



TAMIRES DE FREITAS OLIVEIRA

**ECOTOXICIDADE DE UM HERBICIDA À BASE DE
FLUMIOXAZINA EM ORGANISMOS MODELOS
TERRESTRES E AQUÁTICOS**

**LAVRAS – MG
2024**

TAMIRES DE FREITAS OLIVEIRA

**ECOTOXICIDADE DE UM HERBICIDA À BASE DE FLUMIOXAZINA EM
ORGANISMOS MODELOS TERRESTRES E AQUÁTICOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Doutora.

Dr^a. Larissa Fonseca Andrade Vieira
Orientadora

Dr^a. Maria José dos Santos Wisniewski
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2024**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Oliveira, Tamires de Freitas.

Ecotoxicidade de um herbicida à base de flumioxazina em
organismos modelos terrestres e aquáticos / Tamires de Freitas
Oliveira. - 2024.

97 p.

Orientador(a): Larissa Fonseca Andrade Vieira.

Coorientador(a): Maria José dos Santos Wisniewski.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2024.

Bibliografia.

1. Ecotoxicologia. 2. Ecossistemas terrestres e aquáticos. 3.
Agrotóxicos. I. Vieira, Larissa Fonseca Andrade. II. Wisniewski,
Maria José dos Santos. III. Título.

TAMIRES DE FREITAS OLIVEIRA

**ECOTOXICIDADE DE UM HERBICIDA À BASE DE FLUMIOXAZINA EM
ORGANISMOS MODELOS TERRESTRES E AQUÁTICOS**

**ECOTOXICITY OF A FLUMIOXAZIN-BASED HERBICIDE ON TERRESTRIAL
AND AQUATIC MODEL ORGANISMS**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Botânica Aplicada, área de concentração em Botânica Aplicada, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 21 de março de 2024.

Dr^a. Larissa Fonseca Andrade Vieira (UFLA – MG)

Dr^a. Flavia de Freitas Coelho (UFLA – MG)

Dr^a. Raquel Aparecida Moreira (FURG – RS)

Dr^a. Karime Paina Araújo (UFSCar – SP)

Dr^a. Sara Raquel Boaventura Rodrigues (FCUP – Portugal)

Documento assinado digitalmente



LARISSA FONSECA ANDRADE VIEIRA

Data: 03/06/2024 15:29:25-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dr^a. Larissa Fonseca Andrade Vieira
Orientadora

Dr^a. Maria José dos Santos Wisniewski
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2024**

Aos meus pais, com amor.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento da pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Botânica Aplicada e professores por todos ensinamentos ao longo dos anos.

Aos meus pais, Jussara e Benedito, que sempre me apoiaram e incentivaram meu crescimento. Obrigada por serem meu porto seguro.

À minha orientadora, Larissa Fonseca Andrade Vieira, que além da dedicação e paciência, me incentivou e confiou em mim. Obrigada pelos momentos de crescimento, de risadas e partilhas.

À professora Aliandra Medeiros, que foi essencial no meio da minha caminhada.

À professora Maria José dos Santos Wisniewski, pela parceria e concessão do espaço do Laboratório de Limnologia da Universidade Federal de Alfenas para a realização de parte da pesquisa.

Aos colegas e estagiários do Laboratório de Limnologia da Unifal, que tornaram os dias mais leves e felizes, principalmente pós-pandemia: Ana Trivellato, Livia Nascimento e Matheus Owen.

Às alunas de iniciação científica, Tamara Costa e Maria Fernanda, que muito colaboraram para a realização deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

Às minhas amigas, que foram amparo e ouviram os desabafos nos momentos de desesperos e momentos felizes: Ana Claudia Mesquista, Kaoma Silva e Karime Paina.

À todas as pessoas que de alguma forma foram essenciais para a concretização deste trabalho, meus agradecimentos.

INDICADORES DE IMPACTO

A presente pesquisa abordou a ecotoxicidade de um herbicida de alta relevância no mercado, cujo princípio ativo é a flumioxazina, em organismos modelos terrestres e aquáticos. Os resultados obtidos permitem uma análise ampla dos impactos sociais, tecnológicos, econômicos e culturais, que podem ser tanto concretos e diretos quanto potenciais. Os resultados do estudo destacam a necessidade de um manejo consciente e responsável dos herbicidas, considerando os riscos ambientais identificados. Isso pode influenciar a formulação de políticas públicas e regulatórias voltadas para a proteção do meio ambiente e da saúde pública. A conscientização das comunidades agrícolas e do público em geral sobre os riscos potenciais e as práticas de manejo seguro pode resultar em um uso mais informado e prudente desses produtos químicos. Esses impactos são principalmente potenciais, mas têm o potencial de se concretizar através de políticas e programas de educação. Os achados sobre a sensibilidade de diferentes espécies vegetais e aquáticas à flumioxazina podem levar ao desenvolvimento de tecnologias mais seguras e eficazes para o controle de plantas invasoras. Isso inclui a criação de herbicidas alternativos com menor impacto ambiental ou o aperfeiçoamento de técnicas de aplicação que minimizem a contaminação de ecossistemas aquáticos. Esses impactos são potenciais, dependendo de investimentos em pesquisa e desenvolvimento tecnológico. A identificação de baixa toxicidade para as espécies do meio terrestre testadas sugeriu que o uso de flumioxazina pode ser mantido sem grandes restrições, garantindo a eficácia na produção agrícola e a competitividade dos produtores no mercado. No entanto, as altas toxicidades ambientais para os ecossistemas aquáticos indicam a necessidade de estratégias de mitigação que podem implicar custos adicionais para os agricultores e indústrias químicas. Esses impactos são concretos e diretos, afetando diretamente os custos de produção e as práticas agrícolas. A conscientização sobre os efeitos ambientais dos herbicidas pode promover uma mudança cultural em direção a práticas agrícolas mais sustentáveis e ecológicas. Isso pode influenciar a adoção de técnicas de manejo integrado de pragas e a valorização de práticas agrícolas tradicionais que respeitam o equilíbrio ecológico. Os impactos culturais são potencialmente profundos, podendo se concretizar através de movimentos sociais e iniciativas comunitárias voltadas para a sustentabilidade. Os resultados deste estudo destacam a importância de uma abordagem equilibrada na utilização de herbicidas, considerando tanto os benefícios econômicos quanto os potenciais impactos ambientais. A adoção de políticas públicas informadas pelos achados científicos, juntamente com investimentos em tecnologias mais seguras e práticas agrícolas sustentáveis, pode mitigar os riscos identificados e promover um desenvolvimento agrícola mais responsável e equilibrado.

IMPACT INDICATORS

This research looked at the ecotoxicity of a highly relevant herbicide on the market, the active ingredient of which is flumioxazin, on terrestrial and aquatic model organisms. The results obtained allow for a broad analysis of the social, technological, economic and cultural impacts, which can be both concrete and direct, as well as potential. The results of the study highlight the need for conscious and responsible management of herbicides, taking into account the environmental risks identified. This can influence the formulation of public and regulatory policies aimed at protecting the environment and public health. Raising awareness among farming communities and the general public about the potential risks and safe management practices can result in a more informed and prudent use of these chemicals. These impacts are mainly potential, but have the potential to be realized through policies and education programs. Findings on the sensitivity of different plant and aquatic species to flumioxazin could lead to the development of safer and more effective technologies for controlling invasive plants. This includes creating alternative herbicides with less environmental impact or improving application techniques that minimize contamination of aquatic ecosystems. These impacts are potential, depending on investments in research and technological development. The identification of low toxicity for the terrestrial species tested suggested that the use of flumioxazin can be maintained without major restrictions, guaranteeing efficiency in agricultural production and the competitiveness of producers in the market. However, the high environmental toxicities for aquatic ecosystems indicate the need for mitigation strategies that may imply additional costs for farmers and chemical industries. These impacts are concrete and direct, directly affecting production costs and agricultural practices. Raising awareness about the environmental effects of herbicides can promote a cultural shift towards more sustainable and ecological farming practices. This can influence the adoption of integrated pest management techniques and the appreciation of traditional agricultural practices that respect the ecological balance. The cultural impacts are potentially profound and can be realized through social movements and community initiatives aimed at sustainability. The results of this study highlight the importance of a balanced approach to the use of herbicides, considering both the economic benefits and the potential environmental impacts. The adoption of public policies informed by scientific findings, together with investments in safer technologies and sustainable agricultural practices, can mitigate the risks identified and promote more responsible and balanced agricultural development.

RESUMO

A flumioxazina é um ingrediente ativo de um herbicida frequentemente empregado para o controle de plantas invasoras de folhas largas na agricultura. Devido à sua eficácia, a utilização do produto comercial tem aumentado significativamente nos últimos anos, suscitando preocupações quanto aos riscos ambientais. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos subletais de uma formulação comercial de flumioxazina em diversos organismos modelos, representativos dos ecossistemas terrestres e aquáticos através de uma abordagem integrada para analisar a toxicidade ambiental. O estudo foi iniciado investigando cinco modelos vegetais, dos quais quatro foram utilizados para análises de germinação e desenvolvimento inicial das plantas (*Lactuca sativa* L., *Raphanus sativus* L., *Pennisetum glaucum* L. e *Triticum aestivum* L.), e um (*Allium cepa* L.) foi empregado para avaliar a genotoxicidade do herbicida. A germinação foi o parâmetro menos sensível avaliado, e a espécie *P. glaucum* demonstrou maior sensibilidade à toxicidade do herbicida, apresentando redução da raiz, parte aérea e peso fresco. Embora tenha sido identificado o potencial mutagênico do produto, este se manifestou em doses significativamente superiores às recomendadas para uso em campo (0,005 g L⁻¹ à 0,025 g L⁻¹), sugerindo um baixo risco da formulação comercial da flumioxazina para o meio terrestre. Foram realizados testes de toxicidade com modelos aquáticos, incluindo uma microalga verde (*Raphidocelis subcapitata*) e dois organismos zooplanctônicos (*Ceriodaphnia silvestrii* e *Daphnia magna*). Os resultados revelaram que a microalga apresentou alta sensibilidade ao herbicida, manifestando fitotoxicidade a partir de 2,726 µg L⁻¹ e acumulando carboidratos em resposta à presença da flumioxazina. Os cladóceros também foram negativamente afetados pelo herbicida, tanto em exposição aguda quanto crônica. Foram observados a inibição da imobilidade em ambas as espécies nos ensaios agudos a partir da dose de 47,2 mg L⁻¹ e, na exposição crônica, *C. silvestrii* apresentou inibição da imobilidade e reprodução, a partir de 3,5 mg de flumioxazina L⁻¹. As taxas de filtração e ingestão indicaram respostas espécie-específicas, onde *D. magna* sofreu redução da filtração do alimento e, *C. silvestrii* aumentou a ingestão. A exposição crônica via alimentação de *D. magna* as microalgas contaminadas demonstraram uma inibição de 100% na produção de ovos e, por conseguinte, na sua capacidade de reprodução. A toxicidade do herbicida também reduziu a expectativa de vida de *D. magna* em 13 dias, além de interferir no desenvolvimento do organismo, causando atrasos entre os estágios de vida. Diferentemente das conclusões finais obtidas para os modelos vegetais, a flumioxazina no ambiente aquático pode ser considerada de risco ambiental. Assim, concluímos que enquanto a baixa toxicidade no meio terrestre pode sugerir uma relativa segurança para os organismos terrestres, a alta toxicidade no ambiente aquático destaca a vulnerabilidade dos ecossistemas aquáticos e a necessidade urgente de medidas de mitigação e regulamentação para proteger esses sistemas vitais.

Palavras-chave: flumioxazina; modelos vegetais; modelos aquáticos; fitotoxicidade; ecogenotoxicidade; herbicida.

ABSTRACT

Flumioxazin is an active ingredient in herbicides commonly used to control broad-leaved weeds in agriculture. Due to its effectiveness, the use of commercial products containing flumioxazin has significantly increased in recent years, raising concerns about environmental risks. The objective of this study was to assess the sublethal effects of a commercial formulation of flumioxazin on various model organisms representative of terrestrial and aquatic ecosystems, through an integrated approach to environmental toxicity analysis. In the first place, the study investigated five plant models, four of which were used to analyze germination and initial plant development (*Lactuca sativa* L., *Raphanus sativus* L., *Pennisetum glaucum* L., and *Triticum aestivum* L.), while one (*Allium cepa* L.) was used to evaluate the genotoxicity of the herbicide. Germination was found to be the least sensitive parameter assessed, with the *P. glaucum* species showing the greatest sensitivity to herbicide toxicity, exhibiting reductions in root, aerial part, and fresh weight. Although mutagenic potential was identified, it occurred at doses significantly higher than those recommended for field use (0.005 g L⁻¹ to 0.025 g L⁻¹), suggesting a low risk of the commercial formulation of flumioxazin for terrestrial environments. Toxicity tests were also conducted on aquatic models, including a green microalga (*Raphidocelis subcapitata*) and two zooplankton organisms (*Ceriodaphnia silvestrii* and *Daphnia magna*). Results revealed high sensitivity of microalgae to the herbicide, with phytotoxic effects observed at concentrations as low as 2.726 µg L⁻¹, leading to carbohydrate accumulation in response to flumioxazin. Cladocerans were also negatively impacted by the herbicide, showing inhibition of immobility in acute tests from a dose of 47.2 mg L⁻¹, and inhibition of immobility and reproduction in chronic exposure, with *C. silvestrii* affected at concentrations as low as 3.5 mg L⁻¹ of flumioxazin. Species-specific responses were observed in filtration and ingestion rates, with *D. magna* reducing food filtration and *C. silvestrii* increasing ingestion. Chronic exposure of *D. magna* to contaminated microalgae resulted in 100% inhibition of egg production and reduced life expectancy by 13 days, along with developmental delays between life stages. In contrast to the relatively low toxicity observed in terrestrial environments, flumioxazin poses an environmental risk in aquatic ecosystems. These findings underscore the urgent need for mitigation and regulatory measures to protect aquatic environments from the adverse effects of flumioxazin.

Keywords: flumioxazin; plant models; aquatic models; phytotoxicity; ecogenotoxicity; herbicide.

SUMÁRIO

1.	ESTRUTURA DA TESE	13
2.	INTRODUÇÃO GERAL.....	15
2.1	ORGANISMOS MODELOS TERRESTRES E AQUÁTICOS	18
2.1.1	Organismos modelos terrestres.....	19
2.1.2	Organismos modelos aquáticos	23
2.2	O PRINCÍPIO ATIVO FLUMIOXAZINA.....	25
	REFERÊNCIAS	29
	Capítulo 1. ECOTOXICIDADE DE UM HERBICIDA À BASE DE FLUMIOXAZINA EM ORGANISMOS MODELOS VEGETAIS.....	33
	RESUMO	33
	INTRODUÇÃO.....	35
	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
	RESULTADOS	39
	DISCUSSÕES	45
	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS	50
	Capítulo 2. FITOTOXICIDADE DO HERBICIDA À BASE DE FLUMIOXAZINA NA MICROALGA VERDE <i>Raphidocelis subcapitata</i> E OS IMPACTOS VIA ROTA DIETÉTICA NA TAXA DE FILTRAÇÃO E INGESTÃO DE ORGANISMOS ZOOPLANCTÔNICOS.....	54
	RESUMO	54
	INTRODUÇÃO.....	56
	MATERIAIS E MÉTODOS.....	57
	RESULTADOS	62
	DISCUSSÕES	66
	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	70
	Capítulo 3. A TOXICIDADE DA FORMULAÇÃO HERBICIDA SUMYSIN 500 SC® VIA ALIMENTAÇÃO INIBE A REPRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE <i>Daphnia magna</i> Straus (CRUSTACEA: CLADOCERA)	73
	RESUMO	73
	INTRODUÇÃO.....	75
	MATERIAIS E MÉTODOS.....	76
	DISCUSSÕES	83

CONCLUSÃO.....	85
REFERÊNCIAS	86
Capítulo 4. IMPACTOS DA EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA COMERCIAL À BASE DE FLUMIOXAZINA SOBRE OS ORGANISMOS MODELOS <i>Ceriodaphnia</i> <i>silvestrii</i> E <i>Daphnia magna</i> : Uma Avaliação de Toxicidade Aguda e Crônica	89
RESUMO	89
INTRODUÇÃO.....	91
MATERIAIS E MÉTODOS.....	92
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	94
REFERÊNCIAS	100
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	102

1. ESTRUTURA DA TESE

Este estudo foi concebido com o propósito de investigar a ecotoxicidade de um herbicida comercial amplamente utilizado no Brasil e no mundo, contendo flumioxazina como princípio ativo. Para os testes foram utilizados organismos modelos tanto terrestres quanto aquáticos previamente padronizados por normativas nacionais e internacionais.

A tese foi dividida em quatro artigos, e o documento organizado da seguinte maneira: Introdução Geral com justificativas e objetivos e Referências Bibliográficas. E para uma melhor compreensão dos objetivos gerais e específicos, cada artigo foi estruturado em capítulos contendo Resumo, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências Bibliográficas.

Capítulo 1. Neste capítulo foi estudado a ecotoxicidade do herbicida à base de flumioxazina em organismos modelos terrestres. Os efeitos do herbicida foram avaliados em sementes de *Lactuca sativa* L., *Raphanus sativus* L., *Pennisetum glaucum* L. e *Triticum aestivum* L. sobre a germinação e desenvolvimento inicial das plântulas. Além disso, foram analisados os efeitos genotóxicos do herbicida em células de ponta de raiz de *Allium cepa* L.

Capítulo 2. A partir deste capítulo, exploramos a ecotoxicidade do herbicida à base de flumioxazina em organismos modelos aquáticos, que são representativos significativos dos ecossistemas aquáticos. No Capítulo 2, investigamos a toxicidade da flumioxazina utilizando a microalga verde *Raphidocelis subcapitata*. Através do cálculo da concentração efetiva 50%, (EC_{50}), da concentração sem efeito observado (NOEC - *No Observed Effect Concentration*) e da menor concentração com efeito observado (LOEC - *Lowest Observed Effect Concentration*), conduzimos um novo experimento com microcrustáceos (*Ceriodaphnia silvestrii* e *Daphnia magna*) para analisar as taxas de filtração e ingestão via rota dietética à microalga contaminada.

Capítulo 3. Neste estudo, investigamos as respostas de *D. magna* ao consumir microalgas contaminadas com o herbicida comercial à base de flumioxazina, simulando um processo que ocorre naturalmente em ambientes aquáticos. Para isso, uma concentração de EC_{50} previamente determinada para *R. subcapitata* no banco de dados de propriedades de pesticidas (PPDB - *Pesticide Properties DataBase*) foi aplicada à microalga. Posteriormente, após a centrifugação e lavagem da microalga, procedemos à alimentação de *D. magna* por um período de 21 dias.

Capítulo 4. O capítulo 4 consistiu em avaliar os efeitos agudos por 48 horas e crônicos por 7 dias do herbicida comercial contendo flumioxazina sobre duas espécies de

cladóceros, *C. silvestrii* e *D. magna*, nos quais parâmetros como imobilidade, reprodução e sobrevivência dos organismos foram avaliados.

2. INTRODUÇÃO GERAL

A prática da agricultura remonta na história da humanidade a milhares de anos e desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e na evolução das sociedades humanas. Ao longo dos séculos, a agricultura tem sido a principal fonte de alimentos, fibras e matérias-primas para diversas culturas em todo o mundo (Almeida *et al.* 2021). Ao longo da história, as práticas agrícolas evoluíram significativamente, desde os métodos rudimentares de cultivo até as modernas técnicas agrícolas baseadas em tecnologia avançada. Entre essas inovações, os agrotóxicos surgiram como uma ferramenta predominante, destinados ao controle de doenças e pragas e, ao aumento da produtividade nas culturas (Rico; Cavichioli, 2018). Mas também suscitou preocupações sobre os impactos negativos dos agrotóxicos na saúde humana, no meio ambiente e na biodiversidade. O uso excessivo e indiscriminado desses produtos químicos levanta questões sobre a segurança alimentar, a contaminação do solo e da água, o desenvolvimento de resistência em pragas e plantas daninhas, e a perda de habitats naturais.

À medida que as áreas destinadas à agricultura crescem, impulsionadas pela necessidade de atender às demandas globais por alimentos, o uso de agrotóxicos muitas vezes se intensifica (Lopes; Albuquerque, 2018). Essa relação é complexa e multifacetada, influenciada por fatores como pressões econômicas, necessidade de aumento de produtividade, mudanças climáticas e padrões de consumo. Os resíduos dessas substâncias podem contaminar o solo, a água e os alimentos, resultando em efeitos adversos sobre a biodiversidade, a qualidade dos recursos hídricos e a saúde humana (Ando; Fujisawa; Katagi, 2017; Wehtje; Gilliam; Marble, 2012).

Dentre os agrotóxicos mais utilizados destacam-se os herbicidas, uma categoria que visa especificamente o controle de vegetação não desejada (Kraehmer *et al.*, 2014). Os herbicidas exercem sua ação de maneira direta sobre a fisiologia das plantas, promovendo alterações nas atividades de enzimas e proteínas celulares (Pertile *et al.*, 2020; Stangarlin *et al.*, 2010). Essas modificações desencadeiam uma sequência de eventos que conduzem à morte celular ou à inibição do desenvolvimento do organismo. Apesar de serem agentes eficazes no controle de plantas daninhas, é importante destacar que, se utilizados em excesso ou sem conhecimento prévio adequado, esses herbicidas podem afetar organismos não-alvo, do meio ambiente terrestre e aquático (Ando; Fujisawa; Katagi, 2017; Geoffroy; Frankart; Eullaffroy, 2004), e a saúde animal (Umphres; Roelke; Netherland, 2013). A introdução dessas substâncias em corpos d'água, por exemplo, ocorre por meio de processos como

escoamento, lixiviação, drenagem ou de maneira acidental resultando na contaminação dos ecossistemas aquáticos (Ando; Fujisawa; Katagi, 2017). Tal contaminação representa uma ameaça à integridade fisiológica dos organismos presentes no ambiente aquático, com possíveis consequências para a saúde e a sustentabilidade do ecossistema.

O Brasil intensifica sua atividade na agricultura a cada ano e, com isso, tornou-se um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo (Lopes-Ferreira *et al.*, 2022). A flumioxazina destaca-se entre os herbicidas utilizados no Brasil e no mundo como um produto de significativa relevância e, segundo a bula do produto comercial, oferece suporte a diversos tipos de cultura para o controle de plantas indesejadas. O herbicida à base de princípio ativo flumioxazina é utilizado no controle pré-emergente de ervas daninhas (Boyd, 2014; Ferrell; Vencill, 2003) e tem como alvo principal as dicotiledôneas, especialmente plantas de folhas larga (Pertile *et al.*, 2020). Diversos trabalhos já comprovaram sua eficácia na seletividade dessas plantas daninhas (Assunção *et al.*, 2017).

O mecanismo primário de ação da flumioxazina reside em sua capacidade de afetar os estágios iniciais de desenvolvimento das plantas, atuando diretamente sobre a enzima protoporfirinogênio oxidase (PROTOX) (Ando; Fujisawa; Katagi, 2017; Duke *et al.*, 2016; Ferrell; Vencill, 2003; Mahoney; Shropshire; Sikkema, 2014; Wehtje; Gilliam; Marble, 2012). A substância, ao promover a dessecação das folhas, é prontamente absorvida pelas raízes, tornando-as suscetíveis ao princípio ativo (Boyd, 2014). Estudos demonstraram que a meia-vida da flumioxazina em argila arenosa e areia argilosa de foi de 26,6 dias (Eason *et al.*, 2022). O impacto direto resulta no descontrole da oxidação de substratos e na peroxidação de lipídios, comprometendo significativamente o funcionamento fisiológico das plantas-alvo (Duke *et al.*, 2016).

Considerando o impacto da aplicação, dependente da dose, de herbicidas no ambiente, a avaliação e quantificação desses impactos através de bioensaios ecotoxicológicos são medidas adotadas com frequência em planos de avaliações padronizados e comunidade científica e, são imprescindíveis para conhecer os riscos para o ecossistema auxiliando na precaução e mitigação de possíveis consequências adversas mais severas. Nesse contexto, a Ecotoxicologia surge como uma ferramenta essencial na tentativa de preservar a biota e analisar os riscos associados à contaminação ambiental por produtos químicos (Ronco, 2004). Um dos principais objetivos desta área é avaliar e preservar a integridade do meio ambiente. Para alcançar esse propósito, a ecotoxicologia emprega análises de risco e contribui para a formulação de legislações que classificam produtos químicos com base em sua toxicidade. Os bioensaios, que incluem testes de toxicidade agudos e crônicos, sejam eles aplicados em

modelos vegetais ou aquáticos e, utilizando organismos-teste sensíveis e representativos das espécies encontradas naturalmente nos ecossistemas, são comumente utilizados para obter respostas sobre os impactos potenciais de contaminantes ambientais.

Sementes como a *Lactuca sativa* e *Allium cepa* (Luber *et al.*, 2015; Palmieri *et al.*, 2016) e organismos aquáticos como a *Ceriodaphnia silvestrii* e *Raphidocelis subcapitata* (Castelhana Gebara *et al.*, 2021) são frequentemente utilizados como modelos de testes em estudos de toxicidade ambiental devido à sua sensibilidade aos contaminantes e sua representatividade em diferentes ecossistemas. As sementes, em particular, são amplamente empregadas em testes de germinação e crescimento vegetal para avaliar os efeitos de substâncias químicas no desenvolvimento inicial das plantas (Andrade-Vieira *et al.*, 2014). Esses testes podem fornecer informações valiosas sobre a toxicidade aguda e crônica de contaminantes do solo, água e ar, bem como sobre os mecanismos subjacentes aos seus efeitos nas plantas. Além disso, as sementes são convenientes para manipulação experimental e permitem a avaliação de uma ampla gama de parâmetros, como taxa de germinação, crescimento da raiz e desenvolvimento foliar (Andrade-Vieira *et al.*, 2014; Andrade-Vieira; Davide; Gedraite, 2010; Palmieri *et al.*, 2016).

Por outro lado, organismos aquáticos, como algumas espécies de peixes (Umphres; Roelke; Netherland, 2013), crustáceos (Castelhana Gebara *et al.*, 2021) e de microalgas (Silva *et al.*, 2018), são amplamente utilizados em testes de toxicidade aquática para avaliar os efeitos de poluentes em ambientes de água doce e marinhos. Esses organismos desempenham papéis fundamentais nos ecossistemas aquáticos e são sensíveis a mudanças nas condições ambientais. Os testes de toxicidade aquática podem incluir ensaios de sobrevivência, crescimento, reprodução e comportamento para determinar os efeitos adversos dos contaminantes na saúde e no funcionamento dos ecossistemas aquáticos.

Em conjunto, o uso de sementes e organismos aquáticos como organismos modelos de testes permite uma avaliação abrangente dos impactos ambientais de substâncias químicas e ajuda a informar medidas de mitigação e políticas de proteção ambiental. Além disso, há diversos tipos de testes que complementam a ecotoxicologia de maneira abrangente, entre eles destacam-se os bioensaios de eco-geno-toxicidade. Estes ensaios, integrantes dos testes ecotoxicológicos, apresentam grande utilidade ao visar alterações na estrutura celular, abrangendo aspectos como número e forma, bem como a organização cromossômica no interior das células, conforme destacado por Leme e Marin-Morales, (2009). No âmbito aquático, encontram-se testes que avaliam taxas metabólicas, assim como a taxa de filtração e ingestão do zooplâncton (Moreira; Mansano; Rocha, 2016). Essa variedade de abordagens

pode contribuir para uma compreensão mais holística dos potenciais impactos ambientais que podem causar o herbicida com princípio ativo à base de flumioxazina e fornecer *insights* valiosos sobre os efeitos dessa substância nos ecossistemas.

