

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

**Instituto de Biologia**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal**



**Dissertação**

**Efeitos do herbicida a base de glifosato Roundup Transorb® na tolerância  
térmica máxima de larvas de *Chironomus* sp. (Diptera:Chironomidae)**

**Vinicius Valente Acosta**

**Pelotas, 2022**

**Vinícius Valente Acosta**

**Efeitos do herbicida a base de glifosato Roundup Transorb® na tolerância térmica máxima de larvas de *Chironomus* sp. (Diptera, Chironomidae)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Orientador: Dr. Ricardo Berteaux Robaldo

Pelotas, 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

A185e Acosta, Vinicius Valente

Efeitos do herbicida a base de glifosato Roundup Transorb® na temperatura crítica máxima de larvas do mosquito *Chironomus* sp. (Diptera, Chironomidae) / Vinicius Valente Acosta ; Ricardo Berteaux Robaldo, orientador. — Pelotas, 2022.

33 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. Ambientes aquáticos. 2. Bioindicador. 3. Chironomidae. 4. CTMax. 5. Toxicidade. I. Robaldo, Ricardo Berteaux, orient. II. Título.

CDD : 574.929

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Dedico a todas as vítimas da COVID-19

Em memória à Carlos Alberto Acosta.

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar agradeço a quem me gerou e cuidou, meu muito obrigado a minha mãe Rosele e ao meu pai Carlos.

A família que acompanhou e torceu, aos que largaram a mão e aos que continuam agarrado, meu muito obrigado pois todos contribuíram com a pessoa que eu sou e por onde caminho hoje com muito orgulho.

As amigas e amigos, incansáveis, imbatíveis e implacáveis durante toda a minha vida, sem as contribuições de cada um de vocês eu não seria nada hoje, não vou citar nomes, espero que meu carinho por vocês fale as palavras que vocês merecem ouvir todos os dias. Infinitos obrigados, sem vocês digo mais uma vez, eu não seria mestre em nada, pois nos momentos que precisei encontrei apoio e alento na companhia de vocês.

Aos mestres da vida, dedico essa parte para agradecer aos que além de tudo me ensinaram, deixaram muito da sua história em mim na forma de ensinamentos, no rumo que escolhi, aprender é a ferramenta primordial, pra isso é preciso paciência e perseverança pois os ensinamentos nem sempre são fáceis, os mestres ensinam hoje o que as vezes vamos aprender muito tempo depois. Um simples gesto, um simples momento, um canto de uma ave ou uma composição literária podem vir a serem mestres ali naquele instante e ensinarem algo que lembraremos a vida inteira, a esses momentos meu muito obrigado.

Ao meu orientador, um agradecimento especial, sem tu eu não conseguiria chegar aonde cheguei e cumprir com o que combinamos. Parte do orgulho que tenho é de poder escrever essa parte para ti Robaldo, pois além de grande amigo fosse um grande orientador. Me ensinaste a não desistir, tanto do progresso pessoal quanto do profissional, que nas dificuldades crescemos e ao nos superarmos nos tornamos maiores para nós mesmos, reafirmamos nossa capacidade. Obrigado.

Ao pessoal do laboratório, por todo o apoio e as horas e horas de laboratório trabalhando juntos, vocês são metade de tudo que aconteceu nesse processo. Obrigado. Um obrigado especial ao Gabriel Kimura pelas ilustrações que possibilitaram a exemplificação da morfologia das larvas no trabalho.

E ao pessoal do Instituto de Biologia, colegas e funcionários, meu muito obrigado por todo o aprendizado, pela paciência e compreensão. Em especial para o coordenador do PPGBA Marco Gottschalk por todo o apoio e amizade.

*“O homem é o homem e suas circunstâncias”*

José Ortega y Gasset

## Resumo

ACOSTA, Vinícius Valente. **Efeitos do herbicida a base de glifosato Roundup Transorb® na tolerância térmica máxima de larvas de *Chironomus* sp. (Diptera, Chironomidae)**. Orientador: Ricardo Berteaux Robaldo. 2022. 32 f. Dissertação (Mestre em Biologia Animal) – Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 2022.

A temperatura é um fator que age diretamente sobre os organismos vivos e atualmente a temperatura média da terra está subindo de maneira acelerada integrando as mudanças climáticas. Organismos aquáticos ectotérmicos são suscetíveis às variações térmicas que fogem dos limites tolerados. Além disso, esses limites podem ser comprometidos por poluentes antrópicos. Neste trabalho testamos os efeitos de um herbicida a base de glifosato Roundup Transorb® (RT) na tolerância térmica de larvas de mosquitos *Chironomus* sp. (Diptera: Chironomidae) que habitam o sedimento de águas continentais da região. Considerando que esse mosquito é conhecido por ser bioindicador, sofrendo consequências com a exposição a diversos poluentes, testamos a influência do glifosato sobre sua tolerância térmica, utilizando teste de *Critical Thermal Maximum* (CTMax). Foram escolhidas concentrações realistas de RT, sendo que, para os testes, o CTMax foi avaliado em um grupo controle (T0) e dois grupos de exposição, 1 mg/L (T1) e 10 mg/L (T10), totalizando 72 indivíduos testados. Os períodos de aclimação e exposição foram de 24h a 22°C. Os resultados demonstraram a redução do CTMax médio de indivíduos expostos a 10 mg/L, sem diferença significativa entre o grupo exposto a 1mg/L e o controle. Concluímos que o glifosato causa impacto fisiológico em larvas de *Chironomus* sp. que resulta na queda da tolerância térmica máxima, quando os indivíduos são expostos a 10 mg/L por 24h a 22°C.

**Palavras-Chave:** CTMax. *Critical Thermal Method*. Ambientes Aquáticos. Chironomidae. Bioindicador. Toxicidade.

## Abstract

ACOSTA, Vinícius Valente. **Effects of Glyphosate Based Herbicide Roundup Transorb® on the maximum thermal tolerance of *Chironomus* sp. (Diptera, Chironomidae) Larvae.** Advisor: Ricardo Berteaux Robaldo. 2022. 32 f. Dissertation (Master in Animal Biology) – Institute of Biology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2022.

