

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
UNESP – CAMPUS DE ASSIS

**MARIA VITÓRIA PAMPLONA**

EFEITO DA EXPOSIÇÃO AOS HERBICIDAS GLIFOSATO  
E 2,4-D, E SUAS MISTURAS, SOBRE AS RESPOSTAS  
FOTOSSINTÉTICAS DE ESPÉCIES DE MACROALGAS DE  
RIACHOS

**ASSIS  
2024**



**MARIA VITÓRIA PAMPLONA**

**Efeito da exposição aos herbicidas glifosato e 2,4-D,  
e suas misturas, sobre as respostas fotossintéticas de  
espécies de macroalgas de riachos**

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

Orientador(a): Prof. Dr. Ciro Cesar Zanini Branco

Coorientador(a): Dr. Lucas Kortz Vilas Boas

**ASSIS**

**2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Ana Cláudia Inocente Garcia - CRB 8/6887

Pamplona, Maria Vitória

P186e        Efeito da exposição aos herbicidas glifosato e 2,4-D, e suas misturas, sobre as respostas fotossintéticas de espécies de macroalgas de riachos / Maria Vitória Pamplona. — Assis, 2024  
39 p. : il.

Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências e Letras, Assis

Orientador: Prof. Dr. Ciro Cesar Zanini Branco

Coorientador: Prof. Dr. Lucas Kortz Vilas Boas

1. Macroalga. 2. Glifosato. 3. 2,4-D. 4. Herbicidas. 5. Ácido diclorofenoxiacético. I. Título.

CDD579.8

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE MARIA VITÓRIA PAMPLONA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS E LETRAS - CAMPUS DE ASSIS.

Aos 14 dias do mês de junho do ano de 2024, às 08:30 horas, no(a) Sala de Defesas da Pós-graduação, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de MARIA VITÓRIA PAMPLONA, intitulada Efeito da exposição aos herbicidas glifosato e 2,4-D, e suas misturas, sobre as respostas fotossintéticas de espécies de macroalgas de riachos. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. CIRO CESAR ZANINI BRANCO (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) UNESP/FCLAssis, Prof. Dr. PITÁGORAS DA CONCEIÇÃO BISPO (Participação Presencial) do(a) UNESP/FCL-Assis, Profa. Dra. JULIANA POMARI (Participação Presencial) do(a) Assis/SP. Após a exposição pela mestrandia e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADA. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. CIRO CESAR ZANINI BRANCO



## **Agradecimentos**

Ao prof. Dr. Ciro Cezar Zanini Branco, por toda ajuda e ensinamentos para a realização deste trabalho. Agradeço também, pelas palavras de incentivo e puxões de orelha quando necessários para que eu cresça na profissão, amadureça e continue seguindo em frente.

A minha mãe e minha madrinha, Rosana Garcia de Castro e Layse Pereira Soares do Nascimento que sempre me incentivaram, apoiaram e aconselharam no caminho que segui, e me reergueram quando eu precisei.

Agradeço aos integrantes do LABIA, pelos auxílios em diversos momentos, o apoio quando precisei, e ensinamentos novos que obtive ao longo dos anos.

Aos meus amigos Isadora Andrade Barbosa, Ana Paula Andrade Barbosa, Nágela Maria Giannasi Fiais, Thiago Paulino de Carvalho, Giovana Ribeiro de Melo Afonso e Isabela Theodora Gomes Serra Rodrigues Silva que sempre apoiaram, brigaram, riram e me tiraram a ansiedade e tristezas ao longo do caminho.

Ao meu namorado, Eduardo Paulino Dib, que me auxiliou e apoiou em todos os momentos.

A minha banca Dra. Juliana Pomari, que em muitos momentos de dúvidas ao longo do projeto me estendeu a mão, e prof. Dr. Pitágoras da Conceição Bispo que por vezes me incentivou e aconselhou.

Ao seu Sinésio, que sempre me recebeu com um “Bom dia, Vitoria” sorridente e com conversas sobre diversos assuntos que melhoravam o meu dia e me tiravam boas risadas.

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

## RESUMO GERAL

No Brasil, o uso crescente de agrotóxicos é evidente, especialmente na agricultura convencional, onde a indústria encontrou um mercado promissor. Esse aumento gera impactos significativos no ambiente, afetando comunidades de organismos, como os dos ecossistemas aquáticos próximos a áreas de cultivo intensivo. Resíduos de agrotóxicos atingem rios e lagos, impactando principalmente os produtores primários, como algas bentônicas de riachos, que sofrem alterações fisiológicas importantes, como na fotossíntese, mesmo não sendo o alvo principal dos agrotóxicos. Neste contexto, quatro espécies de macroalgas de riachos, foram submetidas a cenários experimentais nos quais as amostras algais foram expostas a três concentrações (0,28; 3,5 e 6 mg L<sup>-1</sup>) de um herbicida à base de glifosato (formulação comercial Roundup®), a três concentrações (0,30; 2 e 10 mg L<sup>-1</sup>) de um herbicida à base de 2,4-D (formulação comercial Bratt®), e à misturas destes dois herbicidas (0,28 mg L<sup>-1</sup> de glifosato + 0,30 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D; 3,5 + 2 e 6 + 10). Após a exposição, as macroalgas foram avaliadas quanto às suas respostas fotossintéticas através da técnica da fluorescência da clorofila a, utilizando os seguintes parâmetros: i) Rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Y(II)); ii) Rendimento quântico da perda de energia não-fotoquímica regulada do fotossistema II (Y(NPQ)) e iii) Rendimento quântico da perda de energia não-fotoquímica não regulada do fotossistema II (Y(NO)). As respostas das macroalgas verdes aos experimentos de exposição aos herbicidas, isolados e/ou em mistura, mostraram-se espécie-específicas, entretanto, de modo geral, foram registrados poucos efeitos negativos de baixa intensidade mesmo nos tratamentos com misturas dos herbicidas nas mais altas concentrações. Isso sugere ajustes fisiológicos devido à superexposição crônica a ambientes degradados por atividades humanas, enquanto destaca a necessidade de mais estudos experimentais para avaliar o desenvolvimento de resistência e os potenciais impactos na diversidade aquática.

Palavras-chave: Ambientes lóticos; Agrotóxicos; Ecotoxicologia; Ecossistemas aquáticos continentais

## ABSTRACT

In Brazil, the growing use of pesticides is evident, especially in conventional agriculture, where the industry has found a promising market. This increase generates significant impacts on the environment, affecting communities of organisms, such as those in aquatic ecosystems near areas of intensive farming. An example of a non-target organism that may suffer relevant physiological impacts due to exposure to pesticide residues is benthic stream algae, including macroalgae, which are significant primary producers in these aquatic ecosystems. In this context, four species of stream macroalgae, were subjected to experimental scenarios in which algal samples were exposed to three concentrations (0.28; 3.5; and 6 mg L<sup>-1</sup>) of a glyphosate-based herbicide (Roundup® commercial formulation), three concentrations (0.30; 2; and 10 mg L<sup>-1</sup>) of a 2,4-D-based herbicide (Bratt® commercial formulation), and mixtures of these two herbicides (0.28 mg L<sup>-1</sup> glyphosate + 0.30 mg L<sup>-1</sup> 2,4-D; 3.5 + 2; and 6 + 10). After exposure, macroalgae were evaluated for their photosynthetic responses using the chlorophyll a fluorescence technique, employing the following parameters: i) Effective quantum yield of photosystem II (YII); ii) Quantum yield of non-photochemical energy loss regulated by photosystem II (Y(NPQ)); and iii) Quantum yield of non-photochemical energy loss not regulated by photosystem II (Y(NO)). The responses of green macroalgae to exposure experiments to herbicides, either isolated or in mixture, were species-specific; however, overall, few low-intensity negative effects were recorded even in treatments with mixtures of herbicides at the highest concentrations. This suggests potential physiological adjustments due to chronic overexposure to anthropogenically degraded environments, expanding understanding of environmental scenarios from herbicide exposure on non-target organisms, while highlighting the need for further experimental studies to assess resistance development and potential impacts on aquatic diversity.

Keywords: Lotic environments; Pesticides; Ecotoxicology; Continental aquatic ecosystems

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>9</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>14</b>
<b>CAPÍTULO 1: .....</b>	<b>17</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>17</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>17</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>22</b>
<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>30</b>
<b>TABELAS E FIGURAS .....</b>	<b>34</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

Nas últimas décadas, a produção agrícola, especialmente aquela relacionada ao mercado de grãos, tem aumentado exponencialmente dada a necessidade de recursos para suportar o crescimento da população humana e de animais de criação destinados à alimentação humana. O boletim referente à 12ª pesquisa de campo realizada pela Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2023), no final de agosto de 2023, revelou que o Brasil colheu uma safra recorde de grãos, com a produção estimada em 322,8 milhões de toneladas no ano, o que consolida o país como o segundo maior exportador mundial de produtos agrícolas. Esta produção agrícola extraordinária induz, entretanto, um massivo uso de pesticidas por parte dos produtores agrícolas brasileiros, tornando o país como o quinto maior consumidor deste tipo de substância no mundo, com cerca de 20% do uso global (Oliveira, 2022).

É importante destacar que a produção de soja representa a maior parcela do enorme mercado da produção agrícola brasileira (ca. de 154,6 milhões de toneladas – CONAB, 2023), pois esta cultura é utilizada com diversos propósitos, desde a produção de óleo vegetal, consumo em natura ou ainda de forma processada, passando sua utilização na produção de biocombustível até seu uso como matéria prima na indústria alimentícia (p.ex., produção de bebidas alternativas aos leites de origem animal, sucos, emulsificantes etc.). Além do relevante papel na indústria alimentícia, a soja é matéria prima na indústria de beleza, farmacêutica e veterinária, estando na linha de produção de diversos produtos (Lima Filho, 2020).

Especificamente para o cultivo da soja, há diversas moléculas legalmente registradas nos órgãos de controle e fiscalização do Brasil (p.ex., Ministério da Agricultura e Pecuária e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária) que são utilizadas como pesticidas para o controle de outros organismos que podem ocorrer em meio à produção comercial (Cosmann & Drunkler, 2012). A título de exemplo, o consumo de pesticidas na cultura de soja é, em média, de 17,7 litros por hectare (Pignati, 2017). As moléculas que compõem os ingredientes ativos de cada agrotóxico definem, em última análise, o mecanismo de ação dentro de organismos e, portanto, a recomendação de uso de cada um deles. Neste sentido, os herbicidas comerciais, por exemplo, são separados e classificados justamente pelos grupos químicos que formam os seus ingredientes ativos (Roman *et al.*, 2005). No caso dos herbicidas comerciais Roundup® e Bratt®, os princípios ativos são respectivamente, o glifosato e o 2,4-D, dois dos princípios ativos mais comercializados no Brasil e no mundo (Brasil, 2020). O glifosato é segundo a “Weed

*Science Society of America*”, um herbicida do grupo 9 que se caracteriza como um inibidor da enzima EPSPs, enquanto o 2,4-D é um herbicida do grupo 4 que atua como um mimetizador de auxinas (Roman *et al.*, 2005).

Tanto Roundup® como Bratt® têm sido amplamente utilizados em todo mundo, com especial destaque para aqueles à base de glifosato (Roundup®) que são, de fato, os mais comercializados tanto no Brasil como no mundo (Okada *et al.*, 2019, Brasil, 2020). Além do uso destes herbicidas isolados, uma prática que vem sendo amplamente utilizada é o uso destas substâncias em misturas, ou seja, em consorciação. A razão para a adoção deste tipo de manejo é que a mistura de herbicidas promete ser financeiramente vantajoso, além de diminuir os custos de produção e o tempo de aplicação e aumentar a eficácia no controle das plantas indesejáveis que eventualmente estão presentes nos campos de cultivo comercial (Sharma & Singh, 2001).