Considerando que a flumioxazina, em determinadas situações, apresenta potencial substitutivo ao glifosato, um herbicida amplamente conhecido e potencialmente tóxico, em certos tipos de culturas para o controle de ervas daninhas, é crucial observar que esses herbicidas, devido ao seu amplo espectro de ação contra infestações, podem acarretar possíveis consequências adversas para organismos não-alvos (Camargo *et al.*, 2020). Dada a relevância do potencial e dos riscos associados aos herbicidas para ambientes e organismos aquáticos, estudos que abordam o impacto de agentes químicos na estrutura e/ou comportamento cromossômico no estágio inicial do desenvolvimento celular, na germinação de sementes (fase crucial para o desenvolvimento das plantas) e nas respostas fisiológicas e bioquímicas de organismos aquáticos, revestem-se de extrema importância, uma vez que evidenciam os riscos que tais agrotóxicos podem representar para a saúde e o meio ambiente como um todo.

Neste contexto, com base na hipótese de que o herbicida comercial pode ter efeitos adversos em todos os parâmetros avaliados, tanto nos organismos modelos terrestres quanto aquáticos, o objetivo principal deste estudo foi avaliar os efeitos de um herbicida comercial contendo flumioxazina, em diferentes contextos ambientais, terrestres e aquáticos. Buscamos, assim, fornecer uma compreensão abrangente dos impactos potenciais que esse herbicida pode ter nos ecossistemas. Os resultados obtidos são fundamentais para a compreensão dos potenciais efeitos ambientais desse herbicida, contribuindo assim para embasar decisões informadas no âmbito da gestão ambiental e da agricultura sustentável. A complexidade das interações entre o herbicida e os diversos componentes dos ecossistemas destaca a importância de considerar tanto os aspectos terrestres quanto aquáticos na avaliação do impacto ambiental de agrotóxicos.

2.1 ORGANISMOS MODELOS TERRESTRES E AQUÁTICOS

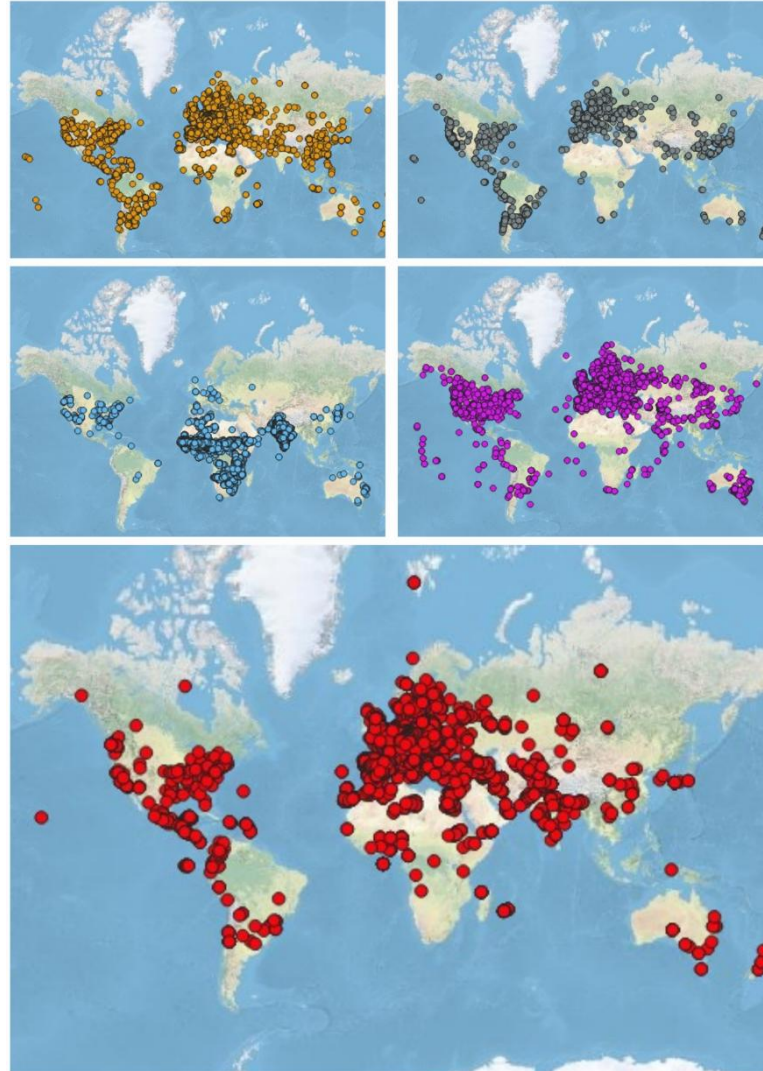
Organismos modelos são organismos vivos, geralmente simples e de fácil manipulação em laboratório, que são usados pelos cientistas como representações de sistemas biológicos mais complexos para estudar processos biológicos fundamentais (Irion; Nusslein-Volhard, 2022). Esses organismos são selecionados por causa de suas características

genéticas, fisiológicas, anatômicas ou comportamentais que os tornam especialmente adequados para estudos científicos. Esses organismos são escolhidos por sua capacidade de fornecer informações valiosas que podem ser extrapoladas para entender processos biológicos em organismos mais complexos, incluindo humanos.

São espécies designadas para estudos científicos intensivos devido às suas características que facilitam a pesquisa e a compreensão de processos biológicos mais amplos. Os organismos modelos são escolhidos porque são considerados indicadores eficientes das condições ambientais locais e desempenham papéis importantes nos ecossistemas em que habitam. O termo organismo modelo é usado para descrever um organismo que é inerentemente conveniente para estudar uma área específica da biologia (Russell *et al.*, 2017) e, sendo assim, sua utilidade primordial reside na exploração das características biológicas distintas de um organismo particular, visando abordar questões de relevância geral. Dentre as mais diversas espécies, destacamos cinco organismos modelos terrestres (Figura 1) e três organismos modelos aquáticos (Figura 2) utilizados nesta pesquisa:

2.1.1 Organismos modelos terrestres

Figura 1: Ocorrência mundial dos organismos modelos terrestres.



Legenda: Círculos representam cada espécie estudada: amarelo – *Lactuca sativa* L.; cinza – *Raphanus sativus*; azul – *Pennisetum glaucum*; roxo - *Triticum aestivum* L. e vermelho – *Allium cepa*.
 Fonte: Do Autor (Software QGIS, 2024).

Lactuca sativa L.

Lactuca sativa L., a alface, pertence à família Asteraceae (Compositae) e gênero *Lactuca* (Vervaaijen *et al.*, 2018). Além das suas categorias taxonômicas, é subdividida em variedades e cultivares, levando em consideração características específicas como cor, forma e textura das folhas. É uma planta de interesse nas áreas biológicas devido às suas características particulares. Esta espécie vegetal apresenta um ciclo de vida relativamente

curto, o que favorece a realização de estudos eficientes sobre seu desenvolvimento e fenótipos. Além disso, sua adaptação ao cultivo em laboratório facilita a condução de experimentos controlados, proporcionando um ambiente propício para a pesquisa científica. A alface responde rapidamente a mudanças nas condições ambientais, tornando-se um excelente organismo modelo de estudo para compreender as respostas das plantas a fatores como luz, temperatura, umidade e a contaminantes (Oh; Carey; Rajashekar, 2009). A sensibilidade da alface a esses fatores a torna uma ferramenta valiosa para investigações científicas voltadas à compreensão dos mecanismos de adaptação das plantas.

Raphanus sativus L.

O rabanete (*Raphanus sativus* L.) é uma planta pertencente à família Brassicaceae, caracterizada por suas raízes tuberosas comestíveis (Kong *et al.*, 2022). É uma planta herbácea anual e possui folhas basais dispostas em roseta e folhas caulinares alternadas ao longo do caule. O rabanete é cultivado em diversos climas e solos, sendo uma planta de rápido crescimento e desenvolvimento. Alguns estudos vêm sendo efetuados com esta espécie devido a estas características. A espécie foi utilizada como planta modelo para analisar alterações no conteúdo de metabólitos selecionados de L-tirosina, como a dopamina, tiramina e normetanefrina e, também, de vitaminas solúveis em água, quando exposta a toxicidade de dois herbicidas (mesotriona e sulcotriona) (Plonka *et al.*, 2022). Devido à sua sensibilidade a vários tipos de estresses ambientais e sua rápida taxa de crescimento, o rabanete é uma ótima escolha para testes de toxicidade em solos, água e outros meios. Os ensaios de toxicidade com rabanete podem envolver a exposição das sementes ou plântulas a diferentes concentrações da substância em estudo e a avaliação de parâmetros como germinação, crescimento das raízes, desenvolvimento foliar, entre outros.

Pennisetum glaucum L.

Pennisetum glaucum L., também conhecido como milheto, é uma espécie de grama da família Poaceae, possui alto impacto ambiental, adaptação, ótima produção e qualidade nutricional (Milke *et al.*, 2018). É uma planta anual com alto potencial para cobertura do solo e utilização como forragem na pecuária, é amplamente cultivada em diversas partes do mundo (Fig. 1) devido à sua adaptabilidade a condições adversas de crescimento, como solos pobres,

seca e altas temperaturas. A espécie faz parte do gênero *Pennisetum*, que inclui mais de 140 espécies distribuídas pelos trópicos (Brunken, 1977). Testes de toxicidade ambiental podem ser conduzidos utilizando o milheto como um modelo vegetal para avaliar os efeitos de contaminantes químicos no crescimento e desenvolvimento das plantas, bem como em processos de fitorremediação.

Triticum aestivum L.

A espécie *Triticum aestivum* L. foi descrita em 1753, por Lineu, é pertencente da família Gramineae (Dedecca; Púrchio, 1952). *Triticum aestivum* L., conhecido popularmente como trigo comum ou trigo de pão, é uma das culturas de cereais mais importantes e amplamente cultivadas em todo o mundo. Esta espécie é valorizada por sua alta produtividade, ampla adaptação a diferentes condições climáticas e versatilidade no uso, sendo uma fonte fundamental de alimento para a humanidade.

Allium cepa L.

O gênero *Allium* L., incluindo o bulbo que pode ser cultivado, a cebola, *Allium cepa*, apresenta distribuição natural no hemisfério norte (Fig. 1). Representando um dos maiores gêneros da família Amaryllidaceae, compreende aproximadamente 1000 espécies (Jang *et al.*, 2023). Bioensaios com *Allium cepa* são empregados para avaliar potenciais citotóxicos e mutagênicos decorrentes de poluentes ambientais, como os agrotóxicos. *Allium cepa* L. é uma espécie diplóide com um número cromossômico de $2n = 2x = 16$, caracterizada por oito grandes pares de cromossomos. Destes, sete são metacêntricos ou submetacêntricos, e um é subteloentríco, contendo a região organizadora do nucléolo (Havey, 1993). Devido a essa configuração cromossômica, a cebola serve como um excelente organismo modelo citológico, sendo seus cromossomos grandes e facilmente observáveis e adequados para estudos citogenéticos.

O teste utilizando *Allium cepa* L. utiliza bulbos ou sementes de cebola para avaliar o potencial tóxico de amostras por meio de ensaios de enraizamento ou germinação. Durante esses ensaios, os materiais vegetais entram em contato direto com a substância em estudo. São examinados diferentes aspectos, como o crescimento das raízes, a taxa de divisão celular nas células meristemáticas (que indica citotoxicidade) e quaisquer mudanças nos cromossomos ou

núcleos dessas células (que indicam genotoxicidade/mutagenicidade). O objetivo dessas análises é determinar o potencial danoso da substância testada. Estes bioensaios são considerados válidos pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (PNUMA), Organização Mundial da Saúde (OMS) e Agência de Proteção Ambiental dos EUA (US-EPA) (Palmieri *et al.*, 2016).

Os testes de citotoxicidade desempenham um papel crucial na avaliação do impacto de agentes potencialmente tóxicos na viabilidade celular. Esse efeito se manifesta por meio de alterações nas funções celulares, que podem resultar em uma diminuição ou aumento na taxa de proliferação celular, um fenômeno observável através de mudanças no Índice Mitótico (IM) e indicativo de citotoxicidade no processo de mitose das células vegetais (Fiskesjö, 1988) Bonciu *et al.* 2018). Já os testes de mutagenicidade e genotoxicidade, utilizando *Allium cepa*, são conduzidos para identificar a inibição do ciclo celular, interrupções na mitose, a indução de alterações cromossômicas estruturais e numéricas e a presença de micronúcleos (Bagatini; Tedesco, 2007; Luber *et al.*, 2015; Palmieri *et al.*, 2016), sendo, portanto, um excelente modelo de monitoramento para detectar agentes químicos e poluentes ambientais.

2.1.2 Organismos modelos aquáticos

Figura 2: Ocorrência mundial dos organismos modelos aquáticos.



Legenda: Círculos representam cada espécie estudada: verde – *Daphnia magna*; amarelo – *Ceriodaphnia silvestrii* e vermelho – *Raphidocelis subcapitata*.

Fonte: Do Autor (Software QGIS, 2024).

Raphidocelis subcapitata

Pertencente ao filo das Chlorophyta, ou também conhecidas como algas verdes, essas possuem clorofila *a* e *b* e, realizam fotossíntese. A *R. subcapitata*, que também já foi chamada de *Pseudokirchneriella subcapitata* (Oliveira, 2007), é uma microalga de água doce disponível em rios e lagoas da América do Sul (sobreposto no mapa pela *C. silvestrii*) e Europa (Figura 2). São indivíduos de vida livre ou coloniais, e possuem simetria externa radial, com formato semelhante a uma meia-lua. Esta espécie é muito utilizada para testes ecotoxicológicos, com diretrizes padronizadas por órgãos internacionais e pela Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT, possui facilidade de cultivo com rápido crescimento e sensibilidade a diversos tipos de contaminantes.

Ceriodaphnia silvestrii

Os Cladocera são pequenos crustáceos da Classe Branchiopoda, e na sua maioria, possuem tamanho entre 0,2 e 3,0 mm. A *C. silvestrii* apresenta um corpo arredondado, cabeça curvada em relação ao corpo e olho grande que preenche quase toda a porção da frente da cabeça (Elmoor-Loureiro, 1997). Seu tamanho varia de 0,86 a 0,88 mm. Foi registrada em águas do Brasil e continente africano (Figura 2). É uma espécie com padronização brasileira para testes ecotoxicológicos agudos e crônicos pois apresenta alta sensibilidade a agentes tóxicos em corpos d'água.

Daphnia magna

Daphnia magna é um crustáceo Cladocera da Classe Branchiopoda que é frequentemente empregada em ensaios de toxicidade aquática devido a diversas características que conferem facilidade e economia ao seu cultivo em laboratório. Possui ciclo de vida curto, alta taxa de fecundidade e reprodução partenogenética (Sosedova *et al.* 2021). Por outro lado, *D. magna* apresenta distinções em relação a outros zooplânctons de água doce, incluindo diferenças em tamanho, habitat, história de vida e resistência à predação por peixes

(Koivisto, 1995). A espécie é predominantemente encontrada em habitats efêmeros, como pequenos lagos e poças rochosas, onde a presença de predadores vertebrados é limitada, devido ao seu tamanho relativamente grande.

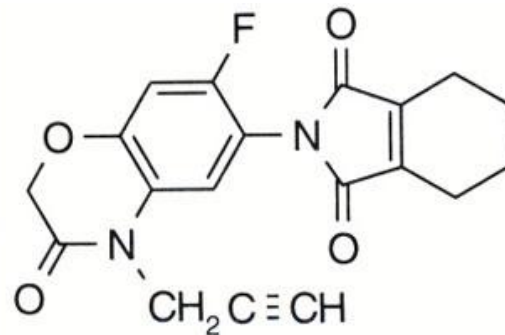
O gênero, composto por mais de 100 espécies identificadas, é encontrado em uma variedade de ambientes de água doce, onde a *D. magna* é uma importante componente dos consumidores primários, desempenhando um papel crucial na cadeia trófica. Sua reprodução é altamente influenciada pelas condições ambientais locais. Em ambientes limpos e estáveis, a reprodução ocorre predominantemente por partenogênese, resultando em populações compostas exclusivamente por fêmeas. No entanto, em ambientes desfavoráveis, como corpos d'água poluídos ou eutrofizados, a espécie tende a produzir machos, que então se reproduzem sexualmente com as fêmeas, gerando ovos de resistência conhecidos como efípios (Antunes, 2001; Ebert, 2005).

2.2 O PRINCÍPIO ATIVO FLUMIOXAZINA

A flumioxazina, de composição *N-(7-fluoro-3,4-dihidro-3-oxo-4-prop-2-ynyl-2H-1,4benzoxazin-6-yl)cyclohex-1-ene-1,2-dicarboxamide*, é um herbicida com registro para uso condicionais de pré e pós emergência, de modo de ação não sistêmico e seletivo, que foi desenvolvido para atuar no controle de plantas daninhas de folhas largas e algumas monocotiledôneas (Flessner *et al.*, 2013), nas culturas de Batata, Café, Cana-de-açúcar, Cebola, Espécies Florestais (Eucalipto e Pinus), Feijão e Soja em solo leve, médio e pesado.

A formulação da flumioxazina é um pó molhável (WP) não inflamável e não corrosivo. É uma molécula pequena (Figura 3), de peso molecular 354,3 g/mol. É uma benzoxazina, um composto acetilênico terminal, uma dicarboximida e um composto organofluorado. Trata-se de molécula com baixos valores de solubilidade em água e pressão de vapor, $1,79 \text{ mg L}^{-1}$ e $2,41 \times 10^{-6} \text{ mm Hg}$, respectivamente, de acordo com as bases de dados de propriedades de pesticidas (PPDB, 2023). Apresenta afinidade pela partição lipofílica ($\log Kow = 2,55$), e alta adsorção à matéria orgânica do solo ($Koc = 889$) (Oliveira *et al.*, 2018).

Figura 3: Fórmula estrutural do herbicida flumioxazina.



Fonte: Banco de dados de propriedades de pesticidas, PPDB.

Após a aplicação, a flumioxazina é absorvida pelas raízes e brotos das plantas por meio de movimentos simplásticos limitados, devido a uma rápida dessecação foliar (Boyd, 2014). Seu mecanismo de ação é caracterizado pela inibição da protoporfirinogênio oxidase (PROTOX), última enzima comum das rotas de síntese do grupo heme e da clorofila, através da transformação de protoporfirinogênio IX em protoporfirina IX (Saladin; Clément; Magné, 2003), desta forma tem-se o bloqueio na síntese de clorofila e citocromos no cloroplasto. Ao desempenhar o papel de pigmento fotodinâmico, o acúmulo de protoporfirina IX no citoplasma, quando exposto à luz e oxigênio molecular, desencadeia a produção de oxigênio singlete. Quando ativado, este oxigênio singlete atua como um iniciador para o processo de peroxidação de lipídios e estresse oxidativo nas membranas celulares. Nesse contexto, tanto lipídios quanto proteínas se tornam alvos de ataque e oxidação, culminando na perda de clorofila e carotenoides, assim como no rompimento das membranas celulares e desintegração das organelas. Conseqüentemente, os tecidos são necrosados e conduzidos à morte, sendo esse processo impulsionado pela peroxidação lipídica (Saladin; Clément; Magné, 2003).

Este herbicida já foi detectado em efluentes de água de estação de tratamento e identificado como um dos principais contribuintes de toxicidade aguda para algas (Maurer *et al.*, 2023). Existem muitos estudos com a flumioxazina, no entanto, ainda são necessárias pesquisas adicionais para compreender completamente seus efeitos e implicações em diferentes contextos ambientais, aquáticos e terrestres. Na Tabela 1, é possível observar alguns trabalhos de relevância para o meio ambiente encontrados na literatura com o princípio ativo.

Tabela 1: Estudos publicados que investigaram os efeitos do herbicida contendo flumioxazina em diversos organismos modelos.

(Continua)

AUTORIA/ANO DE PUBLICAÇÃO	ORGANISMO-MODELO	PARÂMETRO DE AVALIAÇÃO
Saladin; Clément e Magné, (2003)	<i>Vitis vinifera</i> L.	Desenvolvimento e Metabolismo
Bigot <i>et al.</i> , (2007)	<i>Vitis vinifera</i> L.	Fotossíntese e Metabolismo
Mello <i>et al.</i> , (2021)	<i>Glycine max</i>	Seletividade
Ando; Fujisawa e Katagi, (2017)	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> , <i>Synechococcus sp.</i> , <i>Lemna sp.</i> , <i>Myriophyllum elatinoides</i>	Absorção e metabolismo
Parvan <i>et al.</i> , (2020)	<i>Allium cepa</i> L.	Genotoxicidade
Wehtje; Gilliam e Marble, (2012)	<i>Cardamine hirsuta</i> L., <i>Chamaesyce maculata</i> (L.) Small.	Germinação e tempo de vida do herbicida
Jia <i>et al.</i> (2022)	Algodão	Germinação, desenvolvimento e metabolismo
Geoffroy; Frankart e Eullaffroy, (2004)	<i>Lemna minor</i> , <i>Scenedesmus obliquus</i>	Taxa de crescimento e metabolismo
Umphres; Roelke e Netherland, (2013)	<i>Lepomis macrochirus</i> , <i>Prymnesium parvum</i>	Crescimento, sobrevivência e taxa de alimentação
Grichar, (2006)	<i>Amaranthus tuberculatus</i> , <i>Parthenium hysterophorus</i> , <i>Panicum texanum</i> , sorgo granífero	Sobrevivência, tolerância e controle de ervas daninhas

Niekamp e Johnson, (2001)	<i>Glycine max</i>	Controle de ervas daninhas e metabolismo
Silva <i>et al.</i> , (2020)	<i>Brachiaria ruziziensis</i> , <i>Zea mays</i> , <i>Euphorbia heterophylla</i> L.	Controle de ervas daninhas e desenvolvimento
Assunção <i>et al.</i> , (2017)	<i>Triticum aestivum</i>	Controle de ervas daninhas, seletividade e metabolismo
Oliveira <i>et al.</i> , (2018)	<i>Allium cepa</i> L.	Desenvolvimento
Mudge; Bultemeier e Haller, (2012)	<i>Hydrilla verticillata</i>	Metabolismo

Fonte: Do autor, 2023.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Maria Ormindia Aparecida de. HAUBRICK, Andriely Araujo. SOUZA, Rafael de. Acesso Ao Programa Nacional De Agricultura Familiar No Município De Três Rios. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**. ISSN: 2448-0959, Ano 06, Ed. 04, Vol. 13, pp. 05-28. Abril de 2021
- ANDO, D.; FUJISAWA, T.; KATAGI, T. Fate of Flumioxazin in Aquatic Plants: Two Algae (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Synechococcus* sp.), Duckweed (*Lemna* sp.), and Water Milfoil (*Myriophyllum elatinoides*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 40, p. 8813–8822, 2017.
- ANDRADE-VIEIRA, L. *et al.* Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86 (1), p. 373–382, 2014.
- ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides, aluminum, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 4, p. 626–631, 2010.
- ASSUNÇÃO, N. S. *et al.* Seletividade do flumioxazin ao trigo. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 16, n. 2, p. 122, 2017.
- BAGATINI, M. D.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de. v. 17, n. 3, p. 444–447, 2007.
- BIGOT, A. *et al.* Effect of the herbicide flumioxazin on photosynthetic performance of grapevine (*Vitis vinifera* L.). **Chemosphere**, v. 67, n. 6, p. 1243–1251, 2007.
- BOYD, N. S. Pepper and Tomato Root Uptake of Paraquat and Flumioxazin. **Weed Technology**, v. 28, n. 4, p. 626–632, 2014.
- BRUNKEN, J. N. a Systematic Study of *Pennisetum* Sect. *Pennisetum* (Gramineae). **American Journal of Botany**, v. 64, n. 2, p. 161–176, 1977.
- CAMARGO, P. R. DA S. *et al.* Toxicidade do glifosato em *Physa acuta* Draparnaud, 1805, em condições não controladas de laboratório. **Interação**, v. 21, n. 1, p. 579–590, 2020.
- CASTELHANO GEBARA, R. *et al.* Toxicity and Risk Assessment of Zinc and Aluminum Mixtures to *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea: Cladocera). [s.l.] **John Wiley & Sons, Ltd**, 2021. v. 40
- DEDECCA, D. M.; PÚRCHIO, M. J. Variedades agrícolas de trigo (*Triticum aestivum* L.): caracterização botânica de algumas variedades em experimentação em São Paulo. **Bragantia**, v. 12, n. 1–3, p. 19–53, 1952.
- DUKE, S. O. *et al.* Weed Science,. v. 39, n. 3, p. 465–473, 2016.
- EASON, Kayla *et al.* Assessment of flumioxazin soil behavior and thermal stability in aqueous solutions. **Chemosphere**, [s. l.], v. 288, n. P2, p. 132477, 2022. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132477>.

FERRELL, J. A.; VENCILL, W. K. Flumioxazin soil persistence and mineralization in laboratory experiments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 16, p. 4719–4721, 2003.

FISKESJÖ, G. The Allium test - an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 197, n. 2, p. 243–260, 1988.

FLESSNER, M. L. *et al.* Utilizing Flumioxazin for Annual Bluegrass (*Poa annua*) Control in Bermudagrass Turf. **Bragantia**, v. 27, n. 3, p. 590–595, 2013.

GEOFFROY, L.; FRANKART, C.; EULLAFFROY, P. Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin. **Environmental Pollution**, v. 131, n. 2, p. 233–241, 2004.

GRICHAR, W. J. Weed control and grain sorghum tolerance to flumioxazin. **Crop Protection**, v. 25, n. 2, p. 174–177, 2006.

HAVEY, M. J. 4 - Onion: *Allium cepa* L. A2 - KALLOO, G. **Genetic Improvement of Vegetable Crops**, p. 35–49, 1993.

IRION, Uwe; NUSSLEIN-VOLHARD, Christiane. Developmental genetics with model organisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 119, n. 30, p. 1–10, 2022.

JANG, J. E. *et al.* Flower morphology of *Allium* (Amaryllidaceae) and its systematic significance. **Plant Diversity**, v. 46, n. 1, p. 3–27, 2023.

KONG, D. *et al.* Phytochemical investigation on *Raphanus sativus* L. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 105, 2022.

KRAEHMER, H. *et al.* Herbicides as Weed Control Agents: State of the Art: I. Weed Control Research and Safener Technology: The Path to Modern Agriculture. **Plant Physiology**, v. 166, n. 3, p. 1119–1131, 2014.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71–81, 2009.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. DE. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, n. 117, p. 518–534, 2018.

LOPES-FERREIRA, Monica *et al.* Impact of Pesticides on Human Health in the Last Six Years in Brazil. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 19, n. 6, 2022.

LUBER, J. *et al.* Investigation on the effects of guava (*Psidium guajava* L.) infusions on

germination, root tips and meristematic cells of *Latuca sativa*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 2, p. 903–913, 2015.

MAHONEY, K. J.; SHROPSHIRE, C.; SIKKEMA, P. H. Weed Management in Conventional- and No-Till Soybean Using Flumioxazin/Pyroxasulfone. **Weed Technology**, v. 28, n. 2, p. 298–306, 2014.

MAURER, L. *et al.* Contamination Pattern and Risk Assessment of Polar Compounds in Snow Melt: An Integrative Proxy of Road Runoffs. **Environmental Science and Technology**, v. 57, n. 10, p. 4143–4152, 2023.

MELLO, H. M. G. A. DE *et al.* Exploração Do Residual De Flumioxazin Por Meio De Doses E Associações a Outros Herbicidas Em Pré-Emergência Na Soja. **Ciências Agrárias: o avanço da ciência no Brasil - Volume 1**, p. 473–486, 2021.

MILKE, L. M. *et al.* Nutritional evaluation of millet at different seeding rates and cutting heights. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 55, n. 1, p. 1–8, 2018.

MOREIRA, R. A.; MANSANO, A. DA S.; ROCHA, O. Taxas de filtração e ingestão de uma microalga por *Philodina roseola* (Rotifera: Bdelloidea). **Acta Biologica Colombiana**, v. 21, n. 2, p. 325–334, 2016.