Temperature is a factor that acts directly on living organisms, currently the average temperature of the earth is rising faster than the historically experienced, integrating climate change. Ectothermic aquatic organisms are susceptible to thermal variations outside the tolerated limits, in addition these limits can be compromised by anthropogenic pollutants. In this work we tested the effects of a glyphosate based herbicide Roundup Transorb® (RT) on the thermal tolerance of mosquitoes larvae of *Chironomus* sp. (Diptera:Chironomidae), that inhabit the sediment of waters in Pelotas region. This genus is used as bioindicator in many works and suffer consequences from exposure to various pollutants, so we tested the influence of RT on the variable thermal tolerance, using the Critical Thermal Maximum (CTMax) tests. Realistic concentrations of RT were chosen, and the CTMax tests was divided into a control group (T0) and two exposure groups, 1 mg/L (T1) and 10 mg/L (T10), totalizing 72 individuals tested. The acclimatation and exposition time in both tests was 24h. The results showed a reduced CTMax to individuals exposed to 10 mg/L, there was no difference between 1mg/L and control groups. We conclude that glyphosate causes a physiological impact on *Chironomus* sp. larvae that results in a decrease in maximum thermal tolerance, when individuals are exposed to 10 mg/L for 24h at 22°C.

Keywords: CTMax. *Critical Thermal Method*. Aquatic Environment. Chironomidae. Bioindicator. Toxicity.

## Lista de Figuras

Figura 1	Modelo de Larva de <i>Chironomus</i> sp. ....	16
Figura 2	Tabela de distribuição dos comprimentos.....	17
Figura 3	Tabela de distribuição dos comprimentos totais médios .....	18
Figura 4	Tabela dos resultados dos CTMax.....	21

## Lista de abreviaturas e siglas

GL	Glifosato
RT	Roundup Transorb®
a.e	<i>Acid equivalente</i>
CTMax	<i>Critical Thermal Maximum</i>
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

## Sumário

1- Introdução.....	10
2- Objetivos.....	14
2.1- Objetivo Geral.....	14
2.2- Objetivos Especificos.....	14
3- Materiais e Métodos.....	15
3.1- Área de Estudo.....	15
3.2- Insetos.....	15
3.2.1- Identificação dos insetos.....	16
3.2.2- Aclimação.....	18
3.2.3- Amostras.....	18
3.3- Testes de CTMax.....	18
3.4- Análise Estatística .....	19
4- Resultados.....	21
5- Discussão.....	22
6- Conclusões.....	25
7- Referências.....	26

## 1 Introdução

Um dos fatores abióticos que influenciam todas as espécies no planeta é a temperatura. Isso se deve ao fato da temperatura ser um componente fundamental para a sobrevivência, crescimento e dispersão das espécies (ANGILLETTA, 2009). Através do seu efeito nas mudanças químicas e físicas da matéria, este fator determina as taxas de reações bioquímicas e afeta todos os processos fisiológicos dos organismos. Também tem efeito direto na estrutura tridimensional das proteínas e suas funções, sendo esta variável ambiental pervasiva a performance dos organismos (HOCHACHKA, 2002; CHAO, et al. 2020). A temperatura é conhecida por exercer forte influência na distribuição e na mortalidade de espécies (WALTHER, 2002). Sabe-se também que a sequência de eventos térmicos, que variam desde a imobilidade à morte, ocorre em uma faixa mais estreita em altas temperaturas do que nas baixas, agravando os resultados das alterações climáticas (HAZELL, et al., 2010).

A hipótese de variabilidade climática pressupõe que a amplitude da tolerância térmica de uma espécie seja determinada principalmente pela variação de temperatura experimentada em seu ambiente (SUNDAY, 2011). Entretanto, estudos têm demonstrado que a adaptação a condições térmica extremas, em conjunto a outros desafios ambientais como os poluentes, possivelmente comprometam a capacidade de aclimatação dos animais (STILLMAN, 2003; PÖRTNER, et al., 2006).

Diversos modelos preditivos vêm sendo desenvolvidos com a intenção de inferir sobre os efeitos das mudanças climáticas em alterações da biodiversidade, distribuição geográfica e risco de extinção de espécies (GUISAN, 2005; MERMILLOD-BLONDIN, et al., 2013). Tais modelos, em muitos casos, empregam a tolerância térmica como característica chave para as interpretações ecofisiológicas (CALOSI, 2008). A tolerância térmica máxima dos indivíduos é avaliada pelo teste subletal denominado *Critical Thermal Maximum* (CTMax), que é definido como "a temperatura em que o indivíduo apresenta desorganização de sua atividade locomotora e perda da habilidade necessária para escapar de situações que podem o levar a morte" (COWLES, 1944). Essas alterações no comportamento determinam o *endpoint*

(LUTTERSCMIDT, 1997 apud WALTER, 1967). Este teste vem sendo empregado como ferramenta de inferências dos possíveis impactos que o incremento na temperatura mundial poderá causar na biota.

Declínios populacionais de vertebrados e invertebrados têm sido relacionados ao acréscimo da temperatura, embora, a tolerância térmica máxima das espécies não seja considerada a única causa (MCCARTY, 2001; CAHILL, et al., 2013). O aumento da temperatura pode gerar queda no oxigênio disponível no meio e por consequência, aumento da mortalidade natural (PÖRTNER, 2007). Logo os declínios podem estar associados à efeitos indiretos das mudanças climáticas, como limitação de oxigênio e redução da disponibilidade de alimento (PÖRTNER, 2007). Some-se a isso a interação da temperatura com fatores, como a poluição e a demanda fisiológica para a resposta de depuração associada (QIAN, et al., 2008; CAHILL, et al., 2013), reforçando a importância dos estudos sobre termotolerância e ecotoxicologia.

Um poluente amplamente estudado, por ser o herbicida mais empregado na agricultura é o glifosato (GL), comercializado sob diferentes formulações, como o Roundup Transorb® (RT). Atua como dessecante nas plantações de arroz, milho, trigo e soja, transgênicos predominantes na região sul do Brasil.

No Rio Grande do Sul, há um consumo médio de 134 milhões de litros de agrotóxicos por ano, em 8,5 milhões de hectares plantados, sendo o GL o produto mais aplicado, com 5,5L/ha de cultura (PIGNATI, et al., 2017). De acordo com Benbrook (2016) no ano de 2014 foram consumidas 826.000 toneladas de GL no mundo com projeções para maiores demandas no decorrer dos anos.

Peruzzo (2008) registrou que o GL quando aplicado em cultivos de feijão na Argentina alcança corpos d'água e sedimentos em concentrações que variam de 0,10 a 0,7 mg/L. Nesse mesmo país, durante a temporada das chuvas foram observadas concentrações de 105 mg/L na coluna d'água, logo após a aplicação (BROVINI, et al. 2021). Na China foram registradas concentrações de 10mg/L em águas continentais logo após a pulverização (ZHANG, et al., 2016). No sul do Brasil foi encontrado GL nos sedimentos de lagos e rios em concentrações entre 0,36 a 2,16 mg/L (ALMEIDA, 1992). A

legislação do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) permite concentrações de 0,28 mg/L de GL em águas superficiais (BRASIL, 2005).

De acordo com Annett (2014), os herbicidas à base de GL são classificados como perigosos para o ambiente aquático, pois contaminam corpos d'água através de sua lixiviação, dado sua alta hidrossolubilidade. Segundo Relyea (2005), o GL causa perda na abundância, biomassa e queda na taxa de sobrevivência de macroinvertebrados aquáticos.