Entretanto, a despeito da forte correlação do uso de herbicidas com o aumento da produtividade agrícola, vários estudos têm reportado a existência de riscos ambientais associados ao uso excessivo destes compostos, que Portinho *et al.*, 2018 demonstra em seu estudo utilizando os herbicidas a base de glifosato e 2,4-D afetaram os ovos de zooplâncton, sendo que um dos mais graves que está diretamente relacionado com a detecção de resíduos de tais produtos em ambientes diferentes de onde foram aplicados, os chamados ambientes não-alvo, tais como os ecossistemas aquáticos continentais. A ocorrência de resíduos de herbicidas em ambientes não-alvo se dá porque estes compostos são facilmente transportados dos campos de cultivo para corpos d’água tanto pelo escoamento superficial provocado pelas chuvas que “lavam” os solos onde foram aplicados como pela dispersão pelo ar, conforme sugerido no esquema apresentado na Figura 1 (Moreira *et al.*, 2012; Moraes & Rossi, 2010; Garcia-Delgado *et al.*, 2018).

Nos ambientes aquáticos, os herbicidas passam a estar disponíveis, podendo, conseqüentemente, contaminar organismos não-alvo, ou seja, espécies que não estão vinculadas ao processo de manejo agrícola. Organismos não-alvo presentes em ambientes aquáticos que eventualmente são expostos a resíduos de herbicidas podem pertencer a diversos níveis tróficos, incluindo produtores primários, tais como as macro e microalgas e as macrófitas aquáticas, além dos consumidores, entre os quais, microcrustáceos, moluscos, insetos e peixes (Americo *et al.*, 2015; Ansley & Castellano, 2007; Lozano, 2020; Lozano *et al.*, 2018; Wingen *et al.*, 2023). O resultado da exposição eventual de organismo não-alvo a resíduos de herbicidas leva a diversas conseqüências, desde impactos de pequenas proporções até aqueles subletais e, em casos extremos, letais. Entre os efeitos sub-letais da exposição por produtores primários não-alvo aos resíduos de

herbicidas, como é o caso das macroalgas lólicas, estão aqueles associados ao processo fotossintético e, conseqüentemente, a produção de energia disponível para todo o sistema. Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar a relação entre a toxicidade produzida por substâncias químicas em ambientes naturais e os efeitos em organismos não-alvos, especialmente aqueles relacionados às suas funções biológicas. Através de testes físico-químicos é possível detectar e medir as concentrações dessas substâncias e o potencial risco ambiental, porém são necessários estudos específicos que demonstrem as alterações fisiológicas nos organismos. Dentre os estudos realizados, Santos (2021) demonstrou que a exposição de duas espécies de líquens, *Parmotrema tinctorio* e *Usnea barbata*, ao herbicida glifosato determinou expressivas alterações na vitalidade do par algal, na integridade dos pigmentos fotossintéticos e no metabolismo. Outras abordagens também foram utilizadas para comparar uma variedade de organismos não-alvo e avaliar diferentes a existência e a magnitude dos efeitos da exposição à resíduos de herbicidas. É o caso do trabalho realizado por Lozano (2020), cujo resultado confirmou a ocorrência de mudanças estruturais nas comunidades fitoplanctônicas e perifíticas de água doce quando expostas a herbicidas à base glifosato e 2,4-D.



(Fonte: Modificado de Portinho et al., 2018)

**Figura 1.** Esquema geral da dinâmica do agrotóxico no ambiente. Setas indicam os possíveis transportes do contaminante para a atmosfera e ambiente aquático.

Neste sentido, o Laboratório de Biologia Aquática, LABIA, da Faculdade de Ciências e Letras de Assis, UNESP/FCL-Assis, vem desenvolvendo, quase que

solitariamente, uma série de estudos pioneiros a fim de compreender os efeitos da exposição de macroalgas lóaticas e, organismos não-alvo de diferentes níveis tróficos (p.ex, macroalgas, fito e zooplâncton, insetos aquáticos e macrófitas aquáticas) e ecossistemas aquáticos (p.ex., lóaticos e lênticos).

Os estudos ecotoxicológicos no LABIA tiveram início com os experimentos realizados por Oliveira et al. (2016), que tiveram como foco a avaliação dos efeitos do glifosato de grau técnico, Roundup® e ácido aminometilfosfônico (AMPA) na taxa fotossintética líquida, na taxa de respiração no escuro e na concentração de clorofila a de *Nitella microcarpa* var. *wrightii*, uma alga verde encontrada em ecossistemas lóaticos de todo o mundo. O estudo testou três concentrações de glifosato de grau técnico e Roundup® (0,28, 3,5 e 6 mg L<sup>-1</sup>) e uma concentração de AMPA (0,03 mg L<sup>-1</sup>). O estudo concluiu que o glifosato, principalmente quando associado a uma formulação comercial contendo adjuvantes (como o caso do Roundup®), teve um forte efeito inibitório na taxa fotossintética líquida da espécie testada e que a magnitudes dos efeitos inibitórios foram influenciados tanto pela concentração do ingrediente ativo quanto pelo tempo de exposição. Em contraste, o tratamento com AMPA teve um efeito estimulador na taxa fotossintética líquida, possivelmente devido ao aumento da disponibilidade de fósforo proveniente do processo de degradação do herbicida. Os resultados destacaram ainda os potenciais riscos ecológicos apresentados pelos herbicidas à base de glifosato na distribuição espacial e temporal de *N. microcarpa* var. *wrightii*. Adicionalmente, Oliveira et al. (2021) avaliaram outras quatro espécies de macroalgas de riachos, *Nitella subglomerata*, *Desmidium grevillei*, *Oedogonium* sp. e *Spirogyra* sp., submetidas aos mesmos cenários experimentais do estudo realizado por Oliveira et al. (2016). Os resultados deste novo estudo reforçaram e ampliaram as conclusões anteriores, mostrando que o Roundup®, de fato, foi capaz de reduzir a concentração de clorofila a das espécies testadas e que tal redução foi mais pronunciada do que a observada quando as macroalgas estavam expostas ao glifosato de grau técnico. De acordo com esses resultados, os autores sugeriram que a presença de herbicidas à base de glifosato em riachos tropicais, mesmo em concentrações permitidas pela legislação brasileira, pode afetar significativamente a fotossíntese das comunidades de macroalgas dos riachos, representando, assim, um grande risco para a dinâmica estrutural e funcional desses ecossistemas como um todo. Uma consideração adicional relativa à este estudo foi que o grau de severidade dos efeitos da exposição aos herbicidas observados nas diferentes espécies de macroalgas testadas variou de modo espécie-específico, ressaltando a importância de considerar as

especificidades de cada organismo ao avaliar os impactos dessas substâncias nos ecossistemas aquáticos.

Em um outro conjunto de experimentos, Vilas Boas *et al.* (2022) e Vilas Boas *et al.* (no prelo), buscaram avaliar as respostas fotossintéticas de duas espécies de macroalgas lóticicas, *Nitella microcarpa* var. *wrightii* e *Oedogonium* sp., após exposição ao herbicida tebuthiuron em cenários futuros de aumento de temperatura projetados pelo Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC). Considerando a espécie *N. microcarpa* var. *wrightii* (Vilas Boas *et al.*, 2022), os experimentos revelaram que a exposição ao herbicida tebuthiuron em cenários de aumento de temperatura relacionados às mudanças climáticas produziu efeitos sinérgicos, ou seja, os efeitos negativos sobre a resposta fotossintética desta espécie foram mais acentuados do que quando a macroalga foi exposta aos estressores individualmente, evidenciando a complexidade dos impactos dos multiestressores ambientais na fotossíntese das macroalgas lóticicas. Já para *Oedogonium* sp., a exposição ao herbicida tebuthiuron e cenários de aumentos de temperatura relacionado às mudanças climáticas resultou em uma redução na taxa de fotossíntese líquida (NPR) dessa espécie, porém apenas nos tratamentos com a exposição aos estressores individualmente, sem o registro de interação entre eles.

Finalmente, é importante destacar os resultados obtidos por Oliveira (2018) em uma investigação que avaliou o impacto da exposição aos herbicidas glifosato e 2,4-D nas respostas fotossintéticas de quatro espécies de macroalgas verdes. Neste estudo, pela primeira vez, os resultados experimentais não foram conclusivos, pois parte das espécies investigadas (*N. subglomerata* e *Oedogonium* sp.) foi indiferente à presença dos herbicidas, mesmo em mistura, de modo que não resultaram em variação na produtividade, enquanto a outra parte (*Desmidiium greville* e *Spirogyra* sp.), embora demonstrando sinais de estresse fisiológico e, eventualmente uma redução na produtividade primária no início dos experimentos, registrou o aumento no rendimento quântico efetivo ao final do tempo de exposição (após 7 dias). No final das contas, o autor indica, categoricamente, que os resultados experimentais não permitem afirmar que estas macroalgas expostas às formulações comerciais de glifosato e 2,4-D estejam sofrendo inibições na fotossíntese. Diga-se, aliás, que foi justamente a incerteza na interpretação destes resultados que motivou a realização da presente dissertação.

Assim, dando continuidade aos trabalhos já realizados, o presente estudo foi proposto com o objetivo de identificar e, se possível, mensurar os impactos da exposição às combinações de herbicidas, especificamente Roundup® e Bratt, sobre as respostas fotossintéticas, avaliadas através de parâmetros da fluorescência da clorofila a (i.e.,

rendimento quântico efetivo do PSII(Y(II)), dissipação de calor pelo centro de reação do PSII (Y(NO)) e dissipação de calor no complexo antena do PSII (Y(NPQ)), de quatro espécies de macroalgas de riachos pertencentes ao Filo Chlorophyta, *Aegagropilopsis clavuligera*, *Arnoldiella emedii*, *Nitella microcarpa* var. *wrightii* e *Oedogonium* sp.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Américo, J.H.P., Manoel, L.O. Torres, N.H. & Ferreira, L.F.R. 2015. O uso de agrotóxicos e os impactos nos ecossistemas aquáticos. *Revista Científica ANAP Brasil* 8: 1-15.
- Ansley, R.J. & Castellano, M.J. 2007. Effects of summer fire on woody, succulent, and graminoid vegetation in southern mixed-prairie ecosystems: a review. *Texas Agricultural Experiment Station, USA*. p. 63-70.
- Brasil. Ministério do Meio Ambiente. IBAMA. 2020. Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos. Brasília: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais.
- Companhia Nacional de Abastecimento. 2023. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. CONAB, Brasília, DF, safra 2022/23.
- Cosmann, N.J. & Drunkler, D.A. 2012. Agrotóxico utilizados nas culturas de milho e soja em Cascavel-PR. *Revista Eletrônica Científica Inovação e Tecnologia* 2: 15- 32.
- Garcia-Delgado, C., Barba, V., Marín-Benito, J.M., Igual, J.M., Sánchez-Martín, M.J. & Rodriguez-Cruz, M.S. 2018. Simultaneous application of two herbicides and green compost in a field experiment: Implications on soil microbial community. *Applied Soil Ecology* 127: 30-40.
- Lima Filho, R.R. 2020. Excelente resultado do milho e da soja na safra 2020/2021. *Revista Agroanalysis, Mercado & Negócios* 40: 20-21.
- Lozano, V.L., Vinocur, A.L., Sabio Y Garcia, C.A., Allende, L., Cristos, D.S., Rojas, D., Wolansky, M.J. & Pizarro, H. 2018. Effects of glyphosate and 2,4-D mixture on freshwater phytoplankton and periphyton communities: a microcosms approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 148: 1010-1019.
- Lozano, V.L. 2020. Estudio del impacto de la mezcla de los herbicidas glifosato y 2,4-D sobre comunidades microscópicas de agua Dulce y la calidad del agua: aproximación ecotoxicológica em microcosmos y mesocosmos al aire libre. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Buenos Aires. 204p.
- Moraes, P.V. & Rossi, P. 2010. Comportamento ambiental do glifosato. *Scientia Agraria Paranaensis*. 9: 22-35.
- Moreira, J.C., Peres, F., Simões, A.C., Pignati, W.A., Dores, E.C., Vieira, S.N., Strüssmann, C. & Mott, T. 2012. Contaminação de águas superficiais e de chuva por

agrotóxicos em uma região do estado do Mato Grosso. *Ciência & Saúde Coletiva* 17: 1557-1568.

Okada, E., Coggan, T., Anumol, T., Clarke, B., & Allinson, G. 2019. A simple and rapid direct injection method for the determination of glyphosate and AMPA in environmental water samples. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 411: 715-724.