MUDGE, C. R.; BULTEMEIER, B. W.; HALLER, W. T. The Influence of pH and Light on Hydrilla (*Hydrilla verticillata*) Photosynthesis and Chlorophyll after Exposure to Flumioxazin. **Weed Science**, v. 60, n. 1, p. 4–9, 2012.

NIEKAMP, J. W.; JOHNSON, W. G. Weed management with sulfentrazone and flumioxazin in no-tillage soybean (*Glycine max*). **Crop Protection**, v. 20, n. 3, p. 215–220, 2001.

OH, Myung Min; CAREY, Edward E.; RAJASHEKAR, C. B. Environmental stresses induce health-promoting phytochemicals in lettuce. **Plant Physiology and Biochemistry**, [s. l.], v. 47, n. 7, p. 578–583, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2009.02.008>.

OLIVEIRA, M. G. *et al.* Tolerância da cebola implantada por semeadura direta ao flumioxazin aplicado em pós-emergência inicial. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 17, n. 2, p. 585, 2018.

PALMIERI, M. J. *et al.* Cytotoxicity of Spent Pot Liner on *Allium cepa* root tip cells: A comparative analysis in meristematic cell type on toxicity bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 133, p. 442–447, 2016.

PARVAN, L. G. *et al.* Bioensaio com *Allium cepa* revela genotoxicidade de herbicida com flumioxazina. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 11, n. 0, p. 1–10, 2020.

PERTILE, M. *et al.* Responses of soil microbial biomass and enzyme activity to herbicides imazethapyr and flumioxazin. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2020.

PLONKA, J. *et al.* Effect of herbicide stress on the content of tyramine and its metabolites in Japanese radish sprouts (*Raphanus sativus*). **Journal of Food Composition and Analysis**, v.

106, n. July 2021, 2022.

RICO, Gabrielle; CAVICHIOLI, Fábio Alexandre . “Análise geral do uso de agrotóxicos no brasil.” **Revista Interface Tecnológica**, 2018.

RONCO, A., BÁEZ, M. C. D., GRANADOS, Y. P., 2004. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas – Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones. In: Morales, G. C. (ed). Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, Ottawa. 2004.

RUSSELL, J. J. *et al.* Non-model model organisms. [s.l.] **BMC Biology**, 2017. v. 15

SALADIN, G.; CLÉMENT, C.; MAGNÉ, C. Stress effects of flumioxazin herbicide on grapevine (*Vitis vinifera* L.) grown in vitro. **Plant Cell Reports**, v. 21, n. 12, p. 1221–1227, 2003.

SILVA, V. *et al.* Combined effect of copper sulfate and water temperature on key freshwater trophic levels – Approaching potential climatic change scenarios. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 148, n. June 2017, p. 384–392, 2018.

SILVA, P. V. *et al.* Eficácia do herbicida flumioxazin no controle de *Euphorbia heterophylla*, na aplicação sobre diferentes tipos de palha e simulações de chuva. **Revista De Ciências Agrárias (Lisboa)**, v. 43, n. 3, p. 324–332, 2020.

SOSEDOVA, L. M., TITOV, E. A., NOVIKOV, M. A., SHURYGINA, I. A., & SHURYGIN, M. G. (2021). Impacto das nanopartículas metálicas na biocenose aquática (revisão da literatura). **Higiene e saneamento**, 100(1), 30-35. Recuperado de <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2021-100-1-30-35>

STANGARLIN, J. R. *et al.* A defesa vegetal contra fitopatógenos. **Scientia Agraria Paranaensis**, v. 10, p. 24, 2010.

UMPHRES, G. D.; ROELKE, D. L.; NETHERLAND, M. D. The potential algacide flumioxazin has little effect on growth, survival and feed conversion of the bluegill sunfish *Lepomis macrochirus*. **Aquaculture**, v. 380–383, p. 80–83, 2013.

VERWAAIJEN, Bart *et al.* Assembly of the *Lactuca sativa*, L. cv. Tizian draft genome sequence reveals differences within major resistance complex 1 as compared to the cv. Salinas reference genome. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 267, n. December 2017, p. 12–18, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.12.021>.

WEHTJE, G.; GILLIAM, C. H.; MARBLE, S. C. Duration of Flumioxazin-Based Weed Control in Container-Grown Nursery Crops. **Weed Technology**, v. 26, n. 4, p. 679–683, 2012.

Capítulo 1. ECOTOXICIDADE DE UM HERBICIDA À BASE DE FLUMIOXAZINA EM ORGANISMOS MODELOS VEGETAIS

RESUMO

Herbicidas à base do princípio ativo flumioxazina são frequentemente empregados da agricultura para o controle de plantas invasoras de folhas largas. O uso desses herbicidas contendo flumioxazina tem aumentado significativamente nos últimos anos devido sua eficácia o que, por consequência, gera preocupações em relação aos possíveis impactos ambientais. Logo, este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos de uma formulação comercial à base de flumioxazina em diferentes quatro organismos de modelos vegetais: *Lactuca sativa* L., *Raphanus sativus* L., *Pennisetum glaucum* L. e *Triticum aestivum* L. sendo determinada germinação e desenvolvimento inicial das plântulas. Além disso, foram analisados os efeitos genotóxicos do herbicida em células de ponta de raiz de *Allium cepa* L. Os resultados revelaram que o herbicida à base de flumioxazina provocou efeitos significativos no desenvolvimento da plântula para os quatro modelos avaliados, principalmente em concentrações superiores às recomendadas para uso agrícola. Observou-se sensibilidade diferencial entre as espécies estudadas, sendo a sensibilidade mais pronunciada em *P. glaucum* L., destacando-se a importância de avaliar os efeitos em uma variedade de organismos. As respostas de genotoxicidade em *A. cepa* L. mostraram efeitos em dose seis vezes maior que a dose de uso no campo. No entanto, em doses dentro das recomendações, o herbicida à base de flumioxazina não apresentou toxicidade para as espécies de vegetais testadas. Esses achados destacam a importância dos modelos vegetais em estudos de ecotoxicologia para promover uma agricultura mais sustentável.

Palavras-chave: modelos vegetais; flumioxazina; ecotoxicidade; mutagenicidade; micronúcleo.

ABSTRACT

Flumioxazin is an active ingredient in a herbicide often used to control broad-leaved weeds in agriculture. Due to its efficacy, the use of the commercial product has increased significantly in recent years. This study investigated the effects of the commercial formulation of flumioxazin on four plant models, evaluating its impact on germination and seedling development. In addition, the genotoxic effects on *Allium cepa* L. were analyzed. The species used were *Lactuca sativa* L., *Raphanus sativus* L., *Pennisetum glaucum* L. and *Triticum aestivum* L.. The results showed that flumioxazin had significant effects on the four models, especially at concentrations higher than those recommended for agricultural use, above 0.05 g L⁻¹. Differential sensitivity was observed between the species studied, with the most pronounced sensitivity in *P. glaucum* L., highlighting the importance of assessing the effects on a variety of organisms. Genotoxicity responses in *A. cepa* L. showed effects at a dose 6 times higher than the dose used in the field. Despite this, at doses within the recommendations, flumioxazin was considered a low-risk herbicide in the terrestrial environment. These findings underscore the need for caution in the use of agrochemicals and highlight the importance of plant models in ecotoxicology studies to promote more sustainable agriculture.

Keywords: plant models; flumioxazin; ecotoxicity; mutagenicity; micronucleus.

INTRODUÇÃO

A crescente demanda alimentar global impulsiona a ampla utilização de agrotóxicos na produção agrícola. Os agrotóxicos desempenham uma função significativa nos procedimentos do setor agrícola, sendo empregados para o controle de organismos indesejados e classificados de acordo com o seu alvo biológico como herbicidas (plantas daninhas), fungicidas (fungos) e inseticidas (insetos) (Walter, 2002). Desde 2016, os herbicidas têm se destacado como o agrotóxico mais amplamente aplicados na agricultura, correspondendo a aproximadamente 50% do total utilizados em todo o mundo (Mojiri *et al.*, 2020). Dentre esses herbicidas, merece destaque àqueles à base do princípio ativo flumioxazina, muito utilizado na agricultura devido à sua eficácia no controle de diversas espécies de plantas daninhas (Mahoney; Shropshire; Sikkema, 2014; Wehtje; Gilliam; Marble, 2012). Contudo, é importante ressaltar que o uso indiscriminado de herbicidas pode acarretar impactos ambientais significativos ao meio ambiente, incluindo a contaminação do solo (Chen *et al.*, 2021) e da água (Geoffroy; Frankart; Eullaffroy, 2004), assim como efeitos adversos sobre organismos não-alvo.

Herbicidas à base de flumioxazina são empregados em tratamentos de pré-emergência para o controle de plantas invasoras (Boyd, 2014; Ferrell; Vencill, 2003). A flumioxazina é classificada no grupo das N-fenil-ftalamidas (WSSA, 2024) e seu mecanismo de ação nas plantas alvo envolve a inibição da protoporfirinogênio oxidase (protox), uma enzima responsável pela síntese de clorofila que catalisa a oxidação do protoporfirinogênio IX para protoporfirina IX (Saladin; Clément; Magné, 2003). A inibição do Protox resulta no acúmulo de protoporfira, o primeiro agente absorvedor de luz e precursor da clorofila. Após uma série de reações em cadeia, ocorre a perda de clorofila e carotenoides, juntamente com vazamento de membranas, culminando na desidratação das células e organelas celulares, levando-as à morte (Anastassiadou *et al.*, 2020).

No entanto, os herbicidas não agem somente no organismo ou planta alvo, afetando frequentemente plantas e organismos não-alvo. Alguns estudos recentes observaram que a flumioxazina causou fitotoxicidade em algodão (Jia *et al.*, 2022), nos estágios iniciais de crescimento da cebola (Oliveira *et al.*, 2018) entre outros. Nesse cenário, a realização de ensaios que avaliem a toxicidade da flumioxazina presente em herbicidas comerciais torna-se de extrema importância para determinar a extensão dos efeitos causados pelo uso indiscriminado de herbicidas à base desse princípio ativo, no meio ambiente e nos organismos não-alvos nele presentes.

Organismos modelos diversos, como as plantas, são notáveis para a avaliação de impactos de agrotóxicos e outros contaminantes no ambiente devido às suas vantagens, as quais destacam-se por serem modelos simples, econômicos e de fácil manipulação (Fiskesjö, 1988), além disso, não requerem aprovação em Comitês de Bioética (Andrade-Vieira; Palmieri; Davide, 2017; Reis *et al.*, 2017). Dentre os ensaios possíveis de serem realizados com os modelos vegetais, ensaios de germinação e protrusão da radícula e bioensaios de genotoxicidade, constituem métodos biológicos essenciais empregados na avaliação dos níveis de poluição ocasionados por agentes tóxicos uma vez que as sementes são sensíveis a alterações em diversas condições ambientais e a germinação é um estágio crítico no ciclo de vida das plantas. Adicionalmente o ensaio de desenvolvimento complementa os dados de germinação uma vez que as raízes, no ambiente, constituem o primeiro órgão do vegetal que entra em contato com os poluentes ambientais (Andrade-Vieira *et al.*, 2012). Quando esses ensaios são aliados ao ensaio de genotoxicidade, os quais avaliam os efeitos tóxicos de substâncias, em células de raiz, através da análise do ciclo celular e da presença de aberrações cromossômicas e anormalidades nas células em divisão, têm-se uma visão completa dos efeitos da substâncias em questão (Luber *et al.*, 2015; Palmieri *et al.*, 2014). Visto que efeitos não previamente observados na germinação e desenvolvimento podem ser explicados pelos efeitos sobre a célula e os cromossomos uma vez que as mudanças no crescimento da raiz ocorrem em função de respostas ao nível celular.

Ao testar a toxicidade de um herbicida comercial à base de flumioxazina em diferentes tipos de vegetais, incluindo monocotiledôneas e dicotiledôneas, formulamos as hipóteses de que: nas concentrações recomendadas para uso agrícola, a flumioxazina não causará efeitos significativos no índice de germinação e no crescimento radicular das espécies vegetais testadas; e haverá variações significativas na sensibilidade ao herbicida entre os modelos vegetais, com algumas espécies demonstrando maior resistência ou suscetibilidade com base em seus parâmetros de crescimento e desenvolvimento. No nível celular, espera-se uma sensibilidade maior da espécie utilizada, refletida na toxicidade da substância avaliada.

Destarte, o objetivo deste estudo foi avaliar a ecotoxicidade de um herbicida comercial à base de flumioxazina em modelos vegetais distintos. O escopo deste estudo abrange a análise dos efeitos do herbicida sobre o crescimento e desenvolvimento dos modelos vegetais *Lactuca sativa* L., *Raphanus sativus* L., *Pennisetum glaucum* L. e *Triticum aestivum* L.. Além disso, busca-se investigar os potenciais efeitos genotóxicos e mutagênicos do herbicida em células de ponta de raiz de *Allium cepa* L.. A compreensão dos efeitos da flumioxazina nas plantas pode fornecer informações essenciais sobre sua segurança ambiental. Isso é

fundamental para evitar impactos adversos nos ecossistemas naturais, incluindo solos e corpos d'água.

MATERIAIS E MÉTODOS

Modelos de estudo

Foram selecionadas espécies vegetais como organismos modelos representantes de produtores terrestres para conduzir testes de inibição da germinação e crescimento. Duas dicotiledôneas, alface (*Lactuca sativa* L. var. Great lakes) e rabanete (*Raphanus sativus* L. var. Crímon gigante) e, duas monocotiledôneas, milho (*Pennisetum glaucum* L.) e trigo (*Triticum aestivum* L.), foram utilizadas. Para os ensaios de genotoxicidade, foram usadas sementes de cebola (*Allium cepa* L. var. Baia periforme).

As sementes de alface, cebola e rabanete são da marca Topseed Blueline, adquiridas em comércio local, enquanto as sementes de milho foram obtidas por meio de comércio *online*, e as de trigo foram provenientes do Banco de Germoplasma da Universidade Federal de Lavras (UFLA – MG).

Soluções teste

As soluções-teste foram preparadas em água destilada a partir do produto comercial Sumyzin 500 SC[®] contendo 500 g L⁻¹ do princípio ativo de flumioxazina. As concentrações-teste para os modelos vegetais dos ensaios de germinação e desenvolvimento foram determinadas com base em ensaios preliminares com o herbicida utilizando a *Lactuca sativa* L., literatura e dose determinada para aplicação em campo (0,005 à 0,025 g L⁻¹), segundo a bula do fabricante. As doses pré-definidas foram: 1: 0,005 g L⁻¹; 2: 0,025 g L⁻¹; 3: 0,05 g L⁻¹; 4: 0,09 g L⁻¹; 5: 0,16 g L⁻¹; 6: 0,29 g L⁻¹; 7: 0,52 g L⁻¹; 8: 0,94 g L⁻¹; 9: 1,70 g L⁻¹; 10: 3,06 g L⁻¹; 11: 5,50 g L⁻¹ e 12: 9,91 g L⁻¹. O controle negativo utilizou apenas água destilada.

As concentrações do herbicida comercial testadas para o ensaio de genotoxicidade foram previamente definidas com base nas doses recomendadas para uso no campo (0,005 g L⁻¹ a 0,025 g L⁻¹), logo as doses testadas foram: 0,072 g L⁻¹, 0,107 g L⁻¹ e 0,160 g L⁻¹.

Exposição das sementes e delineamento experimental

Os ensaios foram realizados segundo o padrão internacional ISO 18763:2016 que determina os efeitos tóxicos de poluentes na germinação e crescimento de plantas. Para todos os modelos vegetais testados o experimento foi plotado com delineamento inteiramente ao acaso contendo 5 repetições. Cada repetição foi representada por uma placa de Petri de polietileno de 9 cm de diâmetro contendo 25 sementes em cada placa, as quais foram dispostas sobre papel filtro de germinação embebido com 3 mL das soluções testadas. As placas foram armazenadas em BOD (Demanda Bioquímica de Oxigênio) à temperatura de 24 °C, sem iluminação por 96 horas.

Para as análises macroscópicas, a germinação das sementes foi monitorada a cada 12 horas ao longo das 96 horas totais do experimento. Considerou-se que as sementes com protrusão da raiz estavam germinadas, calculando a porcentagem de germinação após 96 horas de exposição e o Índice de Velocidade de Germinação (IVG) (Carmello; Cardoso, 2018; Mangure, 1962; Palmieri *et al.*, 2014). O peso fresco das sementes germinadas em cada placa de Petri foi obtido após 96 horas de exposição usando uma balança de precisão (Shimadzu® AU220), e em seguida, as placas foram armazenadas a -4°C. Para as medições das plântulas (raiz e parte aérea), as placas foram mantidas em temperatura ambiente, e as plântulas foram dispostas e esticadas em uma superfície escura. O comprimento da raiz e da parte aérea foi medido com um paquímetro digital (Messen 150mm/6” 0.01mm) com precisão de duas casas decimais, sendo posteriormente somados.

Genotoxicidade – ensaio com *A. cepa* L.

Para as análises dos efeitos do herbicida no ciclo celular, foi seguida a metodologia previamente descrita por Palmieri *et al.*, (2016). Inicialmente, trinta sementes de *Allium cepa* L. (var. Baia periforme) foram dispostas em placas de Petri (n=6), contendo água destilada para a emergência das raízes. Quando as raízes atingiram aproximadamente 0,5 mm, foram expostas às soluções do herbicida. Esses ensaios compreenderam a exposição de dez raízes germinadas de cada placa à solução contendo flumioxazina e ao grupo controle, por um período de 24 horas.

Para o preparo e avaliação das lâminas, as raízes foram lavadas com água destilada (três vezes por 5 minutos) e submetidas à hidrólise em HCl 5 N a temperatura ambiente por 20 minutos. Foram coletadas duas populações de células do tipo M2, que indicam células do meristema proximal que passaram por diversas divisões celulares (Perilli; Di Mambro;

Sabatini, 2012). As células correspondentes à ponta da raiz foram colocadas em lâminas e delicadamente esmagadas com lamínula em uma gota de solução de orceína acética a 2%. As células M2 foram avaliadas em um microscópio Zeiss com ampliação de 40x e, posteriormente, imagens foram captadas com ampliação de 100x. Os parâmetros considerados no ciclo celular foram os seguintes: o Índice Mitótico (IM), calculado como a razão entre o número de células em divisão (prófase, metáfase, anáfase e telófase) e o número total de células observadas, para avaliar a citotoxicidade; a presença de micronúcleos (MN), determinada pela frequência de células com micronúcleos (Luber *et al.*, 2015), para analisar a mutagenicidade do herbicida; e aberrações cromossômicas, para avaliar a genotoxicidade (Leme; Marin-Morales, 2009).

Análises estatísticas

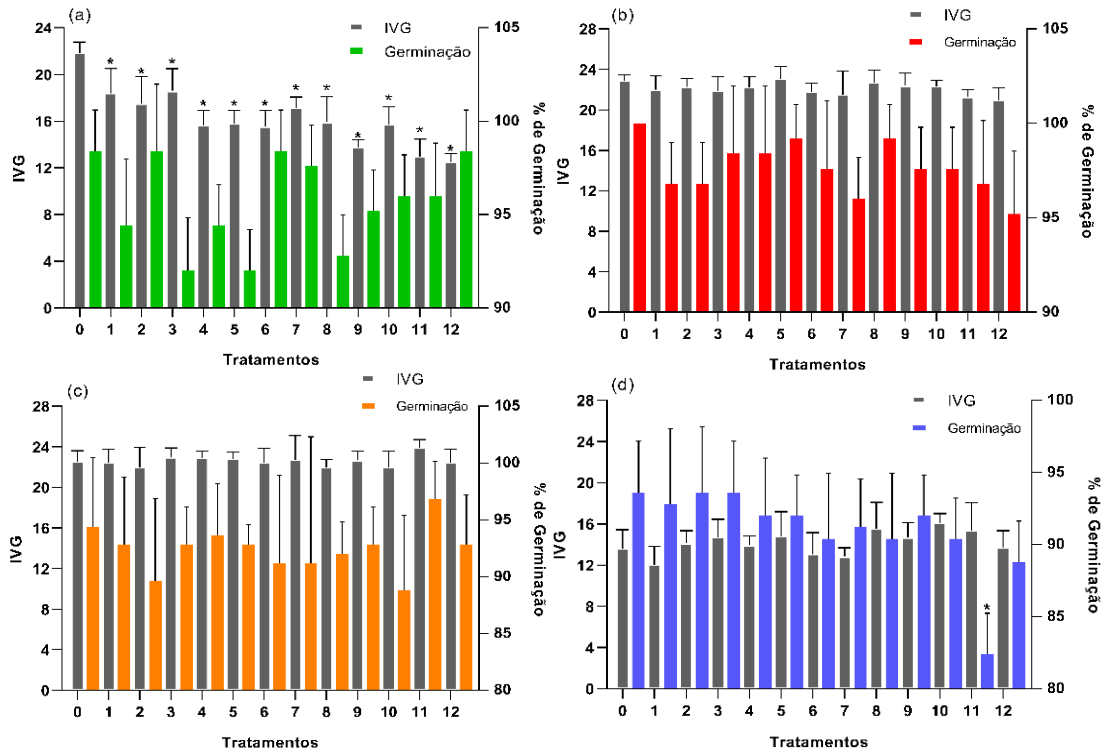
Os resultados obtidos para germinação, IVG, medidas (raiz e parte aérea), peso fresco e as avaliações de genotoxicidade foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e seguido pelo Teste de Dunnett utilizando-se o software Minitab 17, e as diferenças entre os tratamentos foram consideradas significativas com níveis de significância de 95% ($p < 0,05$). Os valores de concentração de inibição do crescimento ($EC_{50\%}$) foram calculados utilizando o software GraphPad Prism (versão 8).

RESULTADOS

Germinação e desenvolvimento das plântulas

Na figura 1, observa-se uma redução significativa (Dunnett, $p = 0,043$) no índice de velocidade de germinação (IVG) da alface (a) em comparação com o controle, começando a partir da primeira concentração de flumioxazina ($0,005 \text{ g L}^{-1}$). Apesar da redução do IVG, a porcentagem de germinação permaneceu estável em relação ao tratamento controle, não havendo diferenças. Para o rabanete (b), milho (c) e trigo (d) não houve diferenças significativas no IVG e na porcentagem de germinação em comparação com o controle, exceto na concentração de $5,50 \text{ g L}^{-1}$ para o trigo na germinação.

Figura 1: Índice de velocidade de germinação (IVG) e porcentagem de germinação dos modelos vegetativos em (a) *Lactuca sativa*, (b) *Raphanus sativus*, (c) *Pennisetum glaucum* e (d) *Triticum aestivum* após 72h de exposição ao herbicida à base de flumioxazina.



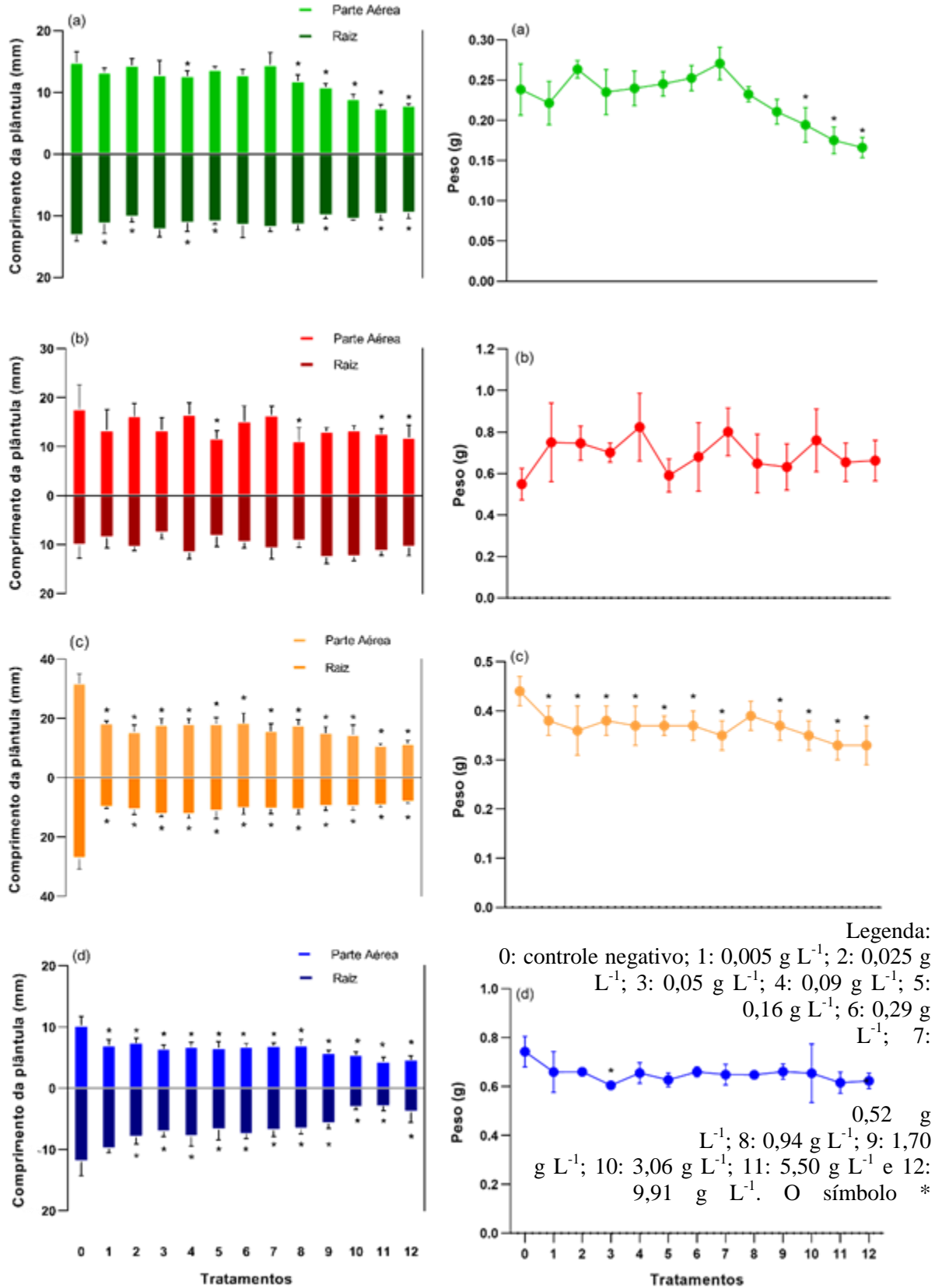
Legenda: 0: controle negativo; 1: 0,005 g L⁻¹; 2: 0,025 g L⁻¹; 3: 0,05 g L⁻¹; 4: 0,09 g L⁻¹; 5: 0,16 g L⁻¹; 6: 0,29 g L⁻¹; 7: 0,52 g L⁻¹; 8: 0,94 g L⁻¹; 9: 1,70 g L⁻¹; 10: 3,06 g L⁻¹; 11: 5,50 g L⁻¹ e 12: 9,91 g L⁻¹. O símbolo * (asterisco) indica diferença estatística (Dunnett p<0,05) em relação ao tratamento controle. As barras representam o desvio-padrão da média.

Fonte: Do autor, 2023.

