glyphosate treatments (p = 0.00062). There was no interaction between Treatments and Generations (p = 0.14491).

A delay in primiparous age was verified on females exposed to glyphosate only in F1 generation(in this case, p = 0.00016 for all comparisons) (Fig. 4a). Females from F1 generation, in control treatment, presented a delay about one day in primiparous age in relation to control Parental treatment (0.04353).

In Parental generation females presented a drop in primiparous size about 0.1mm (p = 0.02164) (Fig. 4b). Females exposed to glyphosate during F1 generation also presented a significantly smaller primiparous size (p = 0.00018 compared to Parental control, p = 0.00020 compared to F1 control and p
= 0.01541 compared to Parental glyphosate). No statistical difference was found between primiparous size in Parental and F1 control treatments (p = 0.40899).

Finally, primiparous weight presented statistical difference just among treatments

(p = 0.00110) (Fig. 4c). There was no statistical difference between primiparous weight in Parental and F1 generations (p
= 0.45705).

Life table

It was impossible to calculate life table parameters for animals exposed to Tebuconazole, since reproduction was completely inhibited.

Significantly different values were obtained for all life table parameters (r, G and R0) both considering treatments and generations (in all cases, $p < 0.0001$) (Table 1).

Discussion

Parental generation did not present significant difference regarding the longevity of organisms among three treatments (Fig. 1a), but considering organisms exposed to glyphosate over two generations we see a decrease in their life expectancy (Fig. 3a). The lethality increase in the F1 generation indicatesthat chronic exposure to a chemical, even at low concentrations, considerably affects non-target organisms (Bordin et al. 2022), which is quite worrying, since it demonstrates the potential of the substance to cause damage to the biodiversity in region where it is used.

Rodriguez-Miguel (2021) studied two generations of the cladoceran *Daphnia exilis*, which were exposed to concentrations of 2.09, 2.49 and 3.15 mg/L of the commercial formulation Faena® (based on glyphosate) and noted a decrease in the organisms survival belonging to the parental generation. As in the present study, Rodriguez-Miguel (2021) also found F1 generation was greatly affected by exposure to glyphosate. Both parental and F1 generation of *Daphnia magna*, exposed to a commercial formulation of glyphosate at a concentration of 65 µg/L, decreased their survival (Bordin et al. 2022). It is interesting to mention, however, that Bordin et al. (2022) did not verify effects on the survival of *D. magna*, in any of the generations studied, when it was submitted to the active ingredient (instead of the commercial formulation). Nogueira et al. (2022) and Da Silva et al. (2021) did not find multi-or transgenerational effects of glyphosate on the longevity of *Daphnia magna*.

Few studies were found dealing with the effects of tebuconazole on the parameters discussed here; in this sense, only a few chronic unigenerational studies allow some kind of comparison. In this regard,it is important a greater research effort in order to fill this gap. Persistence andlong half-life of tebuconazole in the environment make the transgenerational investigation resulting from parental exposure very significant (Lu et al. 2020).

As we previously mentioned, the longevity of the parental generation exposed to tebuconazole seems not to have been affected by the drug during the present study. And as there was no F1 generation for fungicide, it is impossible to infer about multi-or transgenerational effects for longevity. On the contrary, in a study involving *D. magna*, Sancho et al. (2016) observed that tebuconazole negatively affected the longevity of organisms that remained for 21 days exposed to a concentration of 1.14 mg/L. Perhaps the concentration of tebuconazole used in the present study was not sufficient to affect *C. dubia* in terms of longevity.

It is notorious how much glyphosate and tebuconazole affected the fecundity of *C. dubia* (Fig. 1b and 3b). As we described in results, we observed a smaller number of neonates in treatment with glyphosate when compared to the control, in both generations. Furthermore, the presence of tebuconazole completely inhibited the reproduction of *C. dubia*. *D. exilis* exposed to glyphosate presented some similar results: significant decrease in number of neonates produced by parentalgeneration, inhibition of reproduction in F1 generation at concentrations of 2.49 and 3.15 mg/L and even the occurrence of aborted eggs and embryos in the parental generation (Rodriguez-Miguel et al. 2021). Cuhra et al. (2013) observed almost 100% in abortion rate for *D. magna* exposed to a concentration of 1.35 mg/L of glyphosate (Roundup®). Gutierrez et al. (2017) suggested zooplankton eggs are highly sensitive to glyphosate, since during their study the commercial formulation Sulfosate Touchdown® caused a decrease in species richness and diversity in zooplankton egg banks at concentrations of 4 and 8 mg/L.

Bordin et al. (2022) and Da Silva et al. (2021) did not verify changes in the number of neonates produced by *D. magna* females of the parental generation, concerning the active ingredient or commercial formulation they used. However, they found a decrease in number of neonates produced by females of the F1 generation exposed to the active ingredient, once again showing how harmful chemicals can be to populations over time. Similarly, Da Silva et al. (2021) observed effects on the number of neonates of *D. magna*

only in F1 generations. Toxic responses accumulated in individuals under chemical stress can contribute to the extinction of populations (Rodriguez-Miguel et al. 2021). On the contrary, Nogueira et al. (2022) verified no effects of glyphosate on the total number of neonates produced by *D. magna*, both in exposed parental generation and in the two unexposed F1 generation.

Papchenkova et al. (2009), after evaluating 4 generations of *D. magna* and the commercial formulation Roundup® (36% glyphosate /Monsanto), found that the number of broods dropped in the parental and F1 generations that exposed to a concentration of 50 mg/L. They also recorded decreases in the number of neonates per brood due to Roundup®. Thus, we can consider that the present work corroborates all these studies – except that one carried out by Nogueira et al. (2022) - showing that glyphosate is capable of severely affecting the fecundity of cladocerans and threatening, therefore, populations in natural environment.

The present study showed how harmful the concentration of 180 µg/L of tebuconazole can be for reproduction of *C. dubia*, since it completely inhibited the offspring production. *D. magna* exposed to tebuconazole at concentrations between 0.41 and 1.14 mg/L for 21 days showed a decrease in number of neonates produced (Sancho et al. 2016). The brood size of *Caenorhabditis elegans* decreased in parental generation exposed to tebuconazole at concentration levels between 0.01 and 10 µg/L, also in three unexposed F1 generations (Lu et al. 2020). The fact that tebuconazole can interfere with the reproduction of several organisms is already known in the literature (Sancho et al. 2016; Li et al. 2019; Lu et al. 2020; Lopez-Antia et al. 2021) and it can be linked to a probable endocrine disruption in individuals, resulting from exposure to the chemical (Sancho et al. 2010; Poulsen et al. 2015; Li et al. 2019; Huang et al. 2022).

Concentration levels of glyphosate and tebuconazole tested were able to affect primiparous age, size and weight (Fig. 2 and Fig. 4). At a concentration of 65 µg/L, *D. magna* exposed to glyphosate presented a delay in the age of the first offspring for the parental, but not for F1 generation, both in commercial and a.i. treatments (Bordin et al. 2022). Nogueira et al. (2022) verified that there was no change in the age of the first offspring for parental generation of *D. magna* exposed to glyphosate.

Parental generation of *D. exilis*, exposed to glyphosate at 2.49 and 3.15 mg/L, revealed a reduction in the age at first reproduction; most females of F1 generation, in

turn, did not even reach sexual maturity (Rodriguez-Miguel et al. 2021). Da Silva et al. (2021) did not observe effects of glyphosate on the age of first reproduction for the parental generation of *D. magna*, but individuals belonging to the F1 generation, exposed to the highest concentration of the compound (14.86 mg/L), presented a delay of two days in the beginning of the first reproduction. *D. magna* females from parental generation, grew in 25 mg/L of Roundup®, anticipated the age at first reproduction while females from F1 generation, cultivated at 50 mg/L, delayed it (Papchenkova et al. 2009).

Tebuconazole affected the age of primiparous, causing a delay of approximately one day in relation to the control treatment. Alike, *D. magna* exposed to concentration between 0.41 and 1.14 mg/L of tebuconazole presented a delay on first reproduction (Sancho et al. 2016). Such circumstances, once again, corroborate to the facts that both glyphosate and tebuconazole are capable of largely affecting the reproductive parameters of cladoceran populations, deserving special attention when we are dealing with conservation of natural environments.

Glyphosate and tebuconazole caused a decrease in growth of *C. dubia*, both in parental and F1 generation (Fig. 1c and 3c). *D. exilis* females exposed to glyphosate were smaller in the F1 than in parental generation and authors could not take the measurements of animals cultivated at 3.15 mg/L, since at this concentration Faena®herbicide altered the morphologyof organisms so much that it was impossible measure them (Rodrigues-Miguel et al. 2021). On the other hand, some studies verified no effects for growth of parental and F1 generations of *D. magna* exposed to glyphosate (Nogueira et al. 2022, Da Silva et al. 2021).

It is worth of mention that relatively high doses of glyphosate induced a reduction in food intake by gastropod *Pomacea canaliculata*, a fact that led researchers to deduce it could be a key factor in limiting growth and survival of organisms (Xu et al. 2017). According Rodriguez-Miguel et al. (2021) the possible bioaccumulation of glyphosate in cladocerans can lead to changes in biochemical processes related to necessary functions such as growth, reproduction and survival; however, alterations in the intestinal microbiome could also occur, modifying the process of nutrition and food assimilation and, therefore, interfering with the energy balance of individuals.

As already mentioned, tebuconazole also affected the growth rates of *C. dubia*. *D. magna* exposed to concentration levels between 0.41 and 1.14 mg/L of tebuconazole

presented smaller size (Sancho et al. 2016). Tebuconazole also caused a decrease in size of parental generation of *C. elegans* nematodes, cultivated at concentrations of 1 and 10 µg/L, a fact that was repeated in the not exposed F1 generation (Lu et al. 2020).

Glyphosate and tebuconazole also affected the population parameters of life table of *C. dubia.* As already mentioned, in the matter of the present study data showed that there was statistically significant difference among all analyzed parameters (Table 1). As there were no offspring in the case of tebuconazole, it was not even possible to calculate such indicators for fungicide.

No studies were found about values referring to the intrinsic population growth rate (r), generation time (G) and net reproductive rate (R0) over multiple generations of living organisms after exposure to glyphosate or tebuconazole. Villarroel et al. (2000) warn about the importance of calculating the values of intrinsic rate of population growth, in the sense of estimating toxicity at population levels and not just for individuals. For comparison purposes we can cite, for example, the study by Garza-León et al. (2017), who exposed a single generation of the cladoceran *Alona guttata* to the commercial formulation Faena®; they found a decrease in the intrinsic population growth rate at the lowest concentration tested, i.e., 0.7 mg/L and an increase of the intrinsic population growth rate at higher concentration levels -2.8, 5.6 and 11.2 mg/L
- indicating a possible attempt of population to increase the speed of growth, in theface of imminent death early due to presence of herbicide.

Garza-León et al. (2017) observed a decrease in generation time in relation to the control treatment in all glyphosate concentrations, as well as a decrease in net reproductive rate in the concentration levels of
0.7 and 1.4 mg/L. Regarding tebuconazole, Lu et al. (2020) verified an increase in generation time for the parental generation of the nematode *C. elegans* cultivated at concentrations of 0.1, 1 and 10 µg/L.

Despite the fact of several studies are carried out with the most varied formulations of pesticides (whose compositions, according Mesnage et al., 2019, are very different from each other) and involving different living organisms (something that often makes comparisons and extrapolations difficult) this work corroborates the need for more long-term studies, regarding the influence of pesticides on non-target organisms. When toxicity of herbicides is only based on LC50 values, their toxicity are underestimated and

inadequately evaluated, what leads to liberation of several harmful products on market, causing severe environmental damage (Bordin et al. 2022).

Conclusions

Overall, results showed that glyphosate and tebuconazole negatively affected *C. dubia* in the survival, reproduction and growth of individuals and population. Since concentrations of 500 µg/L of glyphosate and 180 µg/L of tebuconazole caused alterations in all analyzed parameters of *C. dubia*, it is to be expected that such alterations would also have consequences for the structure of zooplankton as a whole. Because it is an important link in the trophic chain, variations in the population dynamics of cladocerans end up reaching other links in the food web, such as microalgae, fish and other organisms (Sommer et al. 2003; Llope et al. 2012; Vincent et al. 2020), leading changes and damages to communities in general.

Thus, in view of the results presented, it is essential that a greater number of studies of this nature should be performed. By getting to know more about how pesticides affect species over time, especially in their population aspects, we can help prevent scenarios of imbalance and environmental degradation, inaddition to providing alternatives that are more assertive when there is a need to recover already degenerated environments. Therefore, it is highly recommended that the present study - along with other similar works - might be considered by the environmental agencies and competent authorities regarding the establishment of guidelines and standardization of the rules that manage the numerous water bodies distributed throughout Brazil and the world.

Acknowledgements: we thankfully acknowledge Dr. Luis Henrique Zanini Branco and Dr. Fernando Barbosa Noll, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences at UNESP (São José do Rio Preto – SP), the help and support provided that made possible to cultivate algae and carry out the experiments. We thank Capes (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) for the financial support to Taís C. Bunioto.

Funding

This study was supported by fellowship by Capes (Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel) to the first author and by the Postgraduate program in Biosciences of the Institute of Bioscience Humanities and Exact Sciences - UNESP.

Competing interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Author contributions

Taís Cristina Bunioto: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing, – original draft, Writing – review & editing; **Maria Eduarda Turcato**: Methodology; **Luiz Alberto Beraldo de Moraes:** Chemical analyses; **Eduardo José Crevelin**: Chemical analyses; **Danilo Grünig Humberto da Silva:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing; **Maria Stela Castilho-Noll:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing.

References

Albuquerque AF, Ribeiro JS, Kummrow F, Nogueira AJA, Montagner CC, Umbuzeiro GA (2016) Pesticides in Brazilian freshwaters: a critical review. Environmental Science: Processes & Impacts, 18(7), 779-787. https://doi.org/10.1039/C6EM00268

ABNT 2017. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp.(Crustácea, Cladócera). (Norma número NBR 13373:2017).

Bordin ER, Munhoz RC, Panicio PP, de Freitas AM, Ramsdorf WA (2022) Effects of environmentally relevant concentrations of atrazine and glyphosate herbicides,

isolated and in mixture, on two generation of the freshwater microcrustacean *Daphnia magna*. Ecotoxicology, 31(6), 884-896. https://doi.org/10.1007/s10646- 022-02554-2

Brasil. National Environment Council nº. 357/2005, 17 march 2005. Provides water bodies classification and environmental guidelines. Official gazette of Federative Republico f Brazil. 2005. Acessed 05 September 2023.

Brovini EM, de Deus BCT, Vilas-Boas JA, Quadra GR, Carvalho L, Mendonca R F, Pereira RO, Cardoso SJ (2021) Three-bestseller pesticides in Brazil: Freshwater concentrations and potential environmental risks. Science of The Total Environment, 771, 144754. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144754

CCME 2012. Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life: Glyphosate. Canadian Environmental Quality Guidelines, Canadian Council of Ministers of the Environment, Winnipeg. https://ccme.ca/en/res/glyphosate-en-canadian-water-quality-guidelines-for-the-protection-of-aquatic- life.pdf. Acessed 03 January 2024

Carazo-Rojas E, Pérez-Rojas G, Pérez-Villanueva M, Chinchilla-Soto C, Chin-Pampillo JS, Aguilar-Mora P, Alpízar-Marín M, Masís-Mora M, Rodríguez-Rodríguez CE, Vryzas Z (2018) Pesticide monitoring and ecotoxicological risk assessment in surface water bodies and sediments of a tropical agro-ecosystem. Environmental pollution, 241, 800-809. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.020

Cuco AP, Wolinska J, Santos JI, Abrantes N, Gonçalves FJ, Castro BB (2020) Can parasites adapt to pollutants? A multigenerational experiment with a *Daphnia* × *Metschnikowia* model system exposed to the fungicide tebuconazole. Aquatic Toxicology,226, 105-584. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2020.105584

Cuhra M, Traavik T, Bøhn T (2013) Clone-and age-dependent toxicity of a glyphosate commercial formulation and its active ingredient in *Daphnia magna*. Ecotoxicology,

22(2), 251-262. https://doi.org/10.1007/s10646-012-1021-1

da Silva MLN, Nogueira DJ, Köerich JS, Vaz VP, Justino NM, Schmidt JRA, Vicentini DS, Matias MS, Castilhos Jr AB, Fuzinatto CF, Matias WG (2021). Multigenerational toxic effects on *Daphnia magna* induced by silver nanoparticles and glyphosate mixture. Environmental Toxicology and Chemistry, 40(4), 1123-1131. https://doi.org/10.1002/etc.4952

De Souza Guida Y, Meire RO, Torres JPM, Malm O (2018) Air contamination by legacy and current-use pesticides in Brazilian mountains: an overview of national regulations by monitoring pollutant presence in pristine areas. Environmental pollution, 242, 19-30. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.061

Demissie B, Amsalu A, Tesfamariam Z, Nyssen J, Meaza H, Asfaha TG, Zenebe A, Gregoretti C, Van Eetvelde V. (2022). Landscape changes in the semi-closed Raya agricultural graben floor of Northern Ethiopia. Earth Systems and Environment, 6(2), 453-468. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054310

García MG, Sánchez JIL, Bravo KAS, Cabal MDC, Pérez-Santín, E (2022) Presence, distribution and current pesticides used in Spanish agricultural practices. Science of The Total Environment, 157291. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157291

Garza-León CV, Arzate-Cárdenas MA, Rico-Martínez R (2017) Toxicity evaluation of cypermethrin, glyphosate, and malathion, on two indigenous zooplanktonic species. Environmental Science and Pollution Research, 24(22), 18123-18134. https://doi.org/10.1007/s11356-017-9454-y

Goessens T, De Baere S, Deknock A, De Troyer N, Van Leeuwenberg R, Martel A, Pasmans F, Goethals P, Lens L, Spanoghe P, Vanhaecke L, Croubels S (2022) Agricultural contaminants in amphibian breeding ponds: Occurrence, risk and

correlation with agricultural land use. Science of the Total Environment, 806, 150661. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150661

Gomes MP, Brito JCM, Vieira F, Kitamura R, Juneau P (2022) Emerging contaminants in streams of Doce river watershed, Minas Gerais, Brazil. Frontiers in Environmental Science, 9, 801599. https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.801599

Grafkina MV, Pitryuk AV (2022) Evaluation of statistical data on soil contamination of the Krasnodar Territory with pesticides. In: IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, . IOP Publishing, vol. 979(1), pp 012131.

Grandcoin A, Piel S, Baures E (2017) AminoMethylPhosphonic acid (AMPA) in natural waters: Its sources, behavior and environmental fate. Water Research, 117, 187-197. https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.03.055

Guo L, Li H, Cao A, Gong X (2022) The effect of rising wages of agricultural labor on pesticide application in China. Environmental Impact Assessment Review, 95, 106809. https://doi.org/10.1016/j.eiar.2022.106809

Gutierrez MF, Battauz Y, Caisso B (2017). Disruption of the hatching dynamics of zooplankton egg banks due to glyphosate application. Chemosphere, 171, 644-653. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.110

Haggblade S, Diarra A, Traoré A (2022) Regulating agricultural intensification: Lessons from West Africa's rapidly growing pesticide markets. Development Policy Review, 40(1), e12545. https://doi.org/10.1111/dpr.12545

Huang T, Zhao Y, He J, Cheng H, Martyniuk CJ (2022) Endocrine disruption by azole fungicides in fish: A review of the evidence. Science of The Total Environment, 153412. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153412

Kahle M, Buerge IJ, Hauser A, Muller MD, Poiger T (2008) Azole fungicides: occurrence and fate in wastewater and surface waters. Environmental Science & Technology, 42(19), 7193-7200. https://doi.org/10.1021/es8009309

Kalantary RR, Barzegar G, Jorfi S (2022) Monitoring of pesticides in surface water, pesticides removal efficiency in drinking water treatment plant and potential health risk to consumers using Monte Carlo simulation in Behbahan City, Iran. Chemosphere, 286, 131667. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131667

Lares BA, Vignatti AM, Echaniz SA & Gutiérrez MF (2022). Effects of glyphosate on cladocera: a synthetic review. *Aquatic Toxicology*, *249*, 106232. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2022.106232

Li Y, Dong F, Liu X, Xu J, Han Y, Zheng Y (2015). Enantioselectivity in tebuconazole and myclobutanil non- target toxicity and degradation in soils. Chemosphere, 122, 145-153. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.11.031

Li S, Wu Q, Sun Q, Coffin S, Gui W & Zhu G (2019). Parental exposure to tebuconazole causes thyroid endocrine disruption in zebrafish and developmental toxicity in offspring. Aquatic Toxicology, 211, 116-123. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2019.04.002

Llope M, Licandro P, Chan KS, Stenseth NC (2012) Spatial variability of the plankton trophic interactionin the North Sea: a new feature after the early 1970s. Global Change Biology, 18(1), 106-117. https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02492.x

Lopez-Antia A, Ortiz-Santaliestra ME, Mougeot F, Camarero PR, Mateo R (2021). Birds feeding on tebuconazole treated seeds have reduced breeding output. Environmental Pollution, 2*71*, 116292. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116292

Lu Q, Bu Y, Ma L, Liu R (2020) Transgenerational reproductive and developmental toxicity of tebuconazole in *Caenorhabditis elegans*. Journal of Applied Toxicology, 40(5), 578-591. https://doi.org/10.1002/jat.3927

Machate O, Schmeller DS, Loyau A, Paschke A, Krauss, M, Carmona E, Schulze T, Moyer A, Lutz K,Brack W (2022) Complex chemical cocktail, containing insecticides diazinon and permethrin, drives acutetoxicity to crustaceans in mountain lakes. Science of The Total Environment, 828, 154456. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154456

Merga LB, Mengistie AA, Alemu MT, Van den Brink PJ (2021) Biological and chemical monitoring of the ecological risks of pesticides in Lake Ziway, Ethiopia. Chemosphere, 266, 129214. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.129214

Mesnage R, Benbrook C & Antoniou MN (2019). Insight into the confusion over surfactant co-formulants in glyphosate-based herbicides. Food and Chemical Toxicology, 128, 137-145. https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.03.053

Metcalfe CD, Helm P, Paterson G, Kaltenecker G, Murray C, Nowierski M, Sultana T (2019) Pesticides related to land use in watersheds of the Great Lakes basin. Science of the Total Environment, 648, 681- 692. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.169

Meyer JS, Ingersoll CG, McDonald LL, Boyce MS (1986) Estimating uncertainty in population growth rates: jackknife vs. bootstrap techniques. Ecology, 67(5), 1156-1166. https://doi.org/10.2307/1938671

Milhome MAL, Sousa DOB, Lima, FDAF, & Nascimento RFD (2009). Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe, CE. Engenharia Sanitária e Ambiental, 14, 363-372. https://doi.org/10.1590/S1413- 41522009000300010

Ministry of Health. Minister´s office. Ordinance Nº 888, 04 May 2021. Amends Annex XX of the GM/MS Consolidation Ordinance nº 5, of September 28, 2017, to provide for control and surveillance procedures for the quality of water for human drinking and its potability standard. https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-gm/ms-n-888-de-4-de-maio-de-2021- 318461562. Acessed 03 January 2024.

Minto, W. J., & Froehlich, M. S. A. (2005). A influência do predador *Chaoborus brasiliensis* sobre a migração vertical de microcrustáceos do Lago Monte Alegre: experimentos in vitro. Dissertation, University of São Paulo.

Nogueira DJ, da Silva ACDO, da Silva MLN, Vicentini DS, Matias WG (2022) Individual and combined multigenerational effects induced by polystyrene nanoplastic and glyphosate in *Daphnia magna* (Strauss, 1820). Science of The Total Environment, 811, 151360. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151360

Nørgaard KB, Cedergreen N (2010). Pesticide cocktails can interact synergistically on aquatic crustaceans. Environmental Science and Pollution Research, 17, 957-967. https://doi.org/10.1007/s11356- 009-0284-4

Papchenkova GA, Golovanova IL, Ushakova NV (2009) The parameters of reproduction, sizes, and activities of hydrolases in *Daphnia magn*a Straus of successive generations affected by Roundup herbicide. Inland Water Biology, 2(3), 286-291. https://doi.org/10.1134/S1995082909030158

Patel SK, Verma P, Shankar Singh G (2019) Agricultural growth and land use land cover change in peri- urban India. Environmental monitoring and assessment, 191(9), 1-17. https://doi.org/10.007/s10661-019- 7736-1

Peruzzo PJ, Porta AA, Ronco AE (2008). Levels of glyphosate in waters, sediments and soil associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of

Argentina. Environmental pollution. 156(1): 61-66. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.01.015

Pinheiro A, Silva MR, Kraisch R (2010) Presença de pesticidas em águas superficiais e subterrâneas na bacia do Itajaí, SC. Revista de Gestão de Água da América Latina, 7(2), 17-26.