Oliveira, R. de C., Vilas Boas, L.K. & Branco, C.C.Z. 2016. Assessment of the potential toxicity of glyphosate-based herbicides on the photosynthesis of *Nitella microcarpa* var. *wrightii* (Charophyceae). *Phycologia* 55: 577-584.

Oliveira, R. de C. 2018. Respostas fotossintéticas de macroalgas lólicas do filo chlorophyta submetidas à herbicidas à base de glifosato. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) Universidade Estadual Paulista-UNESP, Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Rio Claro. 124p.

Oliveira, R. de C., Vilas Boas, L.K. & Branco, C.C.Z. 2021. Effect of herbicides based on glyphosate on the photosynthesis of green macroalgae in lotic environments. *Fundamental and Applied Limnology* 195: 85-93.

Oliveira, M.E. de L. 2022. Estudo da atividade fotocatalítica do ZnO através da degradação do herbicida 2, 4-D e avaliação toxicológica utilizando *Artêmia franciscana*.

Pignati, W. A., Lima, F.A.N.D.S., Lara, S.S.D., Correa, M.L.M., Barbosa, J.R., Leão, L.H.D.C., & Pignati, M.G. 2017. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. *Ciência & Saúde Coletiva*, 22: 3281-3293.

Portinho, J.L., Nielsen, D.L., Daré, L., Henry, R., Oliveira, R.C. & Branco, C.C.Z. 2018. Mixture of commercial herbicides based on 2,4-D and glyphosate mixture can suppress the emergence of zooplankton from sediments. *Chemosphere* 203: 151- 159.

Roman, E.S., Vargas, L., Rizzardi, M.A., Hall, L., Beckie, H. & Wolf, T.M. 2005. Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação. Gráfica Editora Berthier. Passo Fundo, Brasil. 152p.

Santos, A.M. 2021. Impacto do herbicida glifosato e do metal pesado cádmio sobre a vitalidade e fisiologia dos líquens *Parmotrema tinctorum* (Nyl.) Hale e *Usnea barbata* (L.) FH Wigg. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Conservação) - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Conservação, Rio Verde. 38p.

Sharma, S.D. & Singh, M. 2001. Environmental factors affecting absorption and bio-efficacy of glyphosate in Florida beggarweed (*Desmodium tortuosum*). *Crop Protection* 20: 511–516.

Vilas Boas, L.K. & Branco, C.C.Z. 2022. Effect of tebuthiuron and temperature increase related to climate change on the photosynthesis of *Nitella microcarpa* var. *wrightii* (Charophyceae). *Journal of applied Phycology* 34: 1721-1729.

Wingen, N.M.A., Cubas, G.K. & Oliveira, G.T. 2023. Impact of 2,4-D and glyphosate-based herbicides on morphofunctional and biochemical markers in *Scinax squaleirostris* tadpoles (Anura, Hylidae). *Chemosphere* 340: 1-11.

**Capítulo 1:** Exposição experimental de macroalgas verdes de ecossistemas lóticos à herbicidas à base de glifosato e 2,4-D, isolados e em combinação: ausência de efeitos negativos sugere aquisição de resistência por exposição prévia.

## RESUMO

A literatura tem descrito que os resíduos de agrotóxicos que atingem rios, riachos e lagos por lixiviação provocado pela água da chuva e/ou dispersão em nuvem pelo vento podem produzir efeitos imprevisíveis, principalmente nos produtores primários desses ambientes, como as macroalgas de riachos. Neste contexto, quatro espécies de macroalgas de riachos pertencentes ao Filo Chlorophyta, *Aegagropilopsis clavuligera*, *Arnoldiella emedii*, *Nitella microcarpa* var. *wrightii* e *Oedogonium* sp., foram submetidas a experimentos nos quais amostras foram expostas a três concentrações (0,28; 3,5 e 6 mg [i.a.].L-1) de um herbicida à base de glifosato (formulação comercial Roundup®), a três concentrações (0,30; 2 e 10 mg [i.a.].L-1) de um herbicida à base de 2,4-D (formulação comercial Bratt®), e à misturas destes dois herbicidas. Após a exposição, as respostas fotossintéticas obtidas a exposição aos herbicidas demonstraram resultados variados entre as espécies de macroalgas analisadas. Para *Aegagropilopsis clavuligera*, todos os parâmetros (Y(II), Y(NPQ), Y(NO)) mostraram diferenças significativas: Y(II) foi maior em misturas de Roundup® e Bratt®, indicando maior rendimento fotossintético; Y(NPQ) e Y(NO) foram superiores em tratamentos com Roundup®, indicando maior estresse fisiológico. *Arnoldiella emedii* apresentou diferenças significativas em Y(NPQ) e Y(NO), com maiores valores de Y(NPQ) no grupo controle e menores valores de Y(NO) em tratamentos com Bratt®. *Nitella microcarpa* var. *wrightii* mostrou diferença apenas em Y(NPQ), com valores maiores para Roundup® em 6 mg/L. Por fim, *Oedogonium* sp. não exibiu variações significativas em nenhum dos parâmetros avaliados. Com base nos resultados do estudo sobre o efeito da exposição aos herbicidas concluímos que as respostas fotossintéticas variaram de acordo com a espécie, foram observados poucos efeitos negativos, mesmo nas concentrações mais altas das misturas de herbicidas.

Palavras-chave: Ambientes lóticos; Agrotóxicos; Ecotoxicologia; Ecossistemas aquáticos continentais

## ABSTRACT

The literature reports that pesticide residues reaching water bodies through leaching by rain or dispersion by wind can cause unpredictable effects, especially on primary producers in these environments, such as stream macroalgae. This study evaluated the effects of a glyphosate-based herbicide (Roundup®) and a 2,4-D-based herbicide (Bratt®) on four species of stream macroalgae from the Chlorophyta Phylum: *Aegagropilopsis clavuligera*, *Arnoldiella emedii*, *Nitella microcarpa* var. *wrightii*, and *Oedogonium* sp. Samples were exposed to three concentrations of each herbicide and to binary combinations of the concentrations. Photosynthetic responses varied among species. For *Aegagropilopsis clavuligera*, all photosynthetic parameters (Y(II), Y(NPQ), Y(NO)) showed significant differences, with higher photosynthetic yield in herbicide mixtures and greater physiological stress with Roundup®. *Arnoldiella emedii* had significant differences in Y(NPQ) and Y(NO), with higher Y(NPQ) in the control group and lower Y(NO) with Bratt®. *Nitella microcarpa* var. *wrightii* showed an increase in Y(NPQ) with Roundup® at 6 mg/L. *Oedogonium* sp. showed no significant variations in any parameter. It is concluded that photosynthetic responses varied according to species, with few negative effects observed even at the highest herbicide mixture concentrations.

Keywords: Lotic environments; Pesticides; Ecotoxicology; Continental aquatic ecosystems

## INTRODUÇÃO

A utilização exacerbada de produtos químicos (i.e., agrotóxicos) relacionados com o manejo da produção agrícola associada ao surgimento de plantas competidoras das culturas de interesse comercial (i.e., as chamadas “plantas daninhas”) resistentes a diversos destes produtos, produziu uma alteração importante nas estratégias de administração dos chamados defensivos agrícolas no mundo. Neste sentido, um ajuste na prática da aplicação dos agrotóxicos muito utilizados também no Brasil foi a aplicação consorciada de mais de um princípio ativo em conjunto, em diferentes momentos ou até mesmo durante o mesmo tempo de aplicação, dependendo da cultura agrônômica de interesse e das substâncias empregadas (Albrecht *et al.*, 2021). A adoção do uso conjunto de agrotóxicos, de forma concomitante ou não, contribuiu, assim, para o aumento do já enorme consumo destas substâncias no Brasil, grande parte associado aos sistemas de produção agrícola convencionais que utilizam tais substâncias para o controle de pragas e doenças que atingem as culturas (Terra & Pelaez, 2009; Soares & Porto, 2012; Salomão *et al.*, 2020).

Do ponto de vista ambiental, a questão central do uso excessivo e indiscriminado de agrotóxicos é que diversos estudos têm demonstrado que resíduos destas substâncias podem derivar (por vários meios, como por exemplo, a lixiviação após chuvas ou mesmo as névoas resultantes da aplicação) e, ao atingir outras regiões, produzir efeitos nocivos em ambientes que não foram alvo da aplicação, tais como rios e riachos, lagos e áreas de vegetação nativa (Sousa *et al.*, 2021; Zhiping *et al.*, 2021; Roth *et al.*, 2022; Banace, 2022; Duque *et al.*, 2020; Lopes & Albuquerque, 2018). Neste contexto, organismos não-alvo, ou seja, aqueles que habitam ambientes atingidos por resíduos de agrotóxicos derivados acidentalmente de campos de cultivo, especialmente os produtores primários, passam a estar susceptíveis aos efeitos da exposição a estas substâncias que, por princípio, são utilizadas para afetar o metabolismo “vegetal”. Em riachos, um dos principais produtores primários são as macroalgas (Branco *et al.*, 2017). Além de relevante papel na produção primária, as macroalgas de riachos também influenciam a dinâmica dos ambientes onde vegetam, modulando o fluxo da água, estabilizando os sedimentos e servindo como refúgio para outras espécies (Ferreira, 2023; Ferreira *et al.*, 2023; Vilas Boas & Branco, 2022).

Em macroalgas de riachos, os efeitos potenciais da exposição aos herbicidas, assim como os mecanismos de ação, tendem a ser semelhante daqueles relatados em plantas. Assim, herbicidas à base de glifosato agem, em plantas e em macroalgas de

riachos, inibindo a enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintase (EPSPS), responsável pela síntese de aminoácidos aromáticos (Oliveira *et al.*, 2016). Como resultado, a planta (ou a macroalga de riacho) não consegue produzir os aminoácidos necessários para a síntese de proteínas e outros compostos importantes, levando à morte do indivíduo. Já para os herbicidas cujo princípio ativo é o 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), o efeito sobre produtores primários ocorre dado que estes são mimetizadores de auxinas (AIA) (Roman *et al.*, 2005). Herbicidas mimetizadores de AIA, em última análise, desregulam de tal forma o crescimento dos indivíduos que os leva à morte pelo esgotamento de suas reservas energéticas (Roman *et al.*, 2005).

Considerando que a prática da aplicação conjunta de herbicidas à base de glifosato e à base de 2,4-D tem sido uma estratégia de manejo recorrente na agricultura mundial (Lozano *et al.*, 2018), o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da exposição conjunta de herbicidas com composição baseada nestes princípios ativos (Roundup® e Bratt®, respectivamente), sobre as respostas fotossintéticas de quatro espécies de macroalgas de riachos pertencentes ao Filo Chlorophyta.

Os parâmetros utilizados foram às suas respostas fotossintéticas através da técnica da fluorescência da clorofila a, utilizando os seguintes parâmetros: i) Rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Y(II)); ii) Rendimento quântico da perda de energia não-fotoquímica regulada do fotossistema II (Y(NPQ)) e iii) Rendimento quântico da perda de energia não-fotoquímica não regulada do fotossistema II (Y(NO)). O Rendimento quântico efetivo do fotossistema II, que indica a eficiência fotossintética do aparato, em uma situação em que em uma condição normal, sem presença de estresse, ele estará mais alto em correlação aos outros, pois a planta estará em seu estado regular. Já nos casos de rendimento quântico da perda de energia não-fotoquímica regulada do fotossistema II e rendimento quântico da perda de energia não-fotoquímica não regulada do fotossistema II, que indicam o estresse que o organismo está sofrendo, em situações normais estarão com números baixos, sendo que a perda regulada, que indica uma alteração no ambiente onde se encontra o organismo mas ainda não o afetará, estará com valores mais altos que a perda não regulada, que indica a desregulação completa do organismo fotossintetizante.