As larvas de chironomídeos estão associadas ao sedimento, e se alimentam de partículas que se depositam no fundo dos ambientes aquáticos (Rzymiski, *et al.* 2013), bioacumulando no tecido desses insetos, até 10,2  $\mu\text{g}/\text{kg}^{-1}$  de GL. O GL foi responsável pela redução de aproximadamente 41% na densidade populacional deste grupo quando expostos à concentrações entre 0,01 e 0,09 mg/L. O GL é conhecido por se depositar no sedimento, onde atinge a comunidade bentônica. Assim, os chironomídeos são apontados como bioindicadores da qualidade da água (ORENDT, 1999), da mesma forma que em ambientes contaminados por metais (DE BISTHOVEN, 2005). Winner (1980) observou a composição da fauna em um rio contaminado com cobre, zinco e cromo, onde encontrou 80% dos representantes sendo chironomídeos. Em ambiente livre de contaminantes, na mesma região da Califórnia – EUA, os representantes da família somavam apenas 10%. Ambientes contaminados por resíduos orgânicos, sob diferentes estágios de eutrofização também demonstram variação na diversidade da família (ARMITAGE, 2012).

Nesse grupo, o tempo de desenvolvimento das larvas é altamente dependente da temperatura e da alimentação (MENZIE, 1981). O aumento da temperatura no desenvolvimento dos chironomídeos acarreta em modificações morfológicas como diminuição das asas e encurtamento do comprimento corporal total (WONGLERSAK, 2021). Além da temperatura, a contaminação do ambiente provoca má formação da cápsula cefálica, deformidades nas antenas e em peças bucais, como o mentum (ARMITAGE, 2012.). Modificações morfológicas podem ter consequências no equilíbrio e na manutenção das espécies, a perda da biomassa em indivíduos da base da cadeia trófica como os chironomídeos pode gerar consequências nas relações

predador-presa nos ambientes aquáticos (BOUKAL, *et al.*, 2019). Além da temperatura, chironomídeos amostrados em ambientes contaminados com GL apresentaram tamanhos reduzidos (RZYMSKI, 2013). Também foi registrado atraso na emergência de fêmeas e precipitação na emergência dos machos de *Chironomus xantus* (Diptera: Chironomidae) quando expostos a concentrações de 1,5 e 4,9mg/L de RT (FERREIRA-JUNIOR, *et al.*, 2017). Comparativamente, o organofosforado Clorpirifós reduziu em 1°C o CTMax de larvas aquáticas de *Ischnura elegans* (Odonata: Coenagrionidae) em concentrações a partir de 1mg/L<sup>-1</sup> (DE BEECK, 2017), ao encontro disso Delnat, *et al.* (2019) observaram que esse mesmo herbicida reduz o CTMax tanto das larvas quanto dos adultos de mosquitos *Culex pipiens*, além de aumentar a mortalidade das larvas.

Por ser um grupo que responde a variações ambientais de diversas formas, pode-se inferir que os chironomídeos sejam bons bioindicadores ambientais. Sendo assim trabalhos nessa área são necessários para contribuir com informações sobre as mudanças climáticas e os impactos antropogênicos em ambientes aquáticos e à organismos bioindicadores.

O presente trabalho teve como objetivo testar a hipótese de que o herbicida RT tem impacto negativo na tolerância térmica de *Chironomus* sp. promovendo prejuízo ao ajuste homeostático adaptativo da espécie.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Identificar a influência do herbicida a base de glifosato Roundup Transorb® (RT) na tolerância térmica de larvas de segundo instar do mosquito *Chironomus* sp.

### **2.2 Objetivos Especificos**

- a) Identificar as larvas capturadas no local amostrado;
- b) Determinar o efeito da exposição a 1 e 10mg/La.e. de glifosato, na formulação Roundup transorb®, por 24h, na tolerância térmica máxima (CTMax) das larvas do mosquito *Chironomus* sp.

### **3 Materiais e Métodos**

#### **3.1 Área de Estudo**

A área de estudo foi um córrego pluvial localizado em uma floresta de *Eucalyptus* sp. no Campus Capão do Leão, da Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brasil (31°48'00.4"S 52°24'59.1"W).

#### **3.2 Insetos**

Desovas e larvas de chironomídeos foram coletadas para a identificação, acompanhamento do desenvolvimento embrionário e larval, e aplicação dos testes de tolerância térmica. Nas coletas foram empregadas armadilhas *pitfall*, construídas com garrafas pet de 500 mL cortadas longitudinalmente, formando uma “canoa”.

As armadilhas foram enterradas no sedimento, no fluxo central do córrego, com pedras utilizadas como lastro e fixação, bem como para promover fluxo turbulento de água e zonas de deposição de matéria orgânica em suspensão, onde as larvas se concentravam. As paredes das armadilhas serviram como substrato para a adesão das desovas.

Para os testes de tolerância térmica os indivíduos foram recolhidos um dia antes nas armadilhas e triados em duas peneiras sobrepostas com malhas de 3 e 5 mm. Lotes que variavam entre 5 e 10 larvas, medindo entre 3 e 5 mm de comprimento corporal, foram selecionadas para aclimatação, por 24h a 22°C, precedentes à exposição.

Todos os procedimentos experimentais e de coleta foram aprovados em concordância com as leis Brasileiras, sendo autorizados pela licença cedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio: nº.78312-2).

##### **3.2.1 – Identificação das larvas**

No laboratório, as larvas coletadas foram filtradas e concentradas entre peneiras de malha de 3mm e 150µm. Para a identificação das larvas

empregou-se a chave taxonômica de TRIVINHO-STRIXINO (2014). Para análise das larvas e estruturas da cápsula cefálica, os exemplares foram fixados em álcool 70% a 60°C e clarificados em solução de KOH a 10% por cerca de 20min. As medições foram feitas com auxílio de estereomicroscópio dotado de ocular micrométrica.

A identificação das larvas foi feita através da análise das estruturas da cápsula cefálica. Foi constatado que as larvas pertencem ao gênero *Chironomus*, por apresentarem antenas não montadas em tubérculo proeminente; placas ventromentais separadas na forma de leque, na linha mediana, com estrias conspícuas; seta subdental inserida no lado ventral da mandíbula; pente epifaríngeo formado por uma placa denteada; dois pares de túbulos no penúltimo segmento abdominal e seta subdental da mandíbula com margem interna lisa (Figura 1).

