

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

JOSSANA RODRIGUES RUFF

**TOXICIDADE DE FORMULAÇÕES A BASE DE GLIFOSATO DEVE-SE
PARCIALMENTE À PRESENÇA DE SURFACTANTE: UM ESTUDO EM
*Caenorhabditis elegans***

Uruguiana

2019

JOSSANA RODRIGUES RUFF

**TOXICIDADE DE FORMULAÇÕES A BASE DE GLIFOSATO DEVE-SE
PARCIALMENTE À PRESENÇA DE SURFACTANTE: UM ESTUDO EM
*Caenorhabditis elegans***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Daiana Silva Ávila

Coorientador: Prof. Dr. Cristiano Ricardo Jesse

**Uruguaiana
2019**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a) através do Módulo de Biblioteca do
Sistema GURI (Gestão Unificada de Recursos Institucionais) .

R922t Ruff, Jossana Rodrigues

Toxicidade de formulações a base de glifosato deve-se
parcialmente à presença de surfactante: um estudo em
Caenorhabditis elegans / Jossana Rodrigues Ruff.

54 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Pampa, MESTRADO EM BIOQUÍMICA, Uruguaiana, 2019.

"Orientação: Daiana Silva Ávila".

1. C. elegans. 2. Glifosato. 3. Roundup®. 4.
Ingredientes Inertes. 5. POEA..

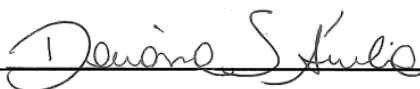
JOSSANA RODRIGUES RUFF

**TOXICIDADE DE FORMULAÇÕES A BASE DE GLIFOSATO DEVE-SE
PARCIALMENTE À PRESENÇA DE SURFACTANTE: UM ESTUDO EM
*Caenorhabditis elegans***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Bioquímica.

Dissertação defendida e aprovado em: 20 de Fevereiro de 2019.

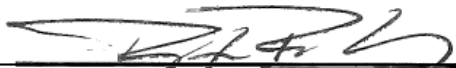
Banca examinadora:



Prof^ª. Dr^ª. Daiana Silva Ávila

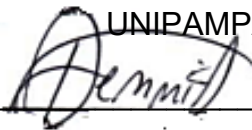
Orientadora

UNIPAMPA



Prof. Dr. Rafael Roehrs

UNIPAMPA



Dr. Dennis Guilherme da Costa Silva

FURG

Dedico este trabalho aos meus pais por tudo o que fizeram e fazem por mim. Desejo poder ter sido merecedora do esforço dedicado por eles em todos os aspectos, especialmente quanto à minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família por tudo.

Agradeço ao meu namorado por ter sido paciente e parceiro, pelo carinho, confiança e apoio para seguir em frente.

Agradeço aos meus amigos, aos bons colegas e professores que fizeram e fazem parte deste percurso.

Ao GBToxCe, que me acolheu e que foi minha família nessa jornada, agradeço a cada integrante, todos tem uma parcela na concretização desse trabalho, com certeza sem vocês eu não teria conseguido, me ensinaram basicamente tudo que sei sobre *C. elegans*. Agradeço a amizade, companhia além do café diário.

Agradeço ao Professor Cristiano Jesse por todo conhecimento compartilhado e por me incentivar a seguir na pesquisa.

Agradeço a minha orientadora por me amparar quando estava “à míngua” e aceitar desenvolver o projeto em tão pouco tempo, pelas puxadas de orelha que sei que foram para meu progresso, tanto como pesquisadora quanto como pessoa, até porque “não estou com a vida ganha”.

Agradeço a banca.

Por fim, agradeço a UNIPAMPA e as agências de fomento a pesquisa.

“Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o que, com frequência, poderíamos ganhar, por simples medo de arriscar.”

William Shakespeare

RESUMO

O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo, sendo o herbicida glifosato o princípio ativo mais vendido no país em mais de 40 formulações comerciais. Essas formulações apresentam além do princípio ativo substâncias chamadas de ingredientes inertes as quais são utilizadas para melhorar suas propriedades químicas e físicas, ampliando seu potencial de ação, mas que não possuem atividade agroquímica. A discriminação dessas substâncias não consta nos rótulos, tornando difícil sua avaliação. Este trabalho buscou avaliar a toxicidade das formulações à base de glifosato Roundup® DI (líquido) (RDI) e Roundup® WG (granulado) (RWG), e de surfactantes utilizados como adjuvantes nas formulações de glifosato, polioxietileno amina (POEA) 05 e 15, bem como uma mistura de ingrediente ativo + surfactantes (MIX) no organismo *Caenorhabditis elegans*, a fim de estabelecer uma relação causa x efeito. Os vermes (L1) foram expostos em meio líquido durante 30 minutos a diferentes concentrações do ingrediente ativo (glifosato em sal de monoisopropilamina), RDI, RWG, POEA 05 ou POEA 15. Após, os vermes foram transferidos para um meio sólido, onde a exposição continuou por mais 48 horas (exposição crônica). Foram avaliadas após 48h a taxa de sobrevivência, tamanho do corpo, tamanho da ninhada, produção de ROS e níveis de ATP. A formulação RWG e o POEA 15 não mostraram toxicidade nos parâmetros avaliados, enquanto RDI e POEA 05 aumentaram a taxa de mortalidade nas concentrações a partir de 0.075 e 0.05% respectivamente, causaram alterações no desenvolvimento dos vermes de modo dependente da concentração 0.04 e 0.06% respectivamente. As formulações RDI, os surfactantes POE 05 e 15 e o MIX induziram a formação de ROS. Quando os animais foram expostos ao MIX não houve intensificação da toxicidade, o que indica que a toxicidade do RDI não se deve apenas à presença do surfactante POEA 05. A formulação Roundup® DI e o surfactante POEA 05 foram mais tóxicos que o princípio ativo *per se*, indicando que a presença de ingredientes inertes aumentam a toxicidade das formulações e, portanto, precisam ser melhor estudadas e melhor descritas nos rótulos dos agrotóxicos.