Com base em trabalhos já realizados (p.ex. Oliveira *et al.*, 2016; 2021; Vilas Boas *et al.*, 2022, Lozano *et al.*, 2018), foram estabelecidas as seguintes hipóteses principais para o presente estudo foram i) os efeitos da exposição sobre as respostas fotossintéticas da macroalgas devem ser diferentes para os herbicidas isoladamente e também devem ser dose-dependentes por conta das diferentes naturezas dos dois princípios ativos (ao menos

até um limite máximo de tolerância); ii) a exposição consorciada dos herbicidas devem apresentar efeitos negativos aditivos sobre as respostas fotossintéticas das macroalgas e iii) os efeitos dos herbicidas sobre as macroalgas devem ser espécie- específicos, dada as diferenças nas naturezas biológicas e ecológicas das espécies testadas.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### Coleta e preparação dos espécimes

Para este experimento, os espécimes de quatro espécies de macroalgas de riachos pertencentes ao Filo Chlorophyta, *Aegagropilopsis clavuligera* (Grunow) Boedeker, *Arnoldiella emedii* (Peres & Branco) Peres & Auricchio, *Nitella microcarpa* var. *wrightii* Groves & Groves e *Oedogonium* sp., foram coletados em riachos de pequeno porte localizados na região sudeste do Brasil. Após a coleta, os espécimes foram colocados em um recipiente contendo água do próprio riacho, e levados “in vivo” para o laboratório, onde foi procedida a limpeza, pesagem e, posteriormente, o procedimento experimental.

No processo de limpeza, onde foram removidos sedimentos e organismos epifíticos, foi utilizado um microscópio estereoscópico, pincel de cerdas duras e jatos de água destilada. Após a limpeza, e seguindo os procedimentos descritos por Oliveira *et al.* (2016), as amostras foram transferidas para frascos erlenmeyer de 150 ml contendo 100 ml de meio basal de Bold (BBM) (Watanabe, 2005) e aclimatadas nas condições experimentais. Em seguida, os espécimes algais foram mantidos em incubadoras B.O.D. (Nova Ética, modelo 411 / FDP355) sob temperatura constante (20,0 °C + 0,5), irradiância constante (140  $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) e fotoperíodo 12h/12h (ciclo claro/escuro). Após um período de aclimação de 24 horas, as amostras foram acondicionadas em erlenmeyers com BBM com adição de ingrediente ativo de acordo com as concentrações nominais estabelecidas para cada tratamento, considerando exposições isoladas ao glifosato e ao 2,4-D e exposições conjuntas, glifosato e 2,4-D.

Com o objetivo de evitar o esgotamento de nutrientes e manter constantes as concentrações nominais dos princípios ativos de cada tratamento, durante os dias de exposição, os meios das amostras foram renovados no terceiro dia de exposição, seguindo as recomendações do guia de testes químicos 221 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE, 2006) e os procedimentos descritos por Oliveira *et al.* (2016). As amostras permaneceram nas condições de cultivo por um total de 7 dias, sendo as análises experimentais realizadas no 7º dia de exposição.

### Preparação de meios

Os herbicidas utilizados nos experimentos de avaliação dos efeitos sobre as espécies de macroalgas investigadas foram a formulação comercial Bratt® (i.a. 2,4-D) com 67% de equivalente ácido e 42,1% de coadjuvantes, a formulação comercial Roundup® (i.a. glifosato) com 36% de equivalente ácido e 68,4% de coadjuvantes, e uma mistura combinada de ambos os herbicidas. As concentrações de Bratt® (i.a. 2,4-D) e de Roundup® (i.a. glifosato), separadas ou em combinação, usadas no experimento de incubação são mostradas na Tabela 1. Além das concentrações experimentais contendo os herbicidas, também foram preparadas amostras sem a adição de herbicidas ao BBM, configurando assim o grupo controle. Todos os grupos experimentais e o grupo controle foram avaliados em quintuplicata.

As três concentrações de Roundup® utilizadas no experimento foram selecionadas, conforme encontradas na literatura com a ausência de novas publicações que abordem especificamente este tema por representarem: i) a concentração máxima para águas de classe III, segundo a resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente nº357/05 (0,28 mg de ingrediente ativo [ia].L<sup>-1</sup>). Este tratamento foi denominado de Tratamento T 0,28; ii) a concentração recomendada para o controle de pragas aquáticas e terrestres (3,5 mg ia.L<sup>-1</sup>) (Vera *et al.*, 2012; Giesy *et al.*, 2000). Este tratamento foi denominado de Tratamento T 3,5 e iii) a concentração próxima a maior já encontrada em ambientes aquáticos naturais (6,0 mg ia.L<sup>-1</sup>) (Edwards *et al.*, 1980). Este tratamento foi denominado de Tratamento T 6. Por sua vez, as três concentrações de Bratt® utilizadas foram selecionadas por representarem: i) a concentração máxima para águas de classe III, segundo a resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente nº357/05 (0,30 mg de ingrediente ativo [ia].L<sup>-1</sup>). Este tratamento foi denominado de Tratamento T 0,30; ii) a concentração recomendada para o controle de pragas aquáticas e terrestres (2 mg ia.L<sup>-1</sup>) (Giesy *et al.*, 2000). Este tratamento foi denominado de Tratamento T 2 e iii) a concentração próxima a maior já encontrada em ambientes aquáticos naturais (10 mg ia.L<sup>-1</sup>) (Edwards *et al.*, 1980). Este tratamento foi denominado de Tratamento T 10.

As combinações das concentrações dos cenários com as misturas binárias dos herbicidas se baseou no uso de: i) concentrações mais baixas que aquelas previstas pela recomendação de uso (i.e., M 0,28-0,28 = 0,30 mg ia.L<sup>-1</sup> de 2,4-D + 0,28 mg ia.L<sup>-1</sup> de glifosato); ii) concentrações recomendadas de uso (i.e., M 2-3,5 = 2 mg ia.L<sup>-1</sup> + 3,5 mg ia.L<sup>-1</sup>) e iii) as mais altas concentrações ambientais destes herbicidas reportadas na literatura (i.e., M 10-6 = 10 mg ia.L<sup>-1</sup> + 6 mg ia.L<sup>-1</sup>).

### Análises experimentais

As respostas fotossintéticas das macroalgas investigadas foram avaliadas através da técnica da fluorescência da clorofila *a* (Baker, 2008; Vilas Boas *et al.*, 2019). Tais análises foram realizadas com o auxílio de um fluorômetro Diving-PAM (Walz, Effeltrich, Alemanha) no sétimo dia de exposição aos tratamentos experimentais. No sétimo dia, então, após um período de 30 minutos de aclimação no escuro, as amostras foram posicionadas na fibra ótica do equipamento e através da função "*Induction Curve*" (Schreiber *et al.*, 1995), 12 pulsos de luz saturante ( $2.000 \mu\text{mol f\u00f3tons.m}^2. \text{s}^{-1}$ ) com duração de 0,8s foram aplicados em intervalos de 15s (Oliveira *et al.*, 2016). Com base nos dados produzidos por essas curvas, foram avaliados os seguintes parâmetros fotossintéticos de cada espécie submetida a cada tratamento (Klughammer & Schreiber, 2008; Oliveira *et al.*, 2016): i) rendimento quântico efetivo do fotossistema II ("Y(II)"); ii) rendimento quântico da perda de energia não fotoquímica regulada no fotossistema II ("Y(NPQ)") e iii) rendimento quântico de perda de energia não fotoquímica não regulada no fotossistema II ("Y(NO)").

### Análise dos dados

Todos os dados obtidos foram submetidos inicialmente à estatística descritiva. Inicialmente, os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk (Shapiro & Wilk, 1965) e, subsequentemente, os dados paramétricos foram analisados através de a Análise de variância de Scott-Knott, (Scott & Knott, 1974), e/ou ANOVA uma-via, sendo utilizado, quando o caso, o teste "Post-hoc de Tukey". Os testes estatísticos paramétricos foram realizados com o auxílio do pacote estatístico Statistica.

## **RESULTADOS**

Os resultados dos experimentos de exposição aos herbicidas estão descritos a seguir considerando as espécies individualmente e os parâmetros analíticos oriundos da técnica da fluorescência da clorofila *a*, quais sejam: i) rendimento quântico efetivo do PSII – Y(II); ii) dissipação de calor pelo centro de reação do PSII - Y(NO) e iii) dissipação de calor no complexo antena do PSII Y(NPQ). Importante destacar que, embora as diferenças entre tratamentos também tenham sido levadas em consideração, as avaliações foram todas baseadas na comparação dos valores obtidos nos tratamentos experimentais envolvendo a exposição aos herbicidas com os valores obtidos para o grupo controle. Em linhas gerais, portanto, valores de Y(II) de um dado tratamento superiores aos do grupo

controle indicam que a macroalga apresentou maior rendimento fotossintético do que o controle e, portanto, respondeu positivamente ao tratamento em questão, enquanto valores de  $Y(NO)$  e  $Y(NPQ)$  de um dado tratamento superiores ao grupo controle indicam que a macroalga apresentou maior nível de estresse fisiológico e, portanto, respondeu negativamente ao tratamento em questão. Considerando, então, esta lógica, para a espécie *Aegagropilopsis clavuligera*, todos os parâmetros avaliados,  $Y(II)$ ,  $Y(NPQ)$  e  $Y(NO)$ , registraram diferenças estatisticamente significativas quando comparados ao grupo controle (Tabela 2). Para o parâmetro  $Y(II)$  as diferenças foram encontradas entre o grupo controle e as misturas de Roundup® e Bratt® nas concentrações, respectivamente, de 0,28 e 0,30 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> e de 6 e 10 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>, com maiores valores reportados para as amostras algais expostas às misturas de herbicidas (Figura 1). Já para o parâmetro  $Y(NPQ)$ , os valores registrados para o grupo controle se mostraram estatisticamente diferentes dos valores registrados para os tratamentos com Roundup® com as concentrações de 3,5 e 6 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> e para as misturas com as combinações de Roundup® e Bratt® em todas as concentrações, ou seja, de 0,28 e 0,30 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>, 3,5 e 2 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> e 6 e 10 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> (Figura 1). No caso do parâmetro  $Y(NPQ)$ , os maiores valores foram registrados para os tratamentos de exposição aos herbicidas (Figura 1). Quanto ao parâmetro  $Y(NO)$ , as diferenças estatísticas encontradas entre os diferentes tratamentos e o grupo controle foram registradas para as amostras expostas ao herbicida Roundup® com concentrações de 3,5 e 6,0 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> e para as amostras expostas à mistura dos herbicidas com concentrações de 0,28 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> de Roundup® e 0,30 de Bratt®, sendo os maiores valores deste parâmetro registrados para as amostras do grupo controle (Figura 1). Outras diferenças estatisticamente significativas registradas envolvem os seguintes tratamentos: i) Roundup® com as concentrações de 6 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> e as concentrações de 0,30, 2 e 10 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> de Bratt® ( $p \leq 0,01$ ,  $p \leq 0,001$  e  $p \leq 0,001$ , respectivamente); ii) Roundup® com as concentrações de 3,5 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> e a concentração de 10 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> de Bratt® ( $p \leq 0,05$ ); iii) Roundup® com as concentrações de 3,5 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> e as concentrações de 0,30, 2 e 10 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> de Bratt® ( $p \leq 0,05$ ,  $p \leq 0,001$  e  $p \leq 0,001$ , respectivamente) e iv) Bratt® com as concentrações de 0,3, 2 e 10 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> e a mistura com concentrações de 0,28 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> de Roundup® e 0,3 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> de Bratt® ( $p \leq 0,001$  em todos os casos).

Já para a espécie *Arnoldiella emedii* foram registradas diferenças estatisticamente significativas para os parâmetros  $Y(NPQ)$  e  $Y(NO)$  (Tabela 2). Considerando o parâmetro  $Y(NPQ)$  as diferenças foram observadas entre o grupo controle e os tratamentos com exposição ao herbicida Bratt® com as concentrações de 2 e 10 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> (Figura 2).

Em adição, também foram registradas diferenças entre os seguintes tratamentos: i) Bratt® com as concentrações de 2 e 10 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> e mistura com concentrações de 0,28 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> de Roundup® e 0,3 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> de Bratt® ( $p \leq 0,01$  em ambos casos) e ii) Bratt® com as concentrações de 2 e 10 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> e Roundup® com a concentração de 3,5 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> ( $p \leq 0,01$  em ambos casos). Em rega, os maiores valores de Y(NPQ) foram registrados para o grupo controle (Figura 2). Para o parâmetro Y(NO), por sua vez, as diferenças significativas foram registradas apenas entre tratamentos de exposição aos herbicidas, sem diferenças significativas entre tratamentos com exposição e o grupo controle (Figura 2), com os menores valores, em geral, registrados para o tratamentos com exposição ao Bratt®, especialmente, nas concentrações 2 e 10 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> (Figura 2).