Plaza-Bolaños P, Padilla-Sánchez JA, Garrido-Frenich A, Romero-González R, Martínez-Vidal JL (2012) Evaluation of soil contamination in intensive agricultural areas by pesticides and organic pollutants: south- eastern Spain as a case study. Journal of Environmental Monitoring, 14(4), 1181-1188. https://doi.org/10.1039/c2em10993j

Poulsen R, Luong X, Hansen M, Styrishave B, Hayes T (2015) Tebuconazole disrupts steroidogenesis in *Xenopus laevis*. Aquatic Toxicology, 168, 28-37. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2015.09.008

Qi SZ, Chen XF, Liu Y, Jiang JZ, Wang CJ (2015). Comparative toxicity of rac-and S-tebuconazole to *Daphnia magna*. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 50(7), 456-462. https://doi.org/10.1080/03601234.2015.1018756

Qi S, Liu X, Zhu L, Chen X, Wang C (2018) Racemic, R-, and S-tebuconazole altered chitinase and chitobiase activity of *Daphnia magna*. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 53(3), 171-175. https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1399245

Reno, U, Gutierrez MF, Longo M, Vidal E, Regaldo L, Negro A, Mariani M, Zalazar C & Gagneten AM (2015). Microcrustaceans: biological models to evaluate a remediation process of glyphosate-based formulations. Water, Air, & Soil Pollution, 226, 1-10. https://doi.org/10.1007/s11270-015-2616-y

Reno U, Doyle SR, Momo FR, Regaldo L, Gagneten AM (2018) Effects of glyphosate formulations on the population dynamics of two freshwater cladoceran species. Ecotoxicology, 27, 784-793. https://doi.org/10.1007/s10646-017-1891-3

Rodríguez-Miguel A, Hernández-Zamora M, Martínez-Jerónimo L, Martínez-Jerónimo F (2021) Exposureto sublethal concentrations of the glyphosate-based herbicide Faena® increases sensitivity in the progeny of the American cladoceran *Daphnia exilis* (Herrick, 1895). Environmental Science and Pollution Research, 28(28), 38094-38105. https://doi.org/10.1080/02772240701529038

Sancho E, Villarroel MJ, Andreu E, Ferrando MD (2009). Disturbances in energy metabolism of *Daphnia magna* after exposure to tebuconazole. Chemosphere, 74(9), 1171-1178. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.11.076

Sancho E, Villarroel MJ, Fernández C, Andreu E, Ferrando MD (2010). Short-term exposure to sublethal tebuconazole induces physiological impairment in male zebrafish (*Danio rerio*). Ecotoxicology and Environmental Safety, 73(3), 370-376. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2009.09.020

Sancho E, Villarroel MJ, Ferrando MD (2016) Assessment of chronic effects of tebuconazole on survival, reproduction and growth of *Daphnia magna* after different exposure times. Ecotoxicology and environmental safety, 124, 10-17. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.09.034

Sharma A, Kumar V, Shahzad B, Tanveer M, Sidhu GPS, Handa N, Kohli SK, Yadav P, Bali AS, Parihar RD, Dar OI, Singh K, Jasrotia S, Bakshi P, Ramakrishnan M, Kumar S, Bhardwaj R & Thukral AK (2019) Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. SN Applied Sciences,1(11), 1-16. https://doi.org/10.1007/s42452-109-1485-1

Silva-Madera RJ, Salazar-Flores J, Peregrina-Lucano AA, Mendoza-Michel J, Ceja-

Gálvez HR, Rojas- Bravo D, Reyna-Villela MZ, Torres-Sánchez ED (2021) Pesticide contamination in drinking and surface water in the Cienega, Jalisco, México. Water, Air, & Soil Pollution, 232(2), 1-13. https://doi.org/10.1007/s11270-021-04990-y

Sommer U, Sommer F, Santer B, Zöllner E, Jürgens K, Jamieson C, Boersma M, Gocke K. (2003) *Daphnia* versus copepod impact on summer phytoplankton: functional compensation at both trophic levels. Oecologia, 135, 639-647. https://doi.org/10.1007/s00442-003-1214-7

Stefano PHP, Roisenberg A, Santos MR, Dias MA, Montagner CC (2022) Unraveling the occurrence of contaminants of emerging concern in groundwater from urban setting: A combined multidisciplinary approach and self-organizing maps. Chemosphere, *299*, 134395. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134395

Stemberger RS (1981) A general approach to the culture of planktonic rotifers. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 38: 721–724. https://doi.org/10.1139/f81-095

Stenchly K, Waongo A, Schaeper W, Nyarko G, Buerkert A (2019) Structural landscape changes in urban and peri-urban agricultural systems of two West African cities and their relations to ecosystem services provided bywoodyplant communities. Urban Ecosystems, 22(2), 397-408. https://doi.org/10.1007/s11252- 018-0811-5

Tóth G, Háhn J, Szoboszlay S, Harkai P, Farkas M, Radó J, Göbölös B, Kaszab E, Szabó I, Urbábyi B, Kriszt B (2022) Spatiotemporal analysis of multi-pesticide residues in the largest Central European shallow lake, Lake Balaton, and its sub-catchment area. Environmental Sciences Europe, 34(1), 1-18. https://doi.org/10.1186/s12302-022-00630-2

Trumbo J (2005) An assessment of the hazard of a mixture of the herbicide Rodeo®

and the non-ionic surfactant R-11® to aquatic invertebrates and larval amphibians. California fish and game, 91(1), 38-46.

Tsui MT, Chu LM (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. Chemosphere, 52(7), 1189-1197. https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00306-0

USEPA 2017. National Primary Drinking Water Regulations. Avalilable in https://www.epa.gov/ground-water-and-drinking-water/national-primary-drinking-water-regulations Accessed 12 October 2022

USEPA, 2017. Pesticides Industry Sales and Usage. 2008 e 2012 Market Estimates. Available in: https://www.epa.gov/pesticides/pesticides-industry-sales-and-usage-2008-2012-market-estimates Accessed 25 August 2022

Van Bruggen AH, Finckh MR, He M, Ritsema CJ, Harkes P, Knuth D, Geissen V (2021) Indirect effects of the herbicide glyphosate on plant, animal and human health through its effects on microbial communities.
Frontiers in Environmental Science, 9. https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.763917

Van Opstal NV, Seehaus MS, Gabioud EA, Wilson MG, Galizzi FJ, Pighini RJ, Reoetti MR, Sasal M C (2022) Quality of the surface water of a basin affected by the expansion of the agricultural frontier over the native forest in the Argentine Espinal region. Environmental Science and Pollution Research, 1-17.
https://doi.org/10.1007/s11356-022-19760-4

Villarroel, M. J., Ferrando, M. D., Sancho, E., & Andreu, E. (2000). Effects of tetradifon on *Daphnia magna* during chronic exposure and alterations in the toxicity to generations pre-exposed to the pesticide. Aquatic toxicology, 49(1-2), 39-47. https://doi.org/10.1016/S0166-445X(99)00074-0

Vincent F, Bertolo A, Lacroix G, Mouchet M, Edeline E (2020) Trait-dependency of trophic interactionsin zooplankton food webs. Oikos, 129(6), 891-902. https://doi.org/10.1111/oik.06783

Woodrow JE, Gibson KA, Seiber JN (2018) Pesticides and related toxicants in the atmosphere. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 247, 147-196. https://doi.org/10.1007/398_2018_19

Xu Y, Li AJ, Li K, Qin J, Li H (2017) Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development and growth of invasive snail (*Pomacea canaliculata*). Aquatic Toxicology, 193, 136-143. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.10.011

Yang X, Wang F, Bento CP, Xue S, Gai L, van Dam R, Mol H, Ritsema CJ, Geissen V (2015) Short-term transport of glyphosate with erosion in Chinese loess soil—a flume experiment. Science of the Total Environment, 512, 406-414. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.01.071

Zhou Y, Wu J, Wang B, Duan L, Zhang Y, Zhao W, Wang F, Sui Q, Chen Z, Xu D, Li Q, Yu G (2020) Occurrence, source and ecotoxicological risk assessment of pesticides in surface water of Wujin District (northwest of Taihu Lake), China. Environmental Pollution, 265, 114953. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.114953

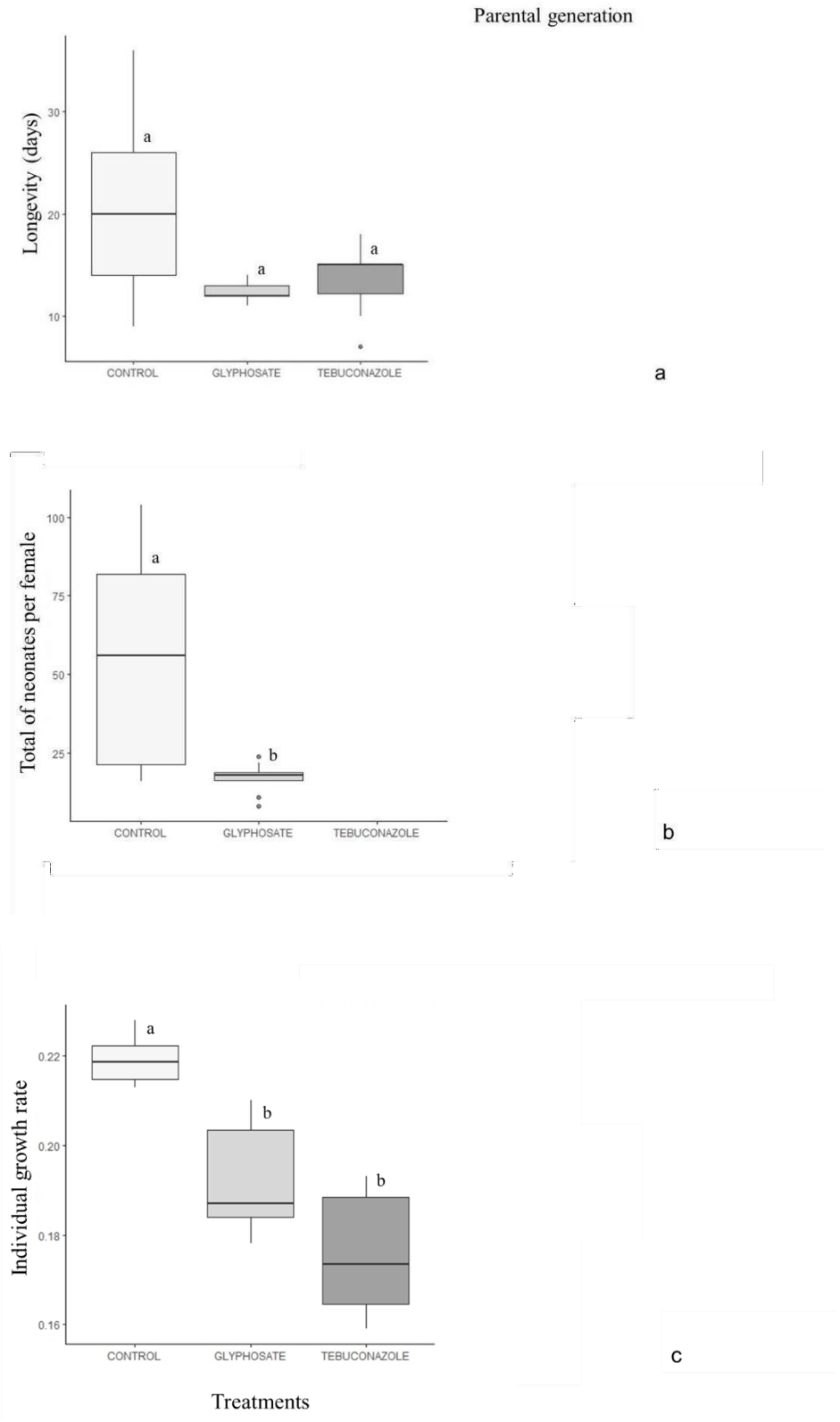


Fig. 1 Longevity (a), Total of neonates per female (b) and Individual growth rate (c) of *C. dubia* in the Parental generation (P), in all treatments tested. Individuals exposed to tebuconazole did not produce offspring (B).

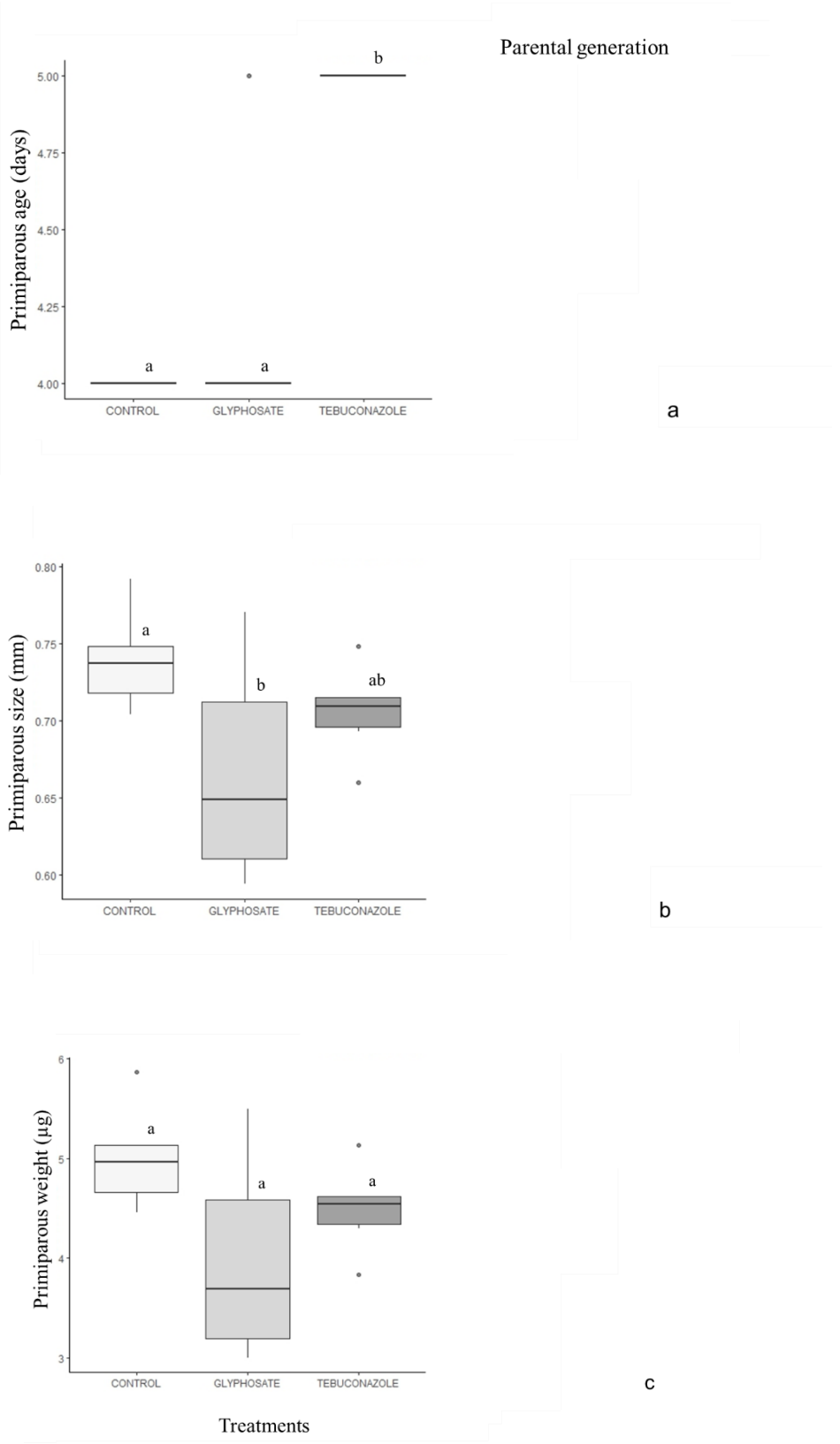


Fig. 2 Primiparous age (days) (a), primiparous size (mm) (b) and primiparous weight (µg) (c) in Parental Generation and in all treatments tested.

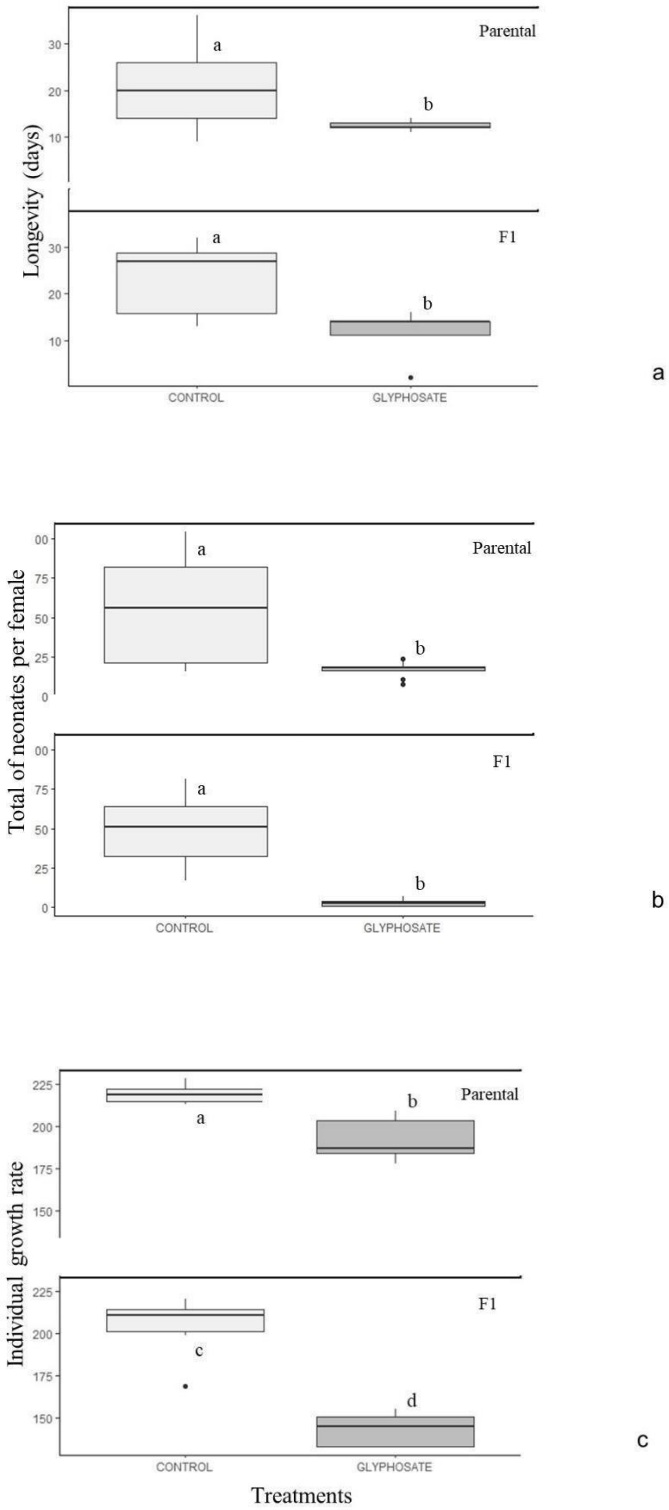


Fig. 3 Longevity (a), Total of neonates per female (b) and Individual growth rate (c) of *C. dubia* in both generations (Parental and F1), in control and glyphosate treatments.

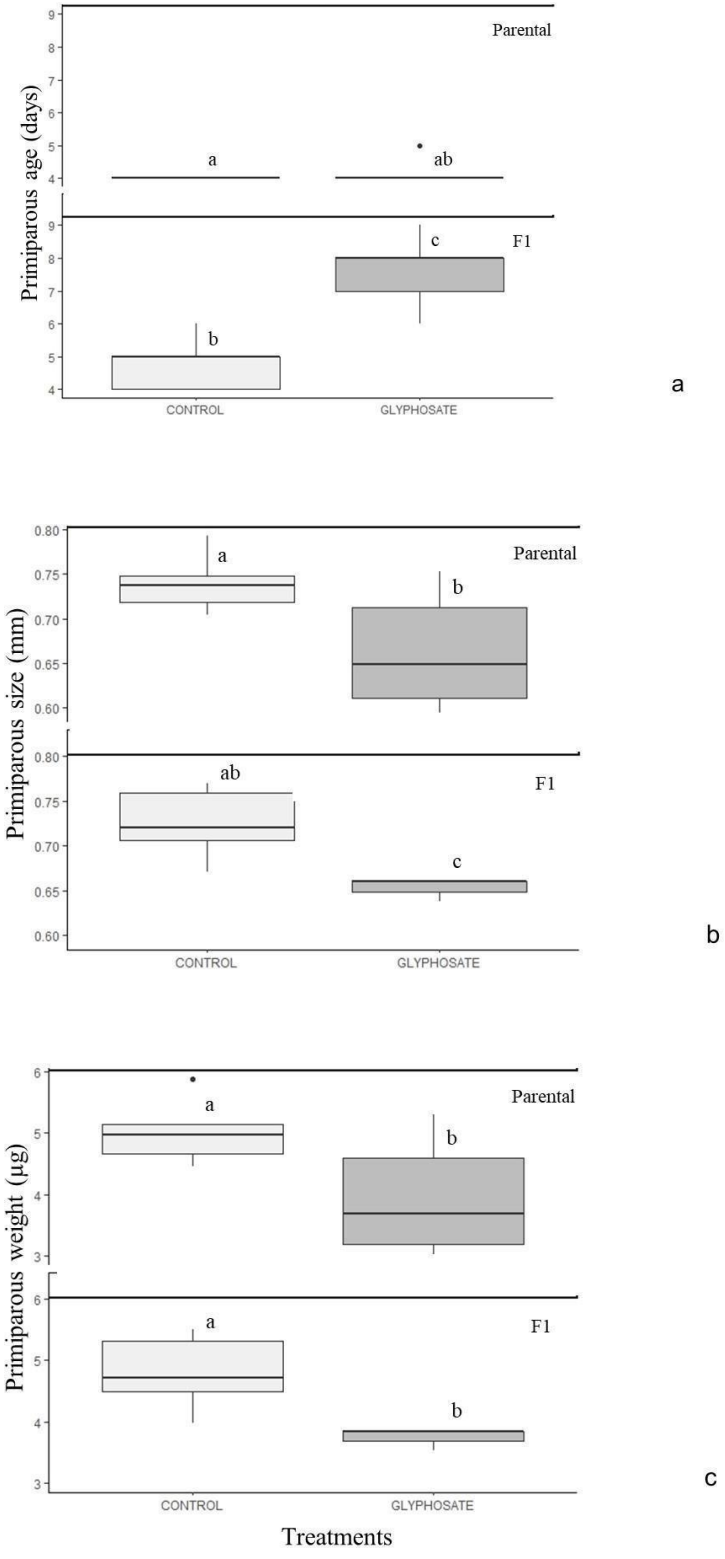


Fig. 4 Primiparous age (days) (a), primiparous size (mm) (b) and primiparous weight (µg) (c) of *C. dubia* in both generations (Parental and F1), in control and glyphosate treatments.

Table 1 Life table parameters of *C. dubia*, in each one of the treatments tested. (r: intrinsic growth rate; G: generation time; R_0: net reproductive rate. Values between parentheses refere to the confidence interval; P: Parental generation; F1: Daughter Generation). Parental Gereration exposed to tebuconazole did not produced offspring, so that was not possible to calculate life table parameters in this case.

Treatments	R	G	R0
Control P	0,27 **a** (0,2737-0,2761)	14,59 **a** (14,4985-14,6770)	54,84 **a** (54,1936-55,4894)
Control F1	0,28 **b** (0,2800-0,2820)	13,96 **b** (13,9016-14,0181)	50,36 **b** (49,9309-50,7931)
Glyphosate P	0,33 **c** (0,3258-0,3271)	8,69 **c** (8,6737-8,6997)	17,09 **c** (17,0002-17,1716)
Glyphosate F1	0,10 **d** (0,1019-0,1050)	9,67 **d** (0,6379-9,7080)	2,83 **d** (2,7823-2,8697)
Tebuconazole	---	---	---

Supplementary material

Glyphosate end Tebuconazole jeopardize both individual traits and population parameters of *Ceriodaphnia dubia* over generations

Taís Cristina Bunioto[1], Maria Eduarda Turcato[1], Luiz Alberto Beraldo de Moraes[2], Eduardo José Crevelin[2], Danilo Grünig Humberto da Silva[3], Maria Stela Castilho-Noll[1*],

[1] Department of Biology – São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto, SP, Brazil

[2] Department of Chemical - University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil

[3] Federal University of Mato Grossso do Sul, Três Lagoas - MS, Brazil

Corresponding autor: Maria Stela Castilho-Noll
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus de São José do Rio Preto - SP (UNESP/Ibilce)
Rua Cristóvão Colombo, 2265
Jardim Nazareth, São José do Rio Preto – SP
Post Code: 15.054-000
Telephon number: +551732212200
Corresponding e-mail: stela.noll@unesp.br

Chemical analysis

Quantification of Glyphosate and Tebuconazole by UPLC-MS/MS

Quantification experiment from the standards of glyphosate (**1**) and tebuconazole (**2**) was carried out by UPLC-MS/MS in the multiple reaction monitoring (MRM) mode. The reference standard solutions were prepared by appropriate dilutions the stock solutions (1.0 mg/mL) with water for compound (**1**) and methanol for compound (**2**) resulting in the following concentrations: 2.5, 5.0, 50.0, 15.0, 45.0, and 90,0 mg/mL for compound (**1**), and 2.5, 5.0, 50.0, 15.0, and 45.0 mg/mL for compound (**2**).

The commercial samples were diluted in water in the case of glyphosate to reach a final concentration of 37 mg/mL, and in methanol in the case of tebuconazole, to obtain a final concentration of 20 ug/mL. Three microliters of the standards and commercial samples were injected into an Ascentis Express C18 column (100 x 4.6 mm i.d.; 2.7 µm particle size) from SUPELCO Analytical; the mobile phase used for gradient elution consisted of formic acid 0.1% as system A and acetonitrile containing 0.1% of formic acid as system B. The flow rate was 0.5 mL/min and the gradient elution program started with 40% B, raised B to 100% in the following 7 min, remained at 100% B for 4 min, and returned to the initial condition (40% B) within the following 6 min. Triplicate injections were made for each standard solution and in quadruplicate for the samples. For each compound the optimum conditions of MRM were determined, as shown in Table 1. The calibration curves obtained in MRM mode were used for quantification of compounds (**1**) and (**2**) and the concentrations in the samples were expressed in mg/mL.

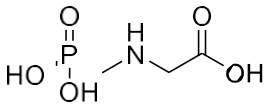
The data was acquired and processed using TargetLynx™ Application Manager software (Waters, Corporation).

Table 1 Ion transitions, instrument settings and retention times for each quantified compounds.

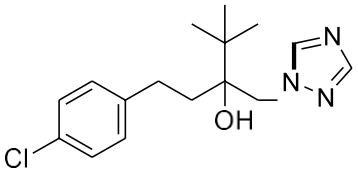
Compound	Precursor ion (*m/z*)	Product ion (*m/z*)	DP[a] (V)	CE[b] (eV)	RT[c] (min)
(1)	169,8*	88,1	40	5	3,55
	169,8**	59,9	40	15	
(2)	309,1*	125,1	40	35	8,22
	309,1**	151,0	40	20	

[a] DP = Declustering Potential
[b] CE = Collision Energy (Argon was used as collision gas)
[c] RT = Retention Time
* Quantification Transition
** Confirmation Transition

169,07 Da

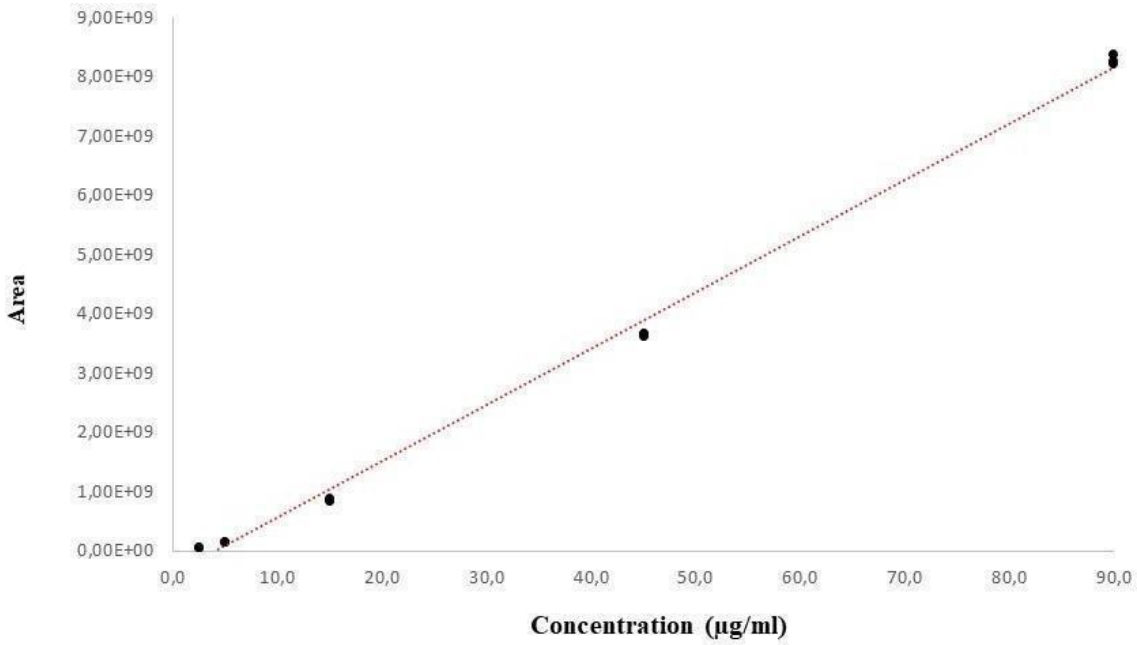


Chemical Formula: $C_3H_8NO_5P$
MW:



Chemical Formula: $C_{16}H_{22}ClN_3O$
MW: 307,82 Da

Analytical curve of glyphosate



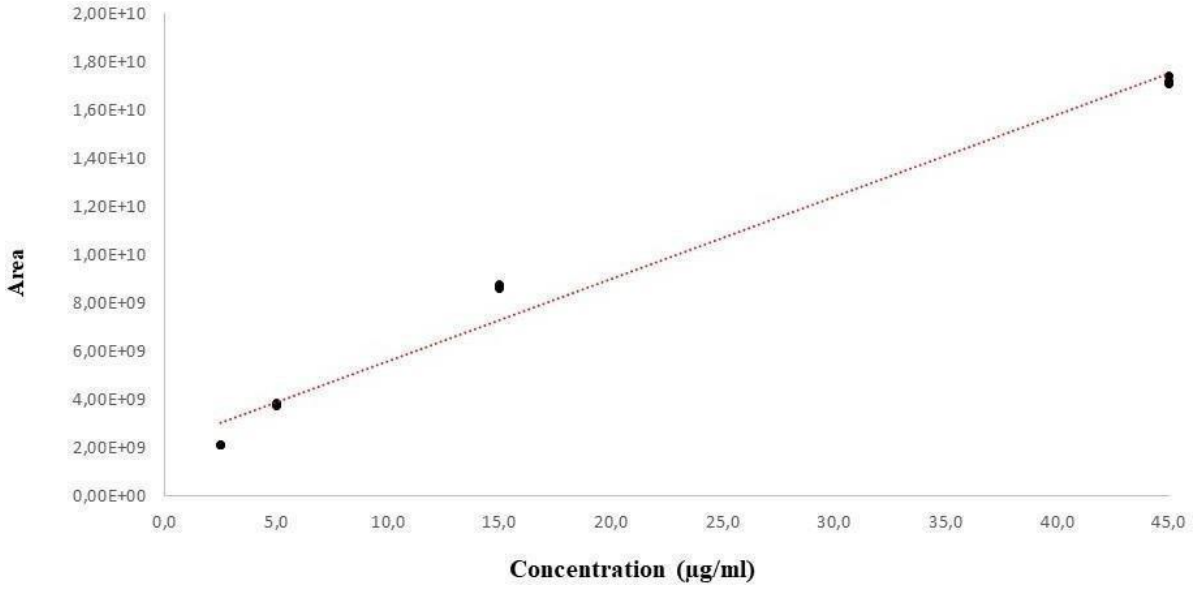
A	B	r^2	R
9,48E+07	-3,75E+08	0,9967	0,9983

Table 2 Concentration of glyphosate in the sample

Replicates Area	Mean	SD	CV(%)	Glyphosate Concentration (g/l)	Absolute Error (g/l)	Relative Error (%)
3,19E+09	3,89E+09	4,9E+08	12,04	371,43	1,43	0,39
4,07E+09						
4,17E+09						
4,14E+09						

SD = Standard Deviation; CV(%) = Coefficient of Variation.