Palavras-Chave: *C. elegans*; Glifosato; Roundup®; Ingredientes Inertes; POEA; Surfactantes; toxicidade.

ABSTRACT

Brazil is one of the largest consumers of pesticides in the world, the herbicide glyphosate being the most sold active ingredient in the country in more than 40 commercial formulations. These formulations present in addition to the active principle substances called inert ingredients which are used to improve their chemical and physical properties, increasing their action potential, but which do not have agrochemical activity. Discrimination of these substances is not on labels, making it difficult to assess them. This work aimed to evaluate the toxicity of formulations based on glyphosate Roundup® DI (liquid) (RDI) and Roundup® WG (granules) (RWG), and of surfactants used as adjuvants in formulations of glyphosate, polyoxyethylene amine (POEA) 05 and 15 as well as a mixture of active ingredient + surfactants (MIX) in the body *Caenorhabditis elegans* in order to establish a cause-effect relationship. The worms (L1) were exposed in liquid medium for 30 minutes at different concentrations of the active ingredient (glyphosate in monoisopropylamine salt), RDI, RWG, POEA 05 or POEA 15. The worms were then transferred to a solid medium where the exposure continued for another 48 hours (chronic exposure). The survival rate, body size, litter size, ROS production and ATP levels were evaluated after 48h. The RWG formulation and POEA 15 showed no toxicity in the evaluated parameters, whereas RDI and POEA 05 increased the mortality rate at concentrations of 0.075 and 0.05%, respectively, causing changes in the development of worms in a concentration dependent manner 0.04 and 0.06% respectively. RDI formulations, POE 05 and 15 surfactants and MIX induced ROS formation. When the animals were exposed to MIX there was no intensification of the toxicity, indicating that RDI toxicity is not due solely to the presence of POEA 05 surfactant. The Roundup® DI formulation and POEA 05 surfactant were more toxic than the active ingredient per indicating that the presence of inert ingredients increases the toxicity of the formulations and therefore needs to be better studied and better described on pesticide labels.

Keywords: *C. elegans*; Glyphosate; Roundup®; Inert Ingredients; POEA; Surfactants; toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura química do glifosato.....	16
Figura 2. Mecanismo de ação do glifosato em plantas..	17
Figura 3. Rótulo Roundup Original DI	19
Figura 4. Rótulo Roundup WG	20
Figura 5. Estrutura química básica (POEA).....	21
Figura 6. Ciclo de vida de <i>C. elegans</i> a 20 °C.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais

POEA: Polioxietileno amina

EPSPS: 5-enolpiruvilshikimate-3-fosfato sintase

AMPA: Ácido Aminometilfosfônico

MIX: Mistura entre o ingrediente ativo + POEA 05

RDI: Roundup® Original DI

RWG: Roundup® WG

G salt: Glifosato em sal de monoisopropilamina

IA: Ingrediente ativo

TIA: Toneladas de ingrediente ativo

ADI: Acceptable daily intake (ingestão diária aceitável)

GBF: Glyphosate based formulations (formulações a base de glifosato)

GFP: Green fluorescent protein (proteína verde fluorescente)

NGM: Nematode growth medium (meio de crescimento nematóide)

PE255: Cepa de *C. elegans* bioluminescente quando com adição de D-luciferina exógena.

ROS: Reactive oxygen species (espécie reativa de oxigênio)

H2DCF-DA: 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (2', 7'-diacetato diclorofluoresceína)

ATP: Adenosine triphosphate (trifosfato de adenosina)

DMSO: Dimetilsulfóxido

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	13
1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1. Glifosato	16
2.1.1. Toxicocinética	17
2.2. Formulações a base de glifosato.....	19
2.3. Ingredientes Inertes.....	20
2.4. <i>Caenorhabditis elegans</i>.....	22
3. JUSTIFICATIVA.....	24
4. OBJETIVOS	
4.1. Geral.....	25
4.2. Específicos	25
5. MANUSCRITO.....	26
6. CONCLUSÕES.....	47
7. PERSPECTIVAS.....	48
8. REFERÊNCIAS.....	49

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação foi desenvolvida em três partes:

CAPÍTULO 1

Contém as seções Introdução, Revisão Bibliográfica, Justificativa e Objetivos.

CAPÍTULO 2

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo científico. As seções Materiais e Métodos, Resultados e Discussão encontram-se no próprio manuscrito. O manuscrito está apresentado da mesma forma que será submetido à revista **Food and Chemical Toxicology**.

CAPÍTULO 3

Contêm as conclusões, perspectivas e referências bibliográficas.

1. Introdução

Agrotóxicos são compostos de substâncias químicas destinadas ao controle, destruição ou prevenção, direta ou indiretamente, de agentes patogênicos para plantas, animais e às pessoas (Brasil, 1989). Atualmente, o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo (Lopes and Albuquerque, 2018). Em 2017 foram comercializados 539.944,95 toneladas de ingrediente ativo (TIA) em produtos formulados em todas as unidades federativas, onde 70.143,64 (TIA) foram comercializados apenas no Rio Grande do Sul (IBAMA, 2018), sendo a média brasileira de 4 Kg/hectare/ano (Neves and Bellini, 2013). Atualmente, cerca de mais de 80% dos agricultores brasileiros utilizam agrotóxicos no combate de pragas e doenças com o intuito de aumentar a produtividade, contribuindo com o aumento de danos ambientais e comprometimento da saúde humana, já que os agricultores e moradores de áreas rurais estão expostos a uma mistura de agrotóxicos (Pedlowski et al., 2012). Segundo dados do IBAMA (2018) a principal classe de uso em produtos formulados é a dos herbicidas com 315.573,38 (58,45%) de toneladas de ingrediente ativo vendidos em 2017, e dentro dessa classe o ingrediente ativo glifosato e seus sais com 173.150.75 de toneladas de ingrediente ativo foram os mais vendidos no país em 2017.