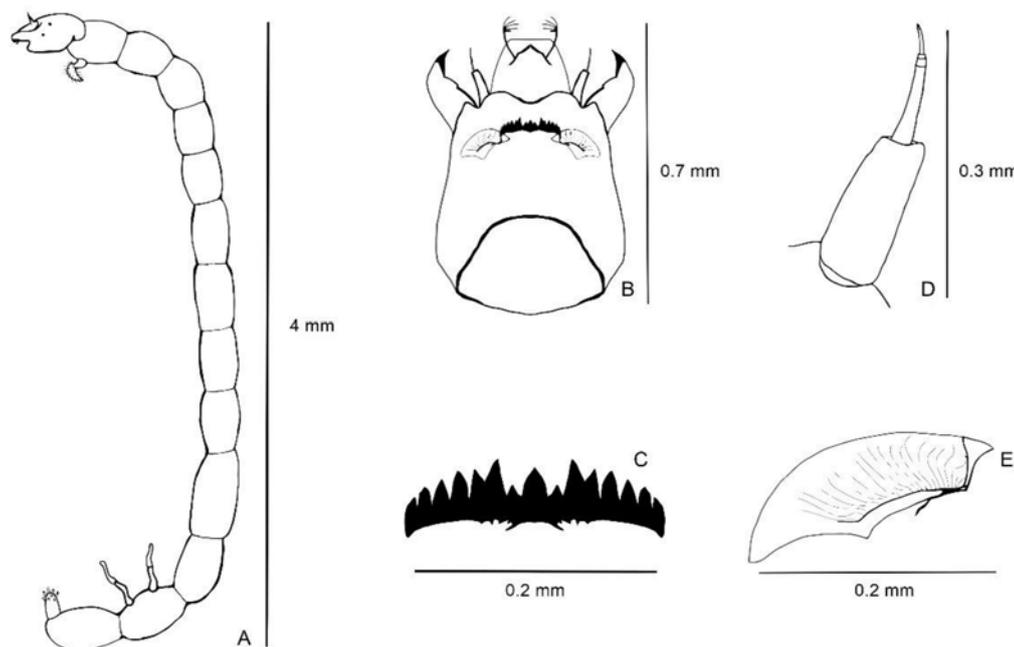


Figura 1 - A) Larva de *Chironomus* sp., 2º instar (vista lateral); B) Cápsula cefálica (vista ventral); C) Mento (vista ventral); D) Antena (vista ventral); E) Placa ventromental (vista ventral).

Para análise das classes de comprimento corporal das larvas nos diferentes ínstares, foi observada uma distribuição trimodal, confirmada pela diferença entre o comprimento médio de cada classe definida pelas modas (Figura 2; Figura 3).

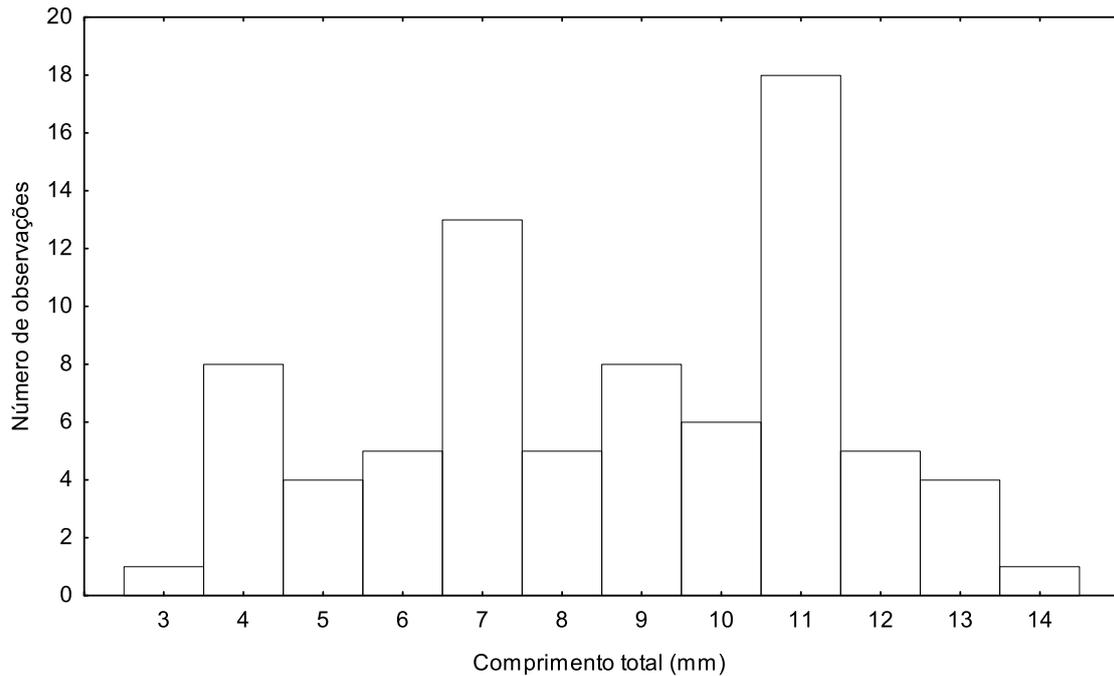


Figura 2 - Distribuição de frequência do comprimento total de larvas de segundo instar de *Chironomus* sp.

A falta de uma quarta moda de tamanho, abaixo da primeira aqui determinada, evidencia que a amostragem não capturou larvas do primeiro instar.

Evidenciou-se larvas de primeiro instar medindo entre 1,3 e 1,5mm, 15h após eclosão em temperatura de 22°C.