A análise dos dados revelou respostas distintas de cada espécie em relação ao comprimento da raiz e da parte aérea e peso final das plântulas (Figura 2) após exposição ao herbicida à base de flumioxazina. O comprimento da raiz da alface foi afetado a partir da primeira concentração do herbicida (0,005 g L⁻¹), indicando uma sensibilidade precoce. A redução no comprimento da parte aérea pode ser observada na quarta concentração (0,09 g L⁻¹), sendo mais pronunciada a partir da oitava dose de flumioxazina (0,94 g L⁻¹). O peso final da alface demonstrou diferença significativa (Dunnett, p<0,010) a partir da décima concentração testada (3,06 g L⁻¹), indicando uma sensibilidade maior em concentrações mais elevadas. O rabanete mostrou resistência no comprimento da raiz, não apresentando diferenças significativas em relação ao controle. A parte aérea, entretanto, foi afetada a partir da quinta concentração do herbicida (0,16 g L⁻¹), e o peso final do rabanete não apresentou

alterações significativas. Para o milho, o comprimento da raiz e a parte aérea foram reduzidos a partir da primeira ($0,005 \text{ g L}^{-1}$) e segunda ($0,025 \text{ g L}^{-1}$) concentração do herbicida, respectivamente. O peso final do milho foi consistentemente reduzido em todas as concentrações, indicando uma sensibilidade constante ao flumioxazina. O trigo apresentou reduções no comprimento da raiz e da parte aérea a partir da primeira concentração do herbicida ($0,005 \text{ g L}^{-1}$). Apesar disso, o peso final do trigo não foi significativamente afetado, sugerindo uma possível tolerância relativa ao flumioxazina.

Figura 2: Comprimento final de raiz e parte aérea das plântulas (mm) e peso final das plântulas (g) dos modelos vegetativos (a) *Lactuca sativa*, (b) *Raphanus sativus*, (c) *Pennisetum glaucum* e (d) *Triticum aestivum* após 72h de exposição ao herbicida à base de flumioxazina.



(asterisco) indica diferença estatística (Dunnet $p < 0,05$) em relação ao tratamento controle. As barras representam o desvio-padrão da média.

Fonte: Do autor, 2023.

As EC_{50} (Tabela 1) fornecem uma visão detalhada da sensibilidade de cada espécie e parâmetro estudado ao herbicida flumioxazina. Esses valores de EC_{50} representam as concentrações do herbicida necessárias para causar efeito em 50% da população em comparação com o controle. Valores menores indicam maior sensibilidade ao herbicida e valores maiores correspondem à resistência. Esta análise dos valores de EC_{50} proporciona uma compreensão mais aprofundada da resposta de cada espécie aos efeitos do herbicida, fornecendo informações valiosas para a tomada de decisões em práticas agrícolas sustentáveis.

Na germinação e IVG, a alface e o milho demonstraram ser altamente sensível, com uma EC_{50} extremamente baixa, aproximando de zero (Tab. 1). O trigo é a espécie menos sensível, com uma EC_{50} intermediária comparado às demais espécies e o rabanete apresenta uma EC_{50} mais alta, indicando uma menor sensibilidade ao herbicida. Os cálculos demonstraram que a alface é altamente sensível, enquanto o milho é menos sensível ao herbicida contendo flumioxazina. Rabanete e trigo estão em níveis intermediários. Em relação ao peso, a alface tem uma EC_{50} elevada, indicando baixa sensibilidade. Já o rabanete mostra uma EC_{50} relativamente alta e o trigo é a espécie mais sensível, seguido pelo milho. Quanto às medidas de raiz e parte aérea a alface é menos sensível na parte aérea em comparação com a raiz, ao contrário do rabanete. O milho mostra uma EC_{50} mais alta na parte aérea em comparação com a raiz. E o trigo é mais sensível na raiz do que na parte aérea. Nas medidas macroscópicas, o milho é mais sensível em todas essas medidas e, por ordem de sensibilidade à toxicidade da flumioxazina segue: milho < alface < rabanete < trigo.

Tabela 1: Valores da concentração de inibição do crescimento (EC_{50}), em $mg L^{-1}$, do herbicida Sumysin 500 SC[®], das plantas modelos tratadas em 72 horas.

(continua)

Parâmetros	Espécies			
	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Raphanus sativus</i>	<i>Pennisetum glaucum</i>	<i>Triticum aestivum</i>
Germinação	1,810e-012	318,5	0,003925	4381
IVG	69,13	612,7	0,000	132,4
Peso	1253	126,5	16,42	9,944
Parte aérea	1143	106,6	12,22	39,94

Raiz	72,10	160,4	3,286	107,3
------	-------	-------	-------	-------

Fonte: Do autor, 2023.

Análise genotóxica de *A. cepa* L.

Os dados apresentados na Tabela 2 demonstram que a frequência de células em divisão no ciclo celular de *A. cepa* L., representado pelo índice mitótico, não apresentou diferença em relação ao controle negativo ($p > 0,682$ pelo Teste de Dunnet). Ao analisar a presença de micronúcleos (MN) nessas mesmas células, foi observada uma diferença estatisticamente significativa (Dunnet, $p < 0,001$) para a maior dose testada ($0,160 \text{ g L}^{-1}$) (Tab. 2).

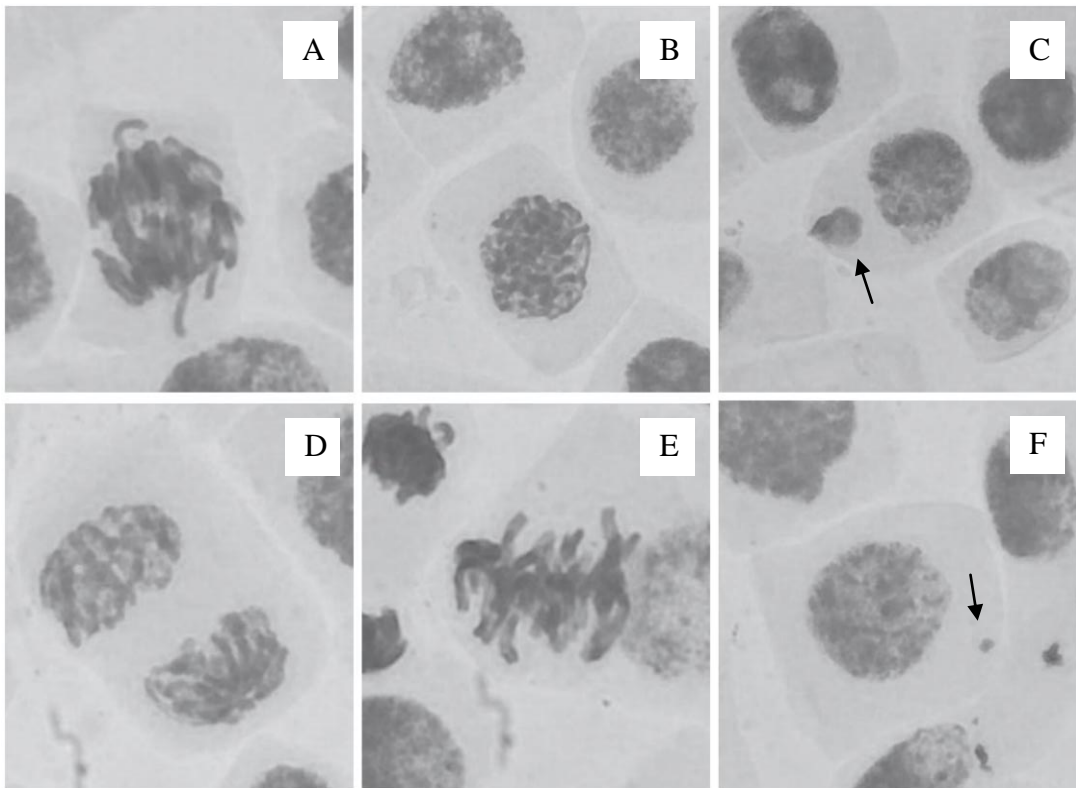
Tabela 2: Índice mitótico (IM) e frequência de alterações no ciclo celular (micronúcleos) em células M2 de *Allium cepa* L. após 24 horas de exposição ao herbicida à base de flumioxazina.

TRATAMENTOS (g L^{-1})	CÉLULAS EM DIVISÃO	MICRONÚCLEOS
Controle	3,95±5,21	0,00±0,00
0,072	2,08±3,32	0,64±1,08
0,107	6,10±5,50	1,26±1,27
0,160	4,74±6,51	3,66±1,85*

Legenda: O símbolo (asterisco) * indica diferença estatisticamente significativa pelo Teste de Dunnet, $p < 0,05$. Fonte: Do autor, 2023.

A figura 3 (C e F) mostra alguns exemplos de MN encontrados na concentração de $0,160 \text{ g L}^{-1}$ em diferentes tamanhos e algumas células analisadas (A, B, D e E).

Figura 3: Células da região M2 observadas em ponta de raiz de *Allium cepa* L., expostas aos tratamentos com o herbicida à base de flumioxazina.



Legenda: A – Anáfase inicial; B – Prófase; C – Micronúcleo; D – Anáfase tardia; E – Metáfase; F – Micronúcleo. Setas indicam a presença de micronúcleo.

Fonte: Do autor, 2023.

DISCUSSÕES

O estudo em questão utilizou quatro modelos distintos para investigar os efeitos tóxicos de diversas concentrações de flumioxazina presente no herbicida Sumysin 500 SC[®]. E a partir de sementes de alface, rabanete, milho e trigo, foi possível analisar os índices de germinação e desenvolvimento inicial da plântula, enquanto células de ponta de raiz de cebola foram utilizadas para avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos.

Em conjunto, os resultados destacam a diversidade nas respostas das espécies ao herbicida. Enquanto a alface mostrou sensibilidade desde as concentrações mais baixas, o rabanete e o trigo exibiram resistência em algumas medidas macroscópicas. O milho, por outro lado, revelou-se particularmente sensível para todas as variáveis macroscópicas analisadas. Compostos químicos que entram em contato com as sementes podem exercer influência na germinação, podendo tanto inibir quanto promover esse processo, o que, por

consequente, pode interferir no desenvolvimento subsequente da plântula (Sobrero e Ronco, 2004).

Efeitos da flumioxazina na germinação e crescimento radicular dos modelos vegetais

Neste estudo incluímos organismos modelos como *L. sativa* (alface) *R. sativus* (rabanete), *P. glaucum* (milheto) e *T. aestivum* (trigo), que são modelos vegetais previstos pela Organization for Economic Co-operation and Development (OECD - 208) e pela normativa ISO 18763:2016 para testes de fitotoxicidade que envolvem germinação de sementes e desenvolvimento de plântulas. Além de desempenharem um papel significativo como bioindicadores, trigo e cebola estão entre as espécies agricultáveis para as quais o herbicida é recomendado para aplicação em campo.

A redução significativa no Índice de Velocidade de Germinação (IVG) da alface a partir da menor concentração de flumioxazina ($0,005 \text{ g L}^{-1}$) indica uma sensibilidade precoce dessa espécie ao herbicida. Esses achados corroboram com estudos anteriores que destacam a alface como um organismo modelo sensível em ensaios ecotoxicológicos com herbicida (Andrade-Viera 2014; Lubber 2015). A estabilidade na porcentagem de germinação, apesar da redução no IVG, sugere que a presença de flumioxazina pode afetar a velocidade de germinação sem comprometer a taxa de sucesso total de protrusão da raiz, ressaltando a importância de avaliar múltiplos parâmetros. Assim como previsto por Andrade-Vieira; Palmieri; Davide, (2017) e Valerio; García; Peinado, (2007), a germinação das sementes não é o parâmetro mais sensível para analisar os efeitos de poluentes, no entanto, é uma ferramenta básica que complementa outros parâmetros, por exemplo, o IVG e ensaios de genotoxicidade.

Contrastando com a alface, o rabanete mostrou resistência ao herbicida quando avaliado sob a ótica do comprimento da raiz, indicando uma capacidade de tolerância ao flumioxazina. No entanto, a parte aérea foi afetada, apresentando reduções de tamanho, em concentrações mais elevadas, revelando uma resposta diferenciada entre os órgãos da planta. O estresse vegetal é definido como uma condição na qual uma alteração nas condições ambientais perturba o funcionamento adequado da planta, induzindo ajustes metabólicos e estruturais. Alguns pesquisadores têm destacado a influência de agentes estressores associados ao acúmulo da enzima catecolamina nas plantas, resultado da ativação ou inibição de tirosina hidroxilase e tirosina descarboxilase, contribuindo para as respostas de defesa das plantas (Plonka *et al.*, 2022).

O milho, por sua vez, demonstrou sensibilidade constante ao flumioxazina, apresentando reduções tanto no comprimento da raiz quanto na parte aérea desde as concentrações mais baixas testadas. Esses resultados são consistentes com estudos que destacam o milho como uma espécie sensível a herbicidas. Na literatura científica, evidenciou-se previamente que resíduos do herbicida sulfentrazone exerceram um impacto significativo sobre o crescimento e o rendimento das culturas de milho (Blanco; Velini, 2005). Assim, apresentando os menores valores para as Concentrações Efetivas 50% (EC₅₀) (Tab. 1) que destacaram a sensibilidade diferencial das espécies estudadas à flumioxazina, e de acordo com os resultados das medidas macroscópicas (Fig. 2), evidenciam que o milho é a espécie mais sensível ao referido herbicida.

O trigo, apesar de evidenciar reduções no comprimento da raiz e parte aérea em concentrações iniciais, não apresentou um impacto significativo em seu peso final quando comparado ao grupo controle. Contudo, é relevante ressaltar que as concentrações mais baixas testadas nesta pesquisa correspondem às doses recomendadas para aplicação em campo, sugerindo que a flumioxazina não exibe seletividade como herbicida ao afetar um tipo de cultura para o qual é recomendada. Nas discussões de Iwaniuk *et al.*, (2021) e Siddiqui e Ahmed (2001), os autores relatam sobre o potencial da flumioxazina em alterar biomoléculas do trigo, reduzindo a concentração de carboidratos e proteínas nos tecidos.

Os parâmetros comprometidos pelo herbicida, como os de desenvolvimento das plântulas, podem estar associados com os mecanismos de ação conhecidos da flumioxazina. A inibição da protoporfirinogênio oxidase (Protox), enzima essencial para a síntese de clorofila, pode explicar os efeitos observados, como a redução no comprimento da parte aérea devido à diminuição da clorofila. O tecido da planta, após a protrusão da raiz e da parte aérea, fica exposto e suscetível com o contato com o herbicida.

Embora os parâmetros analisados tenham revelado efeitos da formulação comercial de flumioxazina nos modelos vegetais, é importante destacar que grande parte desses efeitos ocorreu em concentrações acima da dose recomendada para uso no campo. Apesar disso, e em consonância com achados semelhantes em outros estudos (Chen *et al.*, 2021; Mello *et al.*, 2021), ainda não podemos afirmar categoricamente que o herbicida comercial à base de flumioxazina oferece baixo risco para o ambiente terrestre. É necessário realizar mais estudos que incluam a avaliação de impactos na fauna, a degradação dos solos e as alterações físicas e químicas nos organismos modelos para obter uma compreensão mais completa dos potenciais riscos ambientais.

Efeitos da flumioxazina no ciclo celular de *Allium cepa* L.

Micronúcleos (MN) são pequenos corpos extranucleares encontrados no citoplasma próximo ao núcleo parental. Ao analisar a presença de micronúcleos (MN), é sabido que estes surgem como resultado do desenvolvimento de algumas aberrações cromossômicas que não se dividiram normalmente durante a fase da interfase celular (Kwasniewska; Bara, 2022), tais como quebras e perdas cromossômicas (Leme; Marin-Morales, 2009).

Um aumento significativo na quantidade de MN observados na maior dose testada (0,160 g L⁻¹) neste estudo indicou o potencial mutagênico do herbicida comercial. No entanto, esse efeito ocorre em uma concentração 6,4 vezes maior que a dose recomendada para uso no campo (0,005 a 0,025 g L⁻¹), mantendo-se inalterado nas doses mais próximas a essa faixa de valor. Esse achado destaca a importância de levar em conta a concentração do herbicida ao interpretar seus efeitos genotóxicos, uma vez que doses significativamente mais altas podem ser necessárias para induzir mutagenicidade, enfatizando o risco potencial do herbicida caso a dose recomendada seja extrapolada. Em estudo para avaliar a ação da formulação comercial de atrazina no sistema de teste com *A. cepa* L., Srivastava e Mishra, (2009) concluíram que os efeitos genotóxicos apresentados eram dependentes da dose testada e que o bioensaio utilizando a espécie é adequado para a avaliação.

Uma vez que *A. cepa* L. apresenta cariótipo simétrico e com poucos cromossomos (2n=16), os tamanhos dos MN encontrados são um parâmetro para analisar os efeitos clastogênicos ou aneugênicos na espécie (Leme; Marin-Morales, 2008). Efeitos clastogênicos resultam de quebras no cromossomo e apresentam micronúcleos pequenos, enquanto o efeito aneugênico é aquele decorrente de perda cromossômica, resultando em micronúcleos grandes. A análise dos MN realizada neste estudo sugere que a flumioxazina possui efeitos aneugênicos sobre *A. cepa* L. (Fig. 3, C), pois em nossos achados ocorreram a formação de MN grandes na maior dose testada.

Os níveis de citotoxicidade de um produto químico podem ser determinados pelo aumento ou diminuição do IM e embora o herbicida não tenha demonstrado efeitos citotóxicos em *A. cepa* L., as avaliações de MN podem ser consideradas um parâmetro muito eficaz e simples para analisar o efeito mutagênico promovido por produtos químicos. Além de indicar danos nos cromossomos, também é possível inferir efeitos genotóxicos sobre a planta por meio da presença de micronúcleos.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, é possível concluir que a formulação comercial de flumioxazina demonstrou efeitos significativos nos modelos vegetais estudados, particularmente em concentrações superiores às recomendadas para uso agrícola, a partir de $0,05 \text{ g L}^{-1}$. É importante ressaltar que a sensibilidade variou entre os diferentes organismos utilizados neste estudo, e que *P. glaucum* provou ser um modelo de grande sensibilidade e adequado para avaliação de poluentes. Embora tenham sido observados efeitos genotóxicos e mutagênicos em células de *A. cepa* L., a correlação ocorreu em uma dose 6,4 vezes acima da dose de uso. A análise dos efeitos em concentrações elevadas ressalta a necessidade de precaução no uso desse agente químico, visando minimizar potenciais impactos ambientais e à saúde humana. Além disso, os resultados reforçam a importância do uso de modelos vegetais em estudos de ecotoxicologia, fornecendo informações valiosas sobre os potenciais efeitos de agrotóxicos no meio ambiente.

REFERÊNCIAS

- ANASTASSIADOU, Maria *et al.* Updated peer review of the pesticide risk assessment of the active substance flumioxazin. **EFSA Journal**, [s. l.], v. 18, n. 9, 2020.
- ANDRADE-VIEIRA, Larissa Fonseca. Toxicity of Landfills Assessed by Plant Cytogenetic Approaches. In: Gustavo B.C. Cabral and Beatriz A.E. Botelho.. (Org.). Landfills : waste management, regional practices, and environmental impact. 1ed. New York: Nova Publishers, 2012, v. 1, p. 319-330.
- ANDRADE-VIEIRA, Larissa Fonseca *et al.* Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 86 (1), p. 373–382, 2014.
- ANDRADE-VIEIRA, Larissa Fonseca *et al.* Effects of long exposure to spent potliner on seeds, root tips, and meristematic cells of *Allium cepa* L. **Environmental Monitoring and Assessment**, [s. l.], v. 189, n. 10, 2017.
- BLANCO, F.M.G; VELINI, E.D. Sulfentrazone Persistence in *Soybean*-Cultivated Soil and Effect on Succession Cultures. **Planta Daninha**, [s. l.], v. 23, n. 4, p. 693–700, 2005.
- BOYD, Nathan S. Pepper and Tomato Root Uptake of Paraquat and Flumioxazin. **Weed Technology**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 626–632, 2014.
- CARMELLO, Camila Rodrigues; CARDOSO, Jean Carlos. Effects of plant extracts and sodium hypochlorite on lettuce germination and inhibition of *Cercospora longissima* in vitro. **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 234, n. February, p. 245–249, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.02.056>.
- CHEN, Ye *et al.* Soils, sec remediation and management of contaminated or degraded lands Persistence, mobility, and leaching risk of flumioxazin in four Chinese soils. [s. l.], p. 1743–1754, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11368-021-02904-3>.
- FERRELL, Jason A.; VENCILL, William K. Flumioxazin soil persistence and mineralization in laboratory experiments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 51, n. 16, p. 4719–4721, 2003.
- FISKESJÖ, Geirid. The *Allium* test - an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, [s. l.], v. 197, n. 2, p. 243–260, 1988.
- GEOFFROY, Laure; FRANKART, Cécile; EULLAFFROY, Philippe. Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 131, n. 2, p. 233–241, 2004.
- Herbicide Mode of Action Classification - Disponível em: <https://wssa.net/wp-content/uploads/HerbicideMOAClassification.pdf>. Acesso em: 05/01/2024

ISO. International Organization for Standardization. ISO 18763:2016 Soil quality — Determination of the toxic effects of pollutants on germination and early growth of higher plants Geneva, Switzerland, 2016.

JIA, Ling *et al.* Diazabicyclo derivatives as safeners protect cotton from injury caused by flumioxazin. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 187, n. July, p. 105185, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2022.105185>.

KWASNIEWSKA, Jolanta; BARA, Adrianna Wiktoria. Plant Cytogenetics in the Micronuclei Investigation—The Past, Current Status, and Perspectives. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 23, n. 3, 2022.

LEME, Daniela Morais; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, [s. l.], v. 682, n. 1, p. 71–81, 2009.

LEME, Daniela Morais; MARIN-MORALES, Maria Aparecida. Chromosome aberration and micronucleus frequencies in *Allium cepa* cells exposed to petroleum polluted water—A case study. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, [s. l.], v. 650, n. 1, p. 80–86, 2008.

LUBER, Jaqueline *et al.* Investigation on the effects of guava (*Psidium guajava* L.) infusions on germination, root tips and meristematic cells of *Latuca sativa*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 87, n. 2, p. 903–913, 2015.

MAHONEY, Kris J.; SHROPSHIRE, Christy; SIKKEMA, Peter H. Weed Management in Conventional- and No-Till Soybean Using Flumioxazin/Pyroxasulfone. **Weed Technology**, [s. l.], v. 28, n. 2, p. 298–306, 2014.

MANGURE, J. D. Speed of germination: aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, [s. l.], v. 2, p. 176–177, 1962.

MELLO, Hugo Matheus Guimarães Araújo de *et al.* Exploração Do Residual De Flumioxazin Por Meio De Doses E Associações a Outros Herbicidas Em Pré-Emergência Na Soja. **Ciências Agrárias: o avanço da ciência no Brasil - Volume 1**, [s. l.], p. 473–486, 2021.

MOJIRI, Amin *et al.* Pesticides in aquatic environments and their removal by adsorption methods. **Chemosphere**, [s. l.], v. 253, p. 126646, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126646>.

OECD. OECD 208 Guidelines For the Testing Of Chemicals. Adopted: 19, July, 2006.

OLIVEIRA, Marcelo Gomes *et al.* Tolerância da cebola implantada por semeadura direta ao flumioxazin aplicado em pós-emergência inicial. **Revista Brasileira de Herbicidas**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 585, 2018.

PALMIERI, Marcel José *et al.* Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: A comparative approach. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, [s. l.], v. 763, p. 30–35, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.12.008>.

PALMIERI, Marcel José *et al.* Cytotoxicity of Spent Pot Liner on *Allium cepa* root tip cells: A comparative analysis in meristematic cell type on toxicity bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 133, p. 442–447, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.07.016>.

PERILLI, Serena; DI MAMBRO, Riccardo; SABATINI, Sabrina. Growth and development of the root apical meristem. **Current Opinion in Plant Biology**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 17–23, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2011.10.006>.

PLONKA, Joanna *et al.* Effect of herbicide stress on the content of tyramine and its metabolites in Japanese radish sprouts (*Raphanus sativus*). **Journal of Food Composition and Analysis**, [s. l.], v. 106, n. July 2021, 2022.

SALADIN, G.; CLÉMENT, C.; MAGNÉ, C. Stress effects of flumioxazin herbicide on grapevine (*Vitis vinifera* L.) grown in vitro. **Plant Cell Reports**, [s. l.], v. 21, n. 12, p. 1221–1227, 2003.

SRIVASTAVA, Khyati; MISHRA, Kum Kum. Cytogenetic effects of commercially formulated atrazine on the somatic cells of *Allium cepa* and *Vicia faba*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 93, n. 1, p. 8–12, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pestbp.2008.08.001>.

VALERIO, Marlon Escoto; GARCÍA, Juan Fernández; PEINADO, Francisco Martín. Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 378, n. 1–2, p. 63–66, 2007.

WALTER, Magnus W. Structure-based design of agrochemicals. **Natural Product Reports**, [s. l.], v. 19, n. 3, p. 278–291, 2002.

WEHTJE, Glenn; GILLIAM, Charles H.; MARBLE, Stephen C. Duration of Flumioxazin-Based Weed Control in Container-Grown Nursery Crops. **Weed Technology**, [s. l.], v. 26, n. 4, p. 679–683, 2012.

Capítulo 2. FITOTOXICIDADE DO HERBICIDA À BASE DE FLUMIOXAZINA NA MICROALGA VERDE *Raphidocelis subcapitata* E OS IMPACTOS VIA ROTA DIETÉTICA NA TAXA DE FILTRAÇÃO E INGESTÃO DE ORGANISMOS ZOOPLANCTÔNICOS

RESUMO

Herbicidas à base do ingrediente ativo flumioxazina têm sido eficazmente usados na agricultura para o controle de plantas daninhas de folhas largas. O amplo uso de herbicidas traz consequências não conhecidas e exploradas para o ecossistema aquático. Nesse sentido, este estudo investigou os efeitos diretos do herbicida à base de flumioxazina na microalga *Raphidocelis subcapitata* e via alimentação nos organismos zooplantônicos *Ceriodaphnia silvestrii* e *Daphnia magna*. Os resultados revelaram que a microalga apresentou alta sensibilidade ao herbicida, manifestando fitotoxicidade a partir de $2,726 \mu\text{g L}^{-1}$ e acumulando carboidratos em resposta à presença da flumioxazina, inclusive na concentração efetiva de 50% ($EC_{50\%}$) de $4,57 \mu\text{g L}^{-1}$. Além disso, as taxas de filtração e ingestão dos cladóceros em resposta à microalga contaminada com o herbicida foram alteradas e mostraram-se específicas de cada espécie. O tamanho corporal e as necessidades alimentares individuais de cada espécie resultaram em diferenças nas quantidades ingeridas. No entanto, na concentração efetiva de 50% encontrada para a microalga, a filtração e ingestão dos cladóceros não foram alteradas, sugerindo uma adaptação adequada ao alimento disponível. Esses resultados enfatizam a relevância de ponderar sobre os efeitos distintos dos herbicidas em variados níveis tróficos dos ecossistemas aquáticos, evidenciando que a alimentação dos microcrustáceos pode ser um fator crucial na determinação do impacto desses produtos químicos em todo o ecossistema.

Palavras-chave: taxa de filtração; microalga; *Daphnia magna*; *Ceriodaphnia* sp.; toxicidade; flumioxazina.

ABSTRACT

Herbicides based on the active ingredient flumioxazine have been effectively used in agriculture to control broad-leaved weeds. However, the widespread use of herbicides has unknown and unexplored consequences for the aquatic ecosystem. In this sense, this study investigated the direct effects of the flumioxazin-based herbicide on the microalga *Raphidocelis subcapitata* and via feeding on the zooplankton organisms *Ceriodaphnia silvestrii* and *Daphnia magna*. The results revealed that the microalgae showed high sensitivity to the herbicide, manifesting phytotoxicity from 2.726 $\mu\text{g L}^{-1}$ and accumulating carbohydrates in response to the presence of flumioxazin, including at the 50% effective concentration ($\text{EC}_{50\%}$) of 4.57 $\mu\text{g L}^{-1}$. In addition, the filtration and ingestion rates of the cladocerans in response to the microalgae contaminated with the herbicide were altered and proved to be species-specific. The body size and individual food requirements of each species resulted in differences in the quantities ingested. However, at the effective concentration of 50% found for the microalgae, the filtration and ingestion of the cladocerans were not altered, suggesting an adequate adaptation to the available food. These results emphasize the relevance of considering the different effects of herbicides on various trophic levels of aquatic ecosystems, showing that the feeding of microcrustaceans can be a crucial factor in determining the impact of these chemicals on the entire ecosystem.