As formulações comerciais de glifosato são as mais variadas e apresentam outros ingredientes além do glifosato, os quais são relacionados com a toxicidade de diversos organismos não alvo (Mesnage et al., 2015; Tsui and Chu, 2003). Muitos estudos vêm mostrando a toxicidade das formulações comerciais a base de glifosato: efeitos teratogênicos foram demonstrados em linhas de células humanas (Paganelli et al., 2010), indução na proliferação de células de câncer de mama humano (Thongprakaisang et al., 2013), além de toxicidade em organismos do solo (Gaupp-Berghausen et al., 2015; McVey et al., 2016; Nicolas et al., 2016) e mamíferos (Johansson et al., 2018; Owagboriaye et al., 2017). A toxicidade das formulações comerciais de glifosato como Roundup vem sendo atribuída aos adjuvantes que são adicionados as formulações comerciais (Hazen, 2000) e principalmente aos surfactantes como o Polioxietileno Amina (POEA) que representa aproximadamente 15% nas formulações comerciais de Roundup® (Giesy et al., 2000). Em um teleósteo de água doce *Prochilodus lineatus* foi observada

genotoxicidade após exposição a POEA (Navarro and Martinez, 2014), e este também causou toxicidade em linhagens celulares humanas (Mesnage et al., 2013).

Tendo em vista tal realidade, estudos acerca da toxicologia e composição dos pesticidas tornam-se imprescindíveis para uma maior compreensão e avaliação dos riscos gerados por sua utilização. Estudos em animais superiores, como mamíferos, tornam-se uma questão problemática, principalmente em termos bioéticos e pelo uso racional de animais na experimentação científica (Magda et al., 2012; Tralau et al., 2012). Além disso, o nível de complexidade do organismo adiciona ao estudo muitas variáveis, tornando-se um problema nas primeiras fases da pesquisa. Como solução, propõe-se a utilização de um modelo alternativo para pesquisa, o nematódeo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), o qual possui uma menor complexidade e grande homologia genética com os humanos, não possuindo restrições éticas (Au - Lee and Au - Kang, 2017). Possibilita ainda a avaliação de mecanismos através de animais mutantes e transgênicos, adicionando informações importantes à literatura (Porta-de-la-Riva et al., 2012). Ensaio de toxicidade em *C. elegans* fornecem dados de um animal inteiro com sistemas digestivo, reprodutivo, endócrino, sensorial e neuromuscular íntegro e metabolicamente ativo, além de apresentar LD 50 semelhante as descritas em roedores (Hunt, 2017). Permite a determinação de múltiplos parâmetros como os efeitos sobre as funções biológicas do nematoide e outros usam marcadores moleculares, os parâmetros mais utilizados para avaliar a toxicologia são letalidade, crescimento, reprodução e locomoção (Tejeda-Benitez and Olivero-Verbel, 2016).

De acordo com os estudos supracitados são necessárias avaliações acerca da toxicidade das formulações, visto que o princípio ativo nunca é aplicado sozinho. A avaliação toxicológica para regulamentação deveria ser reajustada e analisada como um todo para estabelecer a segurança dos produtos formulados. Acerca disso acreditamos que as formulações a base de glifosato apresentem uma maior toxicidade em relação ao princípio ativo devido a maior quantidade de ingredientes inertes presentes nessas formulações. Assim realizamos a avaliação da toxicidade de diferentes formulações comerciais à base de glifosato, bem como deste princípio ativo sozinho e dos surfactantes, utilizando o nematoide de vida livre *C. elegans* como organismo modelo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Glifosato

Descoberto em 1950 pelo químico suíço Henri Martin, o glifosato (Figura 1) ou [N-(fosfonometil)glicina] foi testado para diversos usos, mas sua atividade como herbicida foi identificada apenas em 1970 pelo químico da Monsanto Dr. John Franz (Benbrook, 2016). Foi vendido pela primeira vez como produto formulado Roundup® pela Monsanto em 1974 (Duke and Powles, 2008).

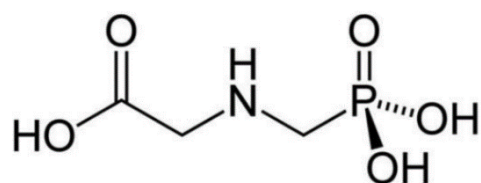


Figura 1. Estrutura química do glifosato. Fonte: (Negga et al., 2011).

Glifosato funde a 200°C, possui densidade aparente de 0,5 g/cm³ e se apresenta bastante estável em presença de luz, inclusive em temperaturas superiores a 60°C (Tomlin, 1994). Comercializado em forma de sal de isopropilamina, sal de potássio e sal de amônio (Aquino Neto, 2009), e possui baixa solubilidade do ácido em água (1,2% a 25°C) (Yamada and CASTRO, 2007), os sais são mais solúveis e por isso preferidos para as formulações. O termo glifosato é geralmente utilizado para indicar tanto o ácido como seus sais, pois é reconhecido que eles são biologicamente equivalentes (Yamada and CASTRO, 2007). Os valores de pK encontrados na literatura para o glifosato são: pK₁ = 0,8; pK₂ = 2,16; pK₃ = 5,46; pK₄ = 10,14. Tais constantes de dissociação indicam o grau de dissociação do herbicida em função do pH (Amarante Junior et al., 2002).

O glifosato atua inibindo a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS) das plantas (Figura 2), necessária para a síntese de aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano. A EPSPS também influencia em outros processos, como a inibição da síntese de clorofila, estimulação da produção de etileno e redução da síntese de proteínas (Galli et al.).