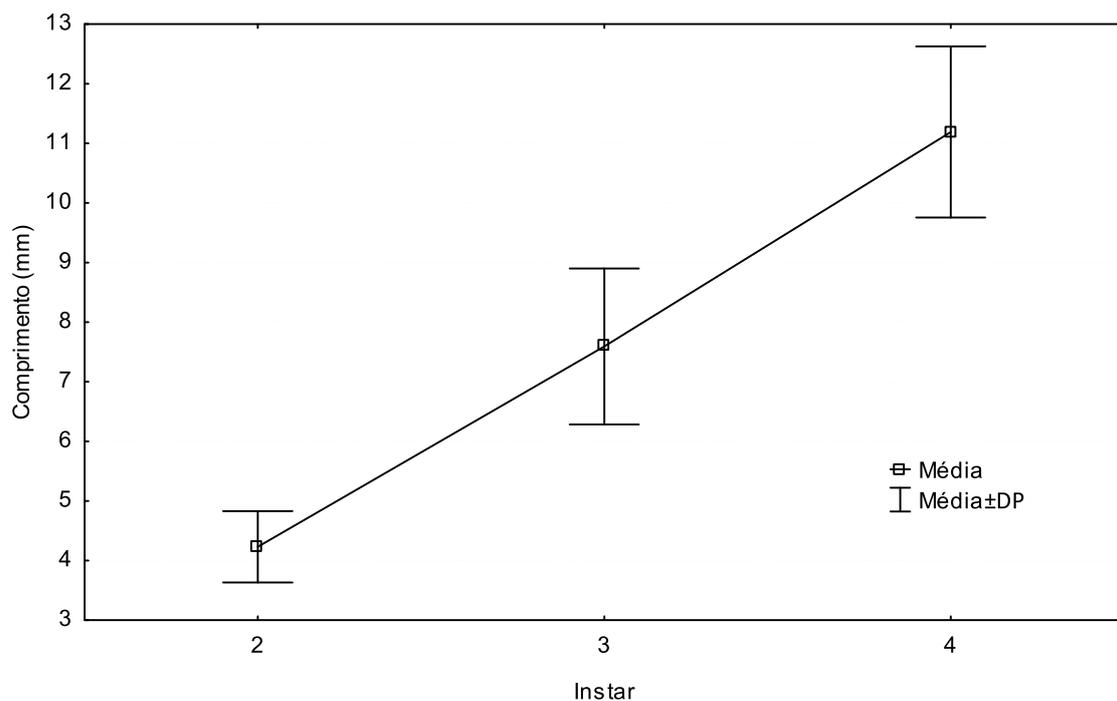


Figura 3 - Comprimento total médio dos instares de *Chironomus* sp. Todas as médias diferiram entre si (ANOVA; Tukey:  $P < 0,05$ )

### 3.2.2 – Aclimação das larvas

A aclimação das larvas seguiu o protocolo apresentado por Villa (2018) e deu-se individualizando os organismos em potes plásticos de 100 mL com água declorada, temperatura de 22°C e fotoperíodo de 12h de luz e 12h de escotoperíodo.

### 3.2.3 – Larvas de *Chironomus* sp.

Para os testes de CTMax foram empregadas 72 larvas. Após a coleta, as larvas de segundo instar foram medidas e individualizadas em potes de 100 mL, para os testes de termotolerância, as larvas foram mantidas em jejum por 48h.

### 3.3 Testes de CTMax

Os testes de CTMax foram executados no período entre 8/12/2021 e 29/05/2022.

O herbicida empregado foi o Roundup transorb®. Nos testes de CTMax a metodologia foi ajustada a partir do proposto por Coccia et al. (2013). Ao término da aclimação, as larvas foram distribuídas em três grupos:

- a) controle (T0): sem adição de herbicida (24 larvas);
- b) exposição a 1mg/La.e. de GL (T1) (23 larvas);
- c) exposição a 10mg/La.e. de GL, (T10), por 24h (25 larvas).

Para determinar o CTMax, as larvas foram transferidas individualmente para o aquário teste, contendo 3L de água declorada a 22°C, para aquecimento (60+60W) sob taxa de 0,3 a 0,5°C por minuto, aeração constante e sistema de homogeneização do meio. Durante o ensaio, a temperatura foi registrada a cada minuto, com termômetro digital (0,01°C), até a observação do *endpoint*, caracterizado pela temperatura na qual o inseto apresentou perda da atividade locomotora e dos movimentos, bem como perda de orientação, constatada quando a larva não respondeu a três estímulos mecânicos consecutivos com um pelo de Ufrey.

Os ensaios foram realizados às cegas, sendo que o observador do *endpoint* não teve acesso as condições de exposição e térmica, bem como o observador da temperatura não teve acesso ao animal para observação do *endpoint*.

Após testadas, as larvas foram individualizadas em potes com água de clorada (22°C) por um período de recuperação de 24h. Após esse período, com a sobrevivência da larva, o CTMax foi validado. Encerrado o tempo de recuperação, as larvas foram sacrificadas por sedação prolongada em banho de eugenol (400mg/L), posteriormente pesadas, medidas e descartadas no biotério central da UFPel.

### **3.5 Análise estatística**

Os dados foram apresentados na forma de média  $\pm$  desvio padrão e a comparação entre médias foi realizada por ANOVA ou teste *t* de Student. As pressuposições para a ANOVA foram avaliadas pelos testes de Kolmogorov-Smirnov (normalidade) e teste de Cochran (homogeneidade da variância) com emprego do programa Statistica 7.0<sup>®</sup>. Diferenças significativas entre médias foram determinadas pelo teste *a posteriori* de Tukey. A determinação das classes de tamanho dos instares foi procedida por análise de distribuição de frequência do comprimento total das larvas. Todos os testes consideraram nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ).



## 4 Resultados

### Testes de CTMax

Os indivíduos do grupo controle tiveram seus *endpoints* variando entre 37,9 e 41,8°C; no grupo exposição a 1 mg/L, as respostas foram entre 32,7 e 41,5°C e no grupo exposição a 10 mg/L entre 35,4 e 41,5°C.

Ocorreu uma resposta deletéria na tolerância térmica dos indivíduos expostos a 10 mg/L, onde a média dos resultados tiveram diferença de aproximadamente 1°C quando comparado às respostas do grupo controle. Não houve diferença significativa entre o grupo controle e exposição a 1 mg/L ( $p > 0,05$ ) (Fig. 4).