Analytical curve of tebuconazole



A	B	r^2	R
3,41E+08	2,19E+09	0,9822	0,9911

Table 3 Concentration of tebuconazole in the sample

Replicates Area	Mean	SD	CV(%)	Tebuconazole Concentration (g/l)	Absolute Error (g/l)	Relative Error (%)
9,24E+09	9,28E+09	5,07E+07	0,55	207,88	7,88	3,94
9,34E+09						
9,23E+09						
9,31E+09						

SD = Standard Deviation; CV(%) = Coefficient of Variation.

Control chart

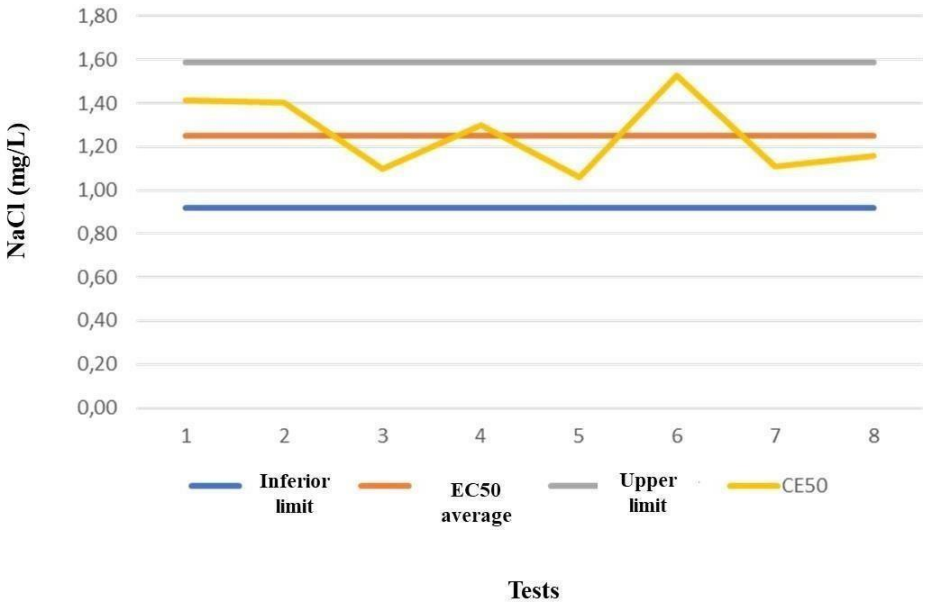


Figure 1. Results for eight sensitivitiy tests with *C. dubia* and the reference substance NaCl (mg/L), performed before the beginning of the experiment.

Results

Statistical analysis

Table 4 Degrees of freedom (Df) for ANOVA test comparing Control, Glyphosate and Tebuconazole treatments in the Parental generation.

Parameter	Df
Individual growth rate	2
Primiparous size (mm)	2
Primiparous weight (µg)	2

Table 5 Degrees of freedom (Df) for Kruskal-wallis test results comparing Control, Glyphosate and Tebuconazole treatments in the Parental generation.

Parameter	Df
Longevity (days)	2
Total of neonates per female	1
Primiparous age (days)	2

Table 6 Degrees of freedom (Df) for the factorial ANOVA test.

Parameters and interactions	
Longevity (days)	Df
Treatments	1
Generations	1
Treatments X Generations	1
Total of neonates per female	
Treatments	1
Generations	1
Treatments X Generations	1
Individual growth rate	
Treatments	1
Generations	1
Treatments X Generations	1
Primiparous age (days)	
Treatments	1
Generations	1
Treatments X Generations	1
Primipaorus size (mm)	
Treatments	1
Generations	1
Treatments X Generations	1
Primiparous weight (µg)	
Treatments	1
Generations	1
Treatments X Generations	1

Physical chemical data

Table 9 pH, Condutivity (C) and Oxygen (O) intervals, in control treatment during all experiment. Added water is the water we put the animals daily and the discarded water is the water from which we removed the organisms daily.

Parameter	Added water	Discarded water
pH	7.03 – 7.71	7.06 – 7.69
Condutivity (µS/cm)	0.079 - 0.088	0.078 - 0.090
Oxygen (mg/L)	5.46 - 9.74	5.28 – 6.94
Hardness (mg $CaCO_3$/L)	42 – 46	

Capítulo 2

A combinação entre cairomônios e glifosato afeta a interação presa-predador?

Taís Cristina Bunioto[1], Daniel Clemente Vieira Rego da Silva[2], Ana Esther De Paula Porfírio[2], Luiz Alberto Beraldo de Moraes[3], Eduardo José Crevelin[3], Danilo Grünig Humberto da Silva[4], Maria Stela Castilho-Noll[1*]

*stela.noll@unesp.br

*Telefone: 55 (17) 3221 2372

[1]Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), São José do Rio Preto, SP, Brasil
[2] Instituto de Recursos Naturais – Universidade Federal de Itajubá - Itajubá, MG, Brasil
[3] Departamento de Química - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil
[4] Campus de Três Lagoas - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Três Lagoas - MS, Brasil

Resumo

Os organismos vivos encontram-se expostos a uma série de agentes estressores em seu meio natural. No ambiente aquático não é diferente. O glifosato, por exemplo, tem sido frequentemente classificado como o herbicida mais utilizado ao redor do mundo, sendo constantemente lixiviado para dentro dos corpos d´água. Cairomônios liberados por predadores,comumente presentes no ambiente límnico, são capazes de causar mudanças morfológicas e no ciclo de vida de suas presas. Considerando-se que cairomônios e agrotóxicos acabam por coexistir nos ambientes naturais, alguns pesquisadores têm buscado avaliar os efeitos combinados destes dois químicos sobre diferentes organismos. O presente estudo avaliou os efeitos isolados e combinados do herbicida glifosato e de cairomônios liberados por *Astyanax lacustris* (lambari prata, típico predador zooplanctônico) sobre o cladócero *Daphnia magna*. Para tanto, neonatos do microcrustáceo foram submetidos à presença dos químicos e acompanhados durante toda a sua vida. Os organismos foram mensurados quando neonatos e aos 25 dias de vida. A longevidade,a idade da primeira reprodução, o número de neonatos da primeira cria e o número de neonatos produzidos ao longo da vida foram também registrados. Os resultados mostraram que não houveinfluência dos compostos sobre o tamanho do elmo e do espinho caudal nos adultos, porém a presença dos cairomônios - isoladamente e em conjunto com o glifosato - levou a um aumento do comprimento e da largura do corpo nos indivíduos com 25 dias de vida. Maior Tempo de geração (T) ocorreu no tratamento Glifosato e maiores valores de Taxa intrínseca de crescimento populacional (r) foram constatados nos tratamentos Cairomônio e Cairomônio + glifosato. A

Taxa reprodutiva líquida (R0), por sua vez, mostrou-se maior no tratamento contendo ambos os químicos, revelando que a relação presa-predador foi afetada pela combinação do herbicida e aleloquímicos. Os dados evidenciam que o glifosato pode atuar em conjunto com cairomônios, alterando parâmetros da história de vida dos organismos; tal fato é preocupante, pois sendo o zooplâncton um importante elo da cadeia trófica, pode- se inferir que mudanças no tamanho e no ciclo de vida de seus organismos são capazes de acarretar mudanças na estrutura da comunidade, trazendo consequências imprevisíveis para o equilíbrio dos ecossistemas.

Palavras-chave: Aleloquímicos, *Astyanax lacustris*, Cladocera, *Daphnia magna*, Tabela de vida, Toxicidade.

Agradecimentos: Agradecemos a Matheus Batista Figueiredo pelo auxílio no cultivo dos peixes. Agradecemos à Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro concedido à Taís C. Bunioto.

1. Introdução

Predadores podem alterar o ciclo de vida, a morfologia e até mesmo o comportamento de suas presas (Black, 1993). No que diz respeito à dinâmica populacional das comunidades aquáticas, Zaret (1980), por exemplo, já havia atribuído à predação maior importância na determinação da estruturação de tais comunidades do que outros, como competição e disponibilidade de alimento. Os cairomônios – mensageiros químicos liberados por predadores que beneficiam mais o organismo receptor do que o organismo emissor (Brown; Eisner; Whittaker, 1970) - seriam os responsáveis por trazer alterações para a vida das presas (Gu *et al.* 2021; Hahn; von Elert, 2022 e outros).

Exemplos de alterações morfológicas e no ciclo de vida, decorrentes de cairomônios são comuns na literatura: a presença do cairomônio da larva de *Chaoborus*, por exemplo, aumentou o elmo da cabeça em *Daphnia ambigua* (Hanazato 1995), levou ao retardo no início da reprodução de *Daphinia lumholtzi* (Dzialowski *et al.* 2003) e ao adiantamento do período reprodutivo e aumento significativo da taxa reprodutiva da população de *Daphnia galeata* (Weber; Vesela; Repka, 2003). A presença do cairomônio do peixe *Leuciscus idus* levou ao aumento da taxa reprodutiva líquida de *Daphnia magna* (Alkimin *et al.* 2020; Jansen *et al.* 2011),

enquanto fêmeas de *Daphnia magna* expostas ao cairomônio do peixe *C. carassius* apresentaram alterações na história de vida (Mikulski; Lipowska; Pijanowska, 2004).

Curiosamente, não apenas os cairomônios parecem induzir o desenvolvimento de defesas contra a predação em cladóceros, mas também alguns tipos de agrotóxicos. Hanazato (1991) observou que alguns inseticidas podem levar ao desenvolvimento do elmo na cabeça de *Daphnia ambigua*, semelhante ao que acontece com os animais na presença de cairomônios de predadores e sugeriu que o estímulo causado por tais agentes químicos no sistema nervoso do animal seja mimético àquele causado pelos cairomônios. Agrotóxicos podem afetar as diversas interações biológicas entre os seres que formam a comunidade zooplanctônica, causando inclusive efeitos secundários; análises dos efeitos de agrotóxicos sobre tais interações são de extrema importância para os estudos de ecotoxicologia, fato que se confirma pela própria escassez de dados na área (Hanazato 2001).

Entre os herbicidas da atualidade, aqueles à base de glifosato destacam-se por serem os mais amplamente utilizados no Brasil e no mundo para o controle de ervas daninha (Ashoka Deepenanda *et al.* 2011; Birsa *et al.* 2018; Brovini *et al.* 2021; Van Bruggen *et al.* 2021). Embora o glifosato esteja geralmente presente na água em quantidades consideradas aceitáveis, Peruzzo, Porta e Ronco (2008), por exemplo, encontraram níveis de glifosato na água variando entre 0,10 e 0,70 mg/L durante seu estudo em uma região da Argentina, conhecida por sua alta produção agrícola.

Considerando que no ambiente natural cairomônios e pesticidas coexistem nos diversos corpos d´água, é importante considerar também os efeitos resultantes da combinação de ambos os químicos sobre os organismos aquáticos. Oda *et al.* (2019) verificaram que os efeitos agudos de toxicidade do carbaril sobre neonatos de *Daphnia magna* aumentaram quando as fêmeas que lhes deram origem foram previamente expostas a cairomônios de peixes. Hanazato (1995) verificou aumento dos efeitos causados pelos cairomônios sobre os organismos quando este químico estava em conjunto com o inseticida carbaril.

Diante desse quadro, o presente estudo teve como objetivo verificar os efeitos do cairomônio do peixe *Astyanax lacustres*, conhecido como lambari prata, e do herbicida glifosato, sobre a morfologia e aspectos do ciclo de vida do cladócero *Daphnia magna*. Considerando-se que estudar a predação sobre cladóceros não envolve apenas estudar o comportamento predatório em si, mas também aspectos relacionados às adaptações induzidas (como, por exemplo, adaptações morfológicas e relativas ao ciclo de vida), e que poucos ainda são os estudos que abordam a influência conjunta de cairomônios e agrotóxicos sobre cladóceros, pode-se dizer que o presente trabalho constitui-se numa ferramenta significativa para o

aprofundamento do conhecimento da interação presa-predador no que se refere ao âmbito da limnologia.

2. Material e métodos

Agrotóxico utilizado Glifosato

Foi utilizada a formulação comercial Roundup® Original DI, pertencente à marca Monsanto. O produto contém 445g/L (44,5%m/v) de sal de di-amônio de N-(phosphonomethyl)glycine (glifosato), 370g/L (37,0%m/v) de equivalente ácido de N-(phosphonomethyl) glycine (glifosato) e 751 g/L (75,1% m/v) de "outros ingredientes". Durante todo o experimento, uma solução estoque contendo 1000 mg/L de glifosato foi diariamente preparada.

Culturas de algas e cladóceros

Populações da espécie *D. magna*, obtidas a partir da eclosão de ovos comercializados para fins de alimentação de peixes ornamentais, foram cultivadas em laboratório durante várias gerações. Os indivíduos foram mantidos no interior de cristalizadores, com capacidade para 1 ou 2 litros, na densidade máxima de 70 indivíduos/L (NBR 13373 / ABNT, 2017), utilizando-se água mineral. Os cristalizadores foram mantidos no interior de câmara climática, a temperatura constante de 22 ± 1^0C e fotoperíodo de 12 horas. A troca da água foi realizada 3 vezes por semana, ocasião em que foi oferecido como alimento a clorofícea *Raphidocelis subcapitata* na concentração de 1 × 10^5 células/ml (NBR 13373 / ABNT, 2017), além de alimento complementar a base de ração de peixe da marca TetraMin® e fermento biológico seco (NBR 13373 / ABNT, 2017), na dosagem de 20 µL/indivíduo. Um condicionador de água da marca Prodac (Biotrix blackwater) foi também adicionado à água na ocasião das trocas, sempre na dosagem de 125 µL/L. As boas condições de cultivo foram atestadas por meio de carta controle utilizando NaCl como substância de referência (NBR 13373 / ABNT, 2017).

O cultivo das algas ocorreu conforme NBR 13373 / ABNT (2017).

Cultivo dos peixes e produção dos cairomônios

O uso dos peixes para a realização deste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA/EESC-USP nº01/2023). Indivíduos da espécie *Astyanax lacustris* foram comprados em um pet shop na cidade de Itajubá – MG e aclimatados no laboratório durante cerca de 10 dias. Os peixes foram mantidos em um aquário estoque, com água mineral, temperatura de 26 ± 1^0C, fotoperíodo de 12h, pH entre 6,0 e 8,0 e aeração constante. Como alimento foi oferecida uma pequena porção diária de ração granulada para peixes, bem como alimento vivo (*Daphnia magna*), no mínimo três vezes por semana. Um total de doze peixes (tendo cada um entre 4 e 5 cm e 1 g de peso aproximadamente) permaneceram em aquário com capacidade para 20L (ABNT 15088/2022).

Com o início do experimento, e antes que fosse adicionada ração pela manhã e com auxílio de rede para captura de peixes ornamentais, um indivíduo foi diariamente retirado do cultivo e colocado em um béquer, preenchido com 1 litro de água mineral, nas mesmas condições de temperatura, pH e aeração que o cultivo estoque. No béquer, o peixe permaneceu durante 24 h, tendo sido alimentado apenas com *Daphnia magna* (nunca menos do que 40 indivíduos), sem receber ração. Após o período de 24 h, tal peixe era devolvido ao aquário estoque enquanto outro era retirado para ser então submetido ao mesmo procedimento. Dessa forma, a produção de cairomônios ocorreu diariamente durante o período experimental. Todas as manhãs, quando o peixe era retirado do béquer para ser devolvido ao cultivo estoque, a água em que este havia permanecido foi filtrada em membrana de fibra de vidro (0,7 µm) e diluída 8 vezes para então ser utilizada nos tratamentos contendo cairomônios. A metodolodia de produção dos cairomônios foi baseada nos trabalhos de Moreira *et al*. (2020) e Qin *et al*. (2022), com modificações. A quatidade de cairomônios presente na água utilizada no experimento equivaleria a cerca de 1 peixe para 10 L de água (Qin *et al*. 2022).

Experimento

Neonatos (6 - 24 h), frutos da terceira cria em diante de fêmeas adultas, foram individualmente colocados no interior de béqueres com cerca de 20ml de solução. Os seguintes tratamentos foram testados: *Controle*, *Cairomônio*, *Glifosato* (500 µg/L) e C*airomônio* + *Glifosato* (500 µg/L). No tratamento Controle os organismos permaneceram nas mesmas condições de cultivo. No tratamento Cairomônio os organismos permaneceram nas mesmas

condições de cultivo, porém foi utilizada água contendo cairomônios, conforme modo de produção explicado anteriormente. No tratamento Glifosato os organismos permaneceram nas mesmas condições de cultivo, porém foi adicionado glifosato na concentração de 500 µg/L. Já no tratamento Cairomônio + Glifosato, os organismos permaneceram nas mesmas condições de cultivo, porém na presença de cairomônios e glifosato (500 µg/L).

Para cada tratamento testado foi montado um total de 10 réplicas. Durante o período experimental, os béqueres permaneceram cobertos com plástico atóxico, no interior de câmara climática, à temperatura constante de 22 ± 1º C e fotoperíodo de 12 horas. O oxigênio, o pH, a condutividade e a dureza da água foram diariamente mensurados (Material suplementar).

Os organismos foram acompanhados durante toda sua vida. A água presente em cada um dos tratamentos foi diariamente trocada, evitando-se dessa forma a sedimentação do alimento e a degradação dos cairomônios e do glifosato. Nessa ocasião, o número de neonatos produzidos por cada fêmea foi devidamente registrado. Tais procedimentos permitiram o cálculo dos seguintes parâmetros da tabela de vida: taxa intrínseca de crescimento populacional (r), tempo de geração (T) e taxa reprodutiva líquida (R0). Durante duas ocasiões os organismos tiveram suas medidas aferidas: no dia de início do experimento (neonatos) e quando completaram 25 dias de vida. Em tais ocasiões os organismos foram delicadamente colocados em um lâmina e mensurados com auxílio de lupa Olympus SZ51. Foram aferidos o comprimento do corpo (distância linear entre o topo da cabeça e a base do espinho caudal), a largura máxima, o elmo e o espinho caudal.

Os valores nominais das concentrações de glifosato foram confirmados por meio de um aparelho de UPLC-MS (Cromatografia líquida de Ultra Performance) ACQUITY UPLC H-Class, acoplado a um espectrômetro de massas Tandem Quadrupole XevoTM TQ-D (Waters Corporation). Os detalhes das análises encontram-se descritas no Material Suplementar.

Análise estatística

Os resultados foram estatisticamente analisados utilizando-se ANOVA one-way e *post hoc* de Tukey, ou Kruskal-Wallis e *pos hoc* de Dunn (conforme distribuição dos dados). A normalidade e homocedasticidade foram verificadas por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os parâmetros da tabela de vida (taxa intrínseca de crescimento populacional (r), tempo de geração (T) e taxa reprodutiva líquida (R_0) foram calculados por meio da técnica de Bootstrap (Meyer, 1986).

Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3. Resultados

Não houve diferença estatisticamente significativa para a Longevidade ($p = 0,3361$) (Fig 1A), a Idade da primeira reprodução ($p = 0,0743$) (Fig 1B) e o Total de neonatos da primeira cria ($p = 0,3724$) (Fig 1C) quando comparados os quatro tratamentos estudados.

Uma vez que os neonatos utilizados durante o experimento apresentaram idade bastante próxima entre si, diferenças estatisticamente significativas entre o Comprimento do corpo (Fig 2A), Largura do corpo (Fig 2B), Tamanho do elmo (Fig 2C) e Tamanho do espinho caudal dos neonatos (Fig 2D) também não foram encontradas ao se comparar os diferentes tratamentos analisados ($p = 0,0616$; $p=0,2209$; $p = 0,7309$ e $0,2630$, respectivamente).

Tanto os adultos com idade de 25 dias cultivados no tratamento Cairomônio quanto aqueles cultivados no tratamento Cairomônio + Glifosato, apresentaram Comprimento do corpo com valor médio de cerca de 0,2 mm maior do que os indivíduos que permaneceram no tratamento Controle (Fig. 3A) ($p = 0,0107$ e $p = 0,0044$, respectivamente). Não houve diferença entre o Comprimento do corpo para os adultos de 25 dias quando comparados os tratamentos Controle e Glifosato ($p = 0,5977$), Cairomônio e Glifosato ($p = 0,2471$) e Cairomônio e Cairomônio + Glifosato ($p = 0,9988$).

A Largura do corpo dos adultos aos 25 dias apresentou o mesmo padrão verificado no caso do Comprimento do corpo: os organismos cultivados nos tratamentos Cairomônio e Cairomônio + Glifosato, apresentaram, em média, Largura do corpo cerca de 0,13 mm maior do que os indivíduos que permaneceram no tratamento Controle (Fig. 3B) ($p = 0,0348$ e $p = 0,0044$, respectivamente). Não houve diferença entre a Largura do corpo para os adultos de 25 dias quando comparados os tratamentos Controle e Glifosato ($p = 0,4266$), Cairomônio e Glifosato ($p = 0,6275$) e Cairomônio e Cairomônio + Glifosato ($p = 0,9854$).

O Tamanho do elmo e do espinho caudal dos indivíduos com 25 dias de vida não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos estudados ($p = 0,1608$ e $p = 0,7349$, respectivamente).

Tabela de vida

Nos tratamentos Cairomônio, Glifosato e Cairomônio + Glifosato as fêmeas produziram,

em média, cerca de 7, 6 e 12 neonatos a mais ao longo de toda a vida, respectivamente, quando comparadas às do tratamento Controle. A Taxa reprodutiva líquida (R0), portanto, foi maior nos tratamentos onde os químicos estavam presentes (Fig. 4A) (p = 0,0000; p = 0,0000 e p = 0,0000, respectivamente). O tratamento Glifosato apresentou R0 menor que os tratamentos Cairomônio e Cairomônio + Glifosato (p = 0,0000, em ambos os casos); a produção de neonatos foi cerca de 3% menor no tratamento Glifosato comparado ao tratamento Cairomônio e cerca de 10% menor no tratamento Glifosato comparado ao tratamento Cairomônio + glifosato. O tratamento Cairomônio + Glifosato apresentou maior taxa reprodutiva líquida em relação ao tratamento Cairomônio (p = 0,0000), com produção média de neonatos cerca de 7,5% maior.

O tempo de geração verificado no tratamento Glifosato foi, em média, cerca de 1 dias maior quando comparado ao tratamento Controle, 2 dias maior quando comparado ao tratamento Cairomônio e 1,5 dias maior quando comparado ao tratamento Cairomônio + glifosato, tendo-se apresentado estatisticamente diferente em tais casos (p = 0,000 em relação aos tratamentos Controle, Cairomônio e Cairomônio + Glifosato) (Fig. 4B). Os tratamentos Cairomônio e Cairomônio + Glifosato apresentaram queda no tempo de geração - cerca de 1,5 dias e 1 dia, respectivamente - quando comparados ao tratamento Controle (p = 0,0000 em ambos os casos). O tratamento Cairomônio + Glifosato apresentou Tempo de geração médio de cerca de 0,6 dias maior quando comparado ao tratamento Cairomônio (p = 0,0000).

O tratamento Glifosato apresentou, em média, Taxa intrínseca de crescimento populacional (r) cerca de 1% menor que o tratamento Controle, 12% menor que o tratamento Cairomônio e 4% menor que o tratamento Cairomônio + glifosato (p = 0,0000 em todos os casos) (Fig. 4C). O tratamento Cairomônio apresentou, em média, Taxa intrínseca de crescimento populacional cerca de 12% maior do que o tratamento Controle e cerca de 4% maior que o tratamento Cairomônio + glifosato (p = 0,0000 em ambos os casos). O tratamento Cairomônio + Glifosato também teve maior valor médio de r - cerca de 8% - quando comparado ao tratamento Controle (p = 0,0000).

4. Discussão

A Longevidade, a Idade da primeira reprodução e o Total de neonatos da primeira cria não foram afetados pela presença dos cairomônios na água, pela presença do herbicida glifosato na concentração de 500 µg/L, ou mesmo pela combinação de ambos os químicos (Fig. 1). Tais dados corroboram resultados obtidos, por exemplo, por Pietrzak *et al.* (2020), quetambém não verificaram efeitos de cairomônios sobre a longevidade de *Daphnia magna* e

Daphnia pulex. Alkimin *et al.* (2020) também não encontraram efeitos sobre a Idade da primeira reprodução para *Daphnia magna* exposta a cairomônios de peixes. Por outro lado, *Daphnia magna* se reproduziu precocemente quando exposta a cairomônios de peixes durante estudo realizado por Chakri *et al*. (2010), enquanto *Daphnia galeata*, também exposta a cairomônios de peixe, produziram mais neonatos na primeira ninhada, sugerindo uma maior alocação de energia para a reprodução em decorrência do agente estressor (Declerck; Weber, 2003).