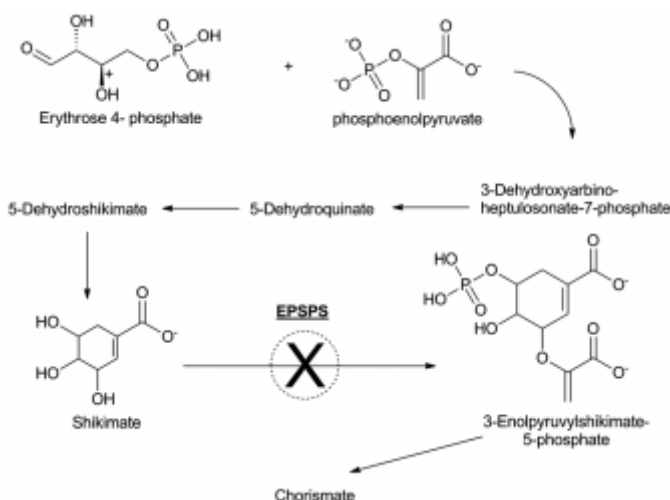


Figura 2. Mecanismo de ação do glifosato em plantas. Fonte: adaptado (Annett et al., 2014).

O glifosato é indicado para o controle de ervas daninhas anuais e perenes, em culturas de arroz irrigado, cana-de-açúcar, café, citros, maçã, milho, pastagens, soja (plantio direto ou indireto), fumo, uva e soqueira em cana-de-açúcar. É indicado, ainda, para as culturas de ameixa, banana, cacau, nectarina, pêra, pêssego, seringueira e plantio direto do algodão (Amarante Junior et al., 2002).

A absorção do glifosato ocorre através das folhas, variando de acordo com a espécie. A difusão é o modo mais provável de transporte através da cutícula da planta, pois como apresenta boas propriedades físico-químicas o glifosato pode se translocar da folha através do floema (Duke and Powles, 2008).

A persistência do glifosato no solo varia substancialmente devido aos processos de degradação e/ou adsorção (Locke et al., 2008). A meia-vida do glifosato no solo varia entre dias a meses, dependendo dos teores de argila e matéria orgânica e do nível de atividade microbiana (Toni et al., 2006). Wauchope et al. (1992), relatam que a meia-vida pode chegar a 174 dias, enquanto que Giesy et al. (2000) relatam que a meia-vida do glifosato em solo varia de dois a 197 dias e do metabólito ácido aminofosfônico (AMPA) de 76 a 240 dias. Com meia-vida maior no solo, a detecção do AMPA no ambiente pode ser útil para a detecção de glifosato (Grunewald et al., 2001).

2.1.1. Toxicocinética

A exposição mais frequente das pessoas ao Glifosato ocorre pelo trabalho (pessoas que usam este herbicida nas suas atividades), ingestão de alimentos contaminados,

exposição causada pela deriva e contato com o solo ou águas de consumo e recreação (Cox, 1995).

O glifosato é degradado principalmente em AMPA (Duke and Powles, 2008). O glifosato sofre pouca biotransformação no organismo em mamíferos, representando cerca de 0,5-1%, que é convertido em AMPA, pelo metabolismo das bactérias do intestino (Oga et al., 2008). Após doses orais e por via intravenosa em ratos, foi verificado que a biodisponibilidade oral do glifosato é de 23,21%. O glifosato é convertido em AMPA e as concentrações máximas de glifosato e AMPA no plasma foram de 4.62 e 0.416 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente (Anadon et al., 2009). Em estudos farmacocinéticos de glifosato em macacos, 95% das doses administradas via intravenosa foram recuperadas (Wester et al., 1991). Uma outra possível via de exposição ao glifosato pode ocorrer por contato dérmico. Um estudo revelou que a superfície de pele de animais e humanos in vitro indicaram uma absorção percutânea menor do que 2% (Wester et al., 1991). A inalação é uma via menor de exposição, mas a névoa de spray pode causar desconforto oral ou nasal, um gosto desagradável na boca, formigamento e irritação na garganta. A exposição dos olhos pode levar a conjuntivite leve (Bradberry et al., 2004).

Como supracitado, o glifosato é pouco absorvido, não é metabolizado e é excretado inalterado pelo organismo oferecendo pouca toxicidade em relação a biotransformação e geração de produtos mais tóxicos ao nosso organismo (Joint, 2005). Aproximadamente (70-80)% da dose administrada é eliminada nas fezes e (20-30)% na urina, sendo geralmente indetectável na urina no segundo ou terceiro dia de exposição (WHO, 1994).

O glifosato não inibe a enzima acetilcolinesterase, apesar de ser classificado como organofosforado (Larsen et al., 2016). Entre os efeitos agudos e crônicos em seres humanos encontram-se dermatite de contato e síndrome tóxica. Após ingestão de altas doses, epigastria (ulceração ou lesão de mucosa gástrica), hipertermia, hipotensão, conjuntivite, arritmias cardíacas, elevação de enzimas hepáticas, acidose metabólica e hipercalcemia são alguns dos sintomas relatados (Amarante Junior et al., 2002).

Apesar do princípio ativo ser pouco metabolizado no organismo humano, estudos associam o glifosato com o aparecimento e suscetibilidade de diferentes patologias, desde efeitos sobre o sistema endócrino (de Souza et al., 2017;

Mesnager et al., 2017), aumento de pessoas com intolerância ao glúten (Samsel and Seneff, 2013) incidência de doenças neurodegenerativas como Parkinson (Levy, 2013; Samsel and Seneff, 2015).

2.2. Formulações a base de glifosato

Os herbicidas a base de glifosato são geralmente comercializados sob formulações comerciais (Mesnager et al., 2015) que possuem além do princípio ativo, adjuvantes a fim de amplificar sua eficácia (Cox, 1998; Hazen, 2000). No Brasil há diversas marcas comerciais de herbicidas a base de glifosato, no presente trabalho duas formulações foram utilizadas, Roundup Original DI (Figura 3) e Roundup WG ambas fabricadas pela Monsanto.



Registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento MAPA sob nº 00513

COMPOSIÇÃO:

Sal de Di-amônio de N-(phosphonomethyl)glycine (GLIFOSATO)	445 g/L (44,5% m/v)
Equivalente ácido de N-(phosphonomethyl)glycine (GLIFOSATO)	370 g/L (37,0% m/v)
Outros Ingredientes	751 g/L (75,1% m/v)

GRUPO	G	HERBICIDA
-------	----------	-----------

CONTEÚDO: VIDE RÓTULO.

CLASSE: Herbicida não seletivo de ação sistêmica do grupo químico glicina substituída.

TIPO DE FORMULAÇÃO: Concentrado solúvel (SL)

Figura 3. Rótulo Roundup Original DI

O Roundup Original DI é recomendado para o controle em pós-emergência de plantas infestantes. Indicado para as culturas de algodão, arroz irrigado, café, cana-de-açúcar, citros, milho e soja.



Registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA sob nº 002094

COMPOSIÇÃO:

Sal de Amônio de N-(phosphonomethyl)glycine (GLIFOSATO).....	792,5 g/kg (79,25% m/m)
Equivalente ácido de N-(phosphonomethyl)glycine (GLIFOSATO).....	720,0 g/kg (72,00% m/m)
Outros ingredientes	207,5 g/kg (20,75% m/m)

GRUPO	G	HERBICIDA
-------	---	-----------

PESO LÍQUIDO: VIDE RÓTULO.

CLASSE: Herbicida seletivo condicional, de ação sistêmica, do grupo químico glicina substituída.

TIPO DE FORMULAÇÃO: Granulado Dispersível (WG).

Figura 4. Rótulo Roundup WG

O Roundup WG é recomendado para o controle em pós-emergência de plantas infestantes. É indicado para as culturas de algodão, ameixa, arroz, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, maçã, milho, nectarina, pastagens, pera, pêssego, seringueira, soja, trigo e uva. Ambas as formulações são de uso exclusivamente agrícola.

2.3. Ingredientes Inertes

Segundo o decreto que trata sobre os agrotóxicos tem-se que os aditivos são substâncias ou produtos adicionados a agrotóxicos, componentes e afins, para melhorar sua ação, função, durabilidade, estabilidade e detecção ou para facilitar o processo de produção. Já ingredientes inertes são substâncias ou produtos não ativos em relação à eficácia dos agrotóxicos e afins, usados apenas como veículos, diluentes ou para conferir características próprias às formulações (Brasil, 2002). Nas formulações comerciais à base de glifosato, os surfactantes são geralmente citados como os principais ingredientes inertes, seguidos por metais. Entretanto, tais ingredientes citados como inertes tem sido associados com a toxicidade das formulações em relação ao princípio ativo sozinho (Mesnage et al., 2015).

Aminas de sebo polietoxilado, também conhecidas como aminas de polioxietileno (POEAs ou POE), são uma classe de surfactantes não

iônicos/catiônicos derivados do sebo. São utilizados como adjuvantes em formulações de herbicidas à base de glifosato para aumentar a cobertura e a penetração do ingrediente ativo através de tecidos superficiais, aumentando a acumulação de glifosato dentro da planta (Ross and Liao, 2015).

Cada molécula de POE consiste em uma cadeia de alquila e duas cadeias de polietoxilato ligadas a um único átomo de nitrogênio (Figura 3). A cadeia alquílica (R) pode incluir ligações carbono-carbono insaturadas (C=C), uma vez que o material fonte contém uma mistura de ácidos graxos saturados e insaturados incluindo ácido esteárico (C18:0), palmítico (C16:0) e ácido oleico (C18: , ω -9). Adicionalmente, as duas cadeias de polietoxilato podem conter números iguais ou diferentes de grupos etoxilado (EO).(Ross and Liao, 2015). O comprimento e diferentes distribuições das cadeias etoxiladas varia em diferentes misturas técnicas e pode conferir propriedades físicas diferentes (Tush et al., 2013). Por exemplo, o uso de POEA em formulações de glifosato pode alterar as características de sorção/dessorção do solo em relação ao glifosato. Este efeito foi demonstrado em outros sistemas surfactante/pesticida (Tush et al., 2013).

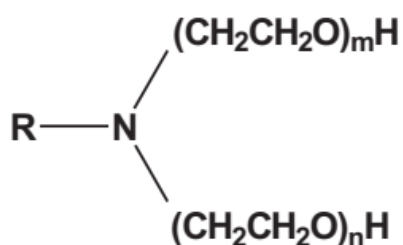


Figura 5. Estrutura química básica (POEA). Fonte: Ross and Liao (2015).

Diversas formulações à base de glifosato apresentam maior toxicidade que o glifosato sozinho e, por isso, estudos vem atrelando aos POEA a toxicidade das dessas formulações (Mesnage et al., 2013; Navarro and Martinez, 2014; Tsui and Chu, 2003). Os fabricantes geralmente detêm a composição de suas formulações como informação proprietária e sigilosa, tornando difícil a determinação dos componentes da formulação além do ingrediente ativo bem como também da toxicidade destes.

2.4. *Caenorhabditis elegans*

O *Caenorhabditis elegans* é um pequeno nematoide de vida livre, eucarioto, multicelular, transparente, que se alimenta de bactérias (NGM- OP50) e é encontrado em todo o mundo. As larvas recém eclodidas (L1) têm 0,25 mm e os adultos 1 mm de comprimento, necessitando de estereomicroscópio para serem observados. O *C. elegans* tem um ciclo de vida rápido (~ 20 dias a 20°C) e existe principalmente como hermafrodita, embora machos surjam com uma frequência <0,2%. Através da autofecundação, um hermafrodita produz, aproximadamente, 300 descendentes. O hermafrodita grávido expele os ovos, o qual, após a eclosão, passa por quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4) até chegar à fase adulta (Figura 6). Através da observação com estereomicroscópio é possível acompanhar os movimentos, comportamento, desenvolvimento, acasalamento e postura de ovos dos vermes em placas de Petri (Corsi et al., 2015).