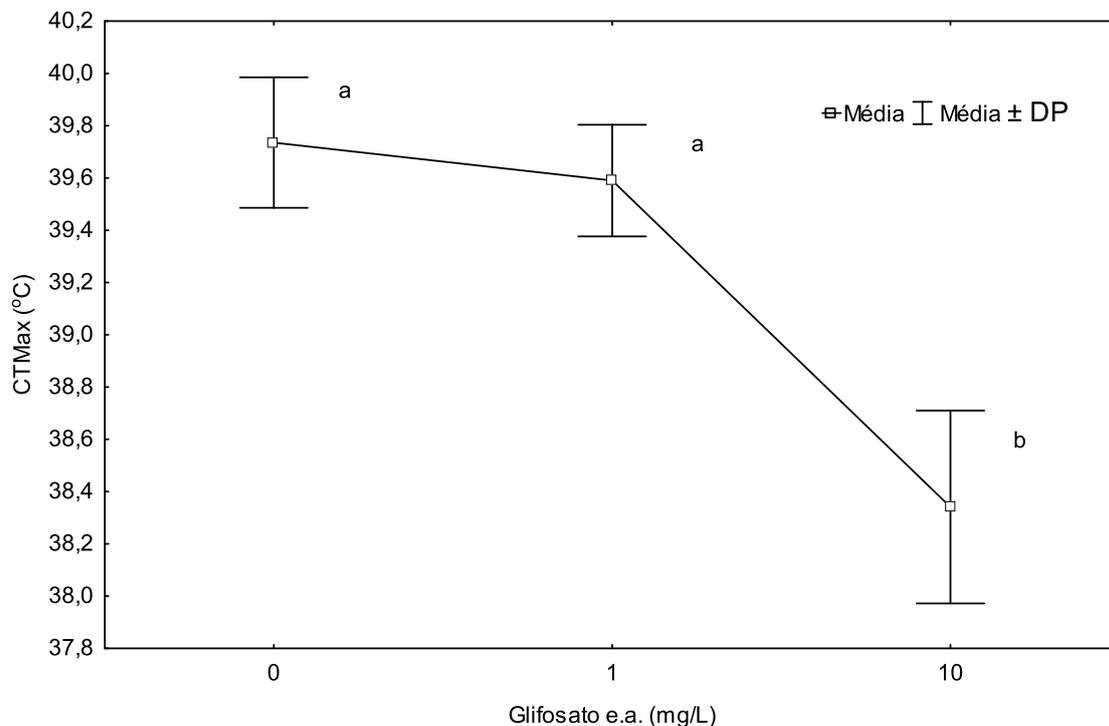


Figura 4- Temperatura crítica máxima (CTMax) de larvas de terceiro instar de *Chironomus* sp., expostas (1 e 10mg/La.e.) ou livres do herbicida a base de glifosato "Roundup Transorb®". Letras distintas denotam diferença significativa entre as médias.

## 5 Discussão

Larvas de Chironomidae possuem corpo alongado e estreito, e uma cápsula cefálica bem desenvolvida, com mandíbulas operando em um plano horizontal (HAMADA, 2014). As larvas de chironomídeos são diferenciadas das larvas de outros nematóceros por não possuírem espiráculos, com exceção de alguns Podonominae (Diptera: Chironomidae), as pernas-falsas ou *prolegs* que ocorrem nos primeiros segmentos torácicos e nos segmentos terminais do abdômen são pareadas. Porém existem variações em espécies terrestres e processos nos segmentos terminais com diferentes cerdas (ARMITAGE, 2012). A subfamília Chironominae é composta por larvas em geral, vermelhas, verdes ou esbranquiçadas, variando o tamanho entre alguns milímetros até alguns centímetros como no gênero *Chironomus*. O gênero possui 16 espécies descritas no Brasil, são encontradas em sistemas lênticos e lóticos de baixa velocidade, estão comumente associadas a sedimentos ricos em detritos orgânicos muitas vezes pobres em oxigênio dissolvido (HAMADA, 2014).

A contaminação dos corpos d'água com GL impacta indivíduos não alvos como os invertebrados, esse impacto é acentuado pelos surfactantes presentes nas formulações dos herbicidas a base de GL por sua ação deletéria na cutícula do exoesqueleto (HILL, 2012). O GL causa efeitos indiretos sobre as populações de ambientes aquáticos, como observado por EDGE, et al. (2020) o impacto na cobertura de macrófitas causado pelo GL atinge a abundância de larvas e de predadores bentônicos. Concentrações de 5,6 mg/L de GL causou a morte de 50% das amostras (LC50) de invertebrados aquáticos (BRECKELS, 2018).

O GL como o RT® causa alterações no desenvolvimento de invertebrados aquáticos em concentrações de 0,3 e 3,0 mg/L, além da queda da densidade de chironomídeos em concentrações de 0,2 mg/L (MAGBANUA, 2012). Em *Chironomus riparius* ocorre queda de biomassa e alteração da hemoglobina quando expostos ao herbicida Paraquat em concentrações de 10 mg/L por 24 h.

Em *Chironomus xantus* ocorre redução do comprimento corporal e da cápsula cefálica quando a larva é submetida a concentrações entre 0,49 e

12,06 mg/L de GL. Além disso, a sobrevivência sofrer forte impacto da exposição por 48 h a concentrações de 2 mg/L desse herbicida (FERREIRA-JUNIOR, et al., 2017).

O objetivo deste trabalho foi testar se o herbicida causava efeitos deletérios na tolerância térmica em larvas de *Chironomus* sp. Essa hipótese foi confirmada uma vez que o CTMax foi reduzido quando as larvas foram expostas a 10 mg/L. Embora elevada, essa concentração foi encontrada em corpos d'água logo após a aplicação conforme descrito em ZHANG, et al. (2016).

A queda do CTMax que constatamos nesse trabalho vai ao encontro do observado por DE BEEK et al. (2017) que também registraram queda no CTMax em larvas de *Ischnura elegans* (Odonata: Coenagrionidae) quando expostas ao organofosforado Clorpirifós. Esse mesmo organofosforado reduziu o CTMax de larvas e adultos do mosquito *Culex pipens* (Diptera: Culicidae) (DELNAT et al., 2019) e da libélula *Coenagrion puella* (JANSSENS, 2018). Apesar de ser um pesticida, também atinge indivíduos não alvos impactando sua tolerância térmica. Além de invertebrados, a queda do CTMax diante da exposição ao GL foi registrada em peixes (ZEBRAL, et al., 2018), o que demonstra que a ação desse poluente é capaz de prejudicar diferentes extratos da cadeia trófica de ambientes aquáticos.

Não só os invertebrados aquáticos são impactados pela contaminação por GL, o aumento da temperatura e a exposição ao herbicida encurtou o tempo de desenvolvimento, a sobrevivência até a fase adulta, a dispersão e a reprodução do grilo *Gryllus lineaticeps* (STAHLSCHMIDT, 2022). Esses testes visaram compreender como as mudanças climáticas podem causar impactos sobre invertebrados terrestres.

Para indivíduos ectotermos que habitam ambientes cuja temperatura é muito variável, seus limites térmicos possuem baixa adaptabilidade hereditária para acompanhar os desafios impostos pelas mudanças climáticas (COUPER et al., 2021) quando soma-se esse fato a contaminação dos habitats, os desafios são aumentados. Além disso, indivíduos menos desenvolvidos são mais suscetíveis a contaminantes. Timmermans et al. (1992) encontraram

maior sensibilidade a metais pesados nas larvas de instares iniciais de *Chironomus riparius*, onde houve atraso maior no desenvolvimento no primeiro e segundo instar, o que torna importante a seleção de larvas de um tamanho pré-determinado para os testes.

Não houve diferença significativa nos resultados do grupo T(1) porém existe uma tendência que talvez fosse mais evidente com um maior tamanho amostral.

## 6 Conclusão

A exposição a uma concentração de 10 mg/La.e de glifosato por 24 h, sob a formulação de Roundup transorb®, reduz a tolerância térmica máxima de larvas de segundo instar de *Chironomus* sp.

Assim, o presente trabalho demonstra a sensibilidade do grupo aos herbicidas a base de glifosato e apresenta um biomarcador de exposição aguda neste importante grupo de organismos bioindicadores.

## 7 Referências

ALMEIDA, FERNANDA S. Residual herbicides in different systems of soil preparation. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, vol. 27, p. 595-601, 1992.