A ausência de diferença estatisticamente significativa, observada entre o Comprimento e Largura do corpo, Tamanho do elmo e Tamanho do espinho caudal dos neonatos (Fig. 2) deve-se, certamente, ao fato de todos apresentarem idade semelhante e terem nascido sob as mesmas condições de cultivo. Já o Tamanho e Largura do corpo dos adultos com 25 dias, apresentou-se maior nos tratamentos onde o cairomônio esteve presente (Fig. 3A e 3B). Tal fato chama a atenção, uma vez que, em geral, dafinídeos reduzem o tamanho corporal na presença de peixes (Burks; Jeppesen; Lodge, 2000; Reede, 1995) visto aumentarem as chances de sobreviver ao tornarem-se menos visíveis aos predadores (Boros; Boross 2022).

O efeito dos cairomônios na morfologia é influenciado pela temperatura, pelas condições alimentares e estado nutricional das presas, assim como pela densidade dos predadores (Hanazato, 1994). Para Pollock e Chivers (2004), as respostas decorrentes dos cairomônios dependem de uma série de fatores, podendo ser alteradas conforme a densidade dos organismos, nicho das presas, condições do habitat e dieta dos predadores. Assim, é possível que no caso do presente estudo, essa resposta inesperada seja decorrente dos fatores supracitados.

As fêmeas expostas ao glifosato não apresentaram alterações no Tamanho e Largura do corpo (Fig. 3A e 3B), corroborando dados de Da Silva *et al.* (2021) e Nogueira *et al.* (2019), por exemplo, que também não encontraram diferenças sobre o crescimento de *D. magna* exposta ao glifosato. Um dos motivos pelos quais o glifosato pode eventualmente afetar o tamanho dos organismos deve-se à alterações na ingestão de alimento (Xu *et al.* 2017), o que parece não ter ocorrido no presente estudo. Outro fator importante diz respeito a possíveis perturbações decorrentes da ação das chamadas espécies reativas ao oxigênio (ERO) - moléculasaltamente reativas e instáveis - que sofreriam alterações na presença do glifosato (Nogueira *et al.* 2022; Xie *et al.* 2007). É preciso lembrar que, no caso do presente trabalho, talvez a concentração de 500 µg/L de glifosato não tenha sido suficiente para afetar negativamente o tamanho de *D magna*.

O Tamanho do elmo e do espinho caudal nos adultos com 25 dias não apresentou diferença nos quatro tratamentos analisados (Fig. 3C e 3D). Em condições bastante específicas,

o inseticida carbaril foi capaz de induzir o desenvolvimento do elmo em *Daphnia ambigua* (Hanazato, 1992) e em seu estudo realizado em 1995, Hanazato verificou que o carbaril, quando em conjunto com cairomônios de *Chaoborus*, potencializou o desenvolvimento de elmos mais alongados e duradouros em *Daphnia ambigua*. Qin *et al.* (2022), por sua vez, relatam que altas concentrações de atrazina reduziram o tamanho do espinho em *Daphnia pulex*, debilitando suas defesas contra a predação. Nesse último caso, é possível hipotetizar que a exposição aos agrotóxicos leva a umprejuízo comrelação ao desenvolvimento das defesas anti-predação, pois perturba o metabolismo do animal, obrigando-o a manter processos metabólicos custosos, como aqueles relacionados à detoxificação, por exemplo (Beckerman;Wieski; Baird, 2007; Pestana *et al.* 2010).

Considerando-se os parâmetros relacionados à tabela de vida de *D magna* é possível observar, inicialmente, aumento da Taxa reprodutiva líquida (R0) em todos os tratamentos testados quando comparados ao Controle (Fig. 4A). Sabe-se que na presença de agentes estressores, como é o caso dos cairomônios e agrotóxicos, muitos organismos podem aumentar a prole na tentativa de conservar a população (Gama-Flores *et al.* 2013; Garza- León *et al.* 2017; Moreira *et al.* 2020). Considerando-se o estudo de Drzymala e Kalka (2020), esse resultado pode ser também devido ao chamado efeito hormese, segundo o qual a resposta reprodutiva seria estimulada por baixas doses dos químicos aos quais os animais foram expostos, mas seria inibida por altas concentrações dessas mesmas substâncias. Por fim, os agentes estressores podem às vezes interagir de modo sinérgico (Darling; Côté, 2008), o que de fato parece ter ocorrido no caso do tratamento Cairomônio + Glifosato.

O Tempo de geração (T) foi maior no tratamento onde o Glifosato estava presente isoladamente (Fig 4B). Ao contrário do verificado no presente estudo, Garza-León *et al.* (2017) observaram queda no tempo de geração de *Alona guttata* exposta ao glifosato. Nos tratamentos nos quais o cairomônio esteve presente, o Tempo de Geração foi menor em relação ao tratamento Controle, talvez porque conforme já mencionado, a presença de agentes estressores pode causar aumento da prole, diminuindo o tempo entre gerações.

A Taxa intrínseca de crescimento populacional (r), por sua vez, apresentou-se maior nos tratamentos onde o cairomônio esteve presente. *Daphnia laevis* também apresentou aumento de r quando exposta aos sinais químicos liberados por tilápia (Tolardo; Da Silva Ferrão-Filho; Santagelo, 2016). A presença do glifosato, porém, causou queda de r em *Alona guttata* cultivada na concentração 0,7 mg/L (Garza-León *et al.* 2017). Tanto a presença isolada do fipronil quanto do fipronil associado com cairomônios de peixe, causaram queda de r em *Ceriodaphnia silvestrii* (Moreira *et al.* 2020). Desse modo, a presença do glifosato no tratamento Cairomônio +

Glifosato pode ter ocasionado a queda na taxa intrínseca de crescimento populacional quando comparado ao tratamento onde o cairomônio esteve presente isoladamente.

Diante desse quadro, é possível dizer que cairomônios e glifosato podem afetar a relação presa-predador, o que, por sua vez, pode alterar a estrutura das populações e comunidades. A predação seletiva por tamanho nos sistemas aquáticos pode influenciar a dinâmica populacional e estrutura da comunidade, visto alterar a idade e tamanho dos indivíduos que constituem as populações (Weider; Pijanowska, 1993). Considerando-se o presente trabalho, a presença dos cairomônios de peixes poderia vir a aumentar a vulnerabilidade de *D. magna* à predação, que acabaria se tornando mais visível com o aumento do tamanho do corpo. Vale ressaltar que Tolardo, Da Silva Ferrão-Filho e Santagelo (2016) observaram variabilidade de respostas à predação em diferentes espécies e clones de cladóceros, assim como maior vulnerabilidade à predação por parte de *Daphnia spinulata*, em decorrência da ausência de mudanças adaptativas nesta espécie.

Nesse sentido, para uma melhor compreensão da dinâmica dos ecossistemas aquáticos é necessário que se considere a ação conjunta de agentes estressores, de origem natural e antrópica. O presente trabalho mostra que tais químicos podem exercer influência sobre os organismos, alterando parâmetros importantes para a conservação das populações, como, por exemplo, total de prole e início da maturidade sexual. Esse fato, por si só, já é um fator determinante para a preservação dos ambientes em sua integridade e deve ser considerado por estudiosos, autoridades ambientais e todos aqueles que zelam pelos cuidados com os biossistemas.

5. Conclusões

Pode-se dizer que, dentre os parâmetros analisados, a Taxa reprodutiva líquida (R_0) mostrou-se maior para *D. magna* quando esta foi submetida ao tratamento Cairomônios + glifosato. Nesse sentido, é possível concluir que, apesar dos químicos em conjunto nem sempre induzirem a formação de defesas morfológicas anti-predação
- como espinhos e elmos mais longos – eles podem alterar parâmetros da tabela de vida, o que, por sua vez, acabará por afetar a dinâmica da relação presa-predador.

A predação é um processo biótico bem conhecido, que tem um papel fundamental na dinâmica da comunidade, embora haja uma variação considerável em seu efeito geral (Janiak;

Branson, 2021). A relação presa- predador pode ser um dos principais mecanismos atuantes na estruturação de comunidades aquáticas (Jeppesen *et al.* 1997). O fato de que cairomônios e glifosato são capazes de interagir, afetando tal conformidade torna a presença de agrotóxicos na água bastante preocupante já que coloca em risco o resguardo das populações.

Referências

ABNT 2017. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp.(Crustácea, Cladócera). (Norma número NBR 13713:2017).

ABNT 2022. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes (*Cyprinidae*). (Norma número NBR 15088:2022).

ALKIMIN, G. D.; NUNES, B.; SOARES, A. M.; BELLOT, M.; GÓMEZ-CANELA, C.; BARATA, C. *Daphnia magna* responses to fish kairomone and chlorpromazine exposures. **Chemico-Biological Interactions**, v. 325, p. e109123, 2020. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109123

ASHOKA DEEPANANDA, K. H. M.; GAJAMANGE, D.; DE SILVA, W. A. J. P.; WEGIRIYA, H. C. E. Acute toxicity of a gliphosate herbicide, Roundup®, to two freshwater crustaceans. **Journal of the national science foundation of Sri Lanka**, v. 39, n. 2, p. 169-173, 2011.

BECKERMAN, A. P.; WIESKI, K.; BAIRD, D. J. Behavioural versus physiological mediation of life history under predation risk. **Oecologia**, v. 152, p. 335-343, 2007. https://doi.org/10.1007/s00442-006-0642-6

BIRSA, T.; KALNENIECE, K.; JANSONS, M.; KALNINS, M.; OZOLINA, I.; BERZINS, A.; SVINKA, V.; SVINKA, R.; BARTKEVICS, V.; MUTER, O. Evaluation of Glyphosate Ecotoxicity and Biodegradability in the Municipal Wastewaters. **Materials Science and Applied Chemistry**, v. 762, p. 75-80, 2018. https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.762.75

BLACK, A.R. Predator-induced phenotypic plasticity in *Daphnia pulex*: Life history and morphological responses to *Notonecta* and *Chaoborus*. **American Society of Limnology and Oceanography**, v. 38, n. 5, p. 986-996, 1993. https://doi.org/10.4319/lo.1993.38.5.0986

BOROS, G.; BOROSS, N. Do omnivorous black bullhead (*Ameiurus melas*) and planktivorous common bleak (*Alburnus alburnus*) elicit different inducible defences in *Daphnia magna*?. **Hydrobiologia**, v. 849, n. 21, p. 4777-4786, 2022. https://doi.org/10.1007/s10750-022-05015-3

BROVINI, E. M.; DE DEUS, B. C. T.; VILAS-BOAS, J. A.; QUADRA, G. R.; Carvalho, L.; MENDONÇA, R. F.; PEREIRA, R. O.; CARDOSO, S. J. Three-bestseller pesticides in Brazil: Freshwater concentrations and potential environmental risks. **Science of The Total Environment**, v. 771, p. e144754, 2021. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144754

BROWN, W. L. Jr.; EISNER, T.; WHITTAKER, R. H. Allomones and kairomones: transspecific chemical messengers. **BioScience**, v. 20, p. 21-22, 1970. https://doi.org/10.2307/1294753

BURKS, R. L.; JEPPESEN, E.; LODGE, D. M. Macrophyte and fish chemicals suppress *Daphnia* growth and alter life-history traits. **Oikos**, v. 88, n. 1, p. 139-147, 2000. https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2000.880116.x

CHAKRI, K.; TOUATI, L.; ALFARHAN, A. H.; AL-RASHEID, K. A.; SAMRAOUI, B. Effect of vertebrate and invertebrate kairomones on the life history of *Daphnia magna* Straus (Crustacea: Branchiopoda). **Comptes Rendus Biologies**, v. 333, n. 11-12, p. 836-840, 2010. https://doi.org/10.1016/j.crvi.2010.09.004

DA SILVA, M. L. N.; NOGUEIRA, D. J.; KÖERICH, J. S.; VAZ, V. P., JUSTINO, N. M.; SCHMIDT, J. R. A.; VICENTINI, D. S.; MATIAS, M. S.; CASTILHOS, Jr A. B.; FUZINATTO, C. F.; MATIAS, W. G. Multigenerational toxic effects on *Daphnia magna* induced by silver nanoparticles and glyphosate mixture. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 40, n. 4, p. 1123-1131, 2021. https://doi.org/10.1002/etc.4952

DARLING, E. S.; CÔTÉ, I. M. Quantifying the evidence for ecological synergies. **Ecology letters**, v. 11, n. 12, p. 1278-1286, 2008. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01243.x

DECLERCK, S.; WEBER, A. Genetic differentiation in life history between *Daphnia galeata* populations: an adaptation to local predation regimes? **Journal of Plankton Research**, v. 25, n. 1, p. 93-102, 2003. https://doi.org/10.1093/plankt/25.1.93

DRZYMALA, J.; KALKA, J. Elimination of the hormesis phenomenon by the use of synthetic sea water in a toxicity test towards *Aliivibrio fischeri*. **Chemosphere**, v. 248,p. e126085, 2020. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126085

DZIALOWSKI, A. R.; LENNON, J. T.; O´BRIEN, W. J.; SMITH, V. H. Predator - induced phenotypic plasticity in the exotic cladoceran *Daphnia lumholtzi*. **Freshwater Biology**, v. 48, n. 9, p. 1593-1602, 2003. https://doi.org/10.1046/j.1365-427.2003.01111.x

GAMA-FLORES, J. L.; HUIDOBRO-SALAS, M. E., SARMA, S. S. S.; NANDINI, S. Effects of allelochemicals released by vertebrates (fish, salamander and tadpole) on *Moina macrocopa* (Cladocera). **Allelopathy Journal**, v. 31, n. 2, p. 415, 2013.

GARZA-LEÓN, C. V.; ARZATE-CÁRDENAS, M. A.; RICO-MARTÍNEZ, R. Toxicity evaluation of cypermethrin, glyphosate, and malathion, on two indigenous zooplanktonic species. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 22, p. 18123-18134, 2017. https://doi.org/10.1007/s11356-017-9454-y

GU, L.; XU, Y.; YANG, T.; QIN, S.; ZHANG, L.; SUN, Y.; HUANG, Y.; YANG, Z. Predator-induced allometric changes in the tail spine length of *Daphnia*: a distinct resource allocation strategy. **Journal of Plankton Research**, v. 43, n. 6, p. 884-893, 2021. https://doi.org/10.1093/plankt/fbab063

HAHN, M.; VON ELERT, E. One kairomone and multiple effects in daphnia Species—5α-cyprinol sulfate induces morphological defenses in the invasive species *Daphnia lumholtzi*. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 10, p. e804521, 2022. https://doi.org/10.3389/fevo.2022.804521

HANAZATO, T. Pesticides as chemical agents inducing helmet formation in *Daphnia ambigua*. **Freshwater Biology**. v. 26, p. 419–424, 1991. https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.1991.tb01408.x

HANAZATO, T. Insecticide inducing helmet development in *Daphnia ambigua*. **Archiv für Hydrobiologie**, v. 123, n. 4, p. 451-457, 1992. https://doi.org/10.1127/archiv-hydrobiol/123/1992/451

HANAZATO, T. Kairomone-mediated predator–prey relationship in lake zooplankton communities. **Japanese Journal of Ecology**, v. 44, p. 61-77, 1994. https://doi.org/10.18960/seitai.44.1_61

HANAZATO, T. Combined effect of the insecticide carbaryl and the *Chaoborus* kairomone on helmet development in *Daphnia ambigua*. **Hydrobiologia**, v. 310, p. 95-100, 1995. https://doi.org/10.1007/BF00015527

HANAZATO, T. Pesticide effects on freshwater zooplankton: an ecological perspective. **Environmental Pollution**, v. 112, n. 1, p. 1-10, 2001. https://doi.org/10.1016/S0269-7491(00)00110-X

JANIAK, D. S.; BRANSON, D. Impacts of habitat and predation on epifaunal communities from seagrass beds and artificial structures. **Marine Environmental Research**, v. 163, p. e105225, 2021. https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2020.105225

JANSEN, M.; DE MEESTER, L.; CIELEN, A.; BUSER, C. C.; STOKS, R. The interplay of past and current stress exposure on the water flea *Daphnia*. **Functional Ecology**, v. 25, n. 5, p. 974-982, 2011. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2011.01869.x

JEPPESEN, E.; LAURIDSEN, T.; MITCHELL, S. F.; BURNS, C. W. Do planktivorous fish structure the zooplankton communities in New Zealand lakes? **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 31, n. 2, p. 163-173, 1997. https://doi.org/10.1080/00288330.1997.9516755

MEYER J. S.; INGERSOLL, C. G.; MCDONALD, L. L.; BOYCE, M. S. Estimating uncertainty in population growth rates: jackknife vs. bootstrap techniques. **Ecology**, v. 67, n. 5, p. 1156-1166, 1986. https://doi.org/10.2307/1938671

MIKULSKI, A.; LIPOWSKA, D.; PIJANOWSKA, J. Ontogenetic changes in *Daphnia* responsiveness to fish kairomone. **Hydrobiologia**, v. 526, p. 219-224, 2004. https://doi.org/10.1023/B:HYDR.0000041601.26048.6d

MOREIRA, R. A.; ROCHA, O.; PINTO, T. J. D. S.; DA SILVA, L. C. M.; GOULART, B. V.; MONTAGNER, C. C.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Life-history traits response to effects of fish predation (kairomones), fipronil and 2, 4-D on neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 79, p. 298-309, 2020. https://doi.org/10.1007/s00244-020-00754-7

NOGUEIRA, D. J.; DA SILVA, A. C. D. O.; DA SILVA, M. L. N.; VICENTINI, D. S.; MATIAS, W. G. Individual and combined multigenerational effects induced by polystyrene nanoplastic and glyphosate in *Daphnia magna* (Strauss, 1820). **Science of The Total Environment**, v. 811, p. e151360, 2022. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151360

ODA, Y.; SATO, K.; HANAZATO, T.; CHANG, K. H.; SAKAMOTO, M. Enhanced sensitivity to an insecticide carbaryl in *Daphnia magna* mediated by fish kairomone. **Limnology**, v. 20, n. 2, p. 137 – 141, 2019. https://doi.org/10.1007/s10201-019-00572-4

PERUZZO, P. J.; PORTA, A. A.; RONCO, A. E. Levels of glyphosate in waters, sediments and soil associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. **Environmental pollution**, v. 156, n. 1, p. 61-66, 2008. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2008.01.015

PESTANA, J. L.; LOUREIRO, S.; BAIRD, D. J.; SOARES, A. M. Pesticide exposure and inducible antipredator responses in the zooplankton grazer, *Daphnia magna* Straus. **Chemosphere**, v. 78, n. 3, p. 241-248, 2010. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.10.066

PIETRZAK, B.; RABUS, M.; RELIGA, M.; LAFORSCH, C.; DANKO, M. J. Phenotypic plasticity of senescence in *Daphnia* under predation impact: no ageing acceleration when the perceived risk decreases with age. **Royal Society Open Science**, v. 7, n. 2, p. e191382, 2020. https://doi.org/10.1098/rsos.191382

POLLOCK, M. S.; CHIVERS, D. P. The effects of density on the learned recognition of heterospecific alarm cues. **Ethology**, v. 110, n. 5, p. 341-349 (2004). https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.2004.00934.x

QIN, S.; YANG, T.; YU, B.; ZHANG, L.; GU, L.; SUN, Y.; YANG, Z. The stress effect of atrazine on the inducible defense traits of *Daphnia pulex* in response to fish predation risk: Evidences from morphology, life history traits, and expression of the defense-related genes. **Environmental Pollution**, v. 311, p. e119965, 2022. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119965

REEDE, T. Life history shifts in response to different levels of fish kairomones in *Daphnia*. **Journal of Plankton Research**, v. 17, n. 8, p. 1661-1667, 1995. https://doi.org/10.1093/plankt/17.8.1661

TOLARDO, M.; DA SILVA FERRÃO-FILHO, A.; SANTANGELO, J. M. Species and clone-dependent effects of tilapia fish (Cichlidae) on the morphology and life-history of

temperate and tropical *Daphnia*. **Ecological research**, v. 31, p. 333-342, 2016. https://doi.org/10.1007/s11284-016-1337-z

VAN BRUGGEN, A. H.; FINCKH, M. R.; HE, M.; RITSEMA, C. J.; HARKES, P.; KNUTH, D.; GEISSEN, V. Indirect effects of the herbicide glyphosate on plant, animal and human health through its effects on microbial communities. **Frontiers in Environmental Science**, v. 9, 2021. https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.763917

WEBER, A.; VESELA, S.; REPKA, S. The supposed lack of trade-off among *Daphnia galeata* life history traits is explained by increased adult mortality in *Chaoborus* conditioned treatments. **Hydrobiologia**, v. 491, p. 273- 287, 2003. https://doi.org/10.1023/A:1024481217605

WEIDER, L. J.; PIJANOWSKA, J. Plasticity of *Daphnia* life-histories in response to chemical cues from predators. **Oikos**, v. 67, p. 385–392 (1993). https://doi.org/10.2307/3545351

XIE, F.; LAMPI, M. A.; DIXON, D. G.; GREENBERG, B. M. Assessment of the toxicity of mixtures of nickel or cadmium with 9,10-phenanthrenequinone to *Daphnia magna*: impact of a reactive oxygen-mediated mechanism with different redox-active metals. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, p. 1425– 1432, 2007. https://doi.org/10.1897/06-224r.1

XU, Y.; LI, A. J.; LI, K.; QIN, J.; LI, H. Effects of glyphosate-based herbicides on survival, development and growth of invasive snail (*Pomacea canaliculata*). **Aquatic Toxicology**, v. 193, p. 136-143, 2017. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.10.011

ZARET, T. M. 1980. Predation and freshwater communities. Yale University Press, London,

187 p.

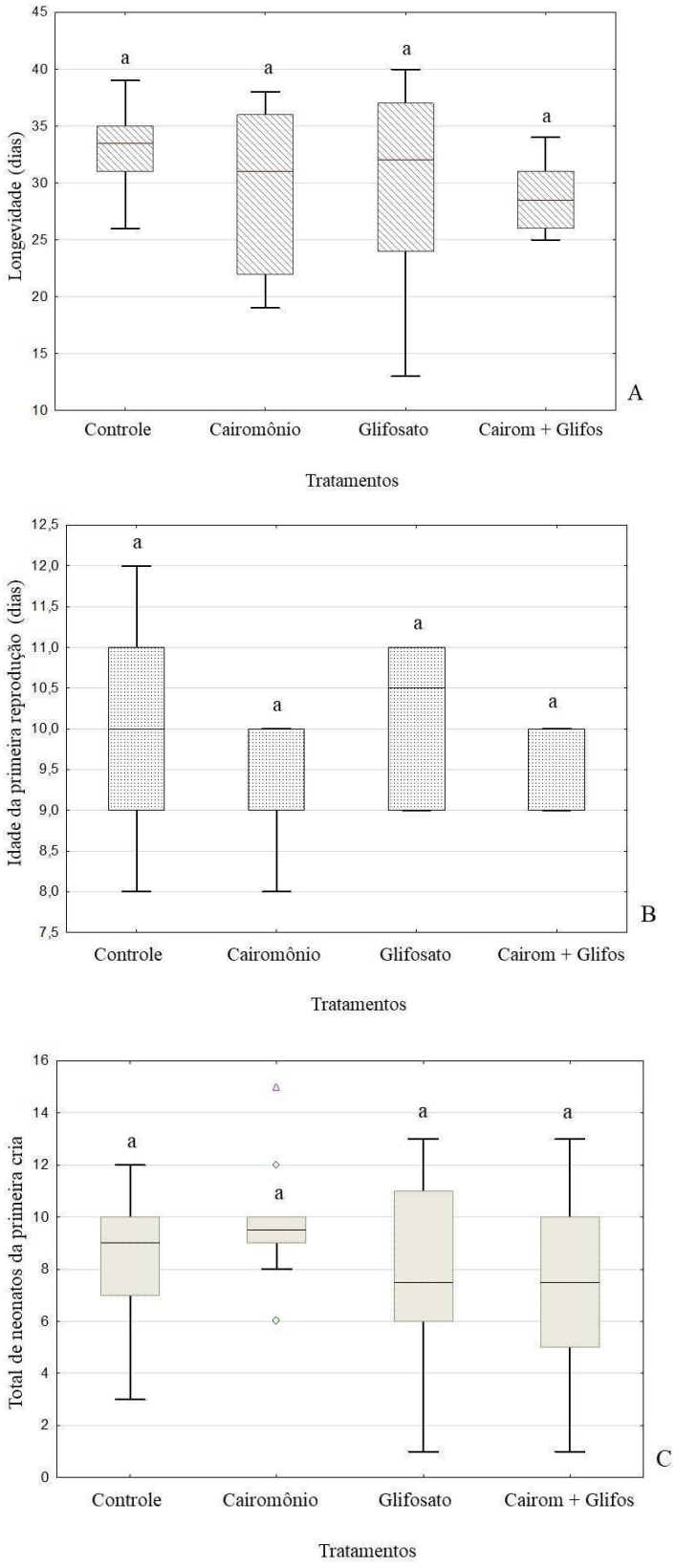


Fig. 1 Longevidade (A), Idade da primeira reprodução (B) e Total de neonatos da primeira cria (C) de *D. magna*, em todos os tratamentos testados.(Cairom + Glifos = Tratamento Cairomônio + Glifosato).