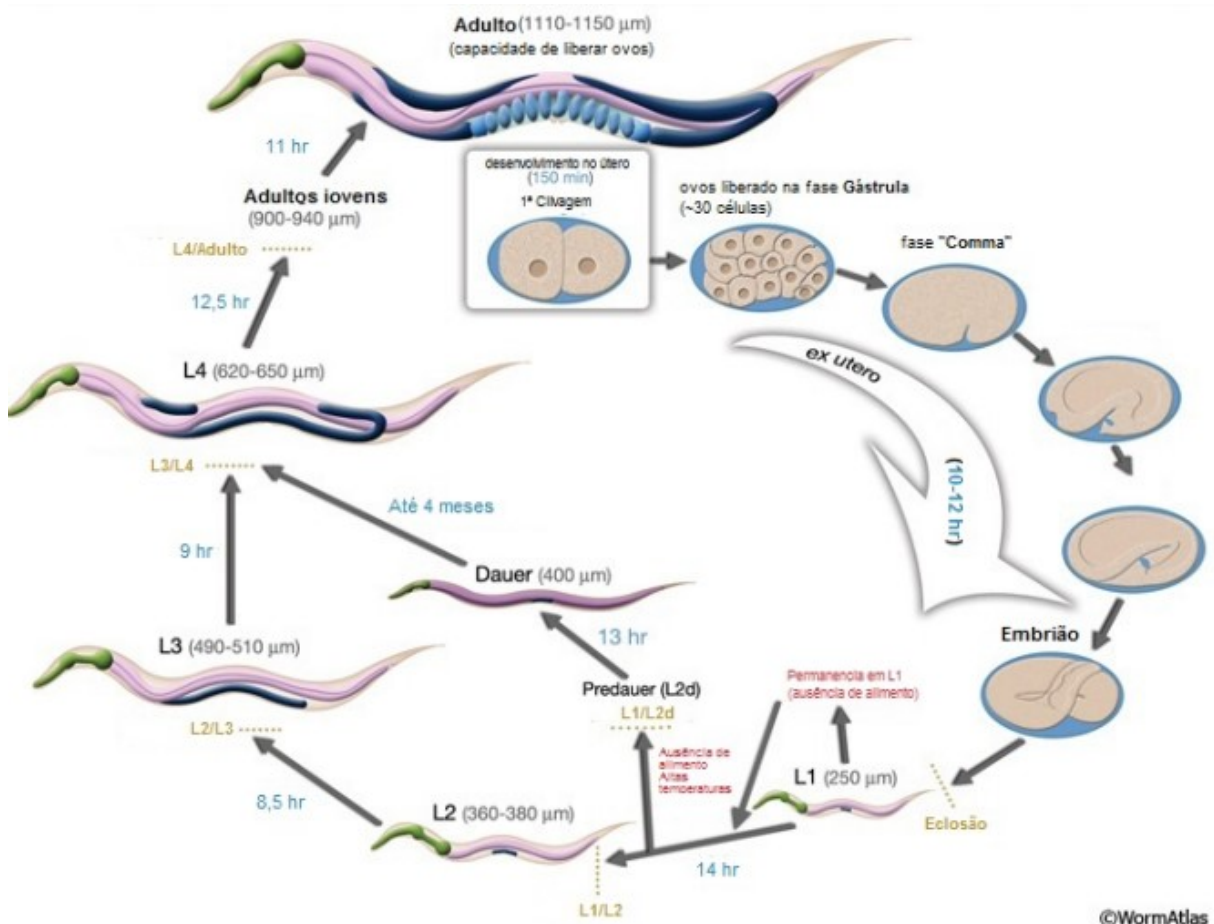


Figura 6. – Ciclo de vida de *C. elegans* a 20 °C (Gava, 2013) adaptado de WormAtlas.

C. elegans é muito utilizado como um modelo experimental desde a década de 60 com as pesquisas de Sydney Brenner, sendo hoje um dos organismos sobre o

qual se tem maior conhecimento nível molecular (Riddle et al., 1997). Sabe-se que cerca de 60-80% dos genes humanos têm um ortólogo no genoma de *C. elegans* (Kaletta and Hengartner, 2006) e 40% dos genes associados a doenças humanas têm ortólogos claros no *C. elegans* (Culetto and Sattelle, 2000). Assim, muitas descobertas em *C. elegans* têm relevância para o estudo da saúde e da doença humana (Corsi et al., 2015). Além disso, o corpo transparente, geração facilitada de cepas com mutações tipo deleção em genes de interesse, e a existência de diversas cepas transgênicas expressando a proteína verde fluorescente combinada a genes promotores de proteínas de interesse, tornam o *C. elegans* um poderoso organismo modelo, evidenciado seu grande potencial para toxicologia ambiental e humana (Chalfie et al., 1994).

Neste sentido, este verme já foi utilizado para avaliar a toxicidade de algumas formulações à base de glifosato. Já foram observadas estresse oxidativo (Kronberg et al., 2018), neurodegeneração (Negga et al., 2011) e disfunção mitocondrial (Luz et al., 2016). Esses achados demonstram a viabilidade do modelo para avaliar a toxicidade de pesticidas, particularmente, o glifosato.