ANGILLETTA, MICHAEL JR. **Thermal adaptation: a theoretical and empirical synthesis**. Oxford, UK: Oxford University Press, p. 1-302, 2009.

ANNETT, ROBERT; HABIBI, HAMID R.; HONTELA, ALICE. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. **Journal of Applied Toxicology**, vol. 34, p. 458–479, 2014.

ARMITAGE, PATRICK D.; PINDER, L. C.; CRANSTON, P. S. **The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges**. Springer Science & Business Media, p. 14 e 401, 2012.

BENBROOK, CHARLES M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environmental Sciences Europe**, vol. 28, n.1, p. 3, 2016.

BOUKAL, DAVID; BIDEAULT, AZENOR; MCARREIRA, BRUNO; SENTIS, ARNAUD. Species interactions under climate change: connecting kinetic effects of temperature on individuals to community dynamics. **Current opinion in insect science**, vol. 35, p. 88-95, 2019.

BRASIL, 2005. Resolução CONAMA N° 357/2005 - “Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.”. Data da legislação: 17/03/2005 - Publicação DOU n° 053, de 18/03/2005, págs. 58-63.

BRECKELS, R. D.; KILGOUR, B. W. Aquatic herbicide applications for the control of aquatic plants in Canada: effects to nontarget aquatic organisms. **Environmental Reviews**, vol. 26, n. 3, p. 333-338, 2018.

CAHILL, ABIGAIL E.; AIELLO-LAMMENS, MATTHEW E.; FISHER-REID, M. CAITLIN; et al. How does climate change cause extinction? **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, vol. 280, 2013.

CALOSI, PIERO; BILTON, DAVID T.; SPICER, JOHN I. Thermal tolerance, acclimatory capacity and vulnerability to global climate change. **Biology letters**, vol. 4, n. 1, p. 99-102, 2008.

CHAO, YIN C.; MERRIT, MELANIE; SCHAEFFERKOETTER, DEVIN; EVANS, TYLER G. High-throughput quantification of protein structural change reveals potential mechanisms of temperature adaptation in *Mytilus* mussels. **BMC Evolutionary Biology**, vol. 20, n. 1, p. 1-18, 2020.

COCCIA, CRISTINA; CALOSI, PIERO; BOYERO, LUZ; GREEN, ANDY J.; BILTON, DAVID T. Does ecophysiology determine invasion success? A comparison between the invasive boatman *Trichocorixa verticalis verticalis* and the native *Sigara lateralis* (Hemiptera, Corixidae) in South-West Spain. **PlosOne**, vol. 8, n. 5, 2013.

COUPER, LISA I.; FARNER, JOHANNAH E.; CALDWELL, JAMIE M.; CHILDS, MARISSA L.; HARRIS, MALLORY J.; KIRK, DEVIN G.; NOVA, NICOLE; SHOCKET, MARTA; SKINNER, ELOISE B.; URICCHIO, LAWRENCE H.; ALONSO-EXPOSITO, MOISES; MORDECAI, ERIN A. How will mosquitoes adapt to climate warming?. **Elife**, v. 10, p. 1 - 36, 2021.

COWLES, RAYMOND B.; BOGERT, CHARLESM. A preliminary study of the thermal requirements of desert reptiles. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, vol. 83, p. 263-296, 1944.

DE BEECK, LIN O.; VERHEYEN, JULIE; STOKS, Robby. Integrating both interaction pathways between warming and pesticide exposure on upper thermal tolerance in high and low latitude populations of an aquatic insect. **Environmental Pollution**, vol. 224, p. 714-721, 2017.

DE BISTHOVEN, L. J.; GERHARDT, A.; SOARES, A. M. V. M. Chironomidae larvae as bioindicators of an acid mine drainage in Portugal. **Hydrobiologia**, vol. 532, p. 181-191, 2005.

DELNAT, VIENNA; TRANNA, TAM T.; VERHEYENA, JULIE, DINHB, KHUONG V.; JANSSENSA LIZANNE; STOKSA, ROBBY. Temperature variation magnifies

chlorpyrifos toxicity differently between larval and adult mosquitoes. **Science of The Total Environment**, vol. 690, p.1237-1244, 2019.

EDGE, CHRISTOPHER B.; BAKER, LEANNE F.; LANCTÔT, CHANTAL M.; MELVIN, STEVEN D.; GAHL, MEGAN K.; KURBAN, MARHARYTA D.; MARTÍN-NAVARRO, LAIA; KIDD, KAREN A.; TRUDEAU, VANCE L.; THOMPSON, DEAN G.; MUDGE, JOSEPH F.; HOULAHAN, JEFF E. Compensatory indirect effects of an herbicide on wetland communities. **Science of the Total Environment**, vol. 718, p. 137254, 2020.

FERREIRA-JUNIOR, DIOGENIS F.; SARMENTO, RENATO A.; DE SOUZA, ALTHIÉRIS S.; PEREIRA, RENATA R.; PICANÇO, MARCELO C.; PESTANA, JOÃO L.T.; SOARES, AMADEU M.V.M. Low concentrations of glyphosate-based herbicide affects the development of *Chironomus xanthus*. **Water, Air, & Soil Pollution**, vol. 228, n. 10, p. 1-8, 2017.

GUISAN, ANTOINE; THUILLER, WILFRIED. Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. **Ecology letters**, vol. 8, n. 9, p. 993-1009, 2005.

HAMADA, NEUSA; NESSIMIAN, JORGE L.; QUERINO, RANYSE B. **Insetos aquáticos na Amazônia brasileira: taxonomia, biologia e ecologia**. Manaus: Editora do INPA. ISBN 978-85-211-0123-9, p. 457, 2014.

HAZELL, STEAPHAN P.; NEVE, BOLETTE P.; GROUTUDES, CONSTANTINOS; DOUGLAS, ANGELA E.; BLACKBURN, TIM M.; BALE, JEFFREY S. Hyperthermic aphids: insights into behaviour and mortality. **Journal of Insect Physiology**, vol. 56, ed. 2, p. 123–131. 2010.

HILL, MARTIN P.; COETZEE, JULIE A.; UECKERMANN, CLAUDIA. Toxic effect of herbicides used for water hyacinth control on two insects released for its biological control in South Africa. **Biocontrol Science and Technology**, v. 22, n. 11, p. 1321-1333, 2012.

HOCHACHKA, PETER W.; SOMERO, GEORGE N. **Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological evolution**. Oxford: Oxford University Press, p. 480, 2002.

JANSSENS, LIZANNE; VERBERK, WILCO; STOKS, ROBBY. A widespread morphological antipredator mechanism reduces the sensitivity to pesticides and increases the susceptibility to warming. **Science of the Total Environment**, v. 626, p. 1230-1235, 2018.