Considerando a espécie *Nitella microcarpa* var. *wrightii*, embora os parâmetros Y(II) e Y(NO) não tenham apresentado diferença estatística nos seus valores entre os tratamentos testados e o grupo controle, para o parâmetro Y(NPQ), observou-se diferenças estatisticamente significativas (Tabela 2). No geral, as amostras expostas ao herbicida Roundup® com concentração de 6 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> registraram valores maiores deste parâmetro do que o grupo controle (Figura 3). Adicionalmente, também foram registradas diferenças significativas entre os valores dos seguintes tratamentos (Figura 3): i) Roundup® com concentração de 6 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> e Bratt® com concentrações de 0,30 e 10 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> ( $p \leq 0,01$  e  $p \leq 0,001$ , respectivamente), ii) Roundup® com concentração de 6 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> e a mistura com concentrações de 6 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> de Roundup® e 10 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> de Bratt® ( $p \leq 0,001$ ) e iii) Roundup® com concentração de 6 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> e Roundup® com concentração de 0,28 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> ( $p \leq 0,05$ ).

Considerando, finalmente, os valores dos parâmetros fotossintéticos avaliados para a macroalga *Oedogonium* sp. quando submetidas aos tratamentos experimentais não registraram nenhuma variação estatisticamente significativa em relação ao grupo controle, nem positiva nem negativa (Tabela 2). Os valores de Y(II), Y(NO) e Y(NPQ) dos tratamentos e do grupo controle de *Oedogonium* sp. estão reportados na Figura 4.

## DISCUSSÃO

Os resultados dos experimentos envolvendo a exposição de quatro espécies de macroalgas verdes de ecossistemas lóticos a diferentes tratamentos com herbicidas a base de glifosato (Roundup®) e 2,4-D (Bratt®), isolados ou em mistura, sugerem, a despeito do caráter espécie-específico das respostas observadas, que, em regra, não houve efeitos

negativos significativos relevantes sobre os parâmetros fotossintéticos avaliados nestes organismos. Eventualmente, foram até registrados, de forma isolada, efeitos significativos de baixa intensidade, tanto positivos quanto negativos, porém as respostas fotossintéticas foram, no geral, similares entre o grupo controle, meio básico concentração de herbicidas, e os tratamentos, meio básico com concentração de herbicidas, inclusive aqueles que envolveram exposição à misturas de herbicidas nas maiores concentrações testadas. Estes resultados refutam as hipóteses iniciais do presente estudo e divergem da maioria dos estudos ecotoxicológicos similares que foram previamente realizados, segundo os quais, a exposição a herbicidas gerou potenciais impactos negativos sobre a fotossíntese de macroalgas lólicas (e.g., Oliveira *et al.*, 2016; 2021; Vilas Boas *et al.*, 2019; 2022). Uma notável exceção os trabalhos de Oliveira (2018) e Oliveira *et al.* (2021), nos quais foram realizados experimentos envolvendo a exposição de macroalgas lólicas à herbicidas, isoladamente ou em misturas, e foram registrados resultados que sugerem não ter havido inibição da fotossíntese e/ou, por outro lado, até, eventualmente, ter havido discreto ganho de eficiência fotossintética de algumas das espécies de macroalgas testadas.

No presente estudo, considerando os resultados experimentais das espécies individualmente, as macroalgas *Nitella microcarpa* var. *wrightii* e *Oedogonium* sp. registraram, basicamente, ausência de diferenças significativas entre os tratamentos de exposição aos herbicidas e o grupo controle para os parâmetros relacionados à fluorescência da clorofila *a* avaliados (Tabela 2). Em outras palavras, de modo geral, especificamente essas espécies de macroalgas se mantiveram convertendo, via fotossíntese, energia luminosa em energia química, dissipando energia passivamente sob a forma de calor e fluorescência e manejando um eventual dano fisiológico provocado pela exposição aos herbicidas com eficiências semelhantes em qualquer uma das condições experimentais às quais as amostras tenham sido submetidas. Oliveira *et al.* (2016), registram, em direção oposta aos resultados do presente estudo, impactos negativos da exposição a herbicidas à base de glifosato sobre a eficiência fotossintética de amostras de *Nitella microcarpa* var. *wrightii*, mesmo em concentrações dentro dos parâmetros da legislação ambiental brasileira. Por outro lado, os mesmos autores (Oliveira *et al.*, 2021) também revelaram que uma outra espécie de *Nitella*, *N. subglomerata*, não apenas não teve a eficiência fotossintética afetada negativamente pela exposição ao Roundup® como, adicionalmente, registrou ganho de eficiência fotossintética quando exposta ao princípio ativo deste herbicida comercial, no caso, glifosato grau-técnico. Estas divergências entre os dados de literatura e os dados do presente estudo mostram que, além das respostas fotossintéticas apresentarem uma clara

tendência de resposta espécie-específica, há também a possibilidade de as respostas algais envolverem tendências populacionais, tanto no espaço como no tempo. A sugestão relacionada a estas variações populacionais podem estar ligadas ao fato (ainda não investigado, diga-se) de que populações eventualmente submetidas à exposição crônica prévia a um agente xenobiótico (p.ex., algum herbicida), poderia, em tese, desenvolver resistência a este poluente. Considerando que os riachos de onde foram retiradas as amostras analisadas no presente estudo estão localizados nas vizinhanças de áreas rurais fortemente sujeitas ao manejo agrícola, é possível inferir que os resultados aqui apresentados possam, potencialmente, ter sido afetados por tais circunstâncias e, portanto, devem ser analisados com a cautela necessária.

No caso de *Oedogonium* sp., Oliveira *et al.* (2021) registraram, de forma semelhante ao presente estudo, uma tendência de leve aumento nos valores do parâmetro Y(II) quando amostras desta macroalga foram submetidas ao herbicida Roundup® em concentrações de 3,5 e 6 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>, indicando, portanto, que especificamente esta espécie de alga verde pode ser considerada como tendo, potencialmente, mecanismos de tolerância (e, eventualmente, até de ganhos de vantagem) à presença de herbicidas à base de glifosato no meio. Por outro lado, Vilas Boas & Branco (2024, no prelo) mostraram que esta mesma macroalga registrou redução de até 86% dos valores de Y(II) quando submetidas à diferentes concentrações de tebuthiuron, um herbicida da classe das uréias que atua inibindo o transporte de elétrons no fotossistema II (Magnusson *et al.*, 2010; Thomas *et al.*, 2020; Marzoni *et al.*, 2021). Neste sentido, as diferenças nas respostas fotossintéticas de *Oedogonium* sp. em função do tipo de herbicida, se à base de glifosato (como no caso do presente estudo) ou de tebuthiuron, podem ser explicadas pelas diferenças nos modos e mecanismos de ação destas diferentes classes de substâncias ecotoxicológicas (Oliveira Jr., 2011).

Com relação às espécies *Aegagropilopsis clavuligera* e *Arnoldiella emedii*, duas espécies de Cladophorales (Chlorophyta) de águas continentais, os resultados experimentais sugerem, senão a ocorrência de claros e concretos efeitos positivos sobre as respostas fotossintéticas (como no caso de *A. clavuligera*) sob condição de exposição aos herbicidas testados, ao menos efeitos indiferentes ou discretamente positivos (como no caso de *A. emedii*). Para *A. clavuligera*, houve registros de aumentos da eficiência fotossintética, sendo o parâmetro Y(II), sob exposição à duas das três misturas de Roundup® e Bratt® que foram testadas no presente estudo quando os dados foram comparados com os do grupo controle, indicando, com clareza, que a presença destes compostos favoreceu o rendimento quântico efetivo da espécie. Para *A. emedii*, por sua

vez, os resultados experimentais observados mostraram algumas diferenças estatisticamente significativas apenas nos valores do parâmetro  $Y(NPQ)$  para dois tratamentos de exposição ao herbicida à base de 2,4-D quando comparados aos valores do grupo. Entretanto, em ambos os casos, houve redução do  $Y(NPQ)$  o que, em última análise, indica diminuição na dissipação de energia de forma fisiologicamente regulada e, portanto, manejo eficiente de estresse fisiológico mesmo sob exposição ao herbicida. Adicionalmente, embora os valores de  $Y(II)$  para as amostras expostas ao 2,4-D não tenham sido estatisticamente diferentes do observado para o grupo controle, nominalmente, os valores dos tratamentos foram maiores do que o do grupo controle.

Tanto o cenário descrito para *A. clavuligera* como o descrito para *A. emedii* sugerem que estas macroalgas possuem um efetivo mecanismo fisiologicamente regulado para o gerenciamento de um eventual estresse provocado pela exposição aos agentes xenobióticos, que as permitem manter uma eficiente taxa de conversão de energia fotoquímica no fotossistema II associada a uma perda mínima de energia através da dissipação passiva (Klughammer & Ulrich Schreiber, 2008). Como este é o primeiro estudo ecotoxicológico/ecofisiológico desta natureza envolvendo algas pertencentes à ordem Cladophorales, no caso, *A. clavuligera* e *A. emedii*, recomenda-se que novos estudos sejam realizados para que se possa confirmar, ou não, a sugestão de que espécies desta classe de algas verdes sejam indiferentes e até, eventualmente, favorecidas pela presença de herbicidas à base de glifosato e 2,4-D no meio. Entretanto, já podemos adiantar que há documentação na literatura dando conta que o habitat típico das Cladophorales de águas continentais está, em regra, associado a ambientes aquáticos ricos em minerais, sais e nutrientes (especialmente o fósforo) dissolvidos na água e que é provável que o aumento da eutrofização ocorrido nas últimas décadas tenha favorecido uma maior ocorrência e distribuição do grupo (Peres & Branco, 2014). O fato de vegetar em habitats caracteristicamente associados a altas cargas de poluição orgânica e inorgânica de origem antrópica podem, por si só, propiciar o desenvolvimento de potenciais mecanismos intrínsecos protetivos contra efeitos fisiológicos de eventuais xenobióticos presentes no meio. Ou seja, não seria uma completa e infundada especulação se se aventasse a possibilidade destas algas, à semelhança do que ocorre com “plantas indesejadas” (popularmente conhecidas como “ervas daninhas”) em campos de cultivo sujeitos à intensa aplicação de herbicidas, adquirirem algum mecanismo de resistência fisiológica.

No caso das “ervas daninhas”, a aquisição de resistência fisiológica aos herbicidas pode ser influenciada por diversos mecanismos, entre os quais está o desenvolvimento de

resistência metabólica através da superexpressão de enzimas ou vias de desintoxicação que levam, em última análise, ao aumentando da capacidade de metabolizar o herbicida e, então, à desintoxicação do tecido vegetal (Gomes, 2014). Outros mecanismos de ajuste fisiológico, como a ativação de bomba de efluxo, também podem estar envolvidos, permitindo, assim, que as ervas daninhas eliminem o herbicida de suas células, reduzindo, ou eliminando, seu efeito sobre o metabolismo da “erva daninha” (Markus *et al.*, 2021). Adicionalmente, “ervas daninhas” submetidas à exposição intensa e contínua à herbicidas podem desenvolver mecanismos aprimorados de reparo de DNA, de modo que estas plantas tenham uma menor inibição do seu crescimento/desenvolvimento quando submetidas a tais substâncias (Souza, Ferreira, Maciel, 2018).