Keywords: filtration rate; microalgae; *Daphnia magna*; *Ceriodaphnia* sp.; toxicity; flumioxazin.

INTRODUÇÃO

A utilização extensiva de herbicidas nos setores agrícolas desempenha um papel importante na manutenção da produtividade das culturas, porém, as preocupações são expressivas quanto aos potenciais efeitos adversos que estes podem causar no ecossistema aquático. Os herbicidas são amplamente utilizados para o controle de ervas daninhas na agricultura, mas, após aplicação no campo, nas plantas-alvo, os resíduos chegam aos corpos d'água por meio de escoamento ou lixiviação (Cosgrove; Jefferson; Jarvis, 2019; Mojiri *et al.*, 2020).

Dentre os herbicidas que tem sido amplamente utilizado no setor agrícola, podemos destacar aqueles à base do ingrediente ativo flumioxazina. Os herbicidas à base de flumioxazina desempenham um papel crucial contra uma grande variedade de ervas daninhas de folha larga (Ando; Fujisawa; Katagi, 2017), o que os tornam cada vez mais populares dentre os agricultores. Concomitante ao aumento da utilização e aplicação de herbicidas à base de flumioxazina nas lavouras, está o aumento na preocupação da contaminação dos ambientes aquáticos.

Em ecossistemas aquáticos, as microalgas desempenham um papel fundamental na manutenção da qualidade da água e na sustentação de ecossistemas aquáticos saudáveis por serem os principais produtores desses ambientes e a base de toda a cadeia alimentar. A microalga verde *Raphidocelis subcapitata*, uma espécie reconhecida mundialmente como modelo para ecotoxicologia aquática, desempenha um papel importante na produção primária e na ciclagem de nutrientes em sistemas aquáticos (Zhang *et al.*, 2022). Além de ser uma fonte vital de alimento para organismos aquáticos, como os organismos zooplancônicos, as microalgas também estão ligadas ao equilíbrio do oxigênio na água, e exercem um impacto significativo na qualidade geral do habitat aquático (Fallahi *et al.*, 2021). No entanto, estudos vem demonstrando que as microalgas possuem grande sensibilidade a agrotóxicos (Dorigo *et al.*, 2004; Magnusson *et al.*, 2010; Turemis *et al.*, 2018) e, a exposição a esses compostos químicos podem resultar em diversos efeitos como: inibição do crescimento, alterações na fotossíntese e nas biomoléculas e perturbações celulares. Assim, a avaliação de como os herbicidas afetam as microalgas é de suma importância para entender o funcionamento dos ecossistemas aquáticos e as implicações para a biodiversidade aquática.

Adicionalmente, os cladóceros, *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia silvestrii* são organismos zooplancônicos e ocupam o segundo nível trófico da cadeia alimentar, os consumidores primários, e desempenham um papel essencial na regulação dos níveis tróficos

e na transferência eficiente de energia dentro dos ecossistemas aquáticos. Sua dieta, que inclui as microalgas e, também matérias orgânicas disponíveis na água, os torna suscetíveis aos efeitos diretos e indiretos de herbicidas, como a flumioxazina, podendo influenciar suas taxas de filtração e ingestão, além de sua viabilidade e reprodução.

Bioensaios de ecotoxicidade e de inibição alimentar em organismos modelos como a *R. subcapitata* e os cladóceros, respectivamente, são ferramentas essenciais para detectar efeitos letais e subletais causados ao meio ambiente, além disso, são considerados confiáveis e rápidos. Os ensaios de inibição alimentar, notadamente, são considerados indicadores de efeitos nos níveis mais sensíveis do organismo, abrangendo aspectos fisiológicos e bioquímicos, uma vez que proporcionam resultados precoces (Agatz *et al.*, 2013). Estes ensaios são particularmente relevantes devido à capacidade de avaliar a ingestão e a filtração, processos comportamentais e fisiológicos exibidos por espécies zooplancônicas quando sujeitas a uma diversidade de dietas (Lurling; Beekman, 2006; Lüring; Van der Grinten, 2003). As taxas de filtração ou depuração indicam a quantidade de água filtrada para a coleta de partículas alimentares, enquanto as taxas de ingestão referem-se à quantidade simples dessas partículas coletadas de uma suspensão alimentar em um intervalo de tempo designado (Davis; Gobler, 2011; Kâ *et al.*, 2012).

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ecotoxicidade do herbicida comercial contendo flumioxazina na microalga verde *R. subcapitata*, para a determinação da concentração efetiva ($EC_{50\%}$) e, a partir dessas informações, utilizando a microalga contaminada por via rota dietética, investigar as taxas de filtração e ingestão em cladóceros padronizados para testes de toxicidade, *C. silvestrii* e *D. magna*. Essa abordagem é relevante, uma vez que o mecanismo de alimentação em questão é comum em ambientes naturais, nos quais a introdução de contaminantes frequentemente ocorre, podendo desempenhar um papel funcional crítico em cadeias tróficas. Com isso, podemos fornecer *insights* valiosos sobre a ecotoxicidade desse herbicida e seus impactos nos organismos aquáticos, contribuindo para uma avaliação abrangente do seu potencial para afetar os ecossistemas aquáticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Modelos de estudo

A microalga verde *Raphidocelis subcapitata* foi obtida a partir da cultura de algas mantida no Laboratório de Limnologia da Universidade Federal de Alfenas/MG. O cultivo da alga foi realizado em frascos Erlenmeyer de 1 litro, contendo 500 mL do meio de cultivo L.C. Oligo (Afnor, 1980). Antes de ser empregado, o meio de cultivo L.C. Oligo foi submetido à esterilização em autoclave a 121°C por 20 minutos. As condições de cultivo foram mantidas a uma temperatura de 23±2°C, iluminação de 6800 lux, com um fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Os frascos foram agitados diariamente para evitar a decantação das células. Foram utilizadas algas saudáveis em fase de crescimento exponencial logarítmica para condução do ensaio de exposição ao contaminante.

A espécie zooplânctônica *Ceriodaphnia silvestrii* foi coletada em ambiente natural por meio de uma rede de zooplâncton com malha de 68 µm, na porção represada do Rio São Thomé – Reservatório de Furnas (21°S 2751`` 46°W 0002``), localizado no município de Alfenas – MG. No laboratório, os organismos foram triados, identificados e transferidos para béqueres de vidro com capacidade para 1000 mL, contendo água coletada do próprio reservatório. Após um período de adaptação às condições laboratoriais, os organismos foram submetidos ao processo de aclimação à água de manutenção de cultivo ou água reconstituída. A espécie aclimatada em laboratório foi cultivada conforme as condições de cultivo estabelecidas pela normativa ABNT NBR 13373:2017. Por sua vez, a espécie *Daphnia magna* foi adquirida por meio de comércio online, sendo aclimatada e cultivada em laboratório de acordo com as diretrizes da normativa ABNT NBR 12713:2016.

Soluções teste

As concentrações-teste para o ensaio de inibição com a microalga verde *R. subcapitata* foram determinadas com base no EC_{50%} (0,852 µg L⁻¹) previamente calculado e apresentado nas bases de dados PPDB (*Pesticide Properties DataBase*) para *R. subcapitata* a partir do princípio ativo de flumioxazina *per se*. As seguintes doses do princípio ativo de flumioxazina foram testadas e 3.2 foi o fator de multiplicação utilizado entre elas: CN: controle negativo; T1: 0,0832 µg L⁻¹; T2: 0,266 µg L⁻¹; T3: 0,852 µg L⁻¹; T4: 2,726 µg L⁻¹; T5: 8,724 µg L⁻¹; T6: 27,918 µg L⁻¹; e T7: 89,338 µg L⁻¹.

Teste de inibição do crescimento da microalga verde

O ensaio foi realizado segundo a normativa NF EN ISO 8692 (2012) contendo 6 repetições por concentração. Cada repetição foi representada por um tubo de ensaio de vidro com 100 mL de capacidade, contendo 30 mL das soluções-teste e densidade celular inicial de 1×10^4 cél mL⁻¹. Os testes foram conduzidos em sala climatizada a $23 \pm 2^\circ\text{C}$, iluminação com intensidade de 6800 Lux e agitação manual periódica a cada amostragem. As amostragens para a determinação da densidade celular foram realizadas a cada 24 horas e, a partir dos resultados obtidos, calculou-se o EC₅₀, a concentração sem efeito observado (NOEC) e a menor concentração com efeito observado (LOEC) para posteriormente prosseguir com o experimento da taxa de filtração com os organismos zooplancônicos.

A determinação da densidade celular da microalga *R. subcapitata* foi realizada com o auxílio de câmaras de contagem de modelo Fuchs Rosenthal. Para isso, diariamente eram retiradas 0,5 mL de cada amostra e fixadas com 0,5 mL de formol 4% para a sua posterior contagem. As taxas de crescimento específica foram calculadas baseadas na abundância celular considerando-se a sua fase exponencial de crescimento de 48 a 96 h onde a taxa de crescimento específica foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$r = [\text{Ln} (N_2) - \text{Ln} (N_1)] / \text{Dt}$$

Onde, r é a taxa intrínseca de crescimento, N_1 é o tamanho da população no início de um intervalo de tempo, N_2 é o tamanho da população no final do intervalo de tempo e Dt é a variação do tempo.

Análise bioquímica da microalga: Carboidratos totais

O teor de carboidratos totais seguiu a metodologia previamente descrita em Albalasmeh *et al.*, (2013). O método é uma reação colorimétrica com ácido sulfúrico que consiste na quantificação dos carboidratos intracelulares totais presentes na microalga. Um novo ciclo de crescimento da microalga foi iniciado com concentrações que abrangeram um espectro que incluiu um nível aceitável para o meio ambiente ($0,852 \mu\text{g L}^{-1}$), a Concentração Efetiva 50% (EC₅₀, $4,57 \mu\text{g L}^{-1}$), e uma terceira concentração ($8,724 \mu\text{g L}^{-1}$) que apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento controle no que se refere ao crescimento celular da microalga e, a partir desta exposição da microalga às concentrações do herbicida, foi realizada a análise dos seus carboidratos totais. Amostras de cada tratamento foram coletadas (30 mL) nas 96 horas de exposição e adicionadas em tubos de ensaios. Em seguida, os tubos passaram por um processo de centrifugação (BL-206/1 FANEM®) por 10 minutos às 1600 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e ao pellet

formado adicionou-se 1 mL de água destilada e as amostras foram congeladas até o momento da análise final.

Para a análise, as amostras foram descongeladas e agitadas para a homogeneização das células. Em seguida, 3 mL de ácido sulfúrico concentrado foi adicionado em cada amostra e estas foram agitadas por 3 minutos, logo após, foram levadas a um banho de gelo para o seu resfriamento. Após o resfriamento, cada amostra foi transferida para uma cubeta de quartzo de capacidade de 2 mL e a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 315 nm (Biospectro® espectrofotômetro SP-220). Uma curva de calibração foi construída seguindo as mesmas definições da microalga e utilizando um padrão de glicose.

Delineamento experimental dos ensaios de taxa de filtração e ingestão com *C. silvestrii* e *D. magna*

As avaliações de filtração e ingestão da microalga verde *Raphidocelis subcapitata* contaminada com um herbicida contendo flumioxazina foram realizadas com os cladóceros *C. silvestrii* e *D. magna*. Esses ensaios envolveram a exposição de 4 organismos adultos não ovíparos por repetição (com 4 repetições) à microalga contaminada. A duração total dos experimentos foi de 3 horas, incluindo um período inicial de 30 minutos para o jejum dos organismos, durante o qual nenhum tipo de alimento foi fornecido. Os organismos foram mantidos em uma sala com temperatura controlada a $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, iluminada por luz artificial branca com uma intensidade luminosa de 1000 Lux. Durante os experimentos, os organismos foram colocados em recipientes de acrílico contendo 30 mL de água reconstituída, juntamente com uma suspensão algal com uma concentração de 5×10^4 cél mL⁻¹ para cada nível de concentração do herbicida. As concentrações específicas do herbicida testadas foram previamente determinadas por meio do ensaio de inibição de crescimento da microalga verde, resultando nos valores de EC₅₀, uma concentração considerada segura para o meio ambiente, e uma terceira concentração considerada tóxica para a microalga. Após um período de crescimento da microalga durante 96 horas em cada uma das concentrações do herbicida, as amostras foram submetidas à centrifugação a 1600 rotações por minuto (rpm) e, posteriormente, ressuspensas em água deionizada. Esse procedimento foi realizado com o intuito de fornecer exclusivamente alimento contaminado aos organismos zooplancônicos.

Para os ensaios de inibição alimentar, foram estabelecidas quatro repetições de controle que continham exclusivamente água reconstituída e células de alga. No início e no final do experimento, os grupos de controle foram fixados com uma solução de formaldeído a

4% para permitir a contagem subsequente do número de células de alga utilizando uma câmara Fuchs Rosenthal, sob um microscópio Zeiss com ampliação de 40x, a fim de monitorar o crescimento algal ao longo do período experimental. Para todos os tratamentos, amostras foram coletadas no início e no final do experimento e também foram fixadas com uma solução de formaldeído a 4%, para possibilitar a contagem da densidade celular antes e após a filtração e ingestão das algas pelos organismos. Além disso, no início dos ensaios, foram efetuadas medições das variáveis como pH, condutividade elétrica, temperatura, dureza da água e concentração de oxigênio dissolvido, com o intuito de verificar as características da água reconstituída utilizada nas diluições.

As taxas de filtração foram calculadas pelo método de contagem das células algais e a seguinte equação preestabelecida por Peters (1984) foi utilizada:

$$F = V (\ln C_0 - \ln C_t) / (tN), \text{ onde:}$$

F = taxa de filtração (mL indivíduo⁻¹ hora⁻¹); V = volume da amostra no recipiente teste; N = número de indivíduos no frasco; t = duração do experimento em horas; C₀=concentração inicial da alga e C_t= concentração final da alga nos recipientes experimentais.

As taxas de ingestão foram expressadas como o número médio de células algais ingeridas pelos cladóceros (cels ind⁻¹ hora⁻¹) no período de duração do experimento. Para os cálculos a seguinte equação, proposta por Paffenhöfer (1971), foi utilizada:

$$I = V (C_0 - C_t) / (tN), \text{ onde:}$$

I = A taxa de ingestão (cels ind⁻¹ hora⁻¹); V = volume da amostra no recipiente teste; C₀= concentração inicial da suspensão algal e C_t = concentração final da suspensão algal nos recipientes experimentais; t = tempo de duração do experimento (em horas); N (número de cladóceros).

Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de Testes de normalidade e homogeneidade seguidos pela análise de variância (ANOVA) e pelo Teste de Dunnett utilizando-se o software Minitab 17, e as diferenças entre os tratamentos foram consideradas significativas com níveis de significância de 95% (p<0,05). Os valores de concentração de inibição do crescimento (EC₅₀), a concentração sem efeito observado (NOEC - *No Observed Effect Concentration*) e a menor concentração com efeito observado (LOEC - *Lowest Effect Concentration*)

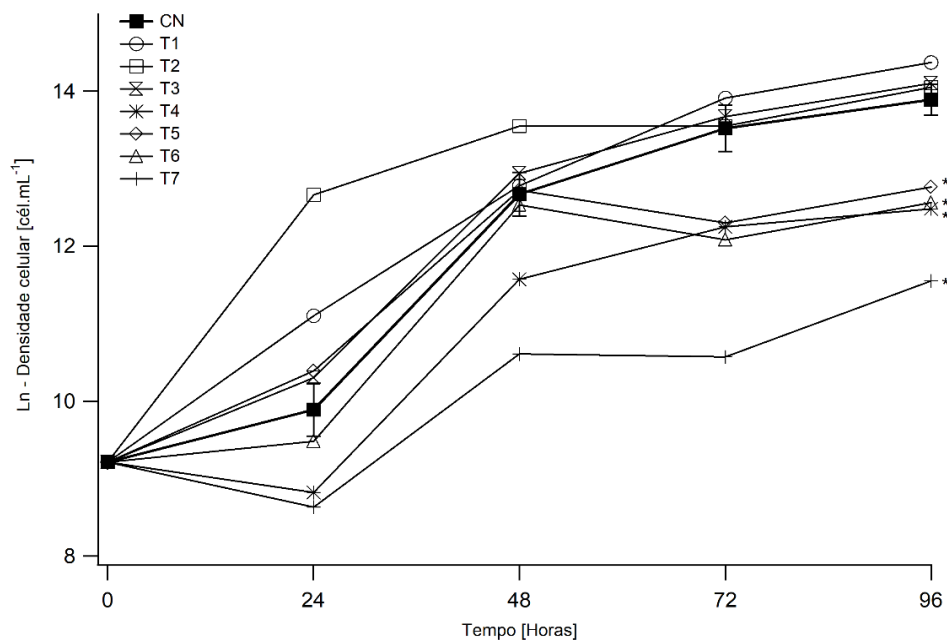
Observed Effect Concentration) foram calculados utilizando o software GraphPad Prism (versão 8).

RESULTADOS

Inibição da microalga verde – *R. subcapitata*

Os resultados do experimento revelaram padrões distintos no crescimento da microalga dentro das doses testadas, destacando-se a partir do tratamento 4 ($2,726 \mu\text{g L}^{-1}$), onde foram observadas reduções significativas tanto na curva de crescimento quanto na taxa de crescimento. Os gráficos de curva de crescimento (Figura 1) evidenciaram um comportamento notável nas concentrações mais elevadas de flumioxazina. Até o tratamento 3 ($0,852 \mu\text{g L}^{-1}$), a microalga apresentou um padrão saudável de crescimento comparado ao tratamento controle.

Figura 1: Parâmetro de crescimento (Ln do número de densidade celular (célula mL^{-1})) da *Raphidocelis subcapitata* testados após exposição ao herbicida à base de flumioxazina.



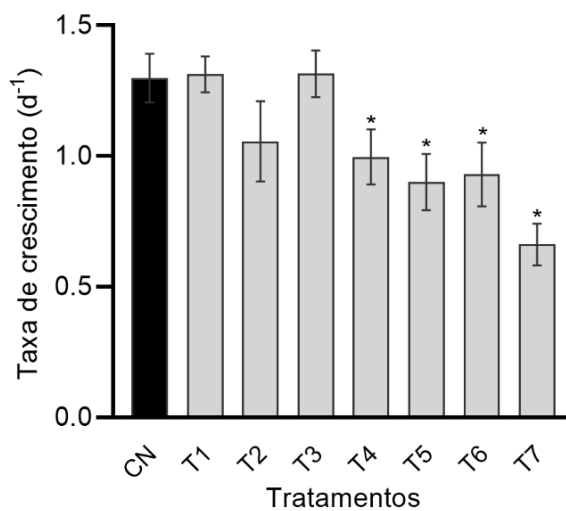
Legenda: CN: controle negativo; T1: $0,0832 \mu\text{g L}^{-1}$; T2: $0,266 \mu\text{g L}^{-1}$; T3: $0,852 \mu\text{g L}^{-1}$; T4: $2,726 \mu\text{g L}^{-1}$; T5: $8,724 \mu\text{g L}^{-1}$; T6: $27,918 \mu\text{g L}^{-1}$; e T7: $89,338 \mu\text{g L}^{-1}$. O símbolo * indica diferença estatística (Dunnet $p < 0,05$) em relação ao tratamento controle. As barras representam o desvio-padrão da média.

Fonte: Do autor, 2023.

A análise da taxa de crescimento (Figura 2) corroborou esses achados, revelando quedas significativas na capacidade de proliferação da microalga a partir do tratamento 4. Este ponto de transição marcou uma alteração substancial nas condições de crescimento, inclusive são concentrações acima do EC_{50} de referência, indicando uma resposta dose-dependente à flumioxazina. Os resultados do experimento permitiram a determinação de parâmetros-chave que descrevem a resposta da microalga à flumioxazina, como o EC_{50} , o NOEC e o LOEC.

A Concentração Efetiva 50% foi identificada como sendo de $4,57 \mu\text{g L}^{-1}$. Este valor representa a concentração na qual observamos uma redução de 50% no crescimento da microalga. O LOEC foi determinado como sendo $2,726 \mu\text{g L}^{-1}$. Concentrações iguais ou superiores a este valor demonstraram efeitos adversos significativos no crescimento da microalga durante o período experimental. Este resultado é crucial para estabelecer limites de exposição que minimizem impactos prejudiciais em ecossistemas aquáticos. Já o NOEC, fornece informações importantes para estabelecer níveis seguros de exposição dos organismos à substância, e foi identificado como $0,852 \mu\text{g L}^{-1}$. Concentrações abaixo desse limiar não apresentaram efeitos significativos observáveis no crescimento da microalga.

Figura 2: Parâmetro de crescimento (Taxa de crescimento por dia (d^{-1})) da *Raphidocelis subcapitata* testados após exposição ao herbicida à base de flumioxazina.



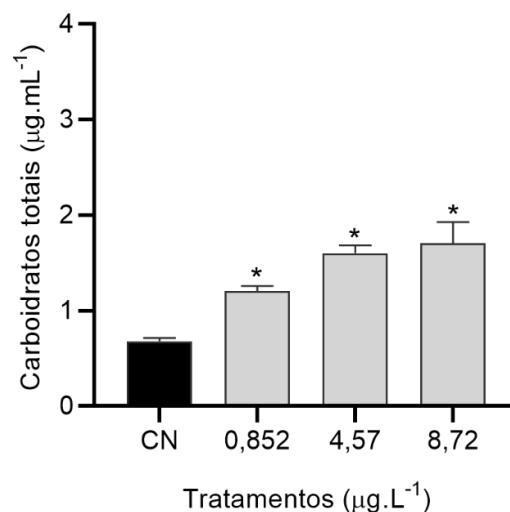
Legenda: CN: controle negativo; T1: $0,0832 \mu\text{g L}^{-1}$; T2: $0,266 \mu\text{g L}^{-1}$; T3: $0,852 \mu\text{g L}^{-1}$; T4: $2,726 \mu\text{g L}^{-1}$; T5: $8,724 \mu\text{g L}^{-1}$; T6: $27,918 \mu\text{g L}^{-1}$; e T7: $89,338 \mu\text{g L}^{-1}$. O símbolo * indica diferença estatística (Dunnet $p < 0,05$) em relação ao tratamento controle. As barras representam o desvio-padrão da média.

Fonte: Do autor, 2023.

Carboidratos totais da microalga

A avaliação do teor de carboidratos totais (Figura 3) na microalga em resposta às concentrações de flumioxazina revelou padrões significativos em comparação ao controle, evidenciando uma resposta dose-dependente com aumento dos teores de carboidratos totais. Para todas as concentrações, o herbicida demonstrou influência clara no teor de carboidratos havendo aumento de 1,8 vezes em $0,852 \mu\text{g L}^{-1}$, 2,3 vezes em $4,57 \mu\text{g L}^{-1}$ e de 2,5 vezes em $8,724 \mu\text{g L}^{-1}$. A resposta dose-dependente observada destaca a complexidade das interações entre a microalga e a flumioxazina.

Figura 3: Teor de carboidratos totais da microalga *Raphidocelis subcapitata* quantificados após 96 horas de exposição ao herbicida à base de flumioxazina.



Legenda: CN: controle negativo; T1: $0,852 \mu\text{g L}^{-1}$; T2: $4,57 \mu\text{g L}^{-1}$ e T3: $8,72 \mu\text{g L}^{-1}$. O símbolo * indica diferença estatística (Dunnet $p < 0,05$) em relação ao tratamento controle. As barras representam o desvio-padrão da média.

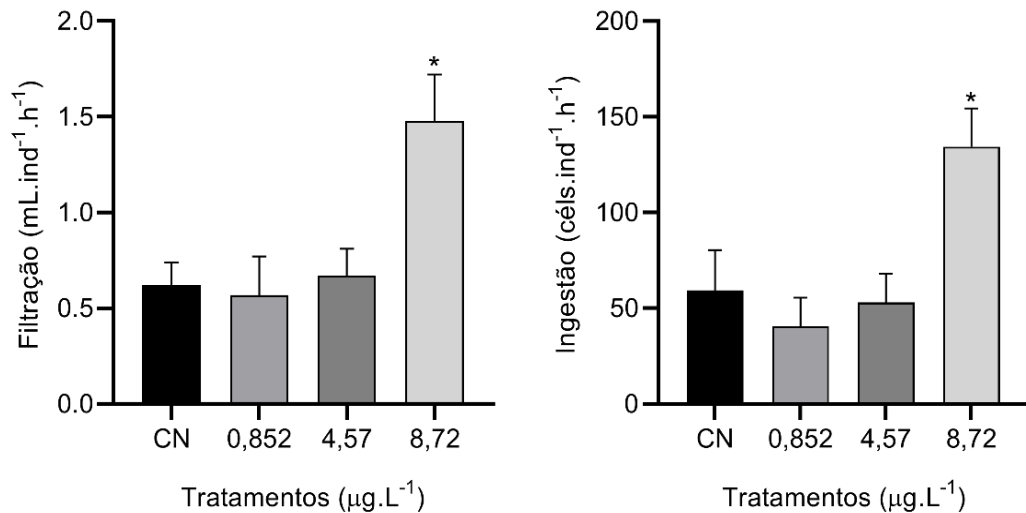
Fonte: Do autor, 2023.

Taxa de filtração e ingestão em *C. silvestrii* e *D. magna*

A partir das concentrações estabelecidas nos testes de toxicidade da microalga ($0,852 \mu\text{g L}^{-1}$, $4,57 \mu\text{g L}^{-1}$ e $8,724 \mu\text{g L}^{-1}$) procedemos à análise da taxa de filtração e ingestão em *C. silvestrii* e *D. magna*. Os resultados mostraram respostas distintas entre as espécies, indicando sensibilidade diferencial à presença do herbicida à base de flumioxazina. Para *C. silvestrii*, observou-se um aumento significativo nas taxas de filtração e ingestão em resposta à concentração de $8,724 \mu\text{g L}^{-1}$ e permanecendo igual ao controle nos demais tratamentos

(Figura 4). Contrastando, em *D. magna*, os resultados foram divergentes. A taxa de filtração reduziu significativamente tanto na concentração $4,57 \mu\text{g L}^{-1}$ quanto na $8,724 \mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 5), indicando uma sensibilidade acentuada a essas concentrações da microalga contaminada com flumioxazina. Simultaneamente, a taxa de ingestão diminuiu em $8,724 \mu\text{g L}^{-1}$.

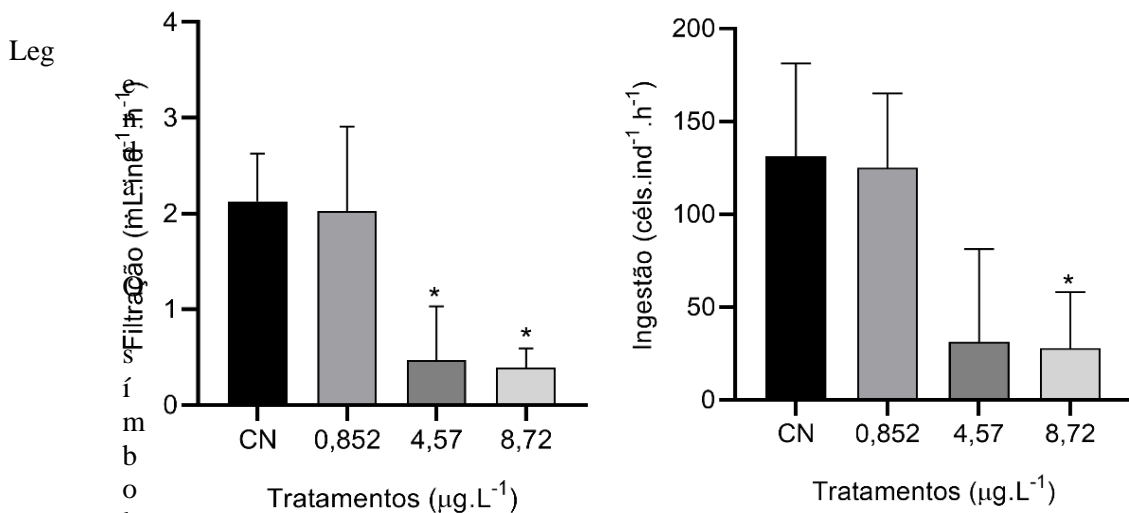
Figura 4: Taxas de filtração ($\text{mL ind}^{-1} \text{h}^{-1}$) (A) e ingestão ($\text{céls ind}^{-1} \text{h}^{-1}$) (B) de *Ceriodaphnia silvestrii* exposta a alimentação contaminada por herbicida à base de flumioxazina por período de 3 horas.