MAGBANUA, FRANCIS S. **Agricultural intensification and stream health: combined impacts of pesticide and sediment**. A thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy. University of Otago. Dunedin, New Zealand. 2012.

MCCARTY, JOHN P. Ecological Consequences of Recent Climate Change. **Conservation Biology**, vol. 15, n. 2, p. 320–331, 2001.

MENZIE, CHARLES A. Production ecology of *Cricotopus sylvestris* (Fabricius) (Diptera: Chironomidae) in a shallow estuarine cove. **Limnology and Oceanography**, vol. 26, n. 3, p. 467-481, 1981.

MERMILLOD-BLONDIN, FLORIAN; FOULQUIER, ARNAUD; GILBERT, FRANCK; NAVEL, SIMON; MONTUELLE, BERNARD; BELLVERT, FLORIAN; COMTE, GILLES; GROSSI, VINCENT; FRAÇOIS FOUREL; CHRISTOPHE LÉCUYER; SIMON, LAURENT. Benzo (a) pyrene inhibits the role of the bioturbator *Tubifex tubifex* in river sediment biogeochemistry. **Science of the total environment**, vol. 450, p. 230-241, 2013.

ORENDT, CLAUS. Chironomids as bioindicators in acidified streams: a contribution to the acidity tolerance of chironomid species with a classification in sensitivity classes. **International Review of Hydrobiology**, vol. 84, n. 5, p. 439-449, 1999.

PERUZZO, PABLO J.; PORTA, ATILIO A.; RONCO, ALICIA E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. **Environmental Pollution**, vol. 156, n. 1, p. 61-66, 2008.

PIGNATI, WANDERLEI A.; DE SOUZA E LIMA, FRANCO A. N.; DE LARA, STEPHANIE S.;CORREA, MARCIA L. M.;BARBOSA, JACKSON R.;LEÃO, LUÍS HENRIQUE D. C.;PIGNATTI, MARTA G. Spatial distribution of pesticide

use in Brazil: a strategy for Health Surveillance. **Ciencia & Saúde Coletiva**, vol. 22, n. 10, p. 3281-3293, 2017.

PÖRTNER, HANS. O.; BENNETT, ALBERT F; BOZINOVIC, FRANCISCO; CLARKE, ANDREW; LARDIES, MARCO. A.; LUCASSEN, MAGNUS; PELSTER, BERND; SCHIEMER, FRITZ; STILLMAN, JONATHON. H. Trade-offs in thermal adaptation: the need for a molecular to ecological integration. **Physiological and Biochemical Zoology**, vol. 79, n. 2, p. 295-313, 2006.

QIAN, ZHENGMIN; HE, QINGCI; LIN, HUNG-MO; KONG, LINGLI; BENTLEY, CHRISTY M.; LIU, WENSHAN; ZHOU, DUNJIN. High temperatures enhanced acute mortality effects of ambient particle pollution in the “oven” city of Wuhan, China. **Environmental Health Perspectives**, vol. 116, n. 9, p. 1172–1178, 2008.

RELYEA, RICK A. The impact of insecticides and herbicides on the biodiversity and productivity of aquatic communities. **Ecological Applications**, vol. 15, n. 2, p. 618–627, 2005.

RELYEA, RICK A.; JONES, DEVIN K. The toxicity of Roundup Original Max® to 13 species of larval amphibians. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, v. 28, n. 9, p. 2004-2008, 2009.

RZYMSKI, PIOTR; KLIMASZYK, PIOTR; KUBACKI, TOMASZ; PONIEDZIALEKM, BARBARA. The effect of glyphosate-based herbicide on aquatic organisms—a case study. **Limnological Review**, vol. 13, n. 4, p. 215-220, 2013.

STAHLSCHMIDT, Z. R; WHITLOCK, J.C.; VO, P.; EVALEN, P.; BUI, D. Pesticides in a warmer world: Effects of glyphosate and warming across insect life stages. **Environmental Pollution**, vol. 307, p. 119508, 2022. STILLMAN, JONATHON, H. Acclimation capacity underlies susceptibility to climate change. **Science**, vol. 301, n. 5629, p. 65-65, 2003.

SUNDAY, JENNIFER M.; BATES, AMANDA E.; DULVY, NICHOLAS K. Global analysis of thermal tolerance and latitude in ectotherms. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, vol. 278, n 1713, p. 1823-1830, 2011.

- TIMMERMANS, KLAAS R.; PEETERS, WILMA; TONKES, MARCEL. Cadmium, zinc, lead and copper in *Chironomus riparius* (Meigen) larvae (Diptera, Chironomidae): Uptake and effects. **Hydrobiologia**, v. 241, n. 2, p. 119-134, 1992.
- VILLA, SARA; DI NICA, VALERIA; PESCATORE, TANITA; BELLAMOLI, FRANCESCO; FINIZIO, ANTONIO; LENCIONI, VALERIA. Comparison of the behavioural effects of pharmaceuticals and pesticides on *Diamesa zernyi* larvae (Chironomidae). **Environmental Pollution**, vol. 238, pag. 130-139, 2018.
- WALTHER, GIAN R.; CONVEY, PETER; MENZEL, ANNETTE; PARMESAN, CAMILLE; BEEBEE, TREVOR J.C.; FROMENTIN, JEAN-MARC; GULDBERG-HOEGH, OVE; BAIRLEIN, FRANZ. Ecological responses to recent climate change. **Nature**, vol. 416, p. 389–395, 2002.
- WINNER, R. W.; BOESEL, M. W.; FARRELL, M. P. Insect community structure as an index of heavy-metal pollution in lotic ecosystems. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, vol. 37, n. 4, p. 647-655, 1980.
- WONGLERSAK, RUNGTIP; FENBERG, PHILLIP B.; LANGDON, PETER G.; BROOKS, STEPHEN J.; PRICE, BENJAMIN W. Insect body size changes under future warming projections: A case study of Chironomidae (Insecta: Diptera). **Hydrobiologia**, vol. 848, n. 11, p. 2785-2796, 2021.
- ZEBRAL, YURI D.; LANSINI, LUIZE R.; COSTA, PATRICIA G., ROZA, MAURICIO; BIANCHINI, ADALTO; ROBALDO, RICARDO B. A glyphosate-based herbicide reduces fertility, embryonic upper thermal tolerance and alters embryonic diapause of the threatened annual fish *Austrolebias nigrofasciatus*. **Chemosphere**, vol. 196, p. 260-269, 2018.
- ZHANG, Q; ZHOU, H.; LI, Z.; ZHU, J. ZHOU, C.; ZHAO M. Effects of glyphosate at environmentally relevant concentrations on the growth of and microcystin production by *Microcystis aeruginosa*. **Environmental monitoring and assessment**, v. 188, n. 11, p. 1-7, 2016.