Um outro fator que também pode estar envolvido no desenvolvimento de resistência metabólicas de determinadas espécies algais à herbicidas se relaciona ao fato de populações algais que permanecem por longos períodos sob superexposição poderem, eventualmente, passar por um processo de seleção natural de genótipos resistentes e/ou de genótipos que sofreram modificações a partir da diversidade genética (e, conseqüentemente, metabólica) típica das populações nativas originais. A ideia aqui é que a superexposição crônica a herbicidas poderia determinar: i) a seleção do extremo populacional que abrigariam indivíduos que, por questões genéticas intrínsecas, seriam capazes de conviver com agentes xenobióticos sem sofrer impactos negativos significativos ou, então, ii) a produção de variantes genéticas pelo estabelecimento de mutações em genes que codificariam proteínas (i.e., enzimas) que seriam os alvos dos herbicidas. A produção de resistência por seleção de variantes genéticas por efeito da superexposição de populações tem sido largamente descrita para “ervas daninhas” em campos de cultivo agrônômico de interesse comercial (p.ex., Kumar *et al.*, 2019, Beckie, 2020, Gaines *et al.*, 2020, Tranel, 2021). Gaines *et al.* (2020), por exemplo, afirmam que o uso em larga escala dos herbicidas sintéticos nos últimos 70 anos levou à evolução de resistência em centenas de espécies de “ervas daninhas”, de modo que mecanismos de resistência no local-alvo (TSR) e de resistência no local não-alvo (NTSR) foram desenvolvidos para a maioria das classes de herbicidas. Segundo estes autores, a resistência do tipo TSR envolve mutações em genes que codificam os alvos proteicos dos herbicidas, afetando a ligação do herbicida aos sítios catalíticos onde regularmente atua, enquanto mecanismos de resistência do tipo NTSR incluem redução da absorção ou translocação do herbicida ou, então, o aumento de sua degradação metabólica.

Considerando os herbicidas à base de glifosato especificamente, as “ervas daninhas” resistentes a estes herbicidas incluem não apenas mutações no local-alvo do

herbicida, tipicamente a enzima EPSPS, mas também mecanismos em locais não-alvo, como redução da absorção e/ou da translocação do glifosato dentro da planta, potencializando, assim, o metabolismo para desintoxicação, o que evita (ou, ao menos, diminui significativamente) seus efeitos negativos (Christoffoleti & López-Ovejero, 2003). A literatura específica tem descrito com frequência que a pressão de seleção resultante do uso contínuo e exclusivo do glifosato nas práticas de manejo de “ervas daninhas” pode, seguramente, acelerar o desenvolvimento de biótipos resistentes.

Por sua vez, a resistência aos herbicidas à base de 2,4-D inclui diversos mecanismos, abrangendo desde o aumento da absorção do 2,4-D até a redução da translocação e o aumento da degradação metabólica desta classe de herbicidas. Adicionalmente, a ligação diferencial a proteínas de ligação a auxina também desempenha um papel crucial nesse processo (Kumar *et al.*, 2019). Um exemplo tangível da evolução da resistência ao 2,4-D é observado no rabanete selvagem, onde a redução do transporte do herbicida foi identificada como o fator determinante da resistência (Goggin *et al.*, 2016).

Dado que o processo de fotossíntese é fundamentalmente semelhante em todas as Primoplantae, não seria incomum conjecturar que, após um período de superexposição crônica, organismos aquáticos fotoautotróficos não-alvo também possam eventualmente desenvolver mecanismos semelhantes de resistência aos herbicidas sob os quais tais organismos estejam recorrentemente superexpostos. Em outras palavras, a compreensão de que a fotossíntese constitui um processo bioquímico essencialmente único e compartilhado por uma ampla variedade de espécies de produtores primários, sugere a possibilidade de que mecanismos semelhantes de adaptação e resistência possam se desenvolver em organismos que não são diretamente alvo da aplicação desses produtos químicos. Essa hipótese levanta questões pertinentes sobre os potenciais efeitos colaterais do uso indiscriminado de herbicidas e destaca a importância de uma análise abrangente da segurança e dos potenciais impactos de tais substâncias no contexto da preservação ambiental e da manutenção da biodiversidade (Rehan *et al.*, 2014), bem como a necessidade de novos estudos especificamente desenhados para avaliar o desenvolvimento de resistência em algas lóxicas e, se constatada, dos quais mecanismos fisiológicos envolvidos e seu eventual potencial impacto sobre a diversidade aquática.

## CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no estudo sobre o efeito da exposição aos herbicidas glifosato e 2,4-D em macroalgas de riachos, podemos concluir que as respostas fotossintéticas das macroalgas testadas no presente estudo variaram de acordo com a espécie, mas de maneira geral, foram observados poucos efeitos negativos, mesmo nas concentrações mais altas das misturas de herbicidas. Isso pode, eventualmente, estar relacionado ao desenvolvimento de ajustes fisiológicos desenvolvidos em populações de macroalgas submetidas à superexposição crônica em ambientes degradados pela ação antrópica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Albrecht, L.P., Albrecht, A.J.P., Silva, A.F.M., Barroso, A.A.M. & Murata, T. 2021. Manejo de organismos geneticamente modificados tolerantes a herbicidas. *Matologia: estudos sobre plantas daninhas*. 506-547.
- Baker, N.R. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review Plant Biology* 59: 89-113.
- Banaee, M. 2022. Toxicological interaction effects of herbicides and the environmental pollutants on aquatic organisms. *New Insights in Herbicide Sciences* 1-16.
- Beckie, H. J. 2020. Herbicide resistance in plants. *Plants* 9: 435.
- Branco, C.C.Z., Riolfi, T.A., Crulhas, B.P., Tonetto, A.F., Bautista, A.I.N. & Necchi Jr., O. 2017. Tropical lotic primary producers: Who has the most efficient photosynthesis in low-order stream ecosystems? *Freshwater Biology* 62: 1623-1636.
- Christoffoleti, P.J. & López-Ovejero R. 2003. "Principais aspectos da resistência de plantas daninhas ao herbicida glyphosate." *Planta daninha* 21: 507-515.
- Duque, T.S., Maciel, J.C., Santos, J.B., Ferreira, E.A. & Souza, J. B. 2020. Uso de bioindicadoras vegetais para identificação de resíduos de herbicidas no solo. *Research, Society and Development* 9: 1-32.
- Edwards, W.M., Triplett, G.B. & Kramer, R.M. 1980. A watershed study of glyphosate transport in runoff. *Journal Environmental Quality* 9: 661-665.
- Ferreira, E.A.S. 2023. Levantamento florístico de macroalgas dos riachos da bacia do Paraná 3. Graduação (Bacharel em Ciências Biológicas - Ecologia e Biodiversidade) - Universidade Federal da Integração Latino- Americana.
- Ferreira, L.A.I., Oliveira Jr., R.S., Constantin, J. & Brunharo, C. 2023. Evolution of ACCaseinhibitor resistance in *Chloris virgata* is conferred by a Trp2027Cys mutation in the herbicide target site. *Pest Management Science* 79: 1-10.

- Gaines, T.A., Duke, S.O., Morran, S., Rigon, C.A., Tranel, P.J., Küpper, A., & Dayan, F.E. 2020. Mechanisms of evolved herbicide resistance. *Journal of Biological Chemistry* 295: 10307-10330.
- Giesy, J.P., Dobson, S. & Solomon, K.R. 2000. *Ecotoxicological risk assessment for Roundup® herbicide*. New York: Springer.
- Goggin, D.E., Cawthray, G.R.; Powles, S.B. 2016. 2, 4-D resistance in wild radish: reduced herbicide translocation via inhibition of cellular transport. *Journal of Experimental Botany* 67: 3223-3235.
- Gomes, G.L.G.C. 2014. Caracterização bioquímica e morfofisiológica de populações de Buva (*Conyza* spp.) resistentes ao glyphosate. Tese de Doutorado - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.
- Klughammer, C. & Schreiber, U. 2008. Complementary PS II quantum yields calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and the Saturation Pulse method. *PAM Application Notes* 1: 27-35.
- Kumar, V., Liu, R., Boyer, G., Stahlman, P.W. 2019. Confirmation of 2, 4-D resistance and Identification of multiple resistance in a Kansas Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*) population. *Pest Manag Science* 75: 2925-2933.
- Lopes, C.V.A. & Albuquerque, G.S.C. 2018. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. *Saúde Debate* 42: 518-534.
- Lozano, V.L., Vinocur, A.L., Sabio Y Garcia, C.A., Allende, L., Cristos, D.S., Rojas, D., Wolansky, M.J. & Pizarro, H. 2018. Effects of glyphosate and 2,4-D mixture on freshwater phytoplankton and periphyton communities: a microcosms approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 148: 1010- 1019.
- Magnusson, M., Heimann, K., Quayle, P., & Negri, A.P. 2010. Additive toxicity of herbicide mixtures and comparative sensitivity of tropical benthic microalgae. *Marine Pollution Bulletin* 60: 1978-1987.
- Markus, C., Barroso, A.A.M., Dalazen, G., Roncatto, E., & Júnior, A.M. 2021. Resistência de plantas daninhas aos herbicidas. *Matologia: Estudos sobre plantas daninhas*. Editora Fábrica da Palavra. 324-364.
- Marzonie, M., Flores, F., Sadoun, N., Thomas, M.C., Valada-Mennuni, A., Kaserzon, S., Mueller, J.F., Negri, A.P. 2021. Toxicity thresholds of nine herbicides to coral symbionts (Symbiodiniaceae). *Scientific Reports* 11: 21636.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2006. Test No. 221: *Lemna* sp. Growth Inhibition Test. Organization for Economic Co- operation and Development. OECD Publishing.
- Oliveira, R. de C. 2018. Respostas fotossintéticas de macroalgas lóxicas do filo chlorophyta submetidas à herbicidas à base de glifosato. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista - UNESP, Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

- Oliveira, R. de C., Vilas Boas, L.K., Branco, C.C.Z. 2021. Effect of herbicides based on glyphosate on the photosynthesis of green macroalgae in lotic environments. *Fundamental Applied Limnology* 195: 85-93.
- Oliveira, R. de C., Vilas Boas, L.K., Branco, C.C.Z. 2016. Assessment of the potential toxicity of glyphosate-based herbicides on the photosynthesis of *Nitella microcarpa* var. *wrightii* (Charophyceae). *Phycologia* 55: 577-584.
- Oliveira Jr, R.S. de. 2011. Mecanismos de Ação de Herbicidas. *Matologia* 7: 141-191.
- Peres, C.K. & Branco, C.C.Z.B. 2014. Algas verdes macroscópicas de ambientes lóticos do Sul do Brasil: taxonomia e aspectos ecológicos. *Novas Edições Acadêmicas*.
- Rehan, M., Kluge, M., Fränzle, S., Kellner, H., Ullrich, R., Hofrichter, M. 2014. Degradation of atrazine by *Frankia alni* ACN14a: gene regulation, dealkylation, and dechlorination. *Applied microbiology and biotechnology* 98: 6125-6135.
- Roman, E.S., Vargas, L., Rizzardi, M.A., Hall, L., Beckie, H., Wolf, T.M. 2005. Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação. Passo Fundo: Gráfica Editora Berthier. 152.
- Roth, S.K., Polazzo, F., García-Astillero, A., Cherta, L., Sobek, A., Rico, A. 2022. Multiple stressor effects of a heatwave and a herbicide on zooplankton communities: implications of global climate change. *Frontiers in Environmental Science*. 10: 920010.
- Schreiber, U., Bilger, W., Neubauer, C. 1995. Chlorophyll fluorescence as a non-intrusive indicator for rapid assessment of in vivo photosynthesis. In: Schulze, E.D.; Caldwell, M.M. (eds.). *Ecophysiology of photosynthesis*. Springer-Verlag. 1098: 49-70.
- Salomão, P.E.A., Ferro, A.M.S., Ruas, W.F. 2020. Herbicidas no Brasil: uma breve revisão. *Research, Society, Development* 9: 1-22.
- Scott, A.J. & Knott, M.A. 1974. A cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics* 30: 507-12.
- Shapiro, S.S. & Wilk, M.B. 1965. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). *Biometrika* 52: 591-611.
- Soares, W.L. & Porto, M.F. de S. 2012. Uso de agrotóxicos e impactos econômicos sobre a saúde. *Revista Saúde Pública* 46: 209-217.
- Sousa, T.M.M. da., Santos, L.K.O., Orssatto, C. dos S. 2021. Efeitos tóxicos causados pela exposição do herbicida glifosato. *Anais do Fórum Rondoniense de Pesquisa* 2: 1-5.
- Sousa, L.L., Ferreira, M.F. da S., Maciel, T.E.F. 2018. Marcadores moleculares baseados em sequenciamento de nova geração. *Tópicos Especiais em Genética e Melhoramento* II. 144.
- Terra, F.H.B. & Pelaez, V. 2009. A história da indústria de agrotóxicos no Brasil: das primeiras fábricas na década 1940 aos In: *Congresso da Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural* 47.