Legenda: O símbolo * indica diferença estatística (Dunnet $p < 0,05$) em relação ao tratamento controle. As barras representam o desvio-padrão da média.

Fonte: Do autor, 2023.

Figura 5: Taxas de filtração ($\text{mL ind}^{-1} \text{h}^{-1}$) e ingestão ($\text{céls ind}^{-1} \text{h}^{-1}$) de *Daphnia magna* exposta a alimentação contaminada por herbicida à base de flumioxazina por período de 3 horas.



* indica diferença estatística (Dunnet $p < 0,05$) em relação ao tratamento controle. As barras representam o desvio-padrão da média.

Fonte: Do autor, 2023.

DISCUSSÕES

O herbicida à base de flumioxazina se mostrou um inibidor substancial para o crescimento celular de *R. subcapitata* neste estudo, quando a partir de 2,726 $\mu\text{g L}^{-1}$ de flumioxazina presente nas células da microalga reduz sua proliferação, corroborando resultados descritos por Geoffroy *et al.*, (2004) apresentados para a espécie, *Scenedesmus obliquus* e Ando; Fujisawa e Katagi, (2017) que observaram inibição no crescimento de *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Synechococcus* sp. ao testar o herbicida. Essa consistência nos efeitos inibitórios destaca a robustez do impacto da flumioxazina sobre diferentes espécies de microalgas. Contudo, é reconhecido que a contaminação de produtores primários constitui uma ameaça para os subseqüentes níveis tróficos nos ecossistemas aquáticos (Hill *et al.*, 2010), o que pode ocorrer por estresse, pela exposição ou pela alimentação. Os microcrustáceos, por exemplo, exercem uma função essencial na teia alimentar, e perturbações neste nível trófico têm o potencial de afetar negativamente tanto os níveis tróficos inferiores quanto superiores, causando um desequilíbrio ambiental (Malzahn *et al.*, 2010). Essa interconexão destaca a vulnerabilidade dos ecossistemas aquáticos diante da contaminação por agrotóxicos.

A microalga, representante do primeiro nível trófico, além da inibição do crescimento, respondeu ao estresse induzido pela flumioxazina por meio do acúmulo de carboidratos em suas células, utilizando-os como fonte de energia. Em um estudo com o herbicida pendimentalina, também foi observado um aumento das moléculas de carboidratos na espécie de microalga verde, *Protosiphon botryoides* (Shabana *et al.* 2001). Este aumento de carboidratos pode indicar uma estratégia adaptativa da microalga na tentativa de preservar sua taxa de crescimento diante das condições adversas causadas pelo herbicida. Assim, em situações estressantes, a síntese de carboidratos pode ser favorecida como uma estratégia para armazenar carbono visando seu uso futuro, quando as condições ambientais se tornarem favoráveis (Markou *et al.*, 2012). Por outro lado, também pode indicar falhas na realização da fotossíntese (Shabana *et al.*, 2001). Ademais, um estudo indica o potencial de acumulação da flumioxazina nas células de *Pseudokirchneriella subcapitata*, o qual, embora seja baixo, não é insignificante, e está diretamente associado à lipofilicidade do composto químico (Ando; Fujisawa e Katagi, 2017).

A partir das concentrações de flumioxazina selecionadas para os ensaios com a microalga, três doses foram especificamente escolhidas para avaliar os efeitos sobre a taxa de filtração e ingestão dos cladóceros. Essas concentrações abrangeram um espectro que incluiu um nível considerado seguro para o ambiente (0,852 $\mu\text{g L}^{-1}$), a Concentração Efetiva 50%

(EC_{50%}, 4,57 µg L⁻¹), e uma terceira concentração (8,724 µg L⁻¹) que apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao tratamento controle no que se refere ao crescimento celular da microalga. Para ambas as espécies, *C. silvestrii* e *D. magna*, tanto a taxa de filtração quanto a taxa de ingestão foram adequadas na concentração determinada como nível seguro para a exposição dos organismos neste estudo. Também foi possível observar que houve diferenças espécie-específicas quanto a estas taxas de filtração e ingestão em relação a quantidade ingerida nesta dose de segurança, característica também encontrada por Pérez-Moralez & Sarma, (2014) ao testar a alimentação em distintos zooplâncton e observar diferenças relacionadas ao tamanho corporal e necessidade alimentar das espécies.

Na concentração de EC_{50%} de 4,57 µg L⁻¹ e na dose de efeito tóxico para a microalga, *D. magna* exibiu uma redução significativa tanto na taxa de filtração quanto na taxa de ingestão. *D. magna* pode apresentar diferentes comportamentos alimentares perante a qualidade do alimento (Rodrigues *et al.*, 2021). A alimentação dos organismos zooplanctônicos pode ser interrompida em situações em que o alimento provém de uma fonte inadequada ou devido à toxicidade das células das algas (Orlowicz, 2012; Rey *et al.*, 2001). Essa resposta pode estar relacionada aos elevados níveis de carboidratos e à contaminação pelo herbicida presentes na microalga. Além disso, presume-se que ocorreu uma rejeição intestinal por parte de *D. magna* em relação às células algais contaminadas, conforme observado anteriormente nos estudos de McMahon e Rigler, (1963) envolvendo *D. magna* e *Chlorella* sp. Esses resultados e observações sugerem que *D. magna*, ao encontrar células algais contaminadas, pode manifestar um mecanismo de rejeição (Rey *et al.*, 2001), acrescidos pelos receptores intestinais, um comportamento que pode estar associado a adaptações evolutivas para evitar a ingestão de alimentos potencialmente prejudiciais ou tóxicos.

Em relação às respostas observadas em *C. silvestrii*, foi notado um estímulo na taxa de filtração e ingestão da maior dose de flumioxazina presente na microalga. Esse aumento pode ser atribuído provavelmente a um fenômeno conhecido como hormese, um efeito estimulante observado em resposta a exposições a doses moderadamente tóxicas, como observado por outros pesquisadores em estudos com esses cladóceros (Castelhana Gebara *et al.*, 2021; Muysen; Bossuyt; Janssen, 2005). Comparada a *D. magna*, a espécie *C. silvestrii* demonstrou maior tolerância alimentar ao herbicida, sugerindo que em um ambiente natural contaminado com o produto, ela poderia facilmente se tornar dominante perante ao estresse. É reconhecido que os agrotóxicos tendem a induzir a dominância de espécies menores de zooplâncton e,

consequentemente, a redução do tamanho corporal médio dos indivíduos na comunidade (Hanazato, 1998).

Essas observações reforçam a importância de compreender as interações específicas entre zooplanktons e fontes alimentares, especialmente em ambientes sujeitos a contaminações. Ao compreendermos como os zooplanktons respondem às mudanças em suas fontes de alimento, como a contaminação da microalga pela flumioxazina, identificamos as possíveis transferências de energia na cadeia trófica. Nessa dinâmica, a energia é transferida dos produtores primários, como as microalgas, para os consumidores primários, como os zooplanktons, e subsequentemente para os consumidores secundários, como os peixes. Essa transferência ocorre à medida que os organismos consomem outros para obter energia, e a energia assim adquirida é utilizada para sustentar suas atividades metabólicas e também é transferida ao longo da cadeia alimentar, à medida que os organismos são consumidos por outros predadores. A eficiência dessa transferência de energia influencia diretamente a estrutura e o funcionamento dos ecossistemas aquáticos, afetando a abundância e a diversidade das espécies e, consequentemente, a estabilidade e a saúde desses ambientes.

CONCLUSÕES

A microalga demonstrou notável suscetibilidade, manifestando fitotoxicidade a partir de $2,726 \mu\text{g L}^{-1}$ e acumulando carboidratos em resposta à presença do herbicida à base de flumioxazina nas concentrações avaliadas, inclusive na concentração efetiva de 50% ($\text{EC}_{50\%}$) de $4,57 \mu\text{g L}^{-1}$. Esses resultados indicaram com clareza a resposta impactante da microalga à exposição ao flumioxazina, destacando a utilidade do bioensaio como uma ferramenta sensível na avaliação dos efeitos do herbicida neste organismo aquático. As taxas de filtração e ingestão dos cladóceros frente à microalga contaminada com o herbicida demonstraram ser específicas de cada espécie. O tamanho corporal e as necessidades alimentares individuais de cada organismo, *D. magna* ou *C. silvestrii*, resultaram em diferenças nas quantidades ingeridas. Para ambas as espécies de cladóceros avaliadas, na concentração efetiva de 50% encontrada para a microalga, a ingestão não foi alterada, sugerindo uma adaptação adequada ao alimento disponível. Essas descobertas ressaltam a importância de considerar as respostas específicas de diferentes organismos em estudos ecotoxicológicos, especialmente quando é avaliado a influência de herbicidas no ambiente aquático.

REFERÊNCIAS

- AFNOR, Association Française Normalisation, 1980. Norme expérimentale. T90-304. **Essais deseaux Determination de l'inhibition de *Scenedesmus subspicatus* par une substance**, Paris, France. França, 1980. 304 p.
- AGATZ, Annika *et al.* Feeding inhibition explains effects of imidacloprid on the growth, maturation, reproduction, and survival of *Daphnia magna*. **Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 47, n. 6, p. 2909–2917, 2013.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 13373:2017. **Ecotoxicologia aquática - Método para ensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*, Straus (Crustacea, Cladocera)**. Rio de Janeiro, 2017.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 12713:2016. **Ecotoxicologia aquática - Guia para seleção de métodos de ensaio com organismos aquáticos**. Rio de Janeiro, 2016.
- ALBALASMEH, Ammar A.; BERHE, Asmeret Asefaw; GHEZZEHEI, Teamrat A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 97, n. 2, p. 253–261, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.072>.
- ANDO, Daisuke; FUJISAWA, Takuo; KATAGI, Toshiyuki. Fate of Flumioxazin in Aquatic Plants: Two Algae (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Synechococcus* sp.), Duckweed (Lemna sp.), and Water Milfoil (*Myriophyllum elatinooides*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 65, n. 40, p. 8813–8822, 2017.
- CASTELHANO GEBARA, Renan *et al.* Toxicity and Risk Assessment of Zinc and Aluminum Mixtures to *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea: Cladocera). [S. l.]: **John Wiley & Sons**, Ltd, 2021-. ISSN 15528618.v. 40 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5162>.
- COSGROVE, Stephanie; JEFFERSON, Bruce; JARVIS, Peter. Pesticide removal from drinking water sources by adsorption: a review. **Environmental Technology Reviews**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–24, 2019.
- DAVIS, Timothy W.; GOBLER, Christopher J. Grazing by mesozooplankton and microzooplankton on toxic and non-toxic strains of *Microcystis* in the Transquaking River, a tributary of Chesapeake Bay. **Journal of Plankton Research**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 415–430, 2011.
- DORIGO, Ursula *et al.* Seasonal changes in the sensitivity of river microalgae to atrazine and isoproturon along a contamination gradient. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 318, n. 1–3, p. 101–114, 2004.
- FALLAHI, Alireza *et al.* Interactions of microalgae-bacteria consortia for nutrient removal from wastewater: A review. **Chemosphere**, [s. l.], v. 272, p. 129878, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.129878>.

- GEOFFROY, Laure; FRANKART, Cécile; EULLAFFROY, Philippe. Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 131, n. 2, p. 233–241, 2004.
- HANAZATO, T. Response of a zooplankton community to insecticide application in experimental ponds: a review and the implications of the effects of chemicals on the structure and functioning of freshwater communities. **Environmental Pollution**, 101, 361–373, 1998.
- HILL, Walter R. *et al.* The role of periphyton in mediating the effects of pollution in a stream ecosystem. **Environmental Management**, [s. l.], v. 45, n. 3, p. 563–576, 2010.
- INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). NBR EN ISO 8692:2012. **Qualidade da água - Determinação do alcalinidade - Método pelo qualímetro de titulação com ácido sulfúrico**. Genebra, 2012.
- KÂ, Samba *et al.* Can tropical freshwater zooplankton graze efficiently on cyanobacteria?. **Hydrobiologia**, [s. l.], v. 679, n. 1, p. 119–138, 2012.
- LURLING, M; BEEKMAN, W. Influence of food-type on the population growth rate of the rotifer *Brachionus calyciflorus* in short-chronic assays. **Acta Zoologica Sinica**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 70–78, 2006.
- LÜRLING, Miquel; VAN DER GRINTEN, Esther. Life-history characteristics of *Daphnia* exposed to dissolved microcystin-LR and to the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* with and without microcystins. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 1281–1287, 2003.
- MAGNUSSON, Marie *et al.* Additive toxicity of herbicide mixtures and comparative sensitivity of tropical benthic microalgae. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 60, n. 11, p. 1978–1987, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2010.07.031>.
- MALZAHN, Arne M. *et al.* Differential effects of nutrient-limited primary production on primary, secondary or tertiary consumers. **Oecologia**, [s. l.], v. 162, n. 1, p. 35–48, 2010.
- MCMAHON, J. W.; RIGLER, F. H. Mechanisms Regulating the Feeding Rate of *Daphnia Magna* Straus. **Canadian Journal of Zoology**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 321–332, 1963.
- MARKOU, G., ANGELIDAKI, I., GEORGAKAKIS, D.,. Microalgal carbohydrates: An overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 96, 631–645., 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4398-0>
- MOJIRI, Amin *et al.* Pesticides in aquatic environments and their removal by adsorption methods. **Chemosphere**, [s. l.], v. 253, p. 126646, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126646>.
- MUYSSSEN, Brita T.A.; BOSSUYT, Bart T.A.; JANSSEN, Colin R. Inter- and intra-species variation in acute zinc tolerance of field-collected cladoceran populations. **Chemosphere**, [s.

l.], v. 61, n. 8, p. 1159–1167, 2005.

ORLOWICZ, Elizabeth. Filtering efficiency and feeding mechanisms of *Daphnia pulex* on *Microcystis aeruginosa* and *Nannochloropsis*. **Marine Biology Commons**, [*s. l.*], p. 15, 2012.

PAFFENHÖFER, G. A. Grazing and ingestion rates of nauplii, copepodids and adults of the marine planktonic copepod *Calanus helgolandicus*. **Marine Biology**, [*s. l.*], v. 11, n. 3, p. 286–298, 1971.

PESTICIDE PROPERTIES DATABASE - PPDB. **Bases de dados de pesticidas**.

Flumioxazin (Ref: S 53482). Recuperado de

<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/335.htm>. Acesso em: 07/08/2023

PÉREZ-MORALEZ, A; SARMA, S.S.S. Feeding and filtration rates of zooplankton (rotifers and cladocerans) fed toxic cyanobacterium (*Microcystis aeruginosa*). **Journal of Environmental Biology**, [*s. l.*], v. 35, n. November, p. 1061–1066, 2014.

PETERS, R H. Methods for the study of feeding, grazing and assimilation by zooplankton. In: Downing JA, Rigler FH, editors.). A manual on methods for the assessment of secondary productivity in freshwaters. 2nd ed. Oxford: **Blackwell Sci Publ**; p. 336-412, 1984.

REY, C. *et al.* Influence of algal diet on growth and ingestion of *Calanus helgolandicus* nauplii. **Marine Ecology Progress Series**, [*s. l.*], v. 216, p. 151–165, 2001.

RODRIGUES, S. *et al.* Can biochemical endpoints improve the sensitivity of the biomonitoring strategy using bioassays with standard species, for water quality evaluation?. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [*s. l.*], v. 215, p. 112151, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112151>.

TUREMIS, Mehmet *et al.* Optical biosensor based on the microalga-paramecium symbiosis for improved marine monitoring. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [*s. l.*], v. 270, p. 424–432, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.04.111>.

Capítulo 3. A TOXICIDADE DA FORMULAÇÃO HERBICIDA SUMYSIN 500 SC[®] VIA ALIMENTAÇÃO INIBE A REPRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE *Daphnia magna* Straus (CRUSTACEA: CLADOCERA)

RESUMO

O presente estudo investigou o efeito do herbicida comercial Sumysin 500 SC[®], contendo flumioxazina como princípio ativo, sobre *Daphnia magna* quando administrado através da dieta de microalgas contaminadas. Os resultados demonstraram que a ingestão da microalga *Raphidocelis subcapitata* contaminada pelo herbicida afetou significativamente a sobrevivência, produção de ovos, reprodução e desenvolvimento de *D. magna*. Adicionalmente, foi observada uma modificação no conteúdo bioquímico da microalga quando exposta à flumioxazina, resultando em um aumento substancial de carboidratos totais, o que pode ter contribuído para os efeitos adversos nos organismos consumidores. O cladóceros *D. magna* demonstrou uma inibição de 100% na produção de ovos e, por conseguinte, na sua capacidade de reprodução. A toxicidade do herbicida também resultou em uma redução da expectativa de vida dos cladóceros em 13 dias, além de interferir no desenvolvimento do organismo, causando atrasos entre os estágios de vida. Em síntese, este estudo enfatiza a sensibilidade dos organismos aquáticos à contaminação ambiental e a importância da preservação da qualidade dos produtores primários para a saúde dos ecossistemas aquáticos.

Palavras-chave: *Raphidocelis subcapitata*; flumioxazina; cadeia trófica; alimentação.

ABSTRACT

This study investigated the effect of the commercial herbicide Sumysin 500 SC®, containing flumioxazin as its active ingredient, on *Daphnia magna* when administered through the diet of contaminated microalgae. The results showed that ingestion of the microalga *Raphidocelis subcapitata* contaminated by the herbicide significantly affected the survival, egg production, reproduction and development of *D. magna*. Additionally, a change in the biochemical content of the microalgae was observed when exposed to flumioxazin, resulting in a substantial increase in total carbohydrates, which may have contributed to the adverse effects on consumer organisms. The cladoceran *D. magna* showed a 100% inhibition in egg production and, consequently, in its ability to reproduce. The toxicity of the herbicide also resulted in a reduction in the life expectancy of the cladocerans by 13 days, as well as interfering with the development of the organism, causing delays between life stages. In summary, this study emphasizes the sensitivity of aquatic organisms to environmental contamination and the importance of preserving the quality of primary producers for the health of aquatic ecosystems.

Keywords: *Raphidocelis subcapitata*; flumioxazin; trophic chain; feeding.

INTRODUÇÃO

Com o aumento na utilização de agrotóxicos em escala global e seu potencial de escoamento e/ou lixiviação para os corpos d'água (Cosgrove; Jefferson; Jarvis, 2019; Mojiri *et al.*, 2020), as espécies aquáticas ficam diretamente expostas e sujeitas à absorção direta desses contaminantes. Isso ocorre por meio de processos como filtração e ingestão de alimentos (Bessa da Silva *et al.*, 2016), tornando os organismos aquáticos vulneráveis aos efeitos adversos desses agrotóxicos presentes no ambiente aquático. A toxicidade desses contaminantes através da dieta dos consumidores aquáticos pode representar uma importante via de absorção desses produtos químicos.

A flumioxazina é um princípio ativo de um herbicida amplamente utilizado no controle de ervas daninhas em diversos setores da agricultura, abrangendo desde grandes até pequenas propriedades (Boyd, 2014; Ferrell e Vencill, 2003). De acordo com o Banco de Dados de Propriedades de Pesticidas (PPDB), a flumioxazina foi classificada como altamente tóxica para algas e plantas aquáticas, apresentando também riscos para a reprodução e desenvolvimento de organismos (PPDB, 2024). Este herbicida já foi detectado em efluentes de estações de tratamento de água, por meio de análise qualitativa (Maurer *et al.*, 2023), indicando sua presença em corpos d'água próximos a áreas urbanas e regiões agrícolas.

Nos ecossistemas aquáticos, os produtores primários desempenham um papel fundamental na ciclagem de nutrientes e representam um grupo-chave na cadeia trófica, pois são responsáveis pela fotossíntese e pela produção primária, sendo os principais produtores de energia para os níveis tróficos subsequentes (Ma *et al.*, 2002; Prado *et al.*, 2009). As microalgas convertem energia solar em matéria orgânica por meio da fotossíntese (Zhang 2022) e, além de servirem como base da cadeia alimentar para uma variedade de organismos aquáticos, incluindo crustáceos, peixes e zooplâncton, são indispensáveis na manutenção do equilíbrio de dióxido de carbono e nitrogênio na atmosfera (Huang *et al.*, 2015). As microalgas, em particular, são suscetíveis à contaminação por herbicidas (Bessa da Silva *et al.*, 2016) e, o potencial de acumulação da flumioxazina em células de *Raphidocelis subcapitata* foi relatado por Ando; Fujisawa e Katagi, (2017) e está diretamente associado à lipofilicidade do composto químico. A transmissão da toxicidade do herbicida pela dieta pode ocorrer pela absorção do produto pelas microalgas e, conseqüentemente, transportar para níveis tróficos seguintes (Rodgher; Lombardi; Melão, 2009), resultando, quando ingeridos, em efeitos tóxicos para os organismos. Contudo, a presença da flumioxazina em corpos

d'água próximos a áreas urbanas e agrícolas levanta preocupações sobre seus potenciais efeitos nos ecossistemas aquáticos.

A produção secundária nos ecossistemas aquáticos refere-se à biomassa produzida pelos consumidores primários, como herbívoros e detritívoros, a partir da energia obtida dos produtores primários, principalmente as microalgas. Com a contaminação dos ecossistemas, os produtores primários podem afetar sua biomassa, qualidade nutricional e saúde geral, como observado em Souza *et al.*, (2014), resultando em uma redução na disponibilidade de alimento para os consumidores primários. Conseqüentemente, os consumidores primários podem experimentar uma diminuição em sua biomassa, taxa de crescimento e eficiência reprodutiva devido à ingestão de alimentos contaminados. Isso pode levar a uma diminuição na produção secundária, afetando toda a cadeia alimentar aquática (Faupe!; Ristau; Traunspurger, 2011).

Embora a transmissão de contaminantes por meio da dieta seja uma via importante de contaminação em organismos aquáticos, muitos estudos na literatura estão focados em metais (Geffard *et al.*, 2008; Rodgher; Lombardi; Melão, 2009; Souza *et al.*, 2014; Wang; Yan; Hyne, 2010). Até o momento, há poucos trabalhos que abordam a toxicidade de agrotóxicos via alimentação, e o impacto do herbicida comercial à base de flumioxazina na dieta de *D. magna* ainda não foi investigado. Por isso, o presente trabalho teve como propósito analisar os impactos de um herbicida comercial à base de flumioxazina na história de vida de *Daphnia magna* Straus (Crustacea: Cladocera) mediante a exposição alimentar a microalga contaminada com herbicida comercial Sumysin 500 SC[®] em um ensaio crônico de 21 dias. Além disso, uma análise do teor de carboidratos totais na microalga foi realizada afim de verificar a qualidade do alimento oferecido aos cladóceros. A hipótese subjacente deste estudo é que a contaminação da microalga com flumioxazina pode ter implicações substanciais na cadeia trófica aquática, uma vez que pode alterar o ciclo de vida do consumidor primário. Ao utilizar a microalga *Raphidocelis subcapitata* contaminada com o herbicida como fonte de exposição é acrescentada uma camada de complexidade realista, uma vez que isto representa uma rota potencial de exposição para organismos zooplactônicos em ambientes aquáticos contaminados. Portanto, este estudo oferece uma perspectiva contextualizada e aplicável às condições ambientais do que apenas administrar o herbicida diretamente. Os resultados deste estudo podem contribuir significativamente para a compreensão dos riscos potenciais associados aos impactos desse herbicida em ambientes aquáticos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Modelos de estudo

A espécie de microalga verde *R. subcapitata* foi obtida da cultura de alga do Laboratório de Limnologia da Universidade Federal de Alfenas / MG. A alga foi cultivada em frasco erlenmeyer de 1 litro contendo 500 mL de meio de cultivo L. C. Oligo (Afnor, 1980) e seu pH ajustado para faixa de 6,8-7,2 usando-se 0,1 mol L⁻¹ de NaOH ou HNO₃. A temperatura de cultivo da cultura foi de 23±/2°C, iluminação de 6800 lux, com fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuridão. Antes do uso, o meio de cultura L.C. Oligo foi esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. O frasco era agitado diariamente para evitar a decantação das células.

A espécie zooplanctônica, *D. magna*, foi obtida por meio de comércio *online*, aclimatada e cultivada seguindo a normativa ABNT NBR 12713:2016. O cultivo era mantido em uma sala com temperatura controlada a 23±2 °C, sob iluminação artificial de luz branca, com fotoperíodo claro/escuro de 12 h cada, em água reconstituída com um pH de 6,8-7,5, condutividade de 160 µS/cm e oxigênio dissolvido acima de 4,0 mg O₂ L⁻¹ (HORIBA®). Os organismos eram alimentados com a alga *R. subcapitata* (1x10⁵ cél mL⁻¹) e uma complementação de levedura (0,5%) e ração para peixes (0,5%) na proporção 1:1 (1 mL L⁻¹).

Solução teste e exposição de *R. subcapitata* ao herbicida

A concentração-teste do herbicida empregada para provocar efeitos tóxicos na alga, a qual desempenharia o papel de fonte alimentar para os cladóceros utilizados no ensaio de cadeia trófica, foi estabelecida conforme o EC_{50%} (0,852 µg L⁻¹) registrado no banco de dados de propriedades de pesticidas (Pesticide Properties DataBase - PPDB) para *R. subcapitata*, derivado do princípio ativo de flumioxazina *per se*. A concentração de teste para o ensaio foi preparada utilizando o herbicida comercial Sumysin 500 SC®, contendo 500 g L⁻¹ do princípio ativo flumioxazina. O preparo do meio nutritivo e a condução do experimento seguiram o método de cultivo da microalga, compreendendo três repetições. Algas saudáveis em estágio de crescimento exponencial logarítmico foram empregadas no ensaio de exposição ao herbicida que continha o princípio ativo flumioxazina.

Após 96 horas de crescimento da microalga exposta ao herbicida, células de *R. subcapitata* foram centrifugadas à 1600 rpm por 10 minutos (BL-206/1 FANEM®) e seu *pellet* foi ressuspenso com água deionizada com a finalidade de retirar o meio de cultivo contaminado e as amostras foram mantidas sob refrigeração à 4°C durante o período

experimental. A alga contaminada ($0,852 \mu\text{g L}^{-1}$ de flumioxazina) e a alga controle (sem contaminação) foram usadas como alimento para os cladóceros na quantidade de 2×10^5 cél mL^{-1} (ABNT NBR 13373:2017). A contagem da densidade celular da microalga *R. subcapitata* foi realizada com o auxílio de câmaras de modelo Fuchs Rosenthal e microscópio Zeiss no aumento de 40 x.