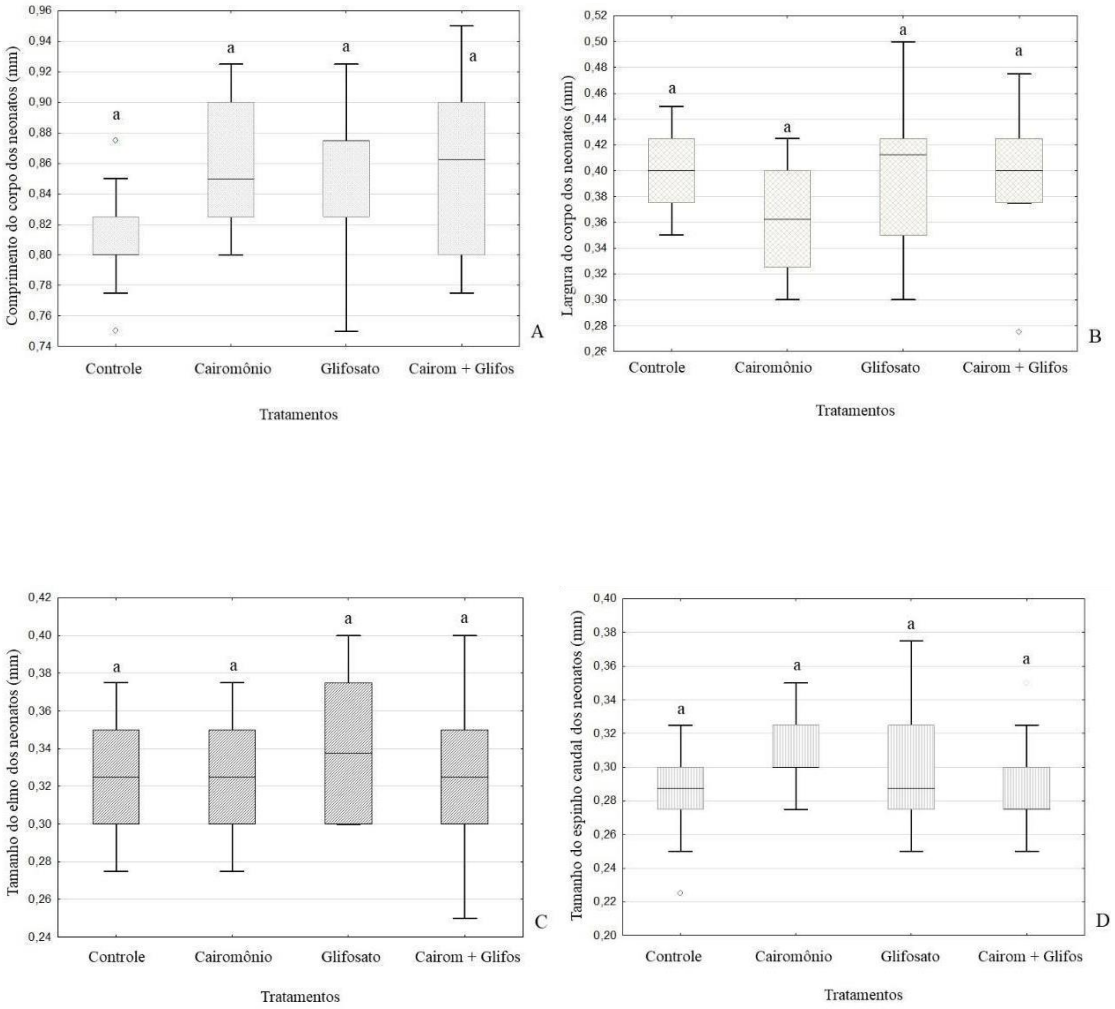


Fig. 2 Comprimento do corpo dos neonatos (mm) (A), Largura do corpo dos neonatos (mm) (B), Tamanho do elmo dos neonatos (mm) (C) e Tamanho do espinho caudal dos neonatos (mm) (D) de *D. magna* em todos os tratamentos testados.(Cairom + Glifos = Tratamento Cairomônio + Glifosato).

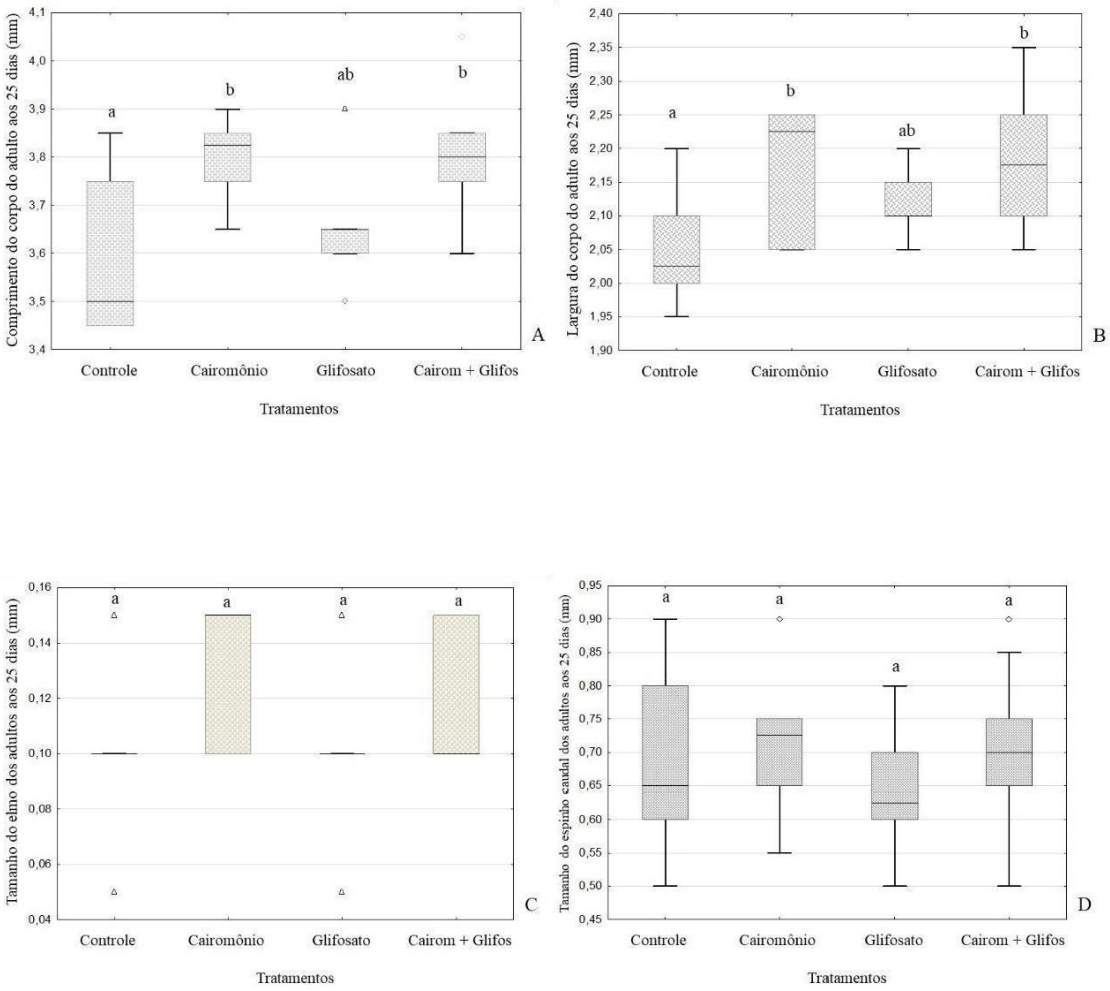


Fig. 3 Comprimento do corpo do adulto aos 25 dias (mm) (A), Largura do corpo do adulto aos 25 dias (mm) (B), Tamanho do elmo do adulto aos 25 dias (mm) (C) e Tamanho do espinho caudal do adulto aos 25 dias (mm) (D) de *D. magna* em todos os tratamentos testados.(Cairom + Glifos = Tratamento Cairomônio + Glifosato).

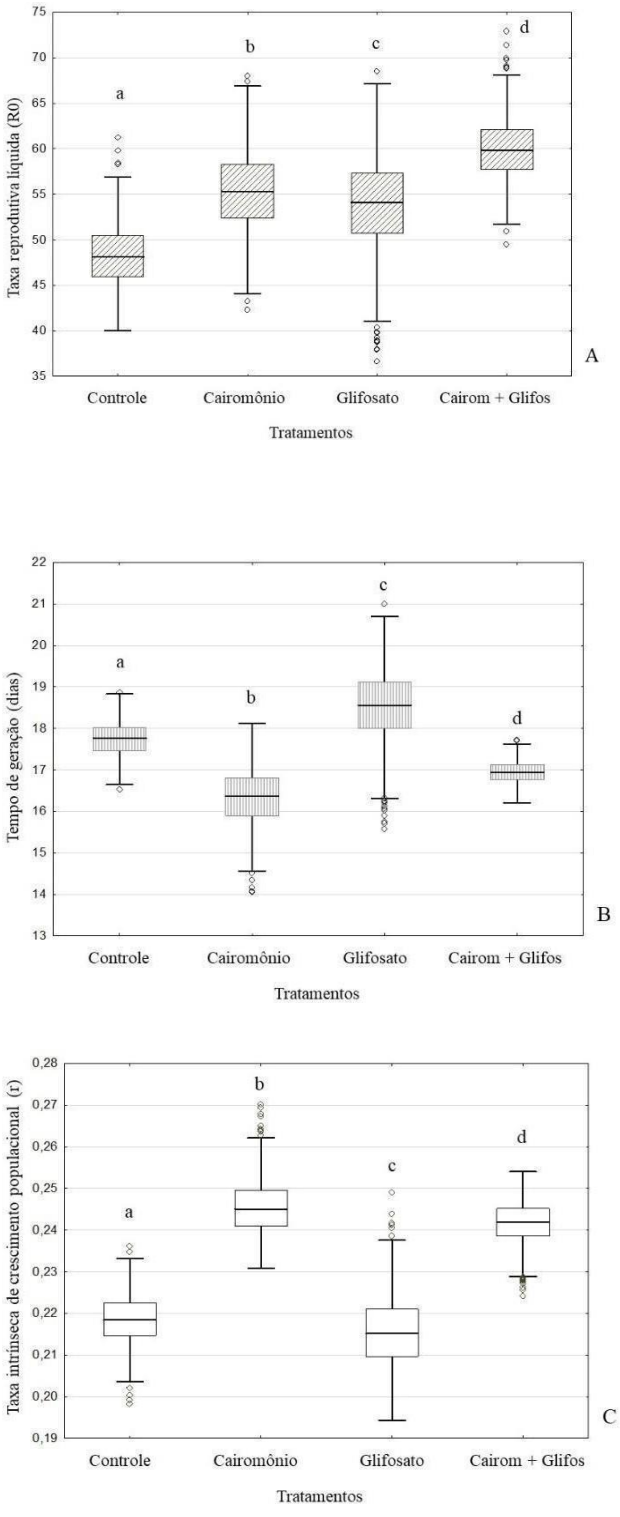


Fig. 4 Parâmetros da Tabela de Vida de *D. magna* em todos os tratamentos testados. Taxa reprodutiva líquida (A), Tempo de geração (dias) e Taxa intrínseca de crescimento populacional (r) (C). (Cairom + Glifos = Tratamento Cairomônio + Glifosato).

Material suplementar

A combinação entre cairomônios e glifosato afeta a interação presa-predador?

Taís Cristina Bunioto[1], Daniel Clemente Vieira Rego da Silva[2], Ana Esther De Paula Porfírio[2], Luiz Alberto Beraldo de Moraes[3], Eduardo José Crevelin[3], Danilo Grünig Humberto da Silva[4], Maria Stela Castilho-Noll[1*]

[1]Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), São José do Rio Preto, SP, Brasil
[2] Instituto de Recursos Naturais – Universidade Federal de Itajubá - Itajubá, MG, Brasil
[3] Departamento de Química - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil
[4] Campus de Três Lagoas - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Três Lagoas - MS, Brasil

Autor correspondente: Maria Stela Castilho-Noll
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus de São José do Rio Preto - SP (UNESP/Ibilce)
Rua Cristóvão Colombo, 2265
Jardim Nazareth, São José do Rio Preto – SP
CEP: 15.054-000
Telefone: +551732212200
E-mail correspondente: stela.noll@unesp.br

Análises químicas

Quantificação do glifosato por UPLC-MS/MS

O experimento de quantificação do glifosato foi realizado por meio de UPLC-MS/MS no modo monitoramento de múltiplas reações (MMR). A solução padrão de referência foi preparada diluindo-se adequadamente a solução estoque (1mg/ml) com água, tendo-se como resultado as seguintes concentrações 2,5; 5,0; 50,0 mg/mL.

A amostra comercial foi diluída em água até a concentração final de 37mg/ml. Três microlitros das amostras padrão e comerciais foram injetados em uma coluna Ascentis Express C18 (100x4,6mm de diâmetro interno; tamanho de partícula de 2,7 µm) da SUPELCO Analytical; a fase móvel utilizada para eluição gradiente consistiu de ácido fórmico 0,1%. A taxa de fluxo foi de 0,5 ml/min e o programa de eluição gradiente começou com 40% de B, aumentou para 100% nos 7 minutos seguintes, permaneceu em 100% de B por 4 minutos e retornou à condição inicial (40%B) nos 6 minutos seguintes. Foram feitas injeções em triplicata para a solução padrão e em quadruplicata para as amostras. As condições ótimas de MMR foram determinadas, conforme apresentado na Tabela 1. As curvas de calibração obtidas no modo MMR foram utilizadas para a quantificação do glifosato e as concentrações nas amostras foram expressas em mg/ml.

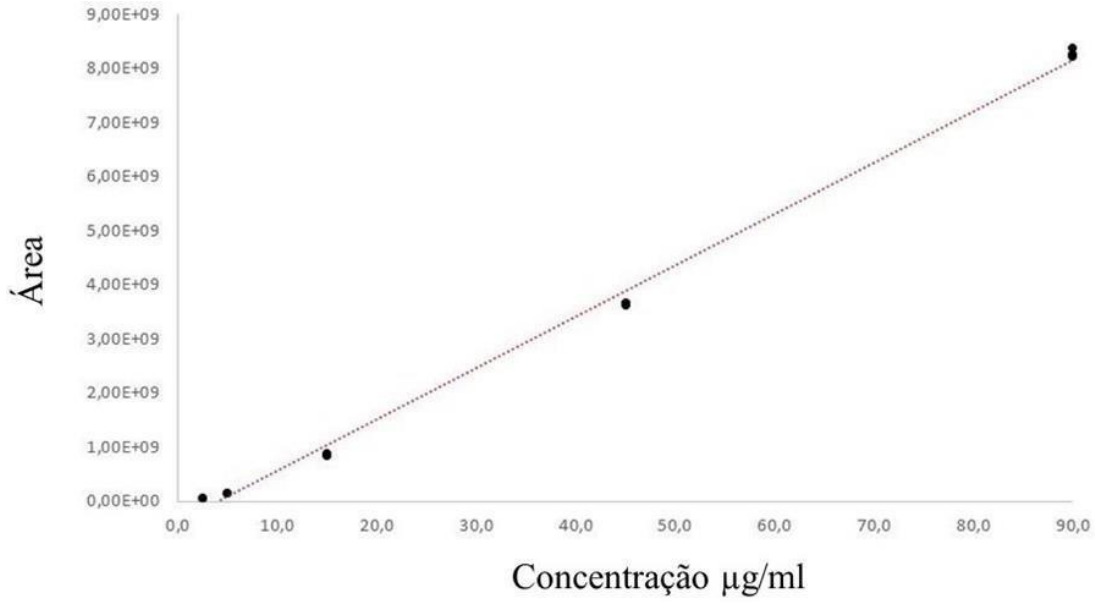
Os dados foram obtidos e processados utilizando-se o software TargetLynx^{TM} Application Manager (Waters, Corporation).

Tabela 1. Transições de íons, configurações de instrumentos e tempos de retenção para o glifosato.

Composto	Precursor íon (*m/z*)	Produto íon (*m/z*)	PD[a] (V)	EC[b] (eV)	TR[c] (min)
Glifosato	169,8*	88,1	40	5	3,55
	169,8**	59,9	40	15	

[a] PD = Potencial de desagrupamento
[b] EC = Energia de colisão (Argônio foi usado como gás de colisão)
[c] TR = Tempo de retenção
* Transição de quantificação
** Transição de confirmação

Curva analítica do glifosato



A	B	r^2	R
9,48E+07	-3,75E+08	0,9967	0,9983

Tabela 2 Concentração do glifosato na amostra.

Réplicas	Média	DP	CV(%)	Glifosato Concentração (g/l)	Erro Absoluto (g/l)	Erro Relativo (%)
3,19E+09	3,89E+09	4,9E+08	12,04	371,43	1,43	0,39
4,07E+09						
4,17E+09						
4,14E+09						

DP = Desvio Padrão; CV(%) = Coeficiente de Variação

Resultados

Dados físico-químicos

Tabela 9. Condutividade (µS/cm) durante todo o período experimental. A água adicionada ao experimento é a água na qual os organismos eram colocados diariamente. A água descartada é a água removida do experimento, na qual os organismos haviam permanecido nas 24 horas anteriores.

	Condutividade da água adicionada (µS/cm)				Condutividade da água descartada (µS/cm)			
Dia	Controle	Cairomônio	Glifosato	Cairomônio + Glifosato	Controle	Cairomônio	Glifosato	Cairomônio + Glifosato
0	104,1	104,2	103,7	104,1				
1	103,2	104,5	102,2	104,2	104,2	101,5	103,6	104,1
2	108,5	108,5	102,6	102,6	109,5	112,3	100,5	109,5
3	108,5	109,5	108,1	107,7	106,4	106,8	106,6	108,1
4	106,6	109,9	108,8	109,5	109	111,2	107,1	109,7
5	108,8	107,9	105	107,7	106	103,1	105,4	110
6	107,9	112	110,2	111,4	108,2	111,3	108,1	108,6
7	106,1	103,8	110,2	102,1	111,4	111,9	102,3	107,1
8	108,2	104,5	106,5	103,4	110	109,5	108,5	104,5
9	117,5	114,5	107,3	106,7	114,8	117,3	110,5	109,9
10	107,9	108,1	107,5	107,1	107,2	108,8	106,4	109,1
11	103,1	104	103,5	104,3	106,8	108	107,6	106,8
12	102,1	108,1	107,9	103,9	110,8	107,6	108,9	110,1
13	100,7	111,2	109	112,6	104,6	109,4	105,7	107,9
14	102,3	110	108,5	109,1	108,5	106,2	103,9	108,1
15	105,6	108,1	104,7	107,3	105,2	108,2	105,7	110,1
16	108,1	105,3	108,9	103,9	106,7	110,1	106,9	105,1
17	101,8	104,5	108,4	106,1	94,1	96,1	100,5	99,2
18	105,9	108,4	106,2	104,1	101,1	102,6	108,1	102,3
19	104,2	106,2	108,1	109,2	103,5	107,3	106,1	103,9
20	107,6	110,1	105,6	109,2	104	101,7	102,3	104,7
21	96,7	96,6	93,3	97,8	97,5	99,4	98,4	100,6
22	97,7	106,9	97,7	100,3	105,1	99,9	96,1	98,5
23	95,8	98,5	94,8	97,3	97,9	99,2	91,3	94,5
24	103,9	103,7	101,4	108,1	104,2	100,8	101,6	104,6
25	106,2	105,6	99,4	109,2	99,4	103,8	106,4	100,7
26	99,6	101,3	94,6	101,6	100,9	100,8	96,3	97,5
27	114,5	104,4	101,5	103,2	97,8	100,5	94,3	98,1
28	109,1	105,2	107,2	108,1	100,1	105,6	102,1	103,4
29	100,1	99,7	96,7	100,1	100,5	98,7	99,9	99,7
30	100,3	100,2	99,8	100,1	98,1	101,1	96,3	100,8
31	100,7	105,5	102,9	103,2	94,5	95,6	93,5	95,6
32	87,3	99,4	97,1	102,4	95,2	102,2	102,3	105,4
33	105,1	106	102,9	105,4	108,7	105,2	102,8	104,1
34	109,2	113,8	108,7	112,4	96,9	102,6	100,7	105,8
35	97,2	95,7	97,3	96,8	93,6	94,3	98,3	100,2
36	100,1	101,3	98,5		95,5	96,7	98	
37	107,2	99	98,9		96,2	95,8	96,2	
38	107,1	105,2	96,6		96,9	102,7	96,8	
39	100,1		96,8		99,8	100,6	99,5	
40			101,6		110,6		101,5	

Tabela 10. Oxigênio (mg/L) durante todo o período experimental.. A água adicionada ao experimento é a água na qual os organismos eram colocados diariamente. A água descartada é a água removida do experimento, na qual os organismos haviam permanecido nas 24 horas anteriores.

	Oxigênio água adicionada (mg/L)				Oxigênio da água descartada (mg/L)			
Dia	Controle	Cairomônio	Glifosato	Cairomônio + Glifosato	Controle	Cairomônio	Glifosato	Cairomônio + Glifosato
0	7,48	7,59	7,63	7,6				
1	7,5	7,51	7,45	7,53	7,99	7,8	7,91	8,09
2	7,59	7,6	7,6	7,86	7,78	7,74	7,89	8,4
3	7,43	7,57	7,46	7,63	8,03	7,99	7,96	7,98
4	7,36	7,46	7,5	7,83	7,68	7,78	7,91	7,77
5	7,75	7,83	7,85	7,88	8,1	8,11	7,99	8,15
6	7,63	7,47	7,61	7,58	7,76	7,84	8,13	8,19
7	7,56	7,56	7,63	7,65	8,18	8,32	8,24	8,21
8	7,61	7,68	7,64	7,79	8,04	8,07	8,24	8,05
9	7,97	7,98	8,04	8,2	8,07	8,08	8,33	8,12
10	7,86	7,81	7,86	7,85	7,94	7,96	8,06	7,83
11	7,99	7,94	8,05	8,1	8,2	8,1	8,19	8,24
12	8,16	8,07	8,11	8,18	8,23	8,34	8,32	8,31
13	8,08	8,13	8,2	8,18	8,23	8,22	8,23	8,32
14	7,3	7,32	7,28	7,36	7,57	7,68	7,71	7,86
15	6,98	7,51	6,95	6,98	7,27	7,11	7,67	7,55
16	7,36	7,4	7,43	7,6	7,49	7,27	7,57	7,51
17	7,42	7,46	7,55	7,57	7,62	7,73	7,64	7,63
18	7,11	7,24	7,26	7,52	7,17	7,47	7,69	7,55
19	7,47	7,58	7,67	7,59	7,72	7,94	7,75	7,94
20	7,23	7,13	7,35	7,32	7,4	7,46	7,42	7,38
21	7,24	7,29	7,46	7,47	7,85	7,92	7,67	7,8
22	7,4	7,36	7,6	7,61	7,54	7,81	7,83	7,92
23	7,43	7,52	7,5	7,67	7,72	7,76	7,77	7,85
24	7,46	7,54	7,57	7,6	7,63	7,74	7,83	7,95
25	7,71	7,65	7,85	7,87	8,06	7,94	8,02	8,01
26	7,73	7,9	7,95	7,97	7,91	8,17	8,11	8,16
27	7,74	7,77	7,86	8,11	7,96	8,13	8,21	7,94
28	7,42	7,47	7,53	7,6	7,81	7,96	7,76	7,82
29	7,73	7,75	7,78	7,86	7,93	8,13	8,12	7,99
30	7,67	7,62	7,78	7,81	7,46	7,44	7,5	7,51
31	7,92	7,84	8,01	7,91	8,04	8,15	8,01	8,12
32	7,81	7,8	7,97	7,89	8,11	8,21	8,15	8,28
33	7,82	7,91	8,08	8,03	7,92	8,04	8,2	8,28
34	8,04	8,13	8,2	8,19	8,39	8,22	8,26	8,38
35	7,49	7,5	7,63	7,54	7,99	7,83	7,92	8,01
36	8,03	7,96	7,94		8,26	8,06	8,13	
37	7,93	7,88	7,85		7,95	7,99	8,04	
38	7,85	7,87	7,94		7,93	8	8,05	
39	7,97		8,01		8,17		8,26	
40			7,94		7,92		8,13	

Tabela 11. Ph durante todo o período experimental. A água adicionada ao experimento é a água na qual os organismos eram colocados diariamente. A água descartada é a água removida do experimento, na qual os organismos haviam permanecido nas 24 horas anteriores.

	pH água adicionada				pH da água descartada			
Dia	Controle	Cairomônio	Glifosato	Cairomônio + Glifosato	Controle	Cairomônio	Glifosato	Cairomônio + Glifosato
0	7,74	7,76	7,85	7,79				
1	7,22	7,66	7,66	7,65	7,42	7,71	7,7	7,68
2	7,53	7,72	7,76	7,8	7,74	7,76	7,76	7,81
3	7,36	7,75	7,79	7,69	7,67	7,72	7,75	7,68
4	7,6	7,76	7,75	7,72	7,74	7,7	7,74	7,71
5	7,69	7,86	7,83	7,84	7,88	7,83	7,84	7,79
6	7,44	7,48	7,5	7,49	7,54	7,48	7,53	7,54
7	7,49	7,69	7,64	7,57	7,7	7,61	7,61	7,54
8	7,5	7,53	7,5	7,46	7,58	7,51	7,5	7,5
9	7,46	7,55	7,6	7,58	7,57	7,52	7,59	7,58
10	7,58	7,71	7,77	7,76	7,7	7,72	7,79	7,97
11	7,96	7,89	7,85	7,74	7,91	7,85	7,79	7,77
12	7,8	7,92	7,86	7,89	7,79	7,88	7,85	7,81
13	6,79	6,99	7,17	7,16	6,98	7,03	7,21	7,2
14	6,96	7,13	7,2	7,22	7,13	7,17	7,22	7,18
15	7	7,68	7,05	7,1	6,99	7	7,09	7,17
16	6,86	6,99	7,15	7,25	6,93	7,02	7,16	7,14
17	7,23	7,32	7,33	7,37	7,29	7,36	7,25	7,39
18	7,15	7,21	7,24	7,34	7,2	7,23	7,28	7,34
19	7,19	7,31	7,43	7,48	7,3	7,35	7,46	7,52
20	7,15	7,25	7,31	7,34	7,27	7,29	7,34	7,35
21	7,08	7,23	7,21	7,24	7,19	7,23	7,22	7,24
22	7,14	7,31	7,33	7,35	7,2	7,31	7,34	7,37
23	7,08	7,19	7,3	7,32	7,09	7,23	7,31	7,42
24	7,15	7,28	7,33	7,37	7,21	7,29	7,34	7,35
25	7,15	7,28	7,25	7,31	7,19	7,25	7,26	7,32
26	7,17	7,24	7,34	7,31	7,22	7,28	7,33	7,34
27	7,11	7,24	7,31	7,33	7,22	7,27	7,35	7,36
28	7,07	7,15	7,22	7,2	7,06	7,17	7,19	7,18
29	7,63	7,66	7,67	7,72	7,65	7,69	7,68	7,71
30	7,36	7,43	7,48	7,52	7,92	7,75	7,69	7,73
31	7,15	7,41	7,58	7,61	7,28	7,5	7,58	7,64
32	7,27	7,34	7,48	7,51	7,39	7,43	7,47	7,51
33	7,04	7,33	7,54	7,5	7,25	7,43	7,54	7,5
34	7,23	7,29	7,4	7,46	7,25	7,35	7,46	7,5
35	7,13	7,17	7,18	7,17	7,18	7,15	7,17	7,16
36	7,04	7,21	7,34		7,15	7,28	7,35	
37	7,1	7,19	7,27		7,13	7,25	7,33	
38	7,06	7,31	7,49		7,22	7,43	7,56	
39	7,14	8,27	7,37		7,18	7,28	7,41	
40			7,16		7,05		7,27	

Tabela 12. Dureza (mg de $CaCO_3$/L) durante todo o período experimental. A água adicionada ao experimento é a água na qual os organismos eram colocados diariamente. A água descartada é a água removida do experimento, na qual os organismos haviam permanecido nas 24 horas anteriores.