Thomas, M.C., Flores, F., Kaserzon, S., Reeks, T.A., Negri, A.P. 2020. Toxicity of the herbicides diuron, propazine, tebuthiuron, and haloxyfop to the diatom *Chaetoceros muelleri*. Scientific Reports 10: 19592

Tranel, P.J. 2021. Herbicide resistance in *Amaranthus tuberculatus*. Pest management science 77: 43-54.

Vera, M.S., Di Fiori, E., Lagomarsino, L., Sinistro, R., Scaray, R., Iummato, M.M., Juárez, A., Molina, M. del C.R. de, Tell, G., Pizarro, H. 2012. Direct and indirect effects of the glyphosate formulation Glifosato Atanor on freshwater microbial communities. Ecotoxicology 21: 18051816.

Vilas Boas, L.K. & Branco, C.C.Z. 2022. Effect of tebuthiuron and temperature increase related to climate change on the photosynthesis of *Nitella microcarpa* var. *wrightii* (Charophyceae). Journal of applied Phycology 34: 1721-1729.

Vilas Boas, L.K., Oliveira, R. de C., Necchi Jr., O., Branco, C.C.Z. 2019. Temperature effects on photosynthesis in gametophytic and sporophytic stages of the freshwater red alga *Sirodotia delicatula* (Rhodophyta, Batrachospermales) under a global warming perspective. Phycological Research 67: 39-44.

Watanabe, M.M. 2005. Freshwater Culture Media. In: Andersen, R.A. (ed.). Algal Culture Techniques. Elsevier. 13-20.

Zhiping, Z., Tingting, L., Shengie, Z., Fei, S., Wenwen, Z., Wenming, Y. & Wanzhen, X. 2021. Synthesis and characterization of sensitive molecular imprinting electrochemical sensor based on chitosan modified HPSNs-NH<sub>2</sub>@Au for detection of 2,4-D. School of Polymeric Materials, School of materials Science and Engineering, Jiangsu University. 16.

**Tabela 1.** Concentrações nominais de Bratt® (i.a. 2,4-D) e Roundup® (i.a. glifosato), e suas misturas, utilizadas nos experimentos de avaliação dos efeitos destes herbicidas sobre a resposta fotossintética de espécies de macroalgas lóticis verdes testadas.

Tratamento	Concentração nominal (mg [i.a.]. L <sup>-1</sup> )
Bratt® (i.a. 2,4-D)	
T 0,30	0,30 <sup>a</sup>
T 2	2 <sup>b</sup>
T 10	10 <sup>d</sup>
Roundup® (i.a. glifosato)	
T 0,28	0.28 <sup>a</sup>
T 3,5	3.5 <sup>b</sup>
T 6	6.0 <sup>c</sup>
Mistura de Bratt® + Roundup®	
0,30-0,28	0.30+0.28
2-3,5	2+3.5
10-6	10+6

a. Concentração máxima para irrigação e consumo animal permitida pela legislação brasileira.

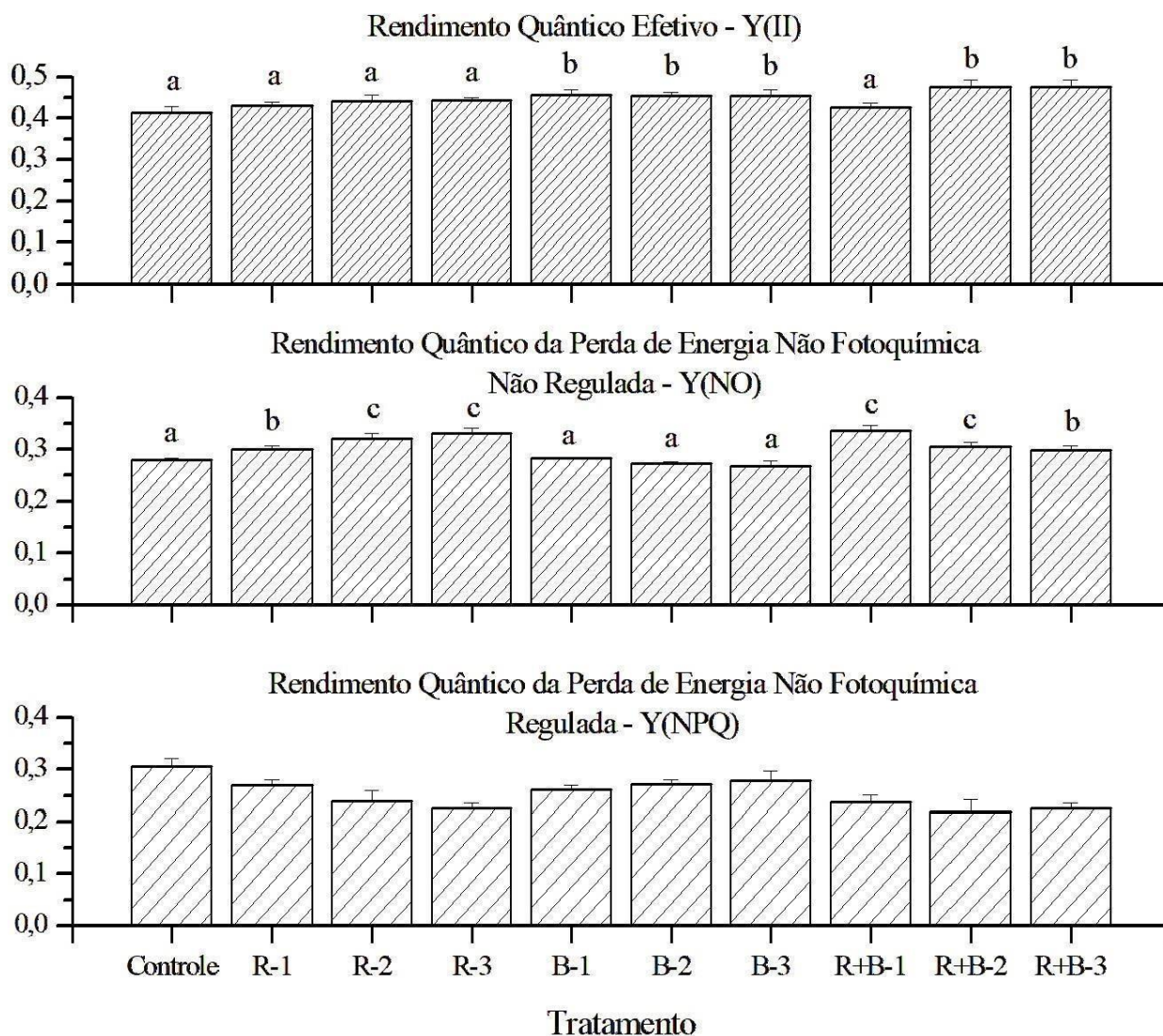
b. Com base na taxa de aplicação recomendada pelo fabricante para controle de pragas (GIESY et al., 2000)

c. Intervalo de concentrações estabelecido em testes ecotoxicológicos agudos (PORTINHO et al., 2018).

d. A maior concentração encontrada em um ambiente aquático natural (EDWARDS et al., 1980)

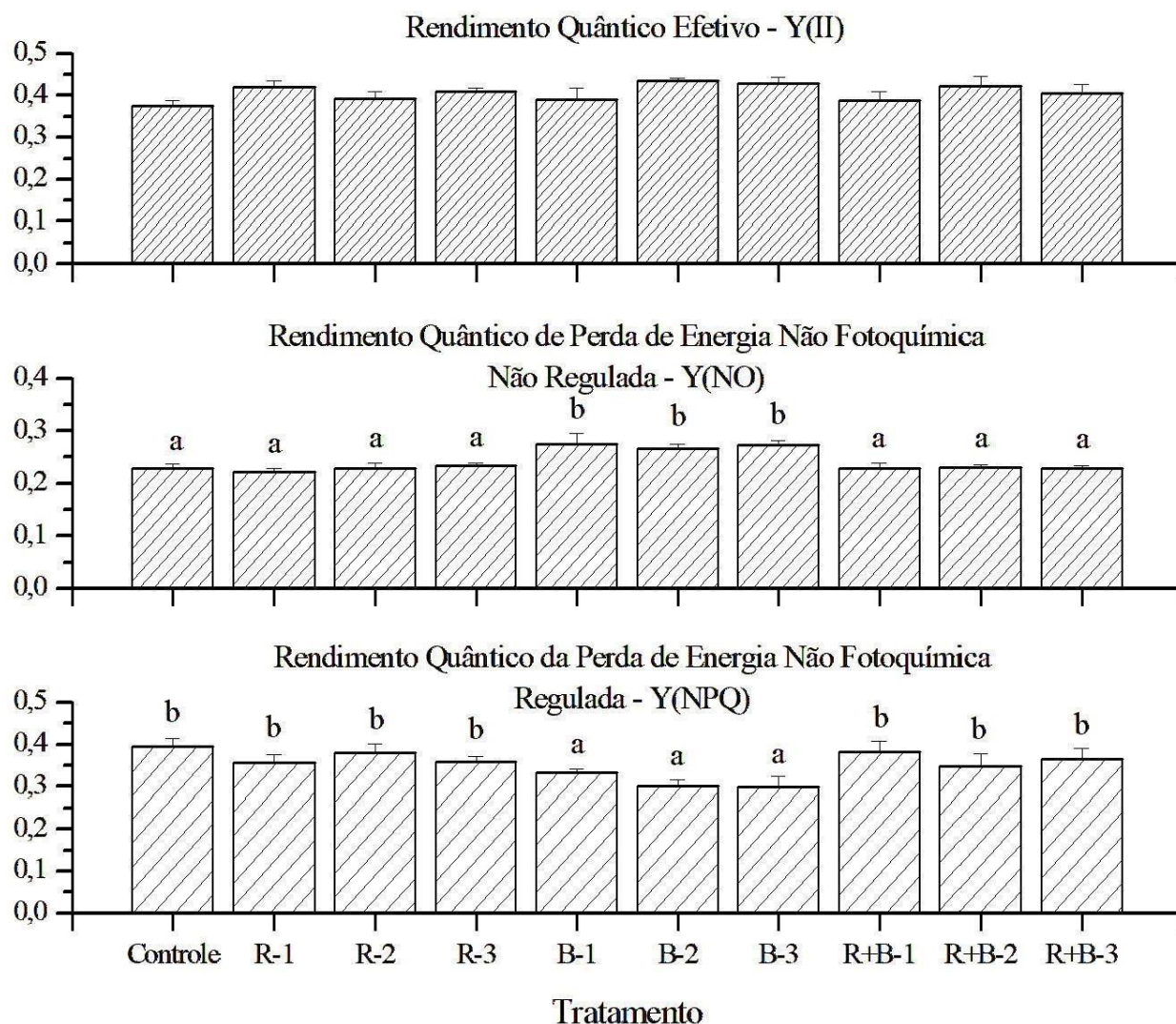
**Tabela 2.** Análise de variância (ANOVA) dos parâmetros da técnica da fluorescência da clorofila *a*, Y(II) (rendimento quântico efetivo do fotossistema II), Y(NPQ) (rendimento quântico da perda de energia não fotoquímica regulada no fotossistema II) e Y(NO) (rendimento quântico de perda de energia não fotoquímica não regulada no fotossistema II), considerando os valores dos grupos controles e dos tratamentos de exposição aos herbicidas, isolados e em mistura, obtidos para as espécies de macroalgas lóticicas verdes testadas.