Análise bioquímica da microalga: Carboidratos totais

O teor de carboidratos totais seguiu a metodologia previamente descrita em Albalasmeh *et al.*, (2013). O método é uma reação colorimétrica com ácido sulfúrico que consiste na quantificação dos carboidratos intracelulares totais presentes na microalga. Amostras de cada tratamento foram coletadas (30 mL) nas 96 horas de exposição e adicionadas em tubos de ensaios. Em seguida, os tubos passaram por um processo de centrifugação (BL-206/1 FANEM[®]) por 10 minutos às 1600 rpm. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e ao *pellet* formado adicionou-se 1 mL de água destilada e as amostras foram congeladas até o momento da análise final.

Para a análise, as amostras foram descongeladas e agitadas para a homogeneização das células. Em seguida, 3 mL de ácido sulfúrico concentrado foi adicionado em cada amostra e estas foram agitadas por 3 minutos, logo após, foram levadas a um banho de gelo para o seu resfriamento. Após o resfriamento, cada amostra foi transferida para uma cubeta de quartzo de capacidade de 2 mL e a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 315 nm (Biospectro[®] espectrofotômetro SP-220). Uma curva de calibração foi construída seguindo as mesmas definições da microalga e utilizando um padrão de glicose.

Exposição de *D. magna* a microalga contaminada com o herbicida

D. magna, representando um consumidor secundário, foi submetida à exposição alimentar (microalga verde – *R. subcapitata*) contaminada por um herbicida à base de flumioxazina, ao longo de um período máximo de 21 dias e o experimento foi baseado na metodologia aplicada em Souza *et al.*, (2014) com modificações. Para tal, neonatos com idades compreendidas entre 6 e 24 horas foram alojados em recipientes acrílicos transparentes contendo 10 mL de água reconstituída conforme as normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2016), sendo alimentados exclusivamente com uma dieta composta por algas na concentração de 2×10^5 células mL^{-1} a cada 48 h, contaminada com $0,852 \mu\text{g}$ de

flumioxazina por célula, enquanto um grupo de controle foi mantido livre de contaminação ao longo de todo o período experimental.

O experimento foi conduzido em sala climatizada com temperatura controlada à 23°C, luz artificial com intensidade luminosa de 1000 Lux e fotoperíodo de 12 horas claro : 12 horas escuro. Foram preparadas dez repetições, cada uma contendo um neonato, para cada tratamento, e os cladóceros foram expostos ao alimento contaminado com o herbicida durante o período experimental de 21 dias. A água de cultivo e o alimento foram integralmente renovados a cada intervalo de 48 horas. As condições da água foram monitoradas em cada renovação por meio da determinação de parâmetros como pH, condutividade e oxigênio dissolvido. Durante a exposição dos cladóceros ao alimento contaminado, os seguintes parâmetros foram avaliados em cada renovação da água e alimento:

- Sobrevivência: o tempo de vida dos organismos da geração 1, desde o nascimento até a morte.
- Reprodução: o número de neonatos produzidos durante a vida dos organismos.
- Tamanho corporal dos organismos nos dias 12 e 21, meio e fim do experimento.
- Alterações morfológicas.

Análises estatísticas

Os resultados obtidos para os parâmetros do crescimento, ciclo de vida e teor de carboidratos foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk. Em seguida, os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e seguido pelo Teste de Dunnett utilizando-se o software Minitab 17, e as diferenças entre os tratamentos foram consideradas significativas com níveis de significância de 95% ($p < 0,05$).

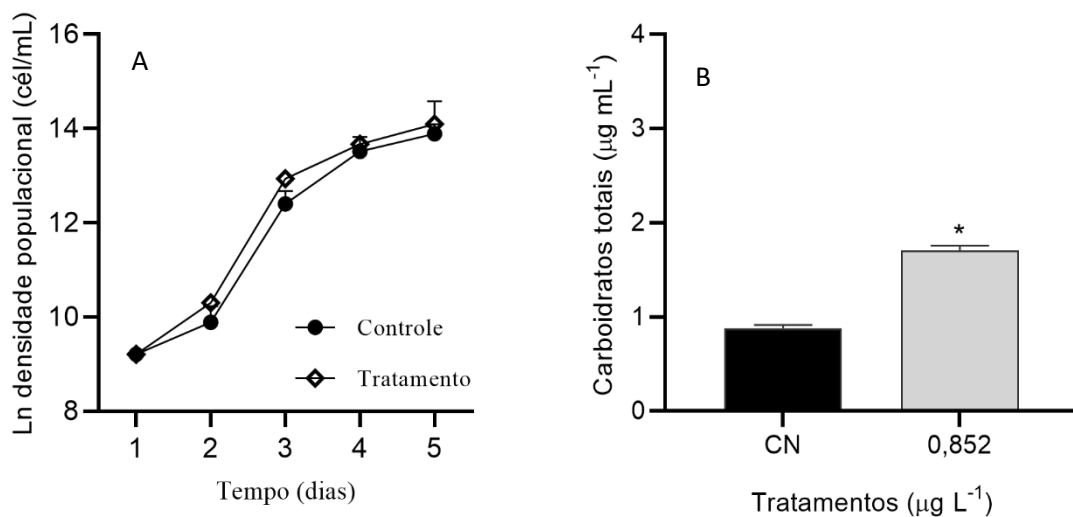
RESULTADOS

A trajetória biológica dos organismos foi monitorada a partir do estágio inicial de sua eclosão, quando os neonatos tinham entre 6 e 24 horas de vida. Ambos os grupos experimentais, controle e tratamento, foram alimentados exclusivamente com algas durante o período de observação. Os organismos do grupo controle foram alimentados com algas cultivadas em um meio de cultura isento de contaminação, enquanto as dafnias do tratamento

foram alimentadas com algas contaminadas com o herbicida comercial à base de flumioxazina.

A densidade da microalga *R. subcapitata* contaminada com o herbicida não foi significativamente alterada em comparação com o grupo controle (Fig. 1, A). Os carboidratos totais (Fig. 1, B) nas microalgas expostas ao herbicida foram aumentados em 2,1 vezes em comparação ao controle.

Figura 1: (A) Parâmetro de crescimento (Ln do número de densidade celular (célula mL⁻¹)) da *R. subcapitata* após exposição ao herbicida à base de flumioxazina na dose de 0,852 µg L⁻¹. (B) Teor de carboidratos totais da microalga *R. subcapitata* quantificados após 96 horas de exposição ao herbicida à base de flumioxazina.



Legenda: O símbolo * indica diferença estatística (Dunnet $p < 0,05$) em relação ao tratamento controle. As barras representam o desvio-padrão da média.

Fonte: Do autor, 2023.

Os impactos da flumioxazina através da alimentação nos parâmetros do ciclo de vida da *D. magna* estão apresentados na Tabela 1. A concentração efetiva de 50% (CE₅₀ 0,852 µg L⁻¹) indicada para *D. magna* causou um efeito significativo (Dunnet, $p < 0,05$) em todos os parâmetros analisados. Nos primeiros dias de alimentação, especificamente nos dias 2 e 3, observou-se nos tratamentos que os organismos apresentaram comportamento agitado e movimentos de natação irregulares, os quais se assemelhavam a movimentos circulares desordenados. A partir do dia 4, nos tratamentos, os organismos começaram a exibir sinais de estresse e apresentaram uma diminuição significativa de atividade na água. A sobrevivência desses indivíduos foi reduzida para apenas 13 dias, com os organismos morrendo progressivamente ao longo do tempo, como mostram os dados de sobrevivência (Tab. 1).

Tabela 1: Médias e desvio padrão dos parâmetros analisados da história de vida de *D. magna* para controle e tratamento de toxicidade do herbicida à base de flumioxazina via alimento com tempo de duração experimental de 21 dias.

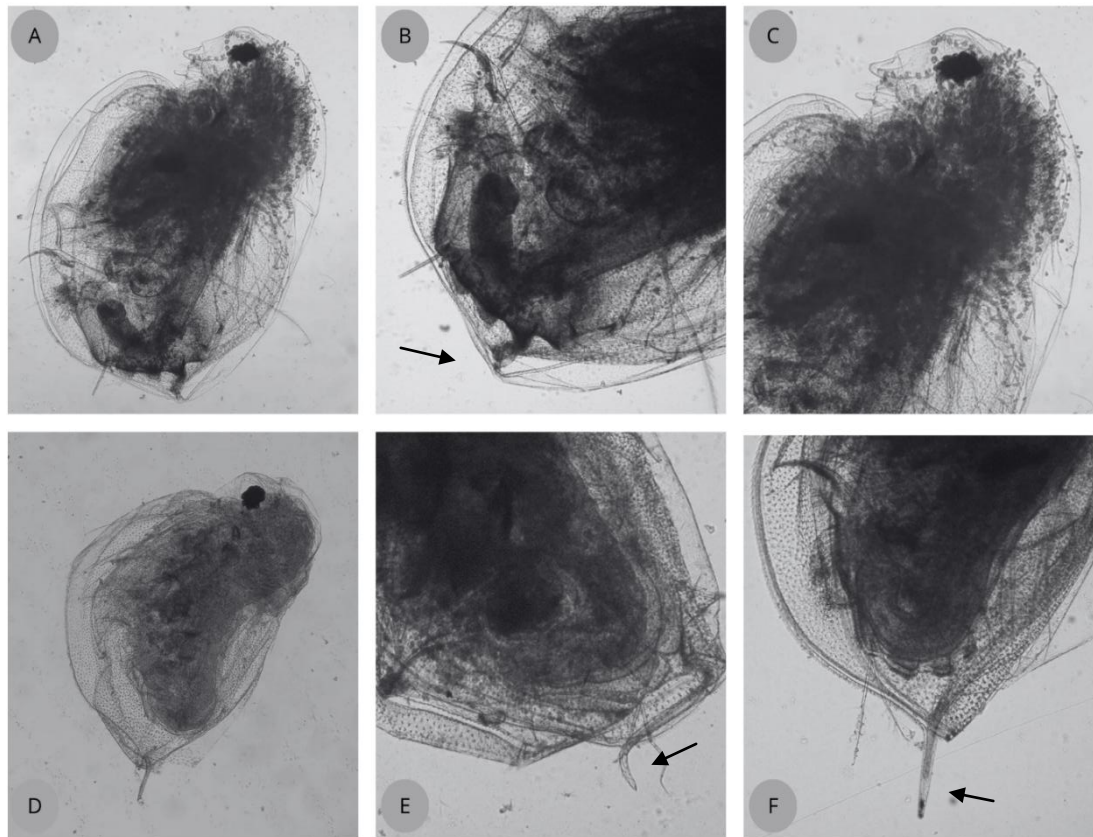
Parâmetros	Controle	Tratamento (0,852 µg cél ⁻¹)
Sobrevivência (n° indivíduos/dias)	8 / 21	1 / 13*
Média de ovos por fêmea	6,97±0,94	0*
Média de neonatos por fêmea	7,12±0,83	0*
Comprimento máximo (µm)	2460,95±0,93	1903,73±0,76*

Legenda: O símbolo * indica diferença estatística (Dunnet p<0,05) em relação ao tratamento controle.
Fonte: Do autor, 2023.

O grupo controle permaneceu saudável ao longo de todo o período experimental, e mantiveram suas atividades metabólicas elevadas desde o primeiro dia. No dia 5, a maioria deles já apresentava troca da carapaça, e era visível a redução da cauda, indicando a passagem para a fase adulta. A partir do nono dia, todos os organismos das repetições apresentaram ovos em seus abdomens e, no décimo segundo dia, os neonatos começaram a nascer. As fêmeas apresentavam em média 6 a 7 ovos, e a cada renovação da água e alimentação, aproximadamente 6 ou 7 neonatos eram retirados do recipiente. Ao final do experimento, que durou 21 dias, os organismos adultos permaneceram com uma média de comprimento máximo de 2460 µm, enquanto os organismos do tratamento sobreviveram apenas 13 dias, mostrando redução em seu desenvolvimento com uma média de tamanho de 1903 µm.

A Figura 3 ilustra as diferenças anatômicas analisadas nos organismos com o mesmo tempo de vida, comparando o grupo controle com o tratamento. É evidente a inibição no desenvolvimento da *D. magna* quando alimentada com a microalga contaminada com a flumioxazina, pois a persistência da cauda é um indicativo da juventude do organismo, ainda não tendo alcançado a fase adulta.

Figura 3: Diferenças anatômicas observadas entre tratamento controle (A, B e C) e tratamentos com alimentação contaminada com herbicida à base de flumioxazina (D, E e F) no 12º dia experimental.



Legenda: B – Fêmea adulta com ausência da cauda. E e F – Jovens com cauda.

Fonte: Do Autor.

DISCUSSÕES

A microalga *R. subcapitata* foi utilizada como fonte alimentar exclusiva para *D. magna* a fim de testar a toxicidade do herbicida com princípio ativo à base de flumioxazina via alimentação. Para este estudo, era fundamental que a microalga fosse contaminada pelo herbicida ao passo que mantivesse sua taxa de crescimento, a fim de assegurar a alimentação das dafnias e uma representação precisa das condições encontradas em ambientes naturais. Apesar disso, o conteúdo total de carboidratos da microalga sofreu alterações significativas com o seu aumento comparado ao grupo controle. A elevação na produção de carboidratos nas células da microalga pode ser interpretada como uma estratégia de resposta ao estresse induzido pelo herbicida, visando compensar os danos causados e fortalecer o metabolismo, aumentando assim a capacidade de sobrevivência em condições adversas (Markou; Angelidaki; Georgakakis, 2012), o que manteve seu crescimento estável. Shabana *et al.*,

(2001) também observaram um aumento nos níveis de carboidratos na microalga exposta ao herbicida. Eles associaram esse aumento de carboidratos na microalga verde *Protosiphon botryoides*, quando exposta ao herbicida pendimetalina, a uma inibição correspondente da fotossíntese. Contudo, é pertinente ressaltar que, embora esse aumento na quantidade de carboidratos totais possa representar uma adaptação da microalga às pressões ambientais impostas pelo herbicida, tal resposta pode acarretar efeitos secundários não antecipados no ecossistema aquático.

Os carboidratos são reconhecidos como a principal fonte de energia para *D. magna* (Bessa da Silva *et al.*, 2016), no entanto, a má qualidade do alimento resultou em alterações no ciclo de vida da espécie, além de inibir completamente sua reprodução (Tab. 1). Vários estudos têm como foco avaliar o impacto da dieta no desenvolvimento de cladóceros e destacam a importância da qualidade do alimento para o metabolismo desses organismos. Por exemplo, Koch; Von Elert e Straile, (2009) realizaram um experimento no qual suplementaram *Daphnia galeata* com algas modificadas em termos de teor de proteínas e lipídios, e observaram um aumento significativo em sua taxa de reprodução. Ademais, a sobrevivência, longevidade e reprodução de *D. magna* podem ser influenciadas pelo tipo e concentração de alimento (Martínez-Jerónimo *et al.*, 1994).

A qualidade do alimento, comprometida pela contaminação com o herbicida à base de flumioxazina, e pelo aumento dos níveis de carboidratos, influenciou significativamente o ciclo de vida de *D. magna*, assim como seu desenvolvimento e reprodução. A exposição tóxica resulta em uma interação entre o agente químico e o local de alcance no organismo, causando uma lesão primária que desencadeará uma série de processos bioquímicos em nível celular (De Coen; Janssen; Segner, 2001). Nos estudos de Bessa da Silva *et al.* (2016), foi observado que a absorção do herbicida pendimetalina, via alimentação, foi responsável pela bioacumulação nos tecidos de *D. magna* e também resultou em alterações significativas em sua reprodução. Além disso, em uma pesquisa realizada por Ferrando *et al.*, (1996), foi demonstrado que *D. magna* absorveu uma quantidade consideravelmente maior do inseticida tetradifon quando alimentada simultaneamente com a microalga previamente exposta ao contaminante, além da exposição à água contaminada com o mesmo composto. Em nossos achados, a exposição do crustáceo planctônico, *D. magna*, à microalga contaminada resultou em uma ingestão direta de flumioxazina, introduzindo-a no nível trófico primário da cadeia alimentar aquática.

A análise morfológica, conforme demonstrado na Figura 3, fornece evidências adicionais dos efeitos adversos da flumioxazina no desenvolvimento dos organismos

expostos. *D. magna* passa por diferentes estágios de mudas até alcançar a fase adulta (Pereira; Marques; Gonçalves, 2004), sendo eles: neonato, jovem e adulto. A persistência da cauda nos organismos jovens sugere uma inibição nos processos normais de metamorfose, indicando um impacto negativo significativo da flumioxazina no desenvolvimento desses organismos quando ingerida através da alimentação.

Em resumo, os achados deste estudo ressaltam a importância essencial das microalgas como produtores primários nos ecossistemas aquáticos, assim como a influência significativa que a contaminação desses produtores pode exercer sobre a transferência de energia ao longo da cadeia trófica. Contudo, a contaminação de microalgas por agentes como herbicidas pode resultar em uma possível interrupção na transferência de energia na cadeia trófica. Tal contaminação pode impactar não apenas a saúde e a função desses produtores, como evidenciado em nossos resultados, mas também a saúde e o desempenho dos consumidores que deles dependem como fonte alimentar. Portanto, a preservação das microalgas e outros produtores primários é essencial para assegurar a estabilidade e a resiliência dos ecossistemas aquáticos, bem como para sustentar as comunidades biológicas que deles dependem.

CONCLUSÃO

Em conclusão, este estudo destaca os impactos negativos da contaminação de microalgas por herbicidas na saúde e no desempenho de *D. magna*, um importante consumidor primário nos ecossistemas aquáticos. A contaminação da microalga *R. subcapitata* pelo herbicida flumioxazina teve impactos negativos no ciclo de vida de *D. magna*, reduzindo o seu desenvolvimento, inibindo em 100% sua reprodução e reduzindo a expectativa de vida do organismo para 13 dias. A exposição da microalga ao flumioxazina resultou em alterações bioquímicas, como um aumento nos níveis de carboidratos, que influenciaram negativamente o desempenho dos organismos consumidores.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIATION FRANÇAISE NORMALISATION (AFNOR) 1980. Norme expérimentale. T90-304. **Essais de seuils Détermination de l'inhibition de *Scenedesmus subspicatus* par une substance**, Paris, France. France, 1980.
- ALBALASMEH, Ammar A.; BERHE, Asmeret Asefaw; GHEZZEHEI, Teamrat A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 97, n. 2, p. 253–261, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.072>.
- ANDO, Daisuke; FUJISAWA, Takuo; KATAGI, Toshiyuki. Fate of Flumioxazin in Aquatic Plants: Two Algae (*Pseudokirchneriella subcapitata*, *Synechococcus* sp.), Duckweed (*Lemna* sp.), and Water Milfoil (*Myriophyllum elatinoides*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 65, n. 40, p. 8813–8822, 2017.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 12713:2016. **Ecotoxicologia aquática - Guia para seleção de métodos de ensaio com organismos aquáticos**. Rio de Janeiro, 2016.
- BESSA DA SILVA, M. *et al.* Effects of dietary exposure to herbicide and of the nutritive quality of contaminated food on the reproductive output of *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, [s. l.], v. 179, p. 1–7, 2016.
- BOYD, Nathan S. Pepper and Tomato Root Uptake of Paraquat and Flumioxazin. **Weed Technology**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 626–632, 2014.
- COSGROVE, Stephanie; JEFFERSON, Bruce; JARVIS, Peter. Pesticide removal from drinking water sources by adsorption: a review. **Environmental Technology Reviews**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–24, 2019.
- DE COEN, W. M.; JANSSEN, C. R.; SEGNER, H. The use of biomarkers in *Daphnia magna* toxicity testing V. In vivo alterations in the carbohydrate metabolism of *Daphnia magna* exposed to sublethal concentrations of mercury and lindane. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 223–234, 2001.
- FAUPEL, Michael; RISTAU, Kai; TRAUNSPURGER, Walter. Biomass estimation across the benthic community in polluted freshwater sediment-A promising endpoint in microcosm studies?. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 74, n. 7, p. 1942–1950, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.06.022>.
- FERRANDO, M. D.; SANCHO, E.; ANDREU-MOLINER, E. Accumulation of tetradifon in an algae (*Nannochloris oculata*) and the cladoceran, *Daphnia magna*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, [s. l.], v. 57, n. 1, p. 139–145, 1996.
- FERRELL, Jason A.; VENCILL, William K. Flumioxazin soil persistence and mineralization in laboratory experiments. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 51, n. 16, p. 4719–4721, 2003.

GEFFARD, Olivier *et al.* Effects of chronic dietary and waterborne cadmium exposures on the contamination level and reproduction of *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [s. l.], v. 27, n. 5, p. 1128–1134, 2008.

HUANG, Haomin *et al.* Effects of natural flavonoids on photosynthetic activity and cell integrity in *Microcystis aeruginosa*. **Toxins**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 66–80, 2015.

KOCH, Ulrike; VON ELERT, Eric; STRAILE, Dietmar. Food quality triggers the reproductive mode in the cyclical parthenogen *Daphnia* (Cladocera). **Oecologia**, [s. l.], v. 159, n. 2, p. 317–324, 2009.

MA, Jianyi *et al.* Differential sensitivity of two green algae, *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella pyrenoidosa*, to 12 pesticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 52, n. 1, p. 57–61, 2002.

MARKOU, Giorgos; ANGELIDAKI, Irini; GEORGAKAKIS, Dimitris. Microalgal carbohydrates: An overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 96, n. 3, p. 631–645, 2012.

MARTÍNEZ-JERÓNIMO, Fernando *et al.* Effect of food type and concentration on the survival, longevity, and reproduction of *Daphnia magna*. **Hydrobiologia**, [s. l.], v. 287, n. 2, p. 207–214, 1994.

MAURER, Loïc *et al.* Contamination Pattern and Risk Assessment of Polar Compounds in Snow Melt: An Integrative Proxy of Road Runoffs. **Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 57, n. 10, p. 4143–4152, 2023.

MOJIRI, Amin *et al.* Pesticides in aquatic environments and their removal by adsorption methods. **Chemosphere**, [s. l.], v. 253, p. 126646, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126646>.

PEREIRA, J. L.; MARQUES, C. R.; GONÇALVES, F. Allometric relations for *Ceriodaphnia* spp. and *Daphnia* spp. **Annales de Limnologie**, [s. l.], v. 40, n. 1, p. 11–14, 2004.

PESTICIDE PROPERTIES DATABASE - PPDB. Flumioxazin (Ref: S 53482). Recuperado de <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/335.htm>. Acesso em: 17/12/2023

PRADO, R. *et al.* The herbicide paraquat induces alterations in the elemental and biochemical composition of non-target microalgal species. **Chemosphere**, [s. l.], v. 76, n. 10, p. 1440–1444, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.06.003>.

RODGHER, Suzelei; LOMBARDI, Ana Teresa; MELÃO, Maria da Graça Gama. Evaluation onto life cycle parameters of *Ceriodaphnia silvestrii* submitted to 36 days dietary copper exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 72, n. 6, p. 1748–1753, 2009.

SHABANA, E. F. *et al.* Effect of pendimethalin on growth and photosynthetic activity of *Protosiphon botryoides* in different nutrient states. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 106–110, 2001.

SOUZA, J. P. *et al.* Effects of dietborne cadmium on life history and secondary production of a tropical freshwater cladoceran. **Ecotoxicology**, [s. l.], v. 23, n. 9, p. 1764–1773, 2014.

WANG, Zaosheng; YAN, Changzhou; HYNE, Ross V. Effects of dietary cadmium exposure on reproduction of saltwater cladoceran *Moina monogolica* Daday: Implications in water quality criteria. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 365–372, 2010.

Capítulo 4. IMPACTOS DA EXPOSIÇÃO AO HERBICIDA COMERCIAL À BASE DE FLUMIOXAZINA SOBRE OS ORGANISMOS MODELOS *Ceriodaphnia silvestrii* E *Daphnia magna*: Uma Avaliação de Toxicidade Aguda e Crônica

RESUMO

A presença de agrotóxicos no ecossistema aquático tem sido objeto de crescente preocupação nas últimas décadas, em decorrência do aumento na utilização desses agentes químicos e do consequente aumento da poluição dos ecossistemas. Os herbicidas constituem uma classe proeminente de pesticidas amplamente empregados no setor agrícola, sendo motivo de crescente inquietação ambiental devido aos seus efeitos sobre organismos não-alvo. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos agudos e crônicos de um herbicida comercial contendo flumioxazina sobre duas espécies de cladóceros, *Ceriodaphnia silvestrii* e *Daphnia magna*. Parâmetros como imobilidade, reprodução e sobrevivência dos organismos foram avaliados. Os resultados do ensaio crônico indicaram uma sensibilidade significativa ao herbicida, com concentrações a partir de 3,5 mg L⁻¹ marcando um ponto crítico para a população de *C. silvestrii*. Os ensaios de toxicidade aguda revelaram uma imobilidade expressiva em ambas as espécies, sendo que *D. magna* apresentou 100% de imobilidade em concentrações superiores, acima de 47,2 mg L⁻¹. O estudo também destacou a dinâmica temporal na resposta dos organismos, com o EC₅₀ 534,0 mg L⁻¹ de 24 h demonstrando uma resistência inicial seguida por uma redução significativa em 48 h, EC₅₀ 247,9 mg L⁻¹, principalmente para *C. silvestrii*. A reprodução partenogenética de *C. silvestrii* foi impactada, sugerindo que diferentes mecanismos de ação do flumioxazina podem interferir diretamente nos processos reprodutivos. Conforme os resultados deste estudo, a classificação do herbicida foi determinada como altamente tóxica, com uma Concentração Efetiva para 50% de sobrevivência (CE₅₀) de 9,13 mg L⁻¹. Tal constatação enfatiza a urgência em avaliar os possíveis riscos ambientais associados a esse herbicida.

Palavras-chave: Toxicidade aguda; toxicidade crônica; flumioxazina; cladóceros; ecossistema aquático.

ABSTRACT

The presence of pesticides in the aquatic ecosystem has been the subject of increasing concern in recent decades, due to the increase in the use of these chemical agents and the consequent increase in ecosystem pollution. Herbicides are a prominent class of pesticides widely used in the agricultural sector, and are a cause of growing environmental concern due to their effects on non-target organisms. The aim of this study was to evaluate the acute and chronic effects of a commercial herbicide containing flumioxazin on two species of cladocerans, *Ceriodaphnia silvestrii* and *Daphnia magna*. Parameters such as immobility, reproduction and survival of the organisms were evaluated. The results of the chronic test indicated a significant sensitivity to the herbicide, with concentrations from 3.5 mg L⁻¹ marking a critical point for the *C. silvestrii* population. The acute toxicity tests revealed significant immobility in both species, with *D. magna* showing 100% immobility at higher concentrations, above 47.2 mg L⁻¹. The study also highlighted the temporal dynamics in the response of the organisms, with the EC₅₀ of 24 h showing an initial resistance followed by a significant reduction in 48 h, especially for *C. silvestrii*. Parthenogenetic reproduction of *C. silvestrii* was impacted, suggesting that different mechanisms of action of flumioxazin can directly interfere with reproductive processes. According to the results of this study, the classification of the herbicide was determined to be highly toxic, with an Effective Concentration for 50% survival (EC₅₀) of 9.13 mg L⁻¹. This finding emphasizes the urgency of assessing the possible environmental risks associated with this herbicide.

Keywords: Acute toxicity; chronic toxicity; flumioxazin; cladocerans; aquatic ecosystem.

INTRODUÇÃO

As atividades antropogênicas podem causar uma redução nas funções do ecossistema aquático, acarretando riscos significativos tanto para a biodiversidade das espécies quanto para a saúde humana (Berti *et al.*, 2015). A presença de resíduos químicos provenientes de atividades humanas, como agricultura intensiva, indústria e descarte inadequado de resíduos, pode desencadear desequilíbrios no ecossistema. Os pesticidas constituem um exemplo paradigmático de agentes químicos empregados na agricultura (Grube *et al.*, 2011), com o propósito de eliminar organismos-alvo que representam ameaças às plantações. Entretanto, o aumento na aplicação desses pesticidas tem gerado crescente apreensão devido aos impactos que podem ocasionar no meio ambiente aquático.