Dia	Dureza (mg/L)
0	46
1	48
2	46
3	42
4	46
5	46
6	42
7	42
8	42
9	42
10	38
11	42
12	44
13	44
14	42
15	40
16	42
17	42
18	46
19	44
20	44
21	42
22	42
23	38
24	42
25	44
26	42
27	42
28	40
29	42
30	40
31	44
32	42
33	40
34	42
35	44
36	40
37	40
38	44
39	40
40	40

Capítulo 3

A combinação entre cairomônios e glifosato e a relação presa-predador: *Daphnia similis* e *Danio rerio*

Taís Cristina Bunioto[1], Daniel Clemente Vieira Rego da Silva[2], Luiz Alberto Beraldo de Moraes[3], Eduardo José Crevelin[3], Danilo Grünig Humberto da Silva[4], Maria Stela Castilho-Noll[1*]

*stela.noll@unesp.br

*Telefone: 55 (17) 3221 2372

[1]Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), São José do Rio Preto, SP, Brasil
[2]Instituto de Recursos Naturais – Universidade Federal de Itajubá - Itajubá, MG, Brasil
[3]Departamento de Química - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil
[4] Campus de Três Lagoas - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Três Lagoas - MS, Brasil

Resumo

Em decorrência das atividades antrópicas a presença de agrotóxicos no ambiente aquático vem se tornando cada vez mais comum. Dentre os químicos utilizados na atualidade o glifosato tem se destacado por seu uso habitual nas lavouras e sua consequente presença nos corpos d´água. Além dos poluentes de origem antrópica, organismos dulcícolas também estão sujeitos à ação de compostos naturais, como é o caso dos cairomônios. Considerando-se tais fatos o presente trabalho investigou a influência de cairomônios do peixe *Danio rerio* e do herbicida glifosato – isolados e em combinação - sobre o cladócero *Daphnia similis*. Foram avaliados: Longevidade, Idade da primeira reprodução, Total de neonatos da primeira cria, Comprimento do corpo/Largura do corpo/Tamanho do elmo/Tamanho do espinho caudal dos adultos com 14 dias, Taxa reprodutiva líquida (R_0), Tempo de geração (T) e Taxa intrínseca de crescimento populacional (r). A Longevidade, o Total de neonatos da primeira cria e o Tamanho do elmo aos 14 dias não apresentaram diferença estatisticamente significativa nos diferentes tratamentos testados. As fêmeas cultivadas na presença dos cairomônios apresentaram antecipação da idade da primeira reprodução em relação ao tratamento Controle. Adultos com 14 dias, cultivados na presença de cairomônios e na presença de Cairomônios + glifosato apresentaram maior Comprimento do corpo quando comparados àqueles cultivados nos tratamentos Controle e Glifosato. Organismos cultivados na presença do cairomônio apresentaram maior Largura do corpo e maior Tamanho do espinho caudal aos 14 dias. A Taxa

reprodutiva líquida aumentou em todos os tratamentos quando comparados ao Controle, em especial onde o cairomônio esteve presente. O Tempo de geração (T) apresentou-se menor na presença do cairomônio isolado e maior na presença conjunta do cairomônio e glifosato. Por fim, maior Taxa intrínseca de crescimento populacional
(r) ocorreu no tratamento cairomônio. Apesar do fato de aparentemente não ter ocorrido interação entre os compostos, os dados mostram que, tanto o cairomônio quanto o glifosato, foram capazes de afetar aspectos importantes da morfologia e do ciclo de vida de *D. similis*, requerendo mais investigações e atenção, tanto por parte de estudiosos quanto por parte de autoridades responsáveis pelos cuidados com a contaminação dos corpos d´água.

Palavras-chave: Aleloquímicos, Cladocera, *Danio rerio*, *Daphnia similis*, Tabela de vida, Toxicidade.

Agradecimentos: Agradecemos a Matheus Batista Figueiredo pelo auxílio no cultivo dos peixes. Agradecemos à Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro concedido à Taís C. Bunioto.

1. Introdução

A predação é um tipo de interação importante no ambiente aquático e pode não apenas influenciar a dinâmica dos organismos como contribuir na moldagem da estrutura de muitas comunidades (Aarflot *et al*. 2022; Leroux *et al*. 2023; Toruan *et al*. 2022). A estrutura do habitat e a predação são os principais fatores que influenciam a distribuição das espécies do zooplâncton e seus aspectos funcionais (Deosti *et al*. 2021). Presas podem alterar seu crescimento (Qin *et al*. 2022), por exemplo, ou particularidades relacionadas à sua história de vida, como início da maturação sexual (Dzialowski *et al*. 2003), em decorrência da presença de predadores.

Dentre as maneiras por meio das quais a predação pode influenciar a dinâmica da vida dos diversos organismos em seu meio natural a mediação química apresenta grande importância, já que por meio dela alterações drásticas no ciclo de vida e na morfologia das presas podem acontecer (Huang *et al*. 2023; Relyea, 2003 e outros). Tal mediação se sucede, muitas vezes, por meio dos chamados cairomônios, mensageiros químicos liberados por predadores, que beneficiam mais o organismo receptor do que o emissor, e têm, portanto, baixo ou nenhum valor adaptativo para os indivíduos que os produzem (Brown; Eisner; Whittaker, 1970). A natureza química de tais moléculas ainda não é amplamente conhecida, mas Hahn e von Elert (2022), por

exemplo, conseguiram identificar o sal 5α-ciprinol sulfato como um cairomônio extraído da bile de peixes, capaz de causar espinhos e elmos significativamente alongados no cladócero*Daphnia lumholtzi* .

Além da predação, uma série de outros fatores acabam por influenciar a vida dos organismos no ambiente natural, de forma que estes acabam expostos a uma multipicidade de agentes estressores. Em se tratando do ambiente aquático, a presença constante de agrotóxicos nos corpos d´água vem chamando a atenção (Brovini *et al*. 2021; Brovini *et al*. 2023; Cabrera *et al*. 2023; Kalantary; Barzegar; Jorfi, 2022); dentre os agrotóxicos comumente utilizados hoje em dia, o herbicida glifosato destaca-se devido ao seu uso amplo (Sharma *et al*. 2019; Van Bruggen *et al*. 2021) e sua presença habitual no ambiente límnico (Brovini *et al*. 2021; Brovini *et al*. 2023; El Baroudi *et al*. 2023; Schomberg; Bringezu; Beusen, 2023).

O zooplâncton constitui-se num grupo de organismos de grande importância, funcionando como um elo fundamental da cadeia trófica no ambiente aquático. Sabe-se que alterações na estrutura do zooplâncton podem facilmente atingir outros grupos de organismos (Babaei *et al*. 2022; Gibbs *et al*. 2023; Lepori, 2019), sendo, portanto, potencialmente danosas ao equilíbrio do ecossistema como um todo. Nesse sentido, conhecimentos a respeito das respostas desse grupo em função de agentes estressores do ambiente são de extrema importância, pois auxiliam na manutenção do equilíbrio dos ambientes.

Dentre os organismos zooplanctônicos, espécimes do grupo Cladocera têm sido comumente utilizadas como modelos em estudos de ecotoxicologia (Ebert, 2022; NBR 12713 / ABNT, 2017; NBR 13373 / ABNT, 2017; Reilly *et al*. 2023), assim como em estudos que buscam compreender melhor as mudanças morfológicas, comportamentais e na história de vida decorrentes da exposição aos cairomônios (Gu *et al*. 2020; Naraki; Hiruta; Tochinai, 2013; Weiss; Leimann; Tollrian, 2015). Além de sua importância ecológica, talvez seja interessante lembrar do fato de que o grupo dos cladóceros é constituído por organismos pequenos, de ciclo de vida curto e cultivo relativamente fácil, o que permite sua manutenção em laboratório para a realização dos mais variados testes e experimentos.

Assim, sabendo-se que glifosato e cairomônios ocorrem simultaneamente no ambiente aquático, e considerando-se que as respostas causadas pela interação destes dois compostos sobre cladóceros ainda não se encontra bem esclarecida, pode-se dizer que estudos que visem aprofundar o conhecimento científico sobre tais questões são bastante valiosos. Considerando esse quadro, o presente estudo teve como objetivo verificar os efeitos do cairomônio do peixe *Danio rerio* – conhecido como peixe-zebra - e do herbicida glifosato, sobre a morfologia e aspectos do ciclo de vida do cladócero *Daphnia similis*, cultivada em laboratório. Em um

período durante o qual o mundo passa por uma crise ambiental em diversos aspectos, compreender melhor como diferentes agentes químicos estressores atuam sobre organismos aquáticos pode, sem dúvida, ser bastante enriquecedor para a ciência, contribuindo para a busca da preservação de ambientes límnicos, tão fundamentais para a humanidade e para o planeta.

2. Material e métodos

Glifosato

Foi utilizada a formulação comercial Roundup® Original DI, pertencente à marca Monsanto. O produto contém 445 g/L (44,5%m/v) de sal de di-amônio de N-(phosphonomethyl)glycine (glifosato), 370 g/L (37,0%m/v) de equivalente ácido de N-(phosphonomethyl) glycine (glifosato) e 751 g/L (75,1% m/v) de "outros ingredientes". Durante todo o experimento, uma solução estoque contendo 1000 mg/L de glifosato foi diariamente preparada.

Culturas de algas e cladóceros

Fêmeas da espécie *D. similis*, doadas pelo Laboratório de Ecotoxicologia da Universidade de São Paulo / campus de Lorena – SP, foram cultivados em laboratório durante várias gerações. Os organismos foram mantidos em água mineral, no interior de cristalizadores, com capacidade para 1 ou 2 litros, na densidade máxima de 70 indivíduos/L (NBR 13373 / ABNT, 2017). Os cristalizadores foram mantidos no interior de câmara climática, a temperatura constante de 22 ± 1^0C e fotoperíodo de 12 horas. A troca da água foi realizada 3 vezes por semana, ocasião em que foi oferecido como alimento a clorofícea *Raphidocelis subcapitata* na concentração de 1×10^5 células/ml (NBR 13373 / ABNT, 2017), além de alimento complementar a base de ração de peixe da marca TetraMin® e fermento biológico seco (NBR 13373 / ABNT, 2017), na dosagem de 20 µL/indivíduo. Um condicionador de água da marca Prodac (Biotrix blackwater) foi também adicionado à água na ocasião das trocas, sempre na dosagem de 125 µL/L. As boas condições de cultivo foram atestadas por meio de carta controle utilizando NaCl como substância de referência (NBR 13373 / ABNT, 2017).

O cultivo das algas ocorreu conforme NBR 13373 / ABNT (2017).

Cultivo dos peixes e produção da água contendo cairomônios de *Danio rerio*

O uso dos peixes para a realização do presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/IRN-Unifei nº01/2023). Um total de 15 indivíduos da espécie *Danio rerio* (cada um com cerca de 2,5 a 3,0 centímetros de comprimento e cerca de 0,27 gramas de massa corporal) foram comprados em um pet shop na cidade de Itajubá – MG e aclimatados no laboratório durante cerca de 8 dias. Os peixes foram mantidos em um aquário estoque, preenchido com 4050 ml de água mineral (ABNT 15088/2022), a temperatura de 26 ± 1^0C, fotoperíodo de 12h, pH entre 6,0 e 8,0 e aeração constante. Como alimento foram oferecidas duas pequenas porções diárias de ração flocada para peixes, bem como alimento vivo (*Daphnia similis*).

Nos quatro dias que precederam a coleta da água contendo os cairomônios de *D. rerio*, a água do áquário foi completamente trocada e a alimentação com ração foi interrompida, de forma que os peixes passaram a receber apenas neonatos e jovens de *D. similis* como alimento. Uma média de 70 neonatos e jovens de *D. similis* foram fornecidas para cada peixe nos três dias que precederam a coleta da água. Na véspera da coleta da água, os peixes foram alimentados com um total de 1500 neonatos e jovens de *D. similis*, tendo sido possível observar que houve consumo de praticamente todos os microcrustáceos. Por fim, no dia subsequente, os peixes foram cuidadosamente retirados do aquário com auxílio de uma rede de captura de peixes ornamentais e aclimatados em outro recipiente. A água que restou no aquário contendo os cairomônios, foi então filtrada em membrana de fibra de vidro (0,7 µm) e fracionada em embalagens plásticas atóxicas, as quais, por sua vez, foram colocadas em bandejas envolvidas com plástico escuro para que pudessem ser congeladas a – 20 ºC (Material suplementar). Durante o período experimental, uma amostra foi diariamente descongelada e diluída 8 vezes, para que pudesse ser então utilizada. A metodolodia de produção dos cairomônios foi baseada nos trabalhos Moreira *et al*. (2020), Qin *et al*. (2022) e Weiss *et al*. (2016), com modificações. A quatidade de cairomônios presente na água utilizada no experimento equivaleria a cerca de 1 peixe para 50 L de água (Moreira *et al*. 2020).

Experimento

Neonatos (6 - 24 h), frutos da terceira cria em diante de fêmeas adultas, foram individualmente colocados no interior de béqueres com cerca de 20ml de solução. Os seguintes tratamentos foram testados: *Controle*, *Cairomônio*, *Glifosato* (500 µg/L) e C*airomônio* + *Glifosato* (500 µg/L). No tratamento Controle os organismos permaneceram nas mesmas

condições de cultivo. No tratamento Cairomônio os organismos permaneceram nas mesmas condições de cultivo, porém foi utilizada água contendo cairomônios, conforme modo de produção explicado anteriormente. No tratamento Glifosato os organismos permaneceram nas mesmas condições de cultivo, porém foi adicionado glifosato na concentração de 500 µg/L. Já no tratamento Cairomônio + Glifosato, os organismos permaneceram nas mesmas condições de cultivo, porém na presença de cairomônios e glifosato (500 µg/L).

Para cada tratamento testado foi montado um total de 10 réplicas. Durante o período experimental, os béqueres permaneceram cobertos com plástico atóxico, no interior de câmara climática, a temperatura constante de 22 ± 1ºC e fotoperíodo de 12 horas. O oxigênio, o pH e a condutividade da água foram diariamente mensurados (Material suplementar).

Os organismos foram acompanhados durante toda sua vida. A água presente em cada um dos tratamentos foi diariamente trocada, evitando-se dessa forma a sedimentação do alimento. Nessa ocasião, o número de neonatos produzidos por cada fêmea foi devidamente registrado. Tais procedimentos permitiram o cálculo dos seguintes parâmetros da tabela de vida: taxa intrínseca de crescimento populacional (r), tempo de geração (T) e taxa reprodutiva líquida (R_0).

Durante duas ocasiões os organismos tiveram suas medidas aferidas: no início do experimento (neonatos) e quando completaram 14 dias de vida. Em tais ocasiões os organismos foram delicadamente colocados em uma lâmina e mensurados com auxílio de lupa Olympus SZ51. Foram aferidos o comprimento do corpo (distância linear entre o topo da cabeça e a base do espinho caudal), a largura máxima, o elmo e o espinho caudal.

Os valores nominais das concentrações de glifosato foram confirmados por meio de um aparelho de UPLC-MS (Cromatografia líquida de Ultra Performance) ACQUITY UPLC H-Class, acoplado a um espectrômetro de massas Tandem Quadrupole XevoTM TQ-D (Waters Corporation). Os detalhes das análises encontram-se descritas no Material Suplementar.

Análise estatística

Os resultados foram analisados utilizando-se ANOVA one-way e *pos hoc* de Tukey, ou Kruskal-Wallis e *pos hoc* de Dunn (obedecendo a distribuição dos dados). A normalidade e homocedasticidade foram verificadas, por meio dos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Os parâmetros da tabela de vida (taxa intrínseca de crescimento populacional (r), tempo de geração (T) e taxa reprodutiva líquida (R_0) foram calculados por meio da técnica de Bootstrap (Meyer, 1986).

Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3. Resultados

Não houve diferença estatisticamente significativa para a Longevidade e Total de neonatos da primeira cria entre os quatro tratamentos testados (p = 0,074400 e p = 0,628758, respectivamente) (Fig 1A e 1C, respectivamente). Considerando-se a Idade da primeira reprodução, no entanto, observa-se que as fêmeas expostas ao tratamento Cairomônio anteciparam sua primeira cria em cerca de 2,5 dias quando comparadas àquelas do tratamento Controle (p = 0,005624) (Fig 1B). Não houve diferença para a Idade da primeira reprodução para as fêmeas expostas ao Cairomônio quando comparadas àquelas expostas ao glifosato (p = 0,078108) e quando comparadas às expostas ao Cairomônio + glifosato (p = 0,905115). Também não foi encontrada difereça estatitiscamente significativa para a Idade da primeira reprodução entre os tratamentos Glifosato e Cairomônio + glifosato (1,000000).

Não foi constatada diferença estatisticamente significativa entre o Comprimento do corpo, a Largura, o Tamanho do elmo e o Tamanho do espinho caudal dos neonatos nos diferentes tratamentos analisados (p = 0,682600; 0,947100; 0,377800 e 0,360800, respectivamente) (Fig 2).

Após 14 dias de experimento, observou-se aumento médio do Comprimento do corpo dos adultos, de cerca de 0,3 mm para aqueles que permaneceram expostos ao tratamento Cairomônio e de cerca de 0,2 mm para aqueles que permaneceram expostos ao tratamento Cairomônio + Glifosato, em relação aos do Controle (p = 0,000266 e 0,008834, respectivamente) (Fig 3A). Os indivíduos com 14 dias, que permaneceram no tratamento Glifosato não apresentaram alteração no Comprimento do corpo em relação àqueles que permaneceram no Controle (p = 0,999985). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o Comprimento do corpo apresentado pelos organismos cultivados na presença do Cairomônio isolado e no tratamento Cairomônio + glifosato (p = 0,620573). Por fim, os indivíduos que permaneceram expostos ao glifosato apresentaram menor crescimento médio aos 14 dias, tanto quando comparados àqueles expostos ao Cairomônio (cerca de 0,3mm) (p = 0,000327) e como quando comparados aqueles expostos ao Cairomônio + glifosato (cerca de 0,2mm) (p = 0,011599).

As fêmeas expostas ao Cairomônio isolado e Cairomônio + glifosato foram aquelas que apresentaram os maiores valores de Largura máxima do corpo aos 14 dias (Fig 3B). Considerando-se as fêmeas expostas ao Cairomônio, estas apresentaram-se, em média, cerca de 0,2mm maiores em Largura do corpo, quando comparadas às fêmeas que permaneceram no

tratamento Controle (p = 0,000376) e cerca de 0,25mm maiores quando comparadas às do tratamento Glifosato (p = 0,000179); porém, não apresentaram diferença significativa quando comparadas às fêmeas expostas ao Cairomônio + glifosato (p = 0,173205). As fêmeas expostas ao Glifosato isolado, por sua vez, não apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto à Largura do corpo em relação ao tratamento Controle (p = 0,682441), mas apresentaram-se, em média, cerca de 0,15mm menores em relação às do tratamento Cairomônio + glifosato (p = 0,013504). Por fim, não houve diferença estatisticamente significativa para a Largura do corpo aos 14 dias apresentada pelas fêmeas do tratamento Cairomônio + glifosato e aquelas que permaneceram no tratamento Controle (p = 0,119889).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre o Tamanho do elmo apresentado pelos adultos com 14 dias quando se comparam os diferentes tratamentos analisados (Fig 3C).

O Tamanho do espinho caudal nos adultos com 14 dias apresentou-se, em média, cerca de 0,2mm maior no tratamento Cairomônio quando comparado ao tratamento Controle (p = 0,002625) (Fig 3D). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o Tamanho do espinho caudal apresentado pelos adultos quando se comparam os tratamentos Controle e Glifosato (p = 0,518568) e Controle e Cairomônio + glifosato (p = 0,094816). As fêmeas com 14 dias expostas ao Glifosato não apresentaram diferença estatisticamente significativa quanto ao Tamanho do espinho caudal quando comparadas àquelas dos tratamentos Cairomônio (p = 0,074207) e Cairomônio
+ glifosato (p = 0,677061). Não houve diferença estatisticamente significativa quanto ao Tamanho do espinho caudal apresentado pelas fêmeas com 14 dias expostas ao Cairomônio e Cairomônio + glifosato (p = 0,601656)

Tabela de vida

Considerando-se o tratamento Cairomônio, a Taxa reprodutiva líquida (R_0), em média, dobrou aproximadamente em relação ao tratamento Controle e foi 30% maior em relação ao tratamento Glifosato (Fig 4A) (p=0,000000, para ambos os casos). As fêmeas expostas ao glifosato, por sua vez, apresentaram valor médio de R_0 aproximadamente 25% maior do que as fêmeas do Controle, porém cerca de 30% menor do que as fêmeas do tratamento Cairomônio + glifosato (p= 0,000000, para ambos os casos). Por fim, o valor de R_0 para os indivíduos cultivados no tratamento Cairomônio + glifosato praticamente dobrou, em média, em relação ao Controle (p=0,000000). Não houve diferença estatisticamente significativa entre R_0

apresentada pelos tratamentos Cairomônio e Cairomônio + glifosato (p = 1,000000)

Com relação ao Tempo de geração (T), diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre todos os tratamentos testados (Fig 4B), sendo que para todas as comparações realizadas o valor de p foi igual a 0,000000. Considerando-se o tratamento Cairomônio, o Tempo de geração foi, em média, cerca de 0,35 dias menor em relação ao Controle, cerca de 2,5 dias menor em relação ao Glifosato e cerca de 3 dias menor em relação ao Cairomônio + glifosato. As fêmeas expostas ao glifosato, por sua vez, apresentaram acréscimo de cerca de 2 dias, em média, para o Tempo de geração quando comparadas às do Controle, e decréscimo de cerca de 0,5 dias quando comparadas às do tratamento Cairomônio + glifosato. O Tempo de geração apresentado pelos indivíduos do tratamento Cairomônio + glifosato foi, em média, quase 3 dias maior quando comparado ao Controle.

Assim como o Tempo de geração, a Taxa intrínseca de crescimento populacional (r) apresentou diferença estatisticamente significativa entre todos os tratamentos analisados; o valor de p foi igual a 0,000000 para todas as comparações realizadas, exceto quando comparados os valores de r apresentados pelas fêmeas dos tratamentos Controle e Cairomônio + glifosato, cujo valor de p foi igual a 0,000551 (Fig 4C). Considerando-se o tratamento Cairomônio, o valor de r foi, em média, cerca de 20% maior em relação ao Controle, 25% maior em relação ao Glifosato e 20% maior em relação ao Cairomônio + glifosato. As fêmeas que permaneceram, na presença do glifosato apresentaram queda de r em média em torno de 5% em relação ao Controle e 6% em relação ao Cairomônio + glifosato. No tratamento Cairomônio + glifosato, por sua vez, as fêmeas apresentaram valor de r, em média, cerca de 1,5% maior do que àquelas que permaneceram no Controle.

4. Discussão

A Longevidade das fêmeas não apresentou diferenças estatisticamente significativas nos diferentes tratamentos testados (Fig 1A). Dawidowicz, Predki e Pietrzak (2010), por outro lado, constataram queda de cerca de 20% na longevidade de *Daphnia hyalina* e *Diaphanosoma brachyurum* expostos a cairomônios de peixes. Bordin *et al*. (2022) verificaram queda na sobrevivência de *Daphnia magna* exposta ao glifosato enquanto Moreira *et al*. (2020) verificaram queda na sobrevivência de *Ceriodaphnia silvestrii* exposta à combinação de cairomônios de peixes e inseticida fipronil.

Sabe-se que a presença de cairomônios pode levar à ocorrência de ciclos de vida mais

curtos em cladóceros (Dawidowicz; Predki; Pietrzak, 2010; Pietrzak *et al*. 2015), assim como o glifosato pode diminuir a sobrevivência de microcrustáceos (Bordin *et al*. 2022; Rodriguez-Miguel *et al.* 2021), mas talvez a concentração de cairomônios e glifosato utilizadas no presente trabalho tenham sido insuficientes para afetar a longevidade de
D. similis. Reede (1995), por exemplo, verificou que *Daphnia* é capaz de ajustar sua história de vida de acordo com diferentes quantidades de cairomônios – e portanto diferentes densidades de peixes – existentes na água.

A Idade da primeira reprodução apresentada pelas fêmeas expostas ao Cairomônio isolado foi significativamente menor do que a Idade da primeira reprodução das fêmeas que permaneceram no tratamento Controle (Fig 1B). Cairomônios podem levar à antecipação da reprodução em cladóceros, como verificado por Castro, Consciência e Gonçalves (2007), Chakri *et al*. (2010), Dawidowicz, Predki e Pietrzak (2010) e outros. De acordo com Pietrzak *et al*. (2015), a teoria da história de vida diz que a alocação de recursos direcionados para uso em idades mais avançadas torna-se inútil quando a probabilidade de sobreviver é baixa, justificando assim a antecipação da reprodução quando existe o risco de predação. Já no caso do tratamento Cairomônio + glifosato, é possível que a presença do glifosato tenha interferido de alguma forma no mecanismo de ação do cairomônio, impedindo a antecipação da primeira reprodução neste caso. Esta interferência pode significar uma diminuição da capacidade de defesa das presas quando na presença do predador.

O Total de neonatos produzidos na primeira cria não foi estatisticamente diferente em relação aos quatro tratamentos estudados (Fig 1C). Ao contrário, Declerck e Weber (2003), por exemplo, verificaram que *Daphnia galeata* produziu mais neonatos na primeira ninhada quando exposta a cairomônios de peixe. Considerando-se que no ambiente natural o risco de morrer como vítima de predação aumenta com a idade, é natural esperar-se que ocorram maiores investimentos na reprodução precoce, bem como que o ciclo de vida seja mais curto (Pietrzak *et al*. 2015). Mais uma vez, talvez a concentração de cairomônios e glifosato utilizadas no presente trabalho não tenham sido suficientes para afetar o Total de neonatos da primeira reprodução em *D. similis.*

Como é de se esperar, neonatos com idade próxima apresentam tamanhos semelhantes, motivo pelo qual não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas com relação ao Comprimento, Largura do corpo, Tamanho do elmo e Tamanho do espinho caudal desses indivíduos (Fig 2). O Comprimento do corpo dos adultos com 14 dias, por sua vez, apresentou-se maior na presença do cairomônio (Fig 3A), ao contrário do que se esperava encontrar, já que na literatura diversos trabalhos apontam para o fato de que a presença de predadores visuais

levam, em geral, à diminuição do corpo dos cladóceros (Moreira *et al*. 2020; Qin *et al*. 2022; Sakwinska, 2000). Mais estudos seriam necessários para elucidar melhor os fatos aqui descritos.

A Largura do corpo dos adultos com 14 dias apresentou-se maior nas fêmeas cultivadas no tratamento Cairomônio quando comparadas às que permaneceram no tratamento Controle (Fig 3B). Neste caso, a presença do glifosato no tratamento Cairomônio + glifosato talvez tenha interferido no crescimento dos indivíduos. Qin *et al*. (2022) também verificaram queda do crescimento de *D. pulex* em decorrência da presença do herbicida atrazina. Segundo Rodriguez-Miguel *et al*. (2021), a possível bioacumulação de glifosato em cladóceros pode alterar processos bioquímicos relacionados ao crescimento, à reprodução e à sobrevivência, além do fato de que o composto poderia alterar o microbioma intestinal dos organismos, modificando processos de nutrição e assimilação de alimento, envolvidos com seu balanço energético.

Não houve diferença quanto ao Tamanho do elmo apresentado pelos organismos aos 14 dias nos diferentes tratamentos analisados (Fig 3C). O Tamanho do espinho caudal, por sua vez, apresentou-se maior para os organismos cultivados no tratamento Cairomônio quando comparado àquele apresentado pelos organismos do tratamento Controle (Fig 3D). Qin *et al*. (2022) encontraram que a adição do cairomônio isolado do peixe *Rhodeus ocellatus* aumentou o tamanho do espinho de *Daphnia pulex*; mas verificaram também que com a adição de atrazina, esse aumento tende a diminuir, indicando que a presença do herbicida pode interferir no processo de formação de defesas induzidas.