Espécies	Y(II)		Y(NPQ)		Y(NO)	
	F	p	F	p	F	p
<i>Aegagropilopsis clavuligera</i> (Grunow) Boedeker	2.48	0.024*	8.91	0.000***	3.59	0.002**
<i>Arnoldiella emedii</i> (Peres & Branco) Peres & Auricchio	1.06	0.408	4.6	0.000***	2.19	0.043*
<i>Nitella microcarpa</i> var. <i>wrightii</i> Groves & Groves	1.18	0.334	0.867	0.562	3.40	0.003**
<i>Oedogonium</i> sp.	1.07	0.406	1.07	0.404	1.39	0.224

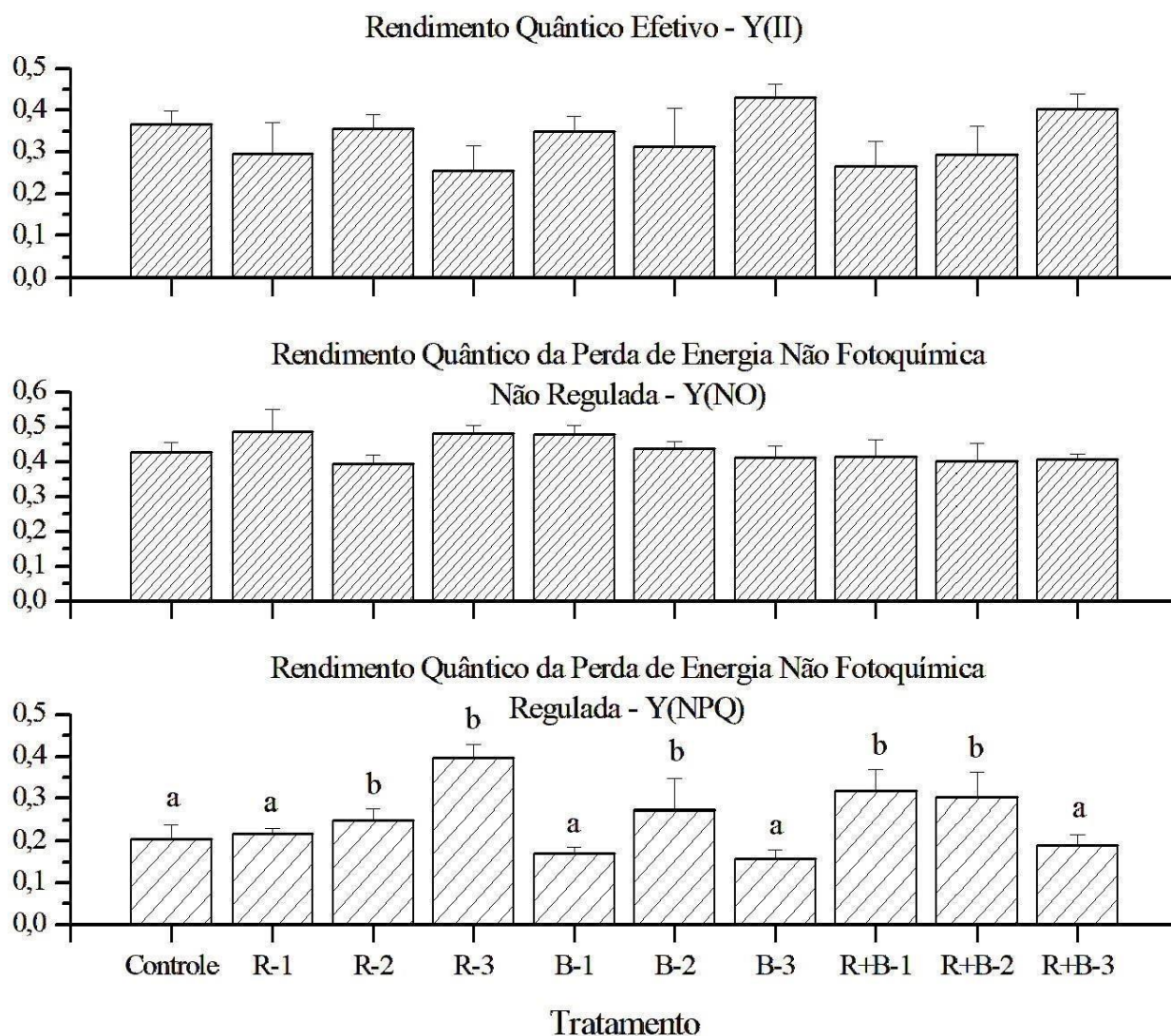


**Figura 1.** Valores médios e desvio-padrão dos parâmetros da fluorescência da clorofila a, Y(II) (rendimento quântico efetivo do fotossistema II), Y(NPQ) (rendimento quântico da perda de energia não fotoquímica regulada no fotossistema II) e Y(NO) (rendimento quântico de perda de energia não fotoquímica não regulada no fotossistema II), de *Aegsagropilopsis clavuloigera* após 7 dias de exposição aos tratamentos com os herbicidas Bratt® e Roundup®, isolados ou em misturas. Controle (meio sem herbicida); R-1: Roundup® na concentração 0,28 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>, R2: Roundup® - 03,5 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>, R-3: Roundup® - 6 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>, B-1: Bratt® na concentração de 0,30 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>, B-2: Bratt® - 2 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>, B-3: Bratt® - 10 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>, R+B-1: 0,30 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> de Bratt® + 0,28 mg ia.L<sup>-1</sup> de Roundup®; R+B-2: 2 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> + 3,5 mg

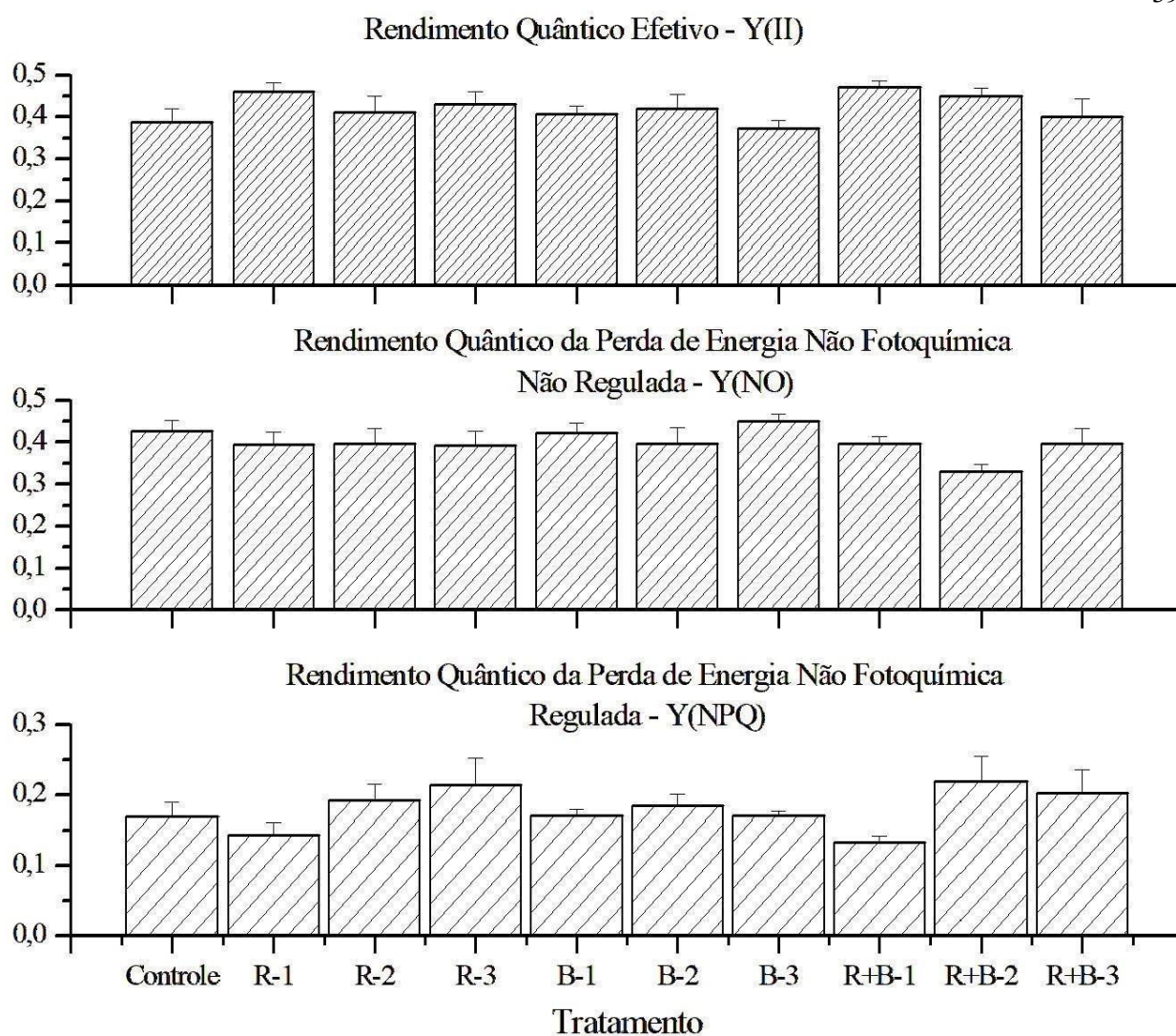
[i.a.].L<sup>-1</sup> e R+B-3: 10 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> + 6 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>. Letras diferentes indicam diferenças entre médias identificadas pelo teste de Scott-Knott.



**Figura 2.** Valores médios e desvio-padrão dos parâmetros da fluorescência da clorofila a, Y(II) (rendimento quântico efetivo do fotossistema II), Y(NPQ) (rendimento quântico da perda de energia não fotoquímica regulada no fotossistema II) e Y(NO) (rendimento quântico de perda de energia não fotoquímica não regulada no fotossistema II), de *Arnoldiella emedii* após 7 dias de exposição aos tratamentos com os herbicidas Bratt® e Roundup®, isolados ou em misturas. Controle (meio sem herbicida); R-1: Roundup® na concentração 0,28 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>, R-2: Roundup® - 03,5 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>, R-3: Roundup® - 6 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>, B-1: Bratt® na concentração de 0,30 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>, B-2: Bratt® - 2 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>, B-3: Bratt® - 10 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>, R+B-1: 0,30 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> de Bratt® + 0,28 mg ia.L<sup>-1</sup> de Roundup®; R+B-2: 2 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> + 3,5 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> e R+B-3: 10 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> + 6 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>. Letras diferentes indicam diferenças entre médias identificadas pelo teste de Scott-Knott.



**Figura 3.** Valores médios e desvio-padrão dos parâmetros da fluorescência da clorofila a, Y(II) (rendimento quântico efetivo do fotossistema II), Y(NPQ) (rendimento quântico da perda de energia não fotoquímica regulada no fotossistema II) e Y(NO) (rendimento quântico de perda de energia não fotoquímica não regulada no fotossistema II), de *Nitella microcarpa* var. *wrightii* após 7 dias de exposição aos tratamentos com os herbicidas Bratt® e Roundup®, isolados ou em misturas. Controle (meio sem herbicida); R-1: Roundup® na concentração 0,28 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>, R2: Roundup® - 03,5 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>, R-3: Roundup® - 6 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>, B-1: Bratt® na concentração de 0,30 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>, B-2: Bratt® - 2 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>, B-3: Bratt® - 10 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>, R+B-1: 0,30 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> de Bratt® + 0,28 mg ia.L<sup>-1</sup> de Roundup®; R+B-2: 2 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> + 3,5 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> e R+B-3: 10 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> + 6 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>. Letras diferentes indicam diferenças entre médias identificadas pelo teste de Scott-Knott.



**Figura 4.** Valores médios e desvio-padrão dos parâmetros da fluorescência da clorofila a, Y(II) (rendimento quântico efetivo do fotossistema II), Y(NPQ) (rendimento quântico da perda de energia não fotoquímica regulada no fotossistema II) e Y(NO) (rendimento quântico de perda de energia não fotoquímica não regulada no fotossistema II), de *Oedogonium* sp. após 7 dias de exposição aos tratamentos com os herbicidas Bratt® e Roundup®, isolados ou em misturas. Controle (meio sem herbicida); R-1: Roundup® na concentração 0,28 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>, R-2: Roundup® - 03,5 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>, R-3: Roundup® - 6 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>, B-1: Bratt® na concentração de 0,30 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>, B-2: Bratt® - 2 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>, B-3: Bratt® - 10 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>, R+B-1: 0,30 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> de Bratt® + 0,28 mg ia.L<sup>-1</sup> de Roundup®; R+B-2: 2 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> + 3,5 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> e R+B-3: 10 mg [i.a.].L<sup>-1</sup> + 6 mg [i.a.].L<sup>-1</sup>.