A aplicação extensiva de pesticidas nas áreas agrícolas pode resultar na lixiviação dessas substâncias para corpos d'água próximos, seja por meio do escoamento superficial ou infiltração no solo (Bhadouria; Mathur; Kaul, 2012; Zhao *et al.*, 2009). Esse transporte de pesticidas para ecossistemas aquáticos pode desencadear efeitos adversos, afetando a fauna e a flora aquáticas. Os herbicidas constituem uma classe proeminente de pesticidas amplamente empregados no setor agrícola com o intuito de controlar o crescimento de plantas daninhas (Kraehmer *et al.*, 2014). Em 2016, cerca de 50% do total global de pesticidas utilizados corresponderam a herbicidas, conforme documentado por Mojiri *et al.*, (2020). Os herbicidas são categorizados em 27 classes com base em seus modos de ação, e entre essas, encontra-se a classe das N-fenil-ftalamidas, que inclui o composto ativo conhecido como flumioxazina. Este atua como inibidor da protoporfirinogênio oxidase (PROTOX), interferindo na rota de síntese da clorofila das plantas. Em particular, provoca o acúmulo de porfirinas, resultando na perda de clorofila e carotenoides, assim como na ruptura das membranas celulares. Esse efeito leva à desintegração das organelas celulares, subsequente necrose do tecido e, por fim, à morte celular (WSSA, 2024).

Os organismos zooplancônicos, pertencentes ao grupo dos cladóceros, são frequentemente empregados em bioensaios de toxicidade devido às suas características biológicas sensíveis e representativas do nível trófico intermediário (Castelhana Gebara *et al.*, 2021). Esses organismos são especialmente sensíveis a alterações ambientais e respondem prontamente a substâncias tóxicas (Sarma; Nandini, 2006). Além disso, sua posição na cadeia alimentar aquática como consumidores primários destaca sua importância na manutenção do equilíbrio ecológico. O estudo conduzido por Castelhana Gebara *et al.* (2021) evidenciou, por meio de ensaios de toxicidade crônica, a notável sensibilidade de *C. silvestrii* aos metais zinco

e alumínio. Os resultados indicaram que concentrações relativamente baixas, com $CE_{50\%}$ de $0,22 \text{ mg L}^{-1}$ para Zn e $0,52 \text{ mg L}^{-1}$ para Al, desencadearam efeitos sinérgicos na espécie. Outra investigação realizada com *D. magna* demonstrou a sensibilidade dessa espécie à toxicidade de resíduos hospitalares presentes no ambiente aquático, resultando na inibição de sua reprodução e sobrevivência (Zórtea; Freiburger; Fuzinato, 2018). Ao submeter *C. silvestrii* e *D. magna* a testes de toxicidade, é possível quantificar de forma precisa os efeitos adversos dos pesticidas em parâmetros vitais, como taxa de sobrevivência, reprodução e crescimento.

A escolha desses organismos modelos não apenas permite a avaliação da toxicidade aguda, mas também fornece entendimentos sobre os efeitos crônicos e cumulativos ao longo do tempo. Essa abordagem holística é essencial para o desenvolvimento de estratégias de gestão ambiental mais eficazes, com o objetivo de minimizar os riscos associados ao uso de pesticidas, notadamente os herbicidas, que são extensivamente empregados no setor agrícola, para preservar a saúde dos ecossistemas aquáticos.

Este estudo propõe a avaliação dos efeitos do herbicida à base de flumioxazina por meio de testes de toxicidade aguda, utilizando os organismos modelos *C. silvestrii* e *D. magna*. Além disso, objetivou-se realizar um teste de toxicidade crônica específico com a espécie *C. silvestrii*, com a finalidade de compreender melhor os impactos a longo prazo dessa substância. Dessa forma, busca-se contribuir para uma análise abrangente dos efeitos imediatos e a longo prazo do herbicida em questão, fornecendo informações relevantes para diversas questões ambientais e a preservação da biodiversidade aquática.

MATERIAIS E MÉTODOS

Modelos de estudo

A espécie zooplanctônica, *C. silvestrii*, foi coletada em ambiente natural por meio de rede de zooplâncton de malha $68 \mu\text{m}$ na porção represada do Rio São Thomé – Reservatório de Furnas ($21^{\circ}\text{S } 27^{\circ}51' 46''\text{W } 00^{\circ}02' 00''$) no município de Alfenas – MG. No ambiente laboratorial, os organismos foram selecionados, identificados e posteriormente transferidos para béqueres de vidro com capacidade para 1000 mL, contendo água proveniente do reservatório de origem. Após um período de adaptação às condições do laboratório, os organismos foram submetidos ao processo de aclimação, utilizando água proveniente do cultivo mantido ou água reconstituída. A espécie aclimatada em laboratório foi cultivada de

acordo com as condições preconizadas pela normativa ABNT NBR 13373:2017. A espécie *Daphnia magna* foi adquirida por meio de comercialização online, e posteriormente passando por um processo de aclimação e sendo cultivada conforme as diretrizes estabelecidas pela normativa ABNT NBR 12713:2016.

Os cultivos de *C. silvestrii* e *D. magna* foram mantidos em uma sala com temperatura controlada a 23 ± 2 °C, sob iluminação artificial de luz branca, seguindo um ciclo claro/escuro de 12 horas cada. A água utilizada nos cultivos foi reconstituída, mantendo um pH entre 6,8-7,5, uma condutividade de 160 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e uma concentração de oxigênio dissolvido superior a 4,0 $\text{mg O}_2 \text{ L}^{-1}$. Os organismos foram alimentados com a alga *Raphidocelis subcapitata* (1×10^5 células mL^{-1}), complementada com levedura (0,5%) e ração para peixes (0,5%) em uma proporção de 1:1 (1 mL L^{-1}).

Produto químico e soluções teste

As concentrações de teste para os ensaios de inibição aguda e crônica foram preparadas utilizando o herbicida comercial Sumysin 500 SC[®], contendo 500 g L^{-1} do princípio ativo flumioxazina. As seguintes doses do princípio ativo flumioxazina foram investigadas nos ensaios agudos, com um fator de multiplicação de 2.0 entre elas: CN: controle negativo; 1: 1,475 mg L^{-1} ; 2: 2,95 mg L^{-1} ; 3: 5,9 mg L^{-1} ; 4: 11,8 mg L^{-1} ; 5: 23,6 mg L^{-1} ; 6: 47,2 mg L^{-1} ; 7: 94,4 mg L^{-1} ; 8: 188,8 mg L^{-1} ; 9: 377,6 mg L^{-1} e 10: 755,2 mg L^{-1} . Com base nos resultados dos testes agudos, o $\text{EC}_{50\%}$ foi obtido e as concentrações para o ensaio crônico foram determinadas. As seguintes doses foram investigadas no ensaio de inibição crônica: CN: controle negativo; 1: 3,520 mg L^{-1} ; 2: 11,290 mg L^{-1} ; 3: 36,130 mg L^{-1} ; 4: 115,62 mg L^{-1} e 5: 370,00 mg L^{-1} .

Ensaio de toxicidade aguda

Os ensaios de toxicidade aguda foram conduzidos conforme as diretrizes estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR 2016) e aplicados tanto à *C. silvestrii* quanto à *D. magna*. Cada tratamento foi executado com 4 repetições, sendo cada repetição composta por 5 neonatos com idade entre 6 e 24 horas, totalizando assim 20 neonatos, conforme especificado pela normativa. Os organismos foram alojados em recipientes acrílicos transparentes contendo 10 mL da solução de teste. Os experimentos

foram conduzidos em uma sala com temperatura controlada a $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, em condições de escuridão total, ao longo de um período total de 48 horas. A avaliação da imobilidade dos organismos foi realizada nos intervalos de 24 e 48 horas de duração do experimento.

Ensaio de toxicidade crônica

O ensaio de toxicidade crônica foi conduzido com *C. silvestrii*, seguindo as diretrizes estabelecidas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT NBR, 2017). Foram utilizados dez recipientes (copos de acrílicos transparentes atóxicos), cada um contendo 15 mL de solução-teste e um organismo neonato com idade entre 6 e 24 horas, para cada concentração de teste do herbicida e o tratamento controle. Os testes foram realizados de forma semiestática, com renovação das soluções de cada tratamento e da alimentação a cada 2 dias. O período experimental teve uma duração total de 7 dias, mantendo os organismos nas mesmas condições do cultivo. Durante o experimento, a medição das variáveis da água, como pH, temperatura, oxigênio dissolvido e condutividade (HORIBA[®]), foi realizada a cada renovação da água reconstituída. Os parâmetros avaliados neste experimento foram a sobrevivência e a reprodução.

Análises estatísticas

Os resultados dos ensaios agudos e crônicos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e, posteriormente, ao Teste de Dunnett, empregando o software Minitab 17. As diferenças entre os tratamentos foram consideradas significativas com níveis de significância de 95% ($p < 0,05$). Os valores de concentração de inibição do crescimento (EC_{50}) foram calculados utilizando o software GraphPad Prism (versão 8).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados dos testes de toxicidade aguda com o herbicida à base de flumioxazina, conduzidos com os organismos modelos *C. silvestrii* e *D. magna*, revelaram padrões distintos de resposta. Os bioensaios de toxicidade aguda foram validados mediante a constatação de que menos de 20% dos indivíduos do grupo controle apresentaram mortalidade ou imobilidade após 48 horas de exposição ao herbicida para ambas as espécies (ABNT, 2016; ABNT, 2017). Durante os experimentos, as variáveis medidas na água, como pH, oxigênio

dissolvido, temperatura e condutividade, mantiveram-se constantes, não interferindo nos resultados obtidos. A temperatura e o pH não variaram mais de 1 °C e 1 unidade, respectivamente, e as concentrações de oxigênio dissolvido foram superiores à 4,5 mg O² L⁻¹ e a condutividade foi de 160 mS/cm.

Para *C. silvestrii* (Tabela 1), em 24 h de exposição ao herbicida, não foi observada imobilidade significativa nas doses testadas. Entretanto, em 48 h, a imobilidade começou a ocorrer a partir de 47,2 mg L⁻¹ de flumioxazina, afetando 25% dos organismos. Na concentração mais alta testada, de 755,2 mg de flumioxazina L⁻¹, alcançou-se 100% de mortalidade. Para a *D. magna* (Tabela 1), em 24 h de exposição a flumioxazina, os organismos apresentaram 90% de imobilidade a partir da dose de 47,2 mg L⁻¹, indicando uma sensibilidade inicial à substância testada. Essa sensibilidade persistiu nas concentrações seguintes, chegando a 100% de imobilidade. Em 48 horas, os resultados permaneceram consistentes nas maiores concentrações e com os efeitos adversos observados nas doses mais baixas mantendo-se inalterados. Os resultados indicam que o herbicida contendo flumioxazina apresentou impactos significativos na mobilidade das espécies testadas, com destaque para *D. magna*. Esses resultados determinam a sensibilidade dos cladóceros ao agrotóxico, sendo importantes modelos de organismos em ensaios de toxicidade que avaliam os impactos de herbicidas no ecossistema aquático. Além disso, esses achados ressaltam a importância em avaliar a toxicidade aguda em diferentes períodos de exposição, uma vez que as respostas dos organismos variam consideravelmente dentro de um período de 24 horas de exposição a um contaminante, podendo tornar-se mais resistentes ou intolerantes. No estudo que avaliou o dimetilsulfóxido (DMSO) em diferentes espécies aquáticas, incluindo *D. magna*, foram identificadas diferenças significativas na mobilidade após 24 horas ou 48 horas de exposição ao solvente químico. Notavelmente, ocorreu uma redução no valor de Concentração Efetiva para 50% de efeito (EC₅₀) em relação ao tempo (Andrade-Vieira *et al.*, 2022), conforme observado neste estudo. Dave e Herger (2012) também compararam EC₅₀ de 24 h com EC₅₀ de 48 h para a toxicidade de compostos farmacêuticos em *D. magna* e observam diferenças significativas.

Tabela 1: Imobilização (%) de *Ceriodaphnia silvestrii* e *Daphnia magna* exposta ao herbicida à base de flumioxazina (mg L⁻¹) no teste agudo em 24 e 48 horas.

(continua)

Teste Agudo

mg L ⁻¹	<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>		<i>Daphnia magna</i>	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	0,00	0,00	0,00	20,0
1,47	0,00	0,00	0,00	10,0
2,95	0,00	0,00	5,00	15,0
5,90	0,00	0,00	5,00	30,0
11,8	0,00	0,00	10,0	45,0
23,6	0,00	0,00	15,0	20,0
47,2	0,00	25,0*	75,0*	95,0*
94,4	0,00	20,0*	95,0*	100,0*
188,8	0,00	30,0*	100,0*	100,0*
377,6	0,00	55,0*	100,0*	100,0*
755,2	10,0	95,0*	100,0*	100,0*

Legenda: O símbolo * indica diferença estatística (Dunnet, $p < 0,05$) em relação ao tratamento controle. As barras representam o desvio-padrão da média. Fonte: Do autor, 2023.

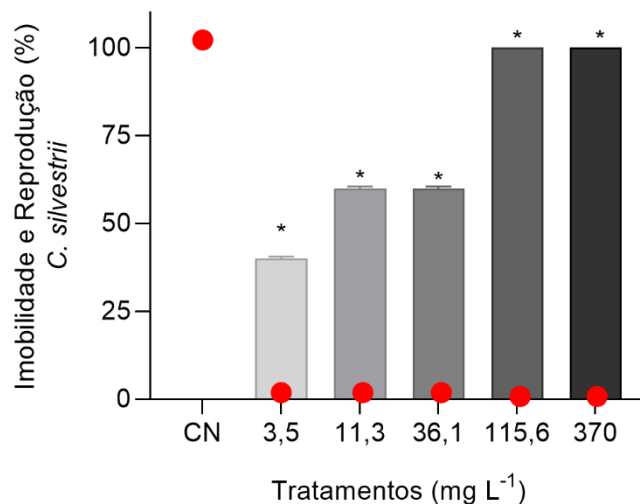
Os valores de Concentração Efetiva para 50% de imobilidade (EC_{50}) foram determinados para avaliar a toxicidade aguda do herbicida à base de flumioxazina nas espécies de cladóceros *C. silvestrii* e *D. magna* em diferentes períodos de exposição. No caso de *C. silvestrii*, a EC_{50} foi identificada como 534,0 mg L⁻¹ durante as primeiras 24 h, registrando uma posterior redução para 247,9 mg L⁻¹ após 48 h de exposição. Quanto a *D. magna*, a EC_{50} foi inicialmente aferida em 30,61 mg L⁻¹ após 24 h, apresentando uma sutil diminuição para 29,59 mg L⁻¹ ao completar 48 h de exposição.

C. silvestrii evidenciou ser uma espécie com maior resistência ao herbicida, tanto em relação ao tempo de exposição quanto às concentrações efetivas para 50% de imobilidade (EC_{50}) calculadas em ambos os períodos, enquanto *D. magna* apresentou maior sensibilidade ao contaminante. Contudo, quando exposta ao produto comercial, *D. magna* demonstrou significativamente maior resistência em comparação com diversos organismos, incluindo *Oncorhynchus mykiss* (CE_{50} de 2,3 mg L⁻¹), *Chironomus riparius* (CE_{50} de 0,73 mg L⁻¹), *Lemna giba* (CE_{50} de 0,00035 mg L⁻¹), *Raphidocelis subcapitata* (CE_{50} de 0,000852 mg L⁻¹) e até mesmo a sua própria espécie, *D. magna* (CE_{50} de 5,9 mg L⁻¹), quando expostos ao reagente puro (PPDB, 2024). Para *Scenedesmus obliquus* e *Lemna minor*, a formulação do herbicida com flumioxazina foi de 3 e 3,6 mg L, respectivamente (Geoffroy *et al.* 2004). Os valores calculados, tanto para *D. magna* quanto *C. silvestrii*, até o presente momento, superam

estas referências encontradas na literatura, ressaltando a relevância de considerar a composição da formulação do produto comercial quando comparado com o princípio ativo puro. Além disso, fatores críticos, como condições de cultivo, alimentação e temperatura, podem exercer influência decisiva nos resultados finais dos experimentos, conforme destacado por De Oliveira *et al.* (2015).

Os dados de toxicidade crônica determinaram impactos negativos na reprodução e na sobrevivência das *C. silvestrii* expostas ao herbicida contendo flumioxazina (Figura 1). O experimento foi validado, conforme as diretrizes da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2016), ao evidenciar que o grupo de controle apresentou 100% de sobrevivência nas fêmeas adultas e a produção de pelo menos 15 neonatos ao final dos sete dias de exposição ao herbicida. Em comparação com o grupo controle, o referido produto causou efeitos significativos nas variáveis analisadas, especialmente na reprodução, resultando em uma inibição de 100% para todos os tratamentos. Os resultados também indicaram que o ponto crítico que reduz a população exposta ao herbicida é observado a partir da concentração de 3,5 mg de flumioxazina L⁻¹.

Figura 1: *Ceriodaphnia silvestrii* exposta ao herbicida à base de flumioxazina (mg L⁻¹) durante o experimento crônico de 7 dias.



Legenda: Barras representam os resultados para imobilidade (%) e círculos vermelhos os resultados para a reprodução (%). Tratamentos: CN (controle negativo); 1: 3,5 mg L⁻¹; 2: 11,3 mg L⁻¹; 3: 36,1 mg L⁻¹; 4: 115,6 mg L⁻¹ e 5: 370 mg L⁻¹. O símbolo * indica diferença estatística (Dunnet, p<0,05) em relação ao tratamento controle. As barras representam o desvio-padrão da média.

Fonte: Do autor, 2023.

A concentração efetiva para 50% de sobrevivência (CE_{50}) foi determinada como 9,13 mg L⁻¹ para o produto comercial à base de flumioxazina, indicando uma sensibilidade da espécie à substância, mesmo em concentrações relativamente baixas. De acordo com a classificação toxicológica do Banco de Dados de Propriedades de Pesticidas (PPDB), a flumioxazina pode ser classificada como altamente tóxica para algas e plantas aquáticas, e moderadamente tóxica para minhocas, abelhas, peixes e invertebrados aquáticos (PPDB, 2024), conforme identificado neste estudo para os modelos zooplanctônicos.

A inibição completa da reprodução pode ser atribuída à ação tóxica da flumioxazina, influenciando diretamente os processos reprodutivos, como a maturação de ovos, que é conduzida por meio da reprodução por partenogênese cíclica (Sanpradit *et al.*, 2024). A reprodução partenogenética representa uma estratégia eficaz para assegurar uma rápida produção de descendentes em condições propícias. Durante a ovulação, a fêmea gera um ou mais ovos não fertilizados. Para o desenvolvimento adequado dos neonatos, são necessários estímulos externos, como a presença abundante de alimentos de boa qualidade e condições ambientais adequadas. A investigação dos efeitos adversos dos herbicidas em organismos aquáticos não alvo, como o zooplâncton, é uma área ainda pouco explorada (Islam e Mydia, 2023). Até o momento, não foram encontrados estudos acessíveis na literatura sobre a toxicidade da formulação de herbicidas contendo flumioxazina. No entanto, um estudo realizado com o herbicida Paraquat, amplamente estudado e reconhecido, revelou que a exposição de invertebrados de água doce a esse herbicida resultou na ruptura da membrana celular das células dos organismos, interferindo no transporte celular e provocando estresse oxidativo, caracterizado pela alteração das atividades enzimáticas da superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e lipoperoxidação (Cochón *et al.*, 2007). Esses achados sugerem a possibilidade de que efeitos semelhantes possam ocorrer com a flumioxazina, dado que a atividade bioquímica de inibição da protoporfirinogênio oxidase é a mesma, o que levou a inibição da reprodução e sobrevivência de *C. silvestrii*. Outro fator relevante para o desenvolvimento dos cladóceros é o dispêndio energético associado à tentativa de eliminação da substância tóxica, neste caso, comparados aqui com o herbicida em questão. Ao ajustar seu metabolismo em prol da sobrevivência, a energia que normalmente seria destinada ao crescimento e reprodução é reduzida (Sanpradit; Peerakietkhajorn, 2023). A inibição total da reprodução observada destaca a sensibilidade dessa espécie aos efeitos tóxicos do herbicida, indicando uma resposta expressiva mesmo em concentrações relativamente baixas.

Em conclusão, o herbicida comercial à base de flumioxazina desempenhou um papel negativo nas espécies testadas, ao controlar os padrões de crescimento e a taxa de reprodução,

o que conseqüentemente, em um ambiente natural, pode exercer um impacto direto na dinâmica populacional de toda a cadeia trófica. No entanto, são necessárias investigações adicionais nesta área para avaliar os mecanismos de ação dos herbicidas sobre os organismos aquáticos e correlacioná-los aos riscos ambientais e ao perigo de extinção das espécies. Além disso, é essencial entender melhor os efeitos dos herbicidas na qualidade da água e nos processos ecológicos dos ecossistemas aquáticos.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE-VIEIRA, Larissa Fonseca *et al.* Ecotoxic effects of the vehicle solvent dimethyl sulfoxide on *Raphidocelis subcapitata*, *Daphnia magna* and *Brachionus calyciflorus*. **Chemistry and Ecology**, [s. l.], v. 38, n. 5, p. 471–483, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/02757540.2022.2076838>.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 13373:2017. **Ecotoxicologia aquática - Método para ensaio de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*, Straus (Crustacea, Cladocera)**. Rio de Janeiro, 2017.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 12713:2016. **Ecotoxicologia aquática - Guia para seleção de métodos de ensaio com organismos aquáticos**. Rio de Janeiro, 2016.
- BERTI, Alessandra Paim *et al.* Efeitos da contaminação do ambiente aquático por óleos e agrotóxicos. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, [s. l.], v. 4, n. July 2009, p. 45–51, 2015.
- BHADOURIA, Bhumesh Singh; MATHUR, Vinod B.; KAUL, Rahul. Monitoring of organochlorine pesticides in and around Keoladeo National Park, Bharatpur, Rajasthan, India. **Environmental Monitoring and Assessment**, [s. l.], v. 184, n. 9, p. 5295–5300, 2012.
- CASTELHANO GEBARA, Renan *et al.* Toxicity and Risk Assessment of Zinc and Aluminum Mixtures to *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea: Cladocera). [S. l.]: **John Wiley & Sons**, Ltd, 2021-. ISSN 15528618.v. 40 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5162>.
- COCHÓN, A. C. *et al.* Differential effects of paraquat on oxidative stress parameters and polyamine levels in two freshwater invertebrates. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [s. l.], v. 68, n. 2, p. 286–292, 2007.
- DAVE, Göran; HERGER, Gabriella. Determination of detoxification to *Daphnia magna* of four pharmaceuticals and seven surfactants by activated sludge. **Chemosphere**, [s. l.], v. 88, n. 4, p. 459–466, 2012.
- DE OLIVEIRA, Laira L.Damasceno *et al.* Acute and chronic ecotoxicological effects of four pharmaceuticals drugs on cladoceran *Daphnia magna*. **Drug and Chemical Toxicology**, [s. l.], v. 39, n. 1, p. 13–21, 2016.
- GEOFFROY, Laure; FRANKART, Cécile; EULLAFFROY, Philippe. Comparison of different physiological parameter responses in *Lemna minor* and *Scenedesmus obliquus* exposed to herbicide flumioxazin. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 131, n. 2, p. 233–241, 2004.
- GRUBE, Arthur *et al.* Pesticides Industry Sales and Usage: 2006 and 2007 Market Estimates. **U.S. Environmental Protection Agency**, [s. l.], p. 1–41, 2011. Disponível em: <http://nepis.epa.gov/Adobe/PDF/3000659P.pdf>.
- ISLAM, Sk Saruk; MIDYA, Sujoy. Growth regulatory pattern of zooplankton in herbicide and antibiotic contaminated aquatic ecosystem: An overview. **Watershed Ecology and the**

Environment, [s. l.], v. 5, p. 153–160, 2023. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.wsee.2023.06.001>.

Herbicide Mode of Action Classification - Disponível em: <https://wssa.net/wp-content/uploads/HerbicideMOAClassification.pdf>. Acesso em: 05/01/2024

KRAEHMER, Hansjoerg *et al.* Herbicides as Weed Control Agents: State of the Art: I. Weed Control Research and Safener Technology: The Path to Modern Agriculture. **Plant Physiology**, [s. l.], v. 166, n. 3, p. 1119–1131, 2014.

MOJIRI, Amin *et al.* Pesticides in aquatic environments and their removal by adsorption methods. **Chemosphere**, [s. l.], v. 253, p. 126646, 2020. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126646>.

PESTICIDE PROPERTIES DATABASE (PPDB), Disponível em:
<https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/Reports/335.htm>. Acesso em: 01/12/2023.

SANPRADIT, Paweena *et al.* Thermal stress-stimulated ZnO toxicity inhibits reproduction of freshwater crustacean *Daphnia magna*. **Environmental Pollution**, [s. l.], v. 343, n. September 2023, p. 123171, 2024. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.123171>.

SANPRADIT, Paweena; PEERAKIETKHAJORN, Saranya. Disturbances in growth, oxidative stress, energy reserves and the expressions of related genes in *Daphnia magna* after exposure to ZnO under thermal stress. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 869, n. January, p. 161682, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.161682>.

SARMA, S. S.S.; NANDINI, S. Review of recent ecotoxicological studies on cladocerans. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, [s. l.], v. 41, n. 8, p. 1417–1430, 2006.

ZHAO, Zhonghua *et al.* Distribution and bioaccumulation of organochlorine pesticides in surface sediments and benthic organisms from Taihu Lake, China. **Chemosphere**, [s. l.], v. 77, n. 9, p. 1191–1198, 2009. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.022>.

ZÓRTEA, Andrezza Morgana; FREIBERGER, Vanessa Luisa; FUZINATTO, Cristiane Funghetto. Avaliação toxicológica de efluente de lavanderia hospitalar: toxicidade aguda e crônica com *Daphnia magna*. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, [s. l.], v. 11, n. 2, p. 73–85, 2018.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados dos múltiplos parâmetros analisados dos modelos vegetais e aquáticos neste trabalho podem contribuir para o melhor entendimento dos riscos potenciais da contaminação do meio ambiente com a formulação comercial de flumioxazina. Em conclusão, estes estudos indicam que a flumioxazina, um ingrediente ativo amplamente utilizado em herbicidas para o controle de plantas invasoras, apresenta diferentes níveis de toxicidade dependendo do ambiente em que é aplicada. Enquanto os testes realizados em modelos vegetais sugerem uma toxicidade em concentrações consideradas extremamente altas, com efeitos subletais detectáveis apenas em doses significativamente superiores às recomendadas para uso em campo, os experimentos com modelos aquáticos revelam uma alta sensibilidade e impacto negativo pronunciado sobre organismos aquáticos, mesmo em concentrações relativamente baixas.

A análise dos efeitos da flumioxazina em organismos aquáticos, incluindo microalgas e zooplâncton, demonstra uma série de respostas adversas, como fitotoxicidade, inibição da imobilidade e reprodução, redução da expectativa de vida e interferência no desenvolvimento dos organismos. Esses resultados indicam claramente que o herbicida à base de flumioxazina pode apresentar um grande impacto para os ecossistemas aquáticos, a partir dos dados obtidos com os organismos modelos testados.

Portanto, embora as concentrações de uso em campo possam sugerir uma relativa segurança para os organismos modelos terrestres testados, e apesar de apresentar efeitos mutagênicos em altas concentrações para o modelo vegetal, a alta toxicidade no ambiente aquático ressalta a vulnerabilidade dos ecossistemas aquáticos e a importância de ações concretas para minimizar os impactos negativos da utilização desse herbicida. Essas descobertas fornecem subsídios valiosos para orientar políticas de manejo e regulamentação ambiental, visando proteger a biodiversidade e a saúde dos ecossistemas aquáticos diante do crescente uso deste agrotóxico na agricultura.