A Taxa reprodutiva líquida (R_0) mostra que a maior produção de prole ocorreu nos tratamentos nos quais o cairomônio esteve presente; porém, no tratamento Glifosato as fêmeas também produziram mais neonatos ao longo da vida quando comparadas às do tratamento Controle (Fig 4A). Tais fatos corroboram, por exemplo, trabalhos como os de Gama-Flores *et al*. (2013), que observaram que a taxa reprodutiva líquida de *Moina macropoda* foi maior nos meios contendo aleloquímicos de peixes, girinos e salamandras. Quando cladóceros são expostos a fatores de estresse ambiental – como é o caso dos cairomônios e do glifosato – podem realocar seus recursos energéticos em processos como crescimento somático ou reprodução, uma vez garantida a sobrevivência (Garza–León; Azarte-Cárdenas; Rico-Martínez, 2017). Segundo observações de Arzate-Cárdenas e Martínez- Jerónimo (2012), o conteúdo energético presente no organismo dos cladóceros adultos pode diminuir à medida que a concentração de substâncias tóxicas aumenta, de forma que as fêmeas alocam maior quantidade de reservas para sua prole (buscando assim garantir a sobrevivência dos neonatos em um ambiente adverso).

O menor Tempo de geração – cerca de 14 dias - foi apresentado pelas fêmeas cultivadas no tratamento Cairomônio (Fig 4B), talvez justamente devido ao fato da produção de prole

neste tratamento ter sido maior. Gama-Flores *et al*. (2013) encontraram tempo de geração em torno de 9 dias para *Moina macropoda* cultivada na presença de cairomônios de peixes. Garza–León, Azarte-Cárdenas e Rico-Martínez (2017), ao contrário do presente estudo, verificaram queda no tempo de geração para o cladócero *Alona guttata* cultivada na presença do glifosato.

Assim como no caso do Tempo de geração, a Taxa intrínseca de crescimento populacional (r) apresentou- se estatisticamente diferente para todos os tratamentos testados (Fig 4C). Considerando-se, mais uma vez, que a maior produção de prole ocorreu no tratamento Cairomônio, maior valor de r foi encontrado neste caso. Talvez seja interessante lembrar que, segundo Garza–León, Azarte-Cárdenas e Rico-Martínez (2017) o aumento da fecundidade nem sempre é uma resposta positiva, uma vez que alocar mais energia para a reprodução ao invés de outros processos importantes pode ter efeitos negativos sobre o fitness da espécie a longo prazo. Moreira *et al*. (2020), por sua vez, encontraram queda de r para *Cerodaphnia silvestrii* cultivada na presença de fipronil isolado e também combinado com cairomônio de peixe. Vilarroel *et al*. (2000) explica que estimar a toxicidade de compostos em níveis populacionais é tão importante quanto estimar a toxicidade em níveis individuais, deixando claro que mais atenção deveria ser dada a parâmetros como a taxa intrínseca de crescimento populacional.

O presente trabalho é marcado tanto por fatos pre existentes na literatura – como a antecipação da reprodução e aumento da produção de neonatos decorrente da presença de cairomônios – quanto por fatos atípicos – como o aumento das proporções corporais na presença de predadores visuais. É importante lembrar, nesse sentido, que os efeitos dos cairomônios sobre a morfologia e a história de vida de cladóceros podem estar ligados à espéciee até mesmo ao clone sobre os quais os aleloquímicos atuam (Tolardo *et al*. 2016), podendo seresta a chave para explicar o porquê de respostas inéditas ocorrerem em determinadas condições. Assim, a realização de mais estudos, envolvendo outras espécies de peixes e cladóceros, tornam-se de suma importância para elucidar melhor o cenário aqui discorrido.

5. Conclusões

Considerando-se a relação de predação entre peixes e cladóceros, o presente trabalho traz alguns fatos singulares e que precisam ser melhor investigados. De modo geral, a literatura têm trazido a existência de uma tendência geral dos cladóceros em diminuir o tamanho do corpo na presença de predadores visuais, aumentando assim suas chances de sobrevivência (Moreira *et al*. 2020; Qin *et al*. 2022; Sakwinska, 2000); no presente estudo, porém, foi verificado aumento do corpo dos cladóceros aos 14 dias de vida, indicando a necessidade de estudos

adicionais.

Sobre a ação conjunta do cairomônio e glifosato sobre a relação presa-predador, pode-se dizer que, aparentemente, não houve interação entre os químicos. Apesar do conhecido fato de que inseticidas induzem mudanças morfológicas em *Daphnia*, as condições para que isso ocorra são restritas (Hanazato, 1995). Considerando-se ainda a ação conjunta do cairomônio e glifosato, o presente estudo corrobora outros nos quais os agrotóxicos também pareceminterferir na ação dos cairomônios, diminuindo a capacidade de defesa das presas (Barry, 2000;Sakamoto; Hanazato; Tanaka, 2009; Qin *et al*. 2022).

Por fim, apesar do fato da combinação entre cairomônios e glifosato não ter levado ao desenvolvimento de elmos e espinhos mais longos em *D. similis*, houve alteração no tamanho do corpo dos organismos submetidos a ambos os compostos, o que, por si só, é um fator importante, já que pode alterar as relações que o cladócero mantém com outros organismos. Sabe-se que o zooplâncton é um elo fundamental da cadeia trófica no ambiente aquático e que alterações no tamanho e reprodução podem alterar a composição e estrutura do grupo. O aumento do tamanho dos organismos pode, neste caso, levar ao aumento da predação por peixes e outros predadores visuais, ocasionando a diminuição das populações de *D. similis*. Recomenda-se também maiores cuidados com relação à contaminação dos corpos d´água com agrotóxicos, já que a presença destes compostos pode alterar parâmetros populacionais importantes, o que por sua vez, acaba também sendo potencialmente danoso à estrutura das comunidades e ecossitemas.

Referências

AARFLOT, J. M.; HJØLLO, S. S.; STRAND, E.; SKOGEN, M. D. Transportation and predation control structures the distribution of a key calanoid in the Nordic Seas. **Progress in Oceanography**, v. 202, p. e102761, 2022. https://doi.org/10.1016/j.pocean.2022.102761

ABNT 2017. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp.(Crustácea, Cladócera). (Norma número NBR 12713:2017).

ABNT 2017. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp.(Crustácea, Cladócera). (Norma número NBR 13373:2017).

ABNT 2022. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes (*Cyprinidae*). (Norma número NBR 15088:2022).

ARZATE-CÁRDENAS, M. A.; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F. Energy resource reallocation in *Daphnia schodleri* (Anomopoda: Daphniidae) reproduction induced by exposure to hexavalent chromium. **Chemosphere**, v. 87, n. 4, p. 326-332, 2012. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.014

BABAEI, M.; TAYEMEH, M. B.; JO, M. S.; YU, I. J.; JOHARI, S. A. Trophic transfer and toxicity of silver nanoparticles along a phytoplankton-zooplankton-fish food chain. **Science of The Total Environment**, v. 842, p. e156807, 2022. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156807

BARRY, M. J. Effects of endosulfan on *Chaoborus*-induced life-history shifts and morphological defenses in *Daphnia pulex*. **Journal of Plankton Research**, v. 22, n. 9, p. 1705-1718, 2000. https://doi.org/10.1093/plankt/22.9.1705

BORDIN E. R.; MUNHOZ, R. C.; PANICIO, P. P.; DE FREITAS, A. M.; RAMSDORF, W. A. Effects of environmentally relevant concentrations of atrazine and glyphosate herbicides, isolated and in mixture, on two generation of the freshwater microcrustacean *Daphnia magna*. **Ecotoxicology**, v. 31, n. 6, p. 884-896, 2022. https://doi.org/10.1007/s10646-022-02554-2

BROVINI, E. M.; DE DEUS, B. C. T.; VILAS-BOAS, J. A.; QUADRA, G. R.; Carvalho, L.; MENDONÇA, R. F.; PEREIRA, R. O.; CARDOSO, S. J. Three-bestseller pesticides in Brazil: Freshwater concentrations and potential environmental risks. **Science of The Total Environment**, v. 771, p. e144754, 2021. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144754

BROVINI, E. M.; QUADRA, G. R.; PARANAÍBA, J. R.; CARVALHO, L.; DE OLIVEIRA PEREIRA, R.; DE AQUINO, S. F.. Occurrence and environmental risk assessment of 22 pesticides in Brazilian freshwaters. **Aquatic Toxicology**, v. 260, p. e106566, 2023. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139286

BROWN, W. L. Jr.; EISNER, T.; WHITTAKER, R. H. Allomones and kairomones: transspecific chemical messengers. **BioScience**, v. 20, p. 21-22, 1970. https://doi.org/10.2307/1294753

CABRERA, M.; CAPPARELLI, M. V.; ÑACATO-CH, C.; MOULATLET, G. M.; LÓPEZ-HERAS, I.; GONZÁLEZ, M. D.; ALVEAR-S, D.; Rico, A. Effects of intensive agriculture and urbanization on water quality and pesticide risks in freshwater ecosystems of the Ecuadorian Amazon. **Chemosphere**, v. 337, p. e139286, 2023. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.139286

CASTRO, B.B.; CONSCIÊNCIA, S.; GONÇALVES, F. Life history responses of *Daphnia longispina* to mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) and pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*) kairomones. **Hydrobiologia**, v. 594, p. 165–174, 2007. https://doi.org/10.1007/s10750-007-9074-5

CHAKRI K.; TOUATI L.; ALFARHAN, A. H.; AL-RASHEID, K. A.; SAMRAOUI, B. Effect of vertebrate and invertebrate kairomones on the life history of *Daphnia magna* Straus (Crustacea: Branchiopoda). **Comptes Rendus Biologies**, v. 333, n. 11-12, p. 836-840, 2010. https://doi.org/10.1016/j.crvi.2010.09.004

DAWIDOWICZ, P.; PREDKI, P.; PIETRZAK, B. Shortened lifespan: another cost of fish-predator avoidance in cladocerans? **Hydrobiologia**, v. 643, p. 27-32, 2010. https://doi.org/10.1007/s10750-010-0132-z

DECLERCK, S.; WEBER, A. Genetic differentiation in life history between *Daphnia galeata* populations: an adaptation to local predation regimes? **Journal of Plankton Research**, v. 25, n. 1, p. 93-102, 2003. https://doi.org/10.1093/plankt/25.1.93

DEOSTI, S.; DE FÁTIMA BOMFIM, F.; LANSAC-TOHA, F. M.; QUIRINO, B. A.; BONECKER, C. C.; LANSAC-TÔHA, F. A. Zooplankton taxonomic and functional structure is determined by macrophytes and fish predation in a Neotropical river. **Hydrobiologia**, v. 848, p. 1475-1490, 2021. https://doi.org/10.1007/s10750- 021-04527-8

DZIALOWSKI, A. R.; LENNON, J. T.; O´BRIEN, W. J.; SMITH, V. H. Predator - induced phenotypic plasticity in the exotic cladoceran *Daphnia lumholtzi*. **Freshwater Biology**, v. 48, n. 9, p. 1593-1602, 2003. https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2003.01111.x

EBERT, D. *Daphnia* as a versatile model system in ecology and evolution. **EvoDevo**, v. 13, n. 1, p. 16, 2022. https://doi.org/10.1186/s13227-022-00199-0

EL BAROUDI, Y.; OUAZZANI, C.; ER-RAMLY, A.; MOUSTAGHFIR, A.; ESSEBBAHI, I.; EL BAROUDI, H.; DAMI, A.; BALOUCH, L. Glyphosate Contamination of Well Water from Various Agricultural Areas-A Case Study in Morocco. **Ecological Engineering & Environmental Technology**, v. 24, n. 7, 2023. https://doi.org/10.12912/27197050/169874

GAMA-FLORES, J. L.; HUIDOBRO-SALAS, M. E.; SARMA, S. S. S.; NANDINI, S. Effects of allelochemicals released by vertebrates (fish, salamander and tadpole) on *Moina macrocopa* (Cladocera). **Allelopathy Journal**, v. 31, n. 2, p. 415-425, 2013.

GARZA-LEÓN, C. V.; ARZATE-CÁRDENAS, M. A.; RICO-MARTÍNEZ, R. Toxicity evaluation of cypermethrin, glyphosate, and malathion, on two indigenous zooplanktonic species. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 22, p. 18123-18134, 2017. https://doi.org/10.1007/s11356-017-9454-y

GIBBS, M. M.; BOWMAN, E.; SAFI, K. A.; ALBERT, A. M.; DUGGAN, I. C.; BURGER, D. Factors influencing summer phytoplankton biomass in a large river system with impoundments: retention time, zooplankton grazing, thermal stratification and internal seiching in a hydro lake. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, p. 1-24, 2023. https://doi.org/10.1080/00288330.2023.2177313

GU, L.; QIN, S.; LU, N.; ZHAO, Y.; ZHOU, Q.; ZHANG, L.; SUN, Y.; HUANG, Y.; LYU, K.; YANG, Z. *Daphnia mitsukuri* traits responding to predation cues alter its population dynamics. **Ecological Indicators**, v. 117, p. e106587, 2020. https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106587

HAHN, M.; VON ELERT, E. One kairomone and multiple effects in daphnia Species—5α-cyprinol sulfate induces morphological defenses in the invasive species *Daphnia lumholtzi*. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 10, p. e804521, 2022. https://doi.org/10.3389/fevo.2022.804521

HANAZATO, T. Combined effect of the insecticide carbaryl and the *Chaoborus* kairomone on helmet development in *Daphnia ambigua*. **Hydrobiologia**, v. 310, p. 95-100, 1995. https://doi.org/10.1007/BF00015527

HUANG, T.; ZHAO, Y.; HE, J.; CHENG, H.; MARTYNIUK, C. J. Endocrine disruption by azole fungicides in fish: a review of the evidence. **Science of The Total Environment**, v. 822, p. e153412, (2022). https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153412

KALANTARY, R. R.; BARZEGAR, G.; JORFI, S. Monitoring of pesticides in surface water, pesticides removal efficiency in drinking water treatment plant and potential health risk to consumers using Monte Carlo simulation in Behbahan City, Iran. **Chemosphere**, v. 286, p. e131667, 2022. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131667

LEPORI, F. Effects of zooplankton structure and phosphorus concentration on phytoplankton biomass in a freshwater pelagic food chain. **Archiv für Hydrobiologie**, v. 192, n. 4, p. 305-317, 2019. http://dx.doi.org/10.1127/fal/2019/1189

LEROUX, R.; PÉPINO, M.; MAGNAN, P.; BERTOLO, A. Within-lake variatiability in predation risk shapes the spatio-temporal structure of the zooplankton community.

Freshwater Biology, v. 68, n. 12, p. 2151-2165, 2023. https://doi.org/10.1111/fwb.14183

MEYER J. S.; INGERSOLL, C. G.; MCDONALD, L. L.; BOYCE, M. S. Estimating uncertainty in population growth rates: jackknife vs. bootstrap techniques. **Ecology**, v. 67, n. 5, p. 1156-1166, 1986. https://doi.org/10.2307/1938671

MOREIRA, R. A.; ROCHA, O.; PINTO, T. J. D. S.; DA SILVA, L. C. M.; GOULART, B. V.; MONTAGNER, C. C.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Life-history traits response to effects of fish predation (kairomones), fipronil and 2, 4-D on neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 79, p. 298-309, 2020. https://doi.org/10.1007/s00244-020-00754-7

NARAKI, Y.; HIRUTA, C.; TOCHINAI, S. Identification of the precise kairomone-sensitive period and histological characterization of necktooth formation in predator-induced polyphenism in *Daphnia pulex*. **Zoological science**, v. 30, n. 8, p. 619-625, 2013. https://doi.org/10.2108/zsj.30.619

PIETRZAK, B.; DAWIDOWICZ, P.; PREDKI, P.; DANKO, M. J. How perceived predation risk shapes patterns of aging in water fleas. **Experimental Gerontology**, v. 69, p. 1–8, 2015. https://doi.org/10.1016/j.exger.2015.05.008

QIN, S.; YANG, T.; YU, B.; ZHANG, L.; GU, L.; SUN, Y.; YANG, Z. The stress effect of atrazine on the inducible defense traits of *Daphnia pulex* in response to fish predation risk: evidences from morphology, life history traits, and expression of the defense-related genes. **Environmental Pollution**, v. 311, p. e119965, 2022. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119965

REEDE, T. Life history shifts in response to different levels of fish kairomones in *Daphnia*. **Journal of Plankton Research**, v. 17, n. 8, p. 1661-1667, 1995. https://doi.org/10.1093/plankt/17.8.1661

REILLY, K.; ELLIS, L. J. A.; DAVOUDI, H. H.; SUPIAN, S.; MAIA, M. T.; SILVA, G. H.; GUO, Z.; MARTINEZ, D. S. T.; LYNCH, I. *Daphnia* as a model organism to probe biological responses to nanomaterials—from individual to population effects via adverse outcome pathways. **Frontiers in toxicology**, v. 5, p. e1178482, 2023. https://doi.org/10.3389/ftox.2023.1178482

RELYEA, R. A. How prey respond to combined predators: a review and an empirical test. **Ecology**, v. 84, n. 7, p. 1827-1839, 2003. https://doi.org/10.1890/0012-9658(2003)084[1827:HPRTCP]2.0.CO;2

RODRÍGUEZ-MIGUEL, A.; HERNÁNDEZ-ZAMORA, M.; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, L.; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F. Exposure to sublethal concentrations of the glyphosate-based herbicide Faena® increases sensitivity in the progeny of the American cladoceran *Daphnia exilis* (Herrick, 1895). **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 28, p. 38094-38105, 2021. https://doi.org/10.1080/02772240701529038

SAKAMOTO, M.; HANAZATO, T.; TANAKA, Y. Impact of an insecticide on persistence of inherent antipredator morphology of a small Cladoceran, *Bosmina*. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 57, p. 68-76, 2009. https://doi.org/10.1007/s00244-008-9247-x

SAKWINSKA, O. Response to fish kairomone in *Daphnia galeata* life history traits relies on shift to earlier instar at maturation. **Oecologia**, v. 131, p. 409–417, 2002. https://doi.org/10.1007/s00442-002-0901-0

SCHOMBERG, A. C., BRINGEZU, S.; BEUSEN, A. W. Water quality footprint of agricultural emissions of nitrogen, phosphorus and glyphosate associated with German bioeconomy. **Communications Earth & Environment**, v. 4, n. 1, p. 404, 2023. https://doi.org/10.1038/s43247-023-01054-3

SHARMA, A.; KUMAR, V.; SHAHZAD, B.; TANVEER, M.; SIDHU, G. P. S.; HANDA, N.; KOHLI, S. K.; YADAV, P.; BALI, A. S.; PARIHAR, R. D.; DAR, O. I.; SINGH, K.; JASROTIA, S.; BAKSHI, P.; RAMAKRISHNAN, M.; KUMAR, S.; BHARDWAJ, R.; THUKRAL, A. K. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. **SN Applied Sciences**, v. 1, p. 1-16, 2019. https://doi.org/10.1007/s42452-109-1485-1

TOLARDO, M.; DA SILVA FERRÃO-FILHO, A.; SANTANGELO, J. M. Species and clone-dependent effects of tilapia fish (Cichlidae) on the morphology and life-history of temperate and tropical *Daphnia*. **Ecological research**, v. 31, p. 333-342, 2016. https://doi.org/10.1007/s11284-016-1337-z

TORUAN, R. L.; DINA, R.; COGGINS, L. X.; GHADOUANI, A. Hydrological Regime and Fish Predation Regulate the Zooplankton Community Size Structure in a Tropical Floodplain Lake. **Water**, v. 14, n. 16, p. 2518, 2022. https://doi.org/10.3390/w14162518

VAN BRUGGEN, A. H.; FINCKH, M. R.; HE, M.; RITSEMA, C. J.; HARKES, P.; KNUTH, D.; GEISSEN, V. Indirect effects of the herbicide glyphosate on plant, animal and human health through its effects on microbial communities. **Frontiers in Environmental Science**, v. 9, p. 464, 2021. https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.763917

VILLARROEL, M. J.; FERRANDO, M. D.; SANCHO, E.; ANDREU, E. Effects of tetradifon on *Daphnia magna* during chronic exposure and alterations in the toxicity to generations pre-exposed to the pesticide. **Aquatic toxicology**, v. 49, n. 1-2, p. 39-47, 2000. https://doi.org/10.1016/S0166- 445X(99)00074-0

WEISS, L. C.; HEILGENBERG, E.; DEUSSEN, L.; BECKER, S. M.; KRUPPERT, S.; TOLLRIAN, R. Onset of kairomone sensitivity and the development of inducible morphological defenses in *Daphnia pulex*. **Hydrobiologia**, v. 779, p. 135-145, 2016. https://doi:10.1007/s10750-016-2809-4

WEISS, L. C.; LEIMANN, J.; TOLLRIAN, R. Predator-induced defences in *Daphnia longicephala*: location of kairomone receptors and timeline of sensitive phases to trait formation. **Journal of Experimental Biology**, v. 218, n. 18, p. 2918-2926, 2015. https://doi:10.1242/jeb.124552

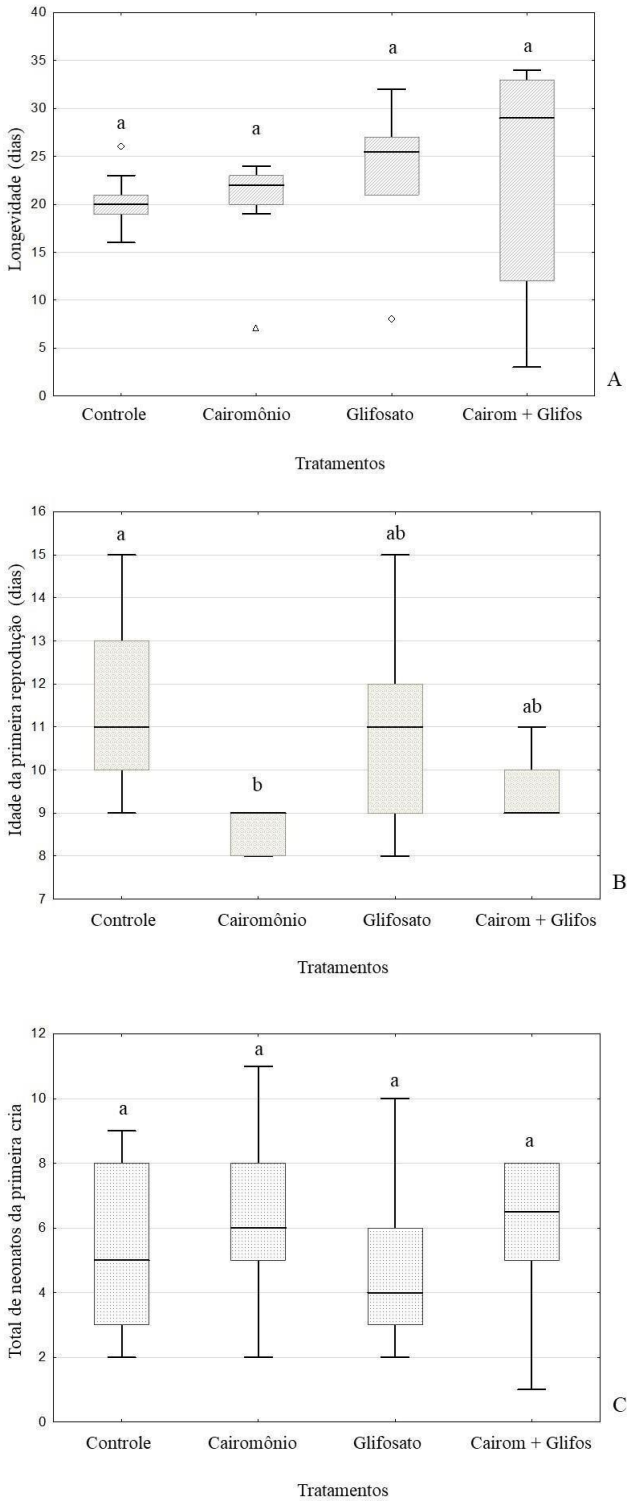


Fig. 1 Longevidade (A), Idade da primeira reprodução (B) e Total de neonatos da primeira cria (C) de *D. similis*, em todos os tratamentos testados.(Cairom + Glifos = Tratamento Cairomônio + Glifosato).

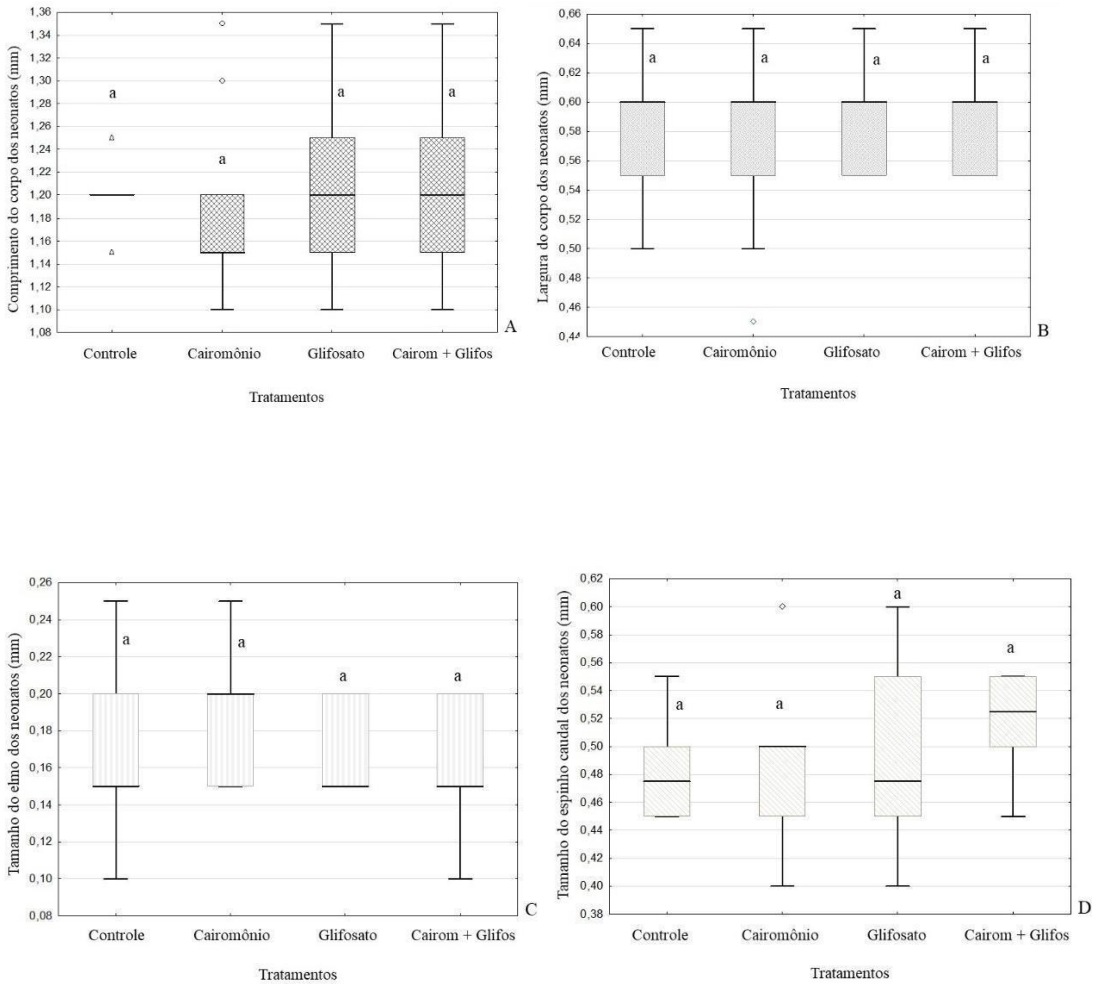


Fig. 2 Comprimento do corpo dos neonatos (mm) (A), Largura do corpo dos neonatos (mm) (B), Tamanho do elmo dos neonatos (mm) (C) e Tamanho do espinho caudal dos neonatos (mm) (D) de *D. similis* em todos os tratamentos testados.(Cairom + Glifos = Tratamento Cairomônio + Glifosato).