3. Justificativa

O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo, sendo o herbicida glifosato o princípio ativo mais vendido no país em forma de várias formulações. Essas formulações apresentam, além do princípio ativo, substâncias chamadas de ingredientes inertes as quais são utilizadas para melhorar suas propriedades químicas e físicas, ampliando seu potencial de ação, mas que não possuem atividade agroquímica. A avaliação toxicológica para o registro dos agrotóxicos leva em conta apenas testes com o princípio ativo, negligenciando os aditivos adicionados às formulações comerciais. Estudos recentes demonstram que as formulações comerciais de glifosato são mais tóxicas que o princípio ativo em si (Mesnage et al., 2015; Tsui and Chu, 2003), podendo causar impacto ambiental e ocupacional. Estudos que se dediquem a investigar a toxicidade das substâncias presentes nas formulações comerciais, buscando identificar os componentes que aumentam a toxicidade do princípio ativo e das formulações são necessários para preservação do meio ambiente e dos organismos não alvo que são expostos a estes agrotóxicos, além de instigar a regulamentação meticulosa destes produtos.

4. Objetivos

4.1. Geral

Avaliar a toxicidade de duas formulações à base de glifosato e de surfactantes presentes nas formulações comerciais de glifosato e compará-las com o princípio ativo em *Caenorhabditis elegans*, a fim de estabelecer uma relação causa x efeito da presença de surfactante nas formulações.

4.2. Específicos

1. Avaliar as diferenças entre as formulações em termos de toxicidade em *C. elegans* (L4) ;
2. Investigar o envolvimento dos surfactantes POE na toxicidade de formulações de glifosato;
3. Verificar se as formulações alteram o equilíbrio oxidativo em *C. elegans*;
4. Verificar se as formulações afetam o metabolismo energético em *c. elegans*.
5. Relacionar a toxicidade da formulação comercial à base de glifosato com a presença de surfactantes.

5. Manuscrito

Toxicity of formulations based on glyphosate is partially determined at the surfactant presence: a study in *Caenorhabditis elegans*

Jossana Rodrigues Ruff^a, Matheus Teixeira Barbosa^a, Marcell Valandro Soares^a,
Mauricio Tavares Jacques^b, *Daiana Silva Ávila^a

^aUniversidade Federal do Pampa– Brasil

^bUniversidade Federal de Santa Catarina– Brasil

Corresponding author:

Daiana Silva Ávila

Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

BR 472 – Km 592 – Caixa Postal 118

CEP 97500-970 Uruguaiana /RS

Email: avilads1@gmail.com

Abstract

Brazil is one of the largest consumers of pesticides in the world, the herbicide glyphosate being the most sold active ingredient in the country in more than 40 commercial formulations. These formulations present in addition to the active principle substances called inert ingredients which are used to improve their chemical and physical properties, increasing their action potential, but which do not have agrochemical activity. Discrimination of these substances is not on labels, making it difficult to assess them. This work aimed to evaluate the toxicity of formulations based on glyphosate Roundup® DI (liquid) (RDI) and Roundup® WG (granules) (RWG), and of surfactants used as adjuvants in formulations of glyphosate, polyoxyethylene amine (POEA) 05 and 15 as well as a mixture of active ingredient + surfactants (MIX) in the body *Caenorhabditis elegans* in order to establish a cause-effect relationship. The worms (L1) were exposed in liquid medium for 30 minutes at different concentrations of the active ingredient (glyphosate in monoisopropylamine salt), RDI, RWG, POEA 05 or POEA 15. The worms were then transferred to a solid medium where the exposure continued for another 48 hours (chronic exposure). The survival rate, body size, litter size, ROS production and ATP levels were evaluated after 48h. The RWG formulation and POEA 15 showed no toxicity in the evaluated parameters, whereas RDI and POEA 05 increased the mortality rate at concentrations of 0.075 and 0.05%, respectively, causing changes in the development of worms in a concentration dependent manner 0.04 and 0.06% respectively. RDI formulations, POE 05 and 15 surfactants and MIX induced ROS formation. When the animals were exposed to MIX there was no intensification of the toxicity, indicating that RDI toxicity is not due solely to the presence of POEA 05 surfactant. The Roundup® DI formulation and POEA 05 surfactant were more toxic than the active ingredient per indicating that the presence of inert ingredients increases the toxicity of the formulations and therefore needs to be better studied and better described on pesticide labels.

Keywords: *C. elegans*; Glyphosate; Roundup®; Inert Ingredients; POEA; Surfactants; toxicity.

1. Introduction

Glyphosate is a broad-spectrum herbicide, currently with the highest production volumes of all herbicides and active ingredient of more than 750 different formulations (Guyton et al., 2015). According to the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA) data from 2017, 173,150.75 ton of this herbicide have been purchased, accounting for 58.45% of all herbicides sales. (IBAMA, 2018). The acceptable daily intake (ADI) is 0.042 mg/kg b.w. for glyphosate, and the maximum allowed amounts of glyphosate and AMPA in drinking water is 500 µg/L (Fiori et al., 2018), however the contamination of foods, soil and water has been of current concern.

The herbicidal activity of glyphosate is rather based on its inhibition of the shikimate pathway, which is present only in plants and micro-organisms and therefore would confer low toxicity to mammals and to nontarget organisms (Mesnage et al., 2015). On the other hand, many studies have found contradictions to the above. The IARC reports state glyphosate as a possible human carcinogen (Group 2A) (IARC, 2015), as, for instance, glyphosate induced human breast cancer cells growth via estrogen receptors (Thongprakaisang et al., 2013). In several aquatic organisms glyphosate-based formulations showed toxicity (Tsui and Chu, 2003), likewise as observed in other models (Cauble and Wagner, 2005; Garcia-Espineira et al., 2018; McVey et al., 2016; Rainio et al., 2019). The formulated products marketed are complex mixtures which, in addition to the active ingredient, have other components such as solvents, wetting agents, emulsifiers and additives in order to increase the effectiveness of the active ingredient (HAZEN, 2000). These components are usually named on the product labels as inert ingredients.