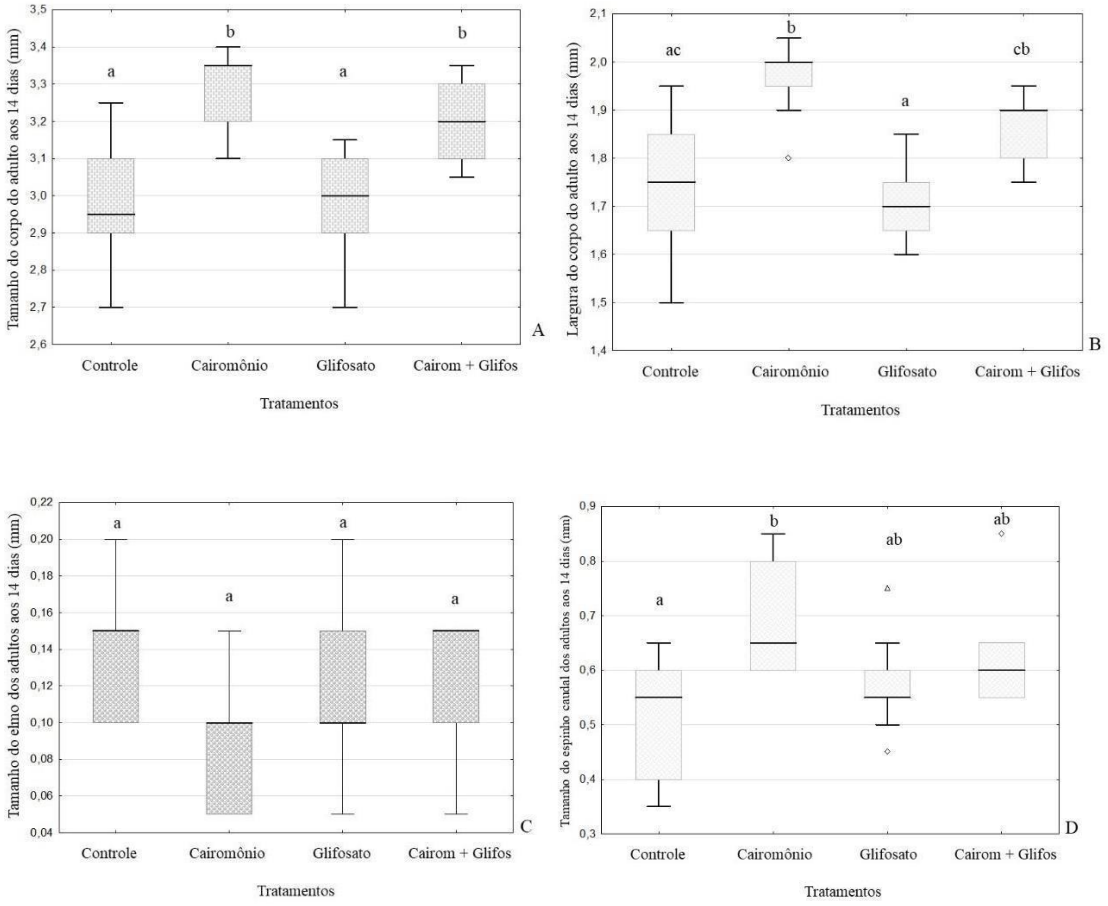
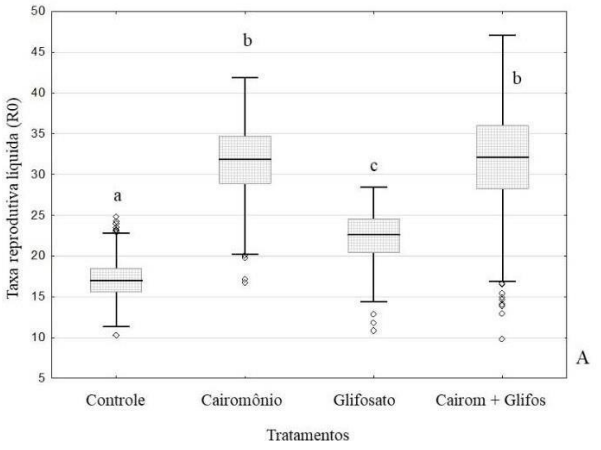
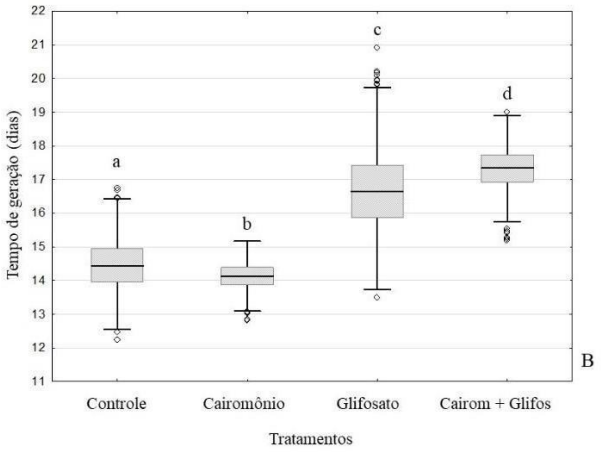


Fig. 3 Comprimento do corpo do adulto aos 14 dias (mm) (A), Largura do corpo do adulto aos 14 dias (mm) (B), Tamanho do elmo do adulto aos 14 dias (mm) (C) e Tamanho do espinho caudal do adulto aos 14 dias (mm) (D) de *D. similis* em todos os tratamentos testados.(Cairom + Glifos = Tratamento Cairomônio + Glifosato).





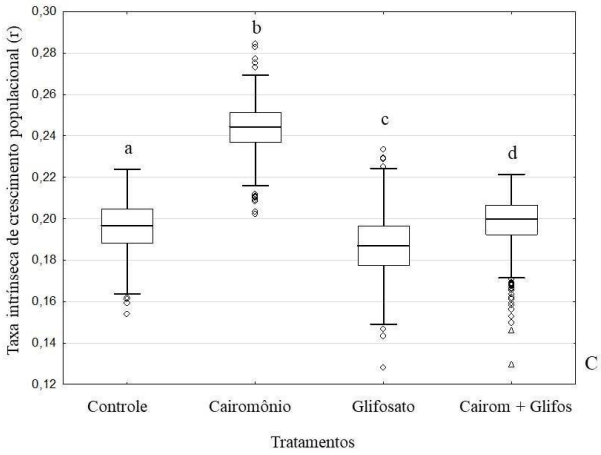


Fig. 4 Parâmetros da Tabela de Vida de *D. similis* em todos os tratamentos testados. Taxa reprodutiva líquida (R0) (A), Tempo de geração (T) (dias) e Taxa intrínseca de crescimento populacional (r) (C). (Cairom + Glifos = Tratamento Cairomônio + Glifosato).

Material suplementar

A combinação entre cairomônios e glifosato e a relação presa-predador: *Daphnia similis* e *Danio rerio*

Taís Cristina Bunioto[1], Daniel Clemente Vieira Rego da Silva[2], Luiz Alberto Beraldo de Moraes[3], Eduardo José Crevelin[3], Danilo Grünig Humberto da Silva[4], Maria Stela Castilho-Noll[1*]

[1]Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), São José do Rio Preto, SP, Brasil
[2] Instituto de Recursos Naturais – Universidade Federal de Itajubá - Itajubá, MG, Brasil
[3] Departamento de Química - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil
[4] Campus de Três Lagoas - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Três Lagoas - MS, Brasil

Autor correspondente: Maria Stela Castilho-Noll

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, campus de São José do Rio Preto - SP (UNESP/Ibilce)
Rua Cristóvão Colombo, 2265
Jardim Nazareth, São José do Rio Preto – SP
CEP: 15.054-000
Telefone: +551732212200
E-mail correspondente: stela.noll@unesp.br

Análises químicas

Quantificação do glifosato por UPLC-MS/MS

O experimento de quantificação do glifosato foi realizado por meio de UPLC-MS/MS no modo monitoramento de múltiplas reações (MMR). A solução padrão de referência foi preparada diluindo-se adequadamente a solução estoque (1mg/ml) com água, tendo-se como resultado as seguintes concentrações 2,5; 5,0; 50,0 mg/mL.

A amostra comercial foi diluída em água até a concentração final de 37mg/ml. Três microlitros das amostras padrão e comerciais foram injetados em uma coluna Ascentis Express C18 (100x4,6mm de diâmetro interno; tamanho de partícula de 2,7 µm) da SUPELCO Analytical; a fase móvel utilizada para eluição gradiente consistiu de ácido fórmico 0,1%. A taxa de fluxo foi de 0,5 ml/min e o programa de eluição gradiente começou com 40% de B, aumentou para 100% nos 7 minutos seguintes, permaneceu em 100% de B por 4 minutos e retornou à condição inicial (40%B) nos 6 minutos seguintes. Foram feitas injeções em triplicata para a solução padrão e em quadruplicata para as amostras. As condições ótimas de MMR foram determinadas, conforme apresentado na Tabela 1. As curvas de calibração obtidas no modo MMR foram utilizadas para a quantificação do glifosato e as concentrações nas amostras foram expressas em mg/ml.

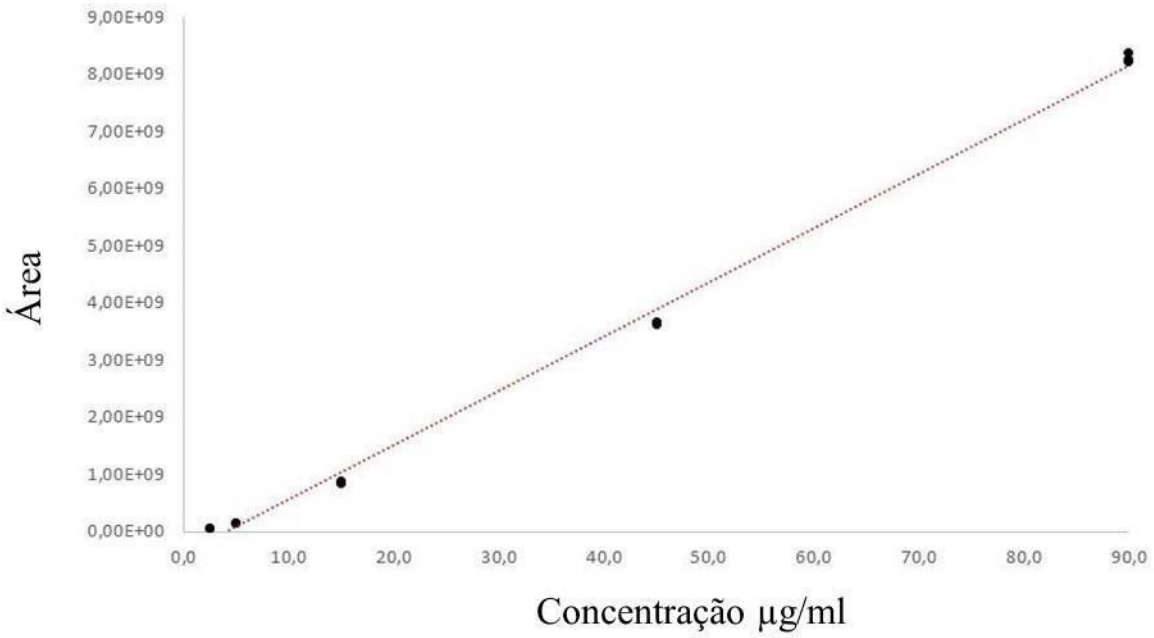
Os dados foram obtidos e processados utilizando-se o software TargetLynx^{TM} Application Manager (Waters, Corporation).

Tabela 1. Transições de íons, configurações de instrumentos e tempos de retenção para o glifosato.

Composto	Precursor íon (*m/z*)	Produto íon (*m/z*)	PD[a] (V)	EC[b] (eV)	TR[c] (min)
Glifosato	169,8[*]	88,1	40	5	3,55
	169,8[**]	59,9	40	15	

[a] PD = Potencial de desagrupamento
[b] EC = Energia de colisão (Argônio foi usado como gás de colisão)
[c] TR = Tempo de retenção
[*] Transição de quantificação
[**] Transição de confirmação

Curva analítica do glifosato



A	B	r^2	R
9,48E+07	-3,75E+08	0,9967	0,9983

Tabela 2. Concentração do glifosato na amostra.

Réplicas	Média	DP	CV(%)	Glifosato Concentração (g/l)	Erro Absoluto (g/l)	Erro Relativo (%)
3,19E+09	3,89E+09	4,9E+08	12,04	371,43	1,43	0,39
4,07E+09						
4,17E+09						
4,14E+09						

DP = Desvio Padrão; CV(%) = Coeficiente de Variação

Figura 1: Alíquotas de água congelada contendo cairomônios de *Danio rerio*.

Resultados

Dados físico-químico

Tabela 9. Condutividade (µS/cm) durante todo o período experimental. A água adicionada ao experimento é a água na qual os organismos eram colocados diariamente. A água descartada é a água removida do experimento, na qual os organismos haviam permanecido nas 24 horas anteriores.

	Condutividade da água adicionada (µS/cm)				Condutividade da água descartada (µS/cm)			
Dia	Controle	Cairomônio	Glifosato	Cairomônio + Glifosato	Controle	Cairomônio	Glifosato	Cairomônio + Glifosato
0	101,2	100,9	98,7	99,3				
1	97,7	98,4	98	101,2	95,5	96,2	93,3	96,4
2	96,9	96,5	94,7	96,6	102,5	97	100,5	99,1
3	100,1	105,4	104,1	105,1	102,5	102,6	102,1	100,6
4	106,1	108,1	107	109,1	99,6	101	100,3	102,7
5	104,3	101,9	102,2	104,6	104,2	103,1	100,5	103,4
6	106	103,4	101,5	93,6	107,7	102	94,1	93,8
7	101,8	105,4	104,6	105	103,6	103,3	102,1	103,1
8	101,9	105,5	106,6	107,1	102	101,1	102,2	102,5
9	102,9	103,4	102,7	106,3	101,6	109,2	107	109,2
10	106,9	105,9	106,8	107,6	103,9	106,1	104,2	107,7
11	108,7	108,3	111	111,1	99,3	106,2	104,4	104
12	103,7	106,7	106,9	107,1	106,6	108,8	109,9	108,8
13	102,3	100,9	102	102,2	97,5	99	98,3	100,3
14	101,3	102,2	101,2	101,6	98,1	99,5	100,7	101,4
15	112,7	107	104,7	106,9	102,5	99,6	99,9	102,5
16	107,5	109,2	108,9	109,4	109	112,3	113,8	107,7
17	100,8	100,9	97	91,3	100,6	97,4	91,7	90,1
18	106,2	103,9	101,8	105,7	104,6	100,2	102	103,5
19	102,9	101,4	99,3	99,5	102,5	101,5	99,7	103,2
20	105,9	100	97,8	98,5	102,7	96,9	94,3	98,7
21	102,2	101,6	97	98,8	98,8	96,2	97,9	98,5
22	102,2	101,7	102,4	103,8	104,1	103	101,2	102
23	111,1	106,4	102,5	99,7	107,1	100	102,6	101,3
24	113,5	104,2	103,3	106,2	107,7	104,1	106,4	106,2
25	107,8		106,3	106,6	105,1		104,2	105,6
26	107,9		101,8	100,6	106,7		96,5	101,6
27			105,6	106,3			105,5	102,3
28			99,7	102,2			101,5	103,7
29			103,9	106,1			101,9	104,5
30			100,5	101,2			100,9	105,1
31			99,1	104,7			98,9	102
32			101,4	100,3			98,8	100,5
33				99,6				98,6
34				105,3				104,8

Tabela 10. Oxigênio (mg/L) durante todo o período experimental. A água adicionada ao experimento é a água na qual os organismos eram colocados diariamente. A água descartada é a água removida do experimento, na qual os organismos haviam permanecido nas 24 horas anteriores. Problemas com o aparelho impediram que as medições fossem realizadas durante todo o período experimental e tais falhas estão indicadas na tabela pelos dizeres "não mensurado".

	Oxigênio água adicionada (mg/L)				Oxigênio da água descartada (mg/L)			
Dia	Controle	Cairomônio	Glifosato	Cairomônio + Glifosato	Controle	Cairomônio	Glifosato	Cairomônio + Glifosato
0	8,15	8,11	8,16	8,28				
1	8,2	8,21	8,25	8,28	8,25	8,23	8,32	8,31
2	8,35	8,34	8,41	8,35	8,52	8,55	8,45	8,52
3	8,3	8,22	8,32	8,27	8,36	8,29	8,4	8,48
4	8,03	7,92	8,04	8,09	8,13	8,15	8,28	8,37
5	não mensurado							
6	não mensurado							
7	8,05	8,19	8,15	8,1	8,57	8,34	8,55	8,42
8	não mensurado							
9	não mensurado							
10	não mensurado							
11	não mensurado							
12	não mensurado							
13	não mensurado							
14	não mensurado							
15	não mensurado							
16	não mensurado							
17	não mensurado							
18	não mensurado							
19	não mensurado							
20	7,7	7,6	7,71	7,68	7,85	7,91	7,82	7,84
21	7,68	7,64	7,68	7,76	7,86	7,88	7,82	7,92
22	7,86	7,78	7,85	7,86	7,89	7,95	7,98	8,02
23	não mensurado							
24	não mensurado							
25	não mensurado							
26	8,32	8,22	8,31	8,41	8,36	8,24	8,36	8,39
27	não mensurado							
28			8,28	8,22			8,3	8,36
29			8,25	8,26			8,28	8,3
30			8,28	8,22			8,3	8,35
31			8,29	8,16			8,31	8,36
32			8,25	8,27			8,42	8,47
33	não mensurado							
34	não mensurado							

Tabela 11. Ph durante todo o período experimental. A água adicionada ao experimento é a água na qual os organismos eram colocados diariamente. A água descartada é a água removida do experimento, na qual os organismos haviam permanecido nas 24 horas anteriores.

	pH água adicionada				pH da água descartada			
Dia	Controle	Cairomônio	Glifosato	Cairomônio + Glifosato	Controle	Cairomônio	Glifosato	Cairomônio + Glifosato
0	7,25	7,33	7,31	7,39				
1	7,28	7,4	7,45	7,51	7,4	7,44	7,1	7,53
2	7,02	7,32	7,44	7,51	7,21	7,36	7,44	7,53
3	7,31	7,53	7,52	7,56	7,44	7,5	7,53	7,54
4	7,32	7,4	7,43	7,54	7,45	7,47	7,49	7,57
5	7,27	7,48	7,57	7,58	7,32	7,56	7,59	7,63
6	7,36	7,38	7,41	7,48	7,34	7,39	7,5	7,45
7	7,25	7,49	7,6	7,57	7,5	7,5	7,58	7,6
8	7,13	7,39	7,47	7,49	7,45	7,41	7,55	7,55
9	7,36	7,51	7,52	7,56	7,49	7,53	7,59	7,57
10	7,64	7,41	7,48	7,6	7,4	7,44	7,57	7,56
11	7,23	7,49	7,56	7,61	7,41	7,53	7,65	7,6
12	7,24	7,55	7,61	7,62	7,38	7,46	7,59	7,55
13	7,38	7,52	7,59	7,6	7,43	7,55	7,57	7,59
14	7,32	7,56	7,59	7,54	7,52	7,59	7,6	7,58
15	7,22	7,42	7,6	7,61	7,51	7,57	7,58	7,55
16	7,27	7,34	7,4	7,45	7,44	7,5	7,51	7,53
17	7,34	7,49	7,6	7,66	7,41	7,56	7,65	7,66
18	7,28	7,44	7,51	7,6	7,41	7,54	7,61	7,62
19	7,38	7,4	7,48	7,52	7,36	7,49	7,53	7,56
20	7,24	7,36	7,53	7,56	7,31	7,45	7,55	7,56
21	7,32	7,44	7,47	7,48	7,44	7,48	7,5	7,43
22	7,22	7,4	7,5	7,54	7,38	7,51	7,54	7,55
23	7,49	7,61	7,67	7,65	7,62	7,63	7,63	7,65
24	7,14	7,58	7,64	7,76	7,6	7,62	7,67	7,59
25	7,19		7,58	7,59		7,55	7,6	7,58
26	7,42		7,59	7,57		7,56	7,58	7,51
27			7,31	7,58			7,59	7,58
28			7,4	7,54			7,58	7,57
29			7,26	7,5			7,46	7,6
30			7,35	7,36			7,34	7,41
31			7,48	7,6			7,44	7,59
32			7,35	7,59			7,45	7,57
33				7,59				7,46
34				7,47				7,45

Tabela 12. Dureza (mg de $CaCO_3$/L) durante todo o período experimental. A água adicionada ao experimento é a água na qual os organismos eram colocados diariamente. A água descartada é a água removida do experimento, na qual os organismos haviam permanecido nas 24 horas anteriores.

Dia	Dureza
0	40
1	48
2	42
3	40
4	46
5	42
6	42
7	46
8	44
9	46
10	42
11	44
12	40
13	44
14	46
15	46
16	44
17	46
18	42
19	44
20	44
21	40
22	40
23	46
24	46
25	44
26	42
27	42
28	46
29	44
30	42
31	44
32	44
33	44
34	40

Conclusão geral

O presente estudo apresenta um panorama geral sobre impactos de um herbicida, um fungicida e cairomônios de peixes sobre três espécies de cladóceros de água doce. Os dados discorridos trazem a importante informação de que a presença conjunta de cairomônios e glifosato no ambiente aquático pode afetar a Taxa reprodutiva líquida (R_0) em populações de cladóceros, tendo, portanto, potencial para alterar a estrutura das mesmas e trazer consequências para comunidades e ecossistemas. Um fato incomum, referente ao aumento do corpo de cladóceros na presença de predadores visuais foi registrado e necessita de mais estudos.

Por último, a simples presença de agrotóxicos no meio aquático oferece risco potencial aos ecossistemas, uma vez que podem afetar fatores importantes, como crescimento e reprodução e, consequentemente, a estrutura de populações. Sendo assim, de modo geral, esse trabalho serve não apenas como uma nova fonte de dados a respeito da magnitude dos impactos decorrentes da presença de agrotóxicos nos ambientes naturais, mas também como um alerta para autoridades e órgãos ambientais que cuidam da legislação e da fiscalização desses químicos no meio aquático.

Referências

BROVINI, E. M.; QUADRA, G. R.; PARANAÍBA, J. R.; CARVALHO, L.; DE OLIVEIRA PEREIRA, R.; DE AQUINO, S. F. Occurrence and environmental risk assessment of 22 pesticides in Brazilian freshwaters. **Aquatic Toxicology**, v. 260, p. e106566, 2023. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106566

BROWN, W. L. Jr.; EISNER, T.; WHITTAKER, R. H. Allomones and kairomones: transspecific chemical messengers. **BioScience**, v. 20, p. 21-22, 1970. https://doi.org/10.2307/1294753

CHEEVAPORN, V.; MENASVETA, P. Water pollution and habitat degradation in the Gulf of Thailand. **Marine pollution bulletin,** v. 47, n. 1-6, p. 43-51, 2003. https://doi.org/10.1016/S0025-326X(03)00101-2

CHEN, S.; WANG, D. *Vallisneria natans* decomposition rates and associated macroinvertebrates, microbes and microalgae along a vertical depth gradient in an urban lake (Nanhu Lake, China). **Chemistry and Ecology**, v. 35, n. 7, p. 660-677, 2019. https://doi.org/10.1080/02757540.2019.1618280

FAN, F.; BU, H.; MCSHEA, W. J.; SHEN, X.; LI, S. Free-ranging livestock cause forest understory degradation in giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) habitat. **Forest Ecology and Management**, v. 538, p. e120990, 2023. https://doi.org/10.1016/j.foreco.2023.120990

GERALDES, A. M.; BOAVIDA, M. J. What factors affect the pelagic cladocerans of the meso-eutrophic Azibo Reservoir? **Annales de Limnologie-International Journal of Limnology**, v. 40, n. 2, p. 101-111, 2004. https://doi.org/10.1051/limn/2004008

HÄDER, D. P.; BANASZAK, A. T.; VILLAFAÑE, V. E.; NARVARTE, M. A.; GONZÁLEZ, R. A.; HELBLING, E. W. Anthropogenic pollution of aquatic ecosystems: Emerging problems with global implications. **Science of the Total Environment**, v. 713, p. e136586, 2020. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136586

HAZWAN, M.; SAMANTHA, L. D.; TEE, S. L.; KAMARUDIN, N.; NORHISHAM, A. R.; LECHNER, A. M.; AZHAR, B. Habitat fragmentation and logging affect the occurrence of lesser mouse-deer in tropical forest reserves. **Ecology and Evolution**, v. 12, n. 3, p. e8745, 2022. https://doi.org/10.1002/ece3.8745

MASUD, N.; CABLE, J. Microplastic exposure and consumption increases susceptibility to gyrodactylosis and host mortality for a freshwater fish. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 153, p. 81-85, 2023. https://doi.org/10.3354/dao03721

MATSUMOTO, M.; ITO, H.; TATEISHI, A.; KOBAYASHI, Y.; SATOH, K.; NUMATA, K.; MIYAKAWA, H. Effects of polycaprolactone degradation products on the water flea, *Daphnia magna*: Carbodiimide additives have acute and chronic toxicity. **Journal of Applied Toxicology**, v. 43, n. 12, p. 1840- 1848, 2023. https://doi.org/10.1002/jat.4516

PASHAEI, R.; DZINGELEVICIENE, R.; PUTNA-NIMANE, I.; OVERLINGE, D.; BLASZCZYK, A.; WALKER, T. R. Acute toxicity of triclosan, caffeine, nanoplastics, microplastics, and their mixtures on *Daphnia magna*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 192, p. e115113, 2023. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2023.115113

RAJEWICZ, W.; ROMANO, D.; SCHMICKL, T.; THENIUS, R. *Daphnia*'s phototaxis as an indicator in ecotoxicological studies: A review. **Aquatic Toxicology**, v. 265, p. e106762 (2023). https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2023.106762

RUANO, F.; LENOIR, A.; SELVESTRE, M.; KHALIL, A.; TINAUT, A. Chemical profiles in *Iberoformica subrufa* and *Formica frontalis*, a new example of temporary host–parasite interaction. **Insectes Sociaux**, v. 66, p. 223-233, 2019. https://doi.org/10.1007/s00040-018-00677-6

SARKER, A.; MASUD, M. A. A.; DEEPO, D. M.; DAS, K.; NANDI, R.; ANSARY, M. W. R.; ISLAM, A. R. M. T.; ISLAM, T. Biological and green remediation of heavy metal contaminated water and soils: a state-of-the-art review. **Chemosphere**, v. 332, p. e138861, 2023. https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138861

SUI, Y. Analyzing the impact of industrial growth and agricultural development on environmental degradation in South and East Asia. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, p. 1-17, 2023. https://doi.org/10.1007/s11356-023-30766-4

WANG, Z.; TAN, K. Honey bee alarm pheromone mediates communication in plant–pollinator–predator interactions. **Insects**, v. 10, n. 10, p. 366, 2019. https://doi.org/10.3390/insects10100366