Toxicity assessment of the formulations is hampered by the lack of specific information on which substances are added and at which concentrations. The active ingredient information is required in the formulation label, but the inert ingredients information is not compulsory (Cox and Sorgan, 2006). The major toxicity of glyphosate based- formulations has been attributed to adjuvants that are responsible for their toxicity to nontarget organisms. According with Tsui and Chu (2003), polyoxyethylene tallow amine (POEA) surfactants contributed more than 46% to Roundup® toxicity in aquatic organisms. Several studies revealed the toxicity of

surfactants (Giesy et al., 2000) added to the glyphosate based formulations in various models, such as aquatic organisms (Tsui and Chu, 2003), frogs (Howe et al., 2004), cell lines (Mesnage et al., 2013; Song et al., 2012) and rats (Adam et al., 1997). Notably, the proportion glyphosate:surfactant in the Roundup formulations varies according to the country in which the product is marketed, which is aggravating (Cox and Sorgan, 2006).

Considering that the use of herbicides is always through commercial formulations with the omnipresence of surfactants, studies aiming at the biological effects of the inert components are necessary for a better understanding and evaluation of the risks generated by their use. However, toxicological studies in higher animals, such as mammals, have become a problematic issue today, mainly in bioethical terms. As a solution, the use of alternative models such as the nematode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) have been validated. This worm has been used as a useful tool in experimental toxicology due to the high degree (60-80%) of homology with the human genome. Its easy maintenance, handling, fast life cycle, short longevity (approximately 20 days), transparent body, facilitated generation of deletion type mutations in genes of interest, the existence of several transgenic lines expressing fluorescent green protein (GFP) makes *C. elegans* an experimental model of great relevance in toxicology (Brenner, 1974). Notably, some studies have shown that some glyphosate-based formulations can cause abnormal neuronal morphology and mitochondrial inhibition in *C. elegans* (Burchfield et al., 2018; McVey et al., 2016), however the relevance of the surfactants to these effects has not been assessed in this animal.

Thus, the premise of this study was to evaluate the differential toxicity between glyphosate (active ingredient) and two different formulations based on glyphosate, a liquid (Roundup Original DI) and a granulated (Roundup WG) in the worm *C. elegans*. Furthermore, we aimed to evaluate whether the toxicity is due to the polyoxyethylene surfactant present in the liquid formulations.

2. Materials and Methods

Chemicals

The GBF Roundup® WG (79.25% of Active Ingredient) and Roundup® Original DI (44.5% of Active Ingredient) were obtained from donations The isolated

form of glyphosate (N-Phosphonomethyl glycine, monoisopropylamine salt solution) (G salt) was obtained from Sigma-Aldrich. The stock solution concentration of GBF was 1% (active ingredient) diluted in distilled water, same as that obtained for glyphosate in monoisopropylamine salt solution (G salt). All treatment dilutions started from 0.01%. The surfactants POEA (05) and POEA (15) tallow amine were obtained from ChemService.

2.2. Maintenance of the Worms

C. elegans were obtained from *Caenorhabditis* Genetics Center, Minnesota, USA and maintained in Petri dishes containing NGM (nematode growth media) with *E. coli* OP50 and kept in incubators at 20 °C. The strains used were N2 (wild type) and PE255 (sur-5p::Luciferase:: GFP [prol-6 (su1006)] X). The worms at the first larval stage (L1) were obtained by a synchronization process (Brenner, 1974) .

2.3. Chronic Pesticides Treatments

After 14 hours of the synchronization process, freshly hatched larvae were treated with different concentrations of GBFs or G salt. Concentrations were calculated as a percentage of the active ingredient (0.010 to 0.2%). First, 1,500 L1 worms were exposed for 30 minutes in a liquid medium and then the whole treatment was transferred to Petri dishes with NGM and *E. coli* OP50 (Jacques et al., 2017). All the analyzes were performed after 48 h of exposure.

2.4. Chronic Surfactants and MIX Treatments

Hatched larvae (L1) were treated as described in item 2.3. with the surfactants POEA 05 and 15. The concentrations were calculated as 15% relative to the active ingredient concentration as this concentration is present in Roundup commercial formulations (Giesy et al., 2000; Howe et al., 2004; Tush et al., 2013). We also tested a mixture (MIX) of the active ingredient and POEA 05 surfactant in order to verify toxicity when the surfactant and active ingredient were associated. The concentrations used were 0.010, 0.050, 0.075, 0.1 and 0.2% active ingredient (G salt) and the equivalent of 15% of these concentrations of POEA 05.

2.5. Survival Assay

After the end of the 48 h exposure the survival rate was scored by using a transparent grid beneath the NGM plate. 25 quadrants were analyzed under a dissection microscope, where the live worms were differentiated from dead worms (motionless and with no reaction to a platinum wire touch). At least three experiments were carried out and the LC50 was calculated for each treatment.

2.6. Body Size

The body size of the worms was evaluated 48h after treatment. The worms were transferred to microscope slides (with levamisole 236,3mg/mL) and photos were obtained. These images were then analyzed using the ImageJ software, where head to tail length was measured using 5 worms per treatment group per experiment. This measurement is used to verify whether the treatment affects the size and the worms development.

2.7. Brood Size

After 48 hours of exposure, treated worms were individually transferred to a NGM/OP50 plate. The transference of the P0 worm was carried out daily during the reproductive period. The brood size was measured as total larvae, monitoring the worms every 24 hours during the fertile cycle. The assays were performed in triplicates and at least three independent experiments were performed.

2.8. ROS Measurement

Synchronized N2 L1 worms (3,000) were treated chronically as described in section 2.3. After 48h treatment, worms were collected to microtubes (0,5% NaCl medium) and a fluorescent probe for reactive oxygen species (ROS) detection, H2DCF-DA (2,7-dichlorofluorescein-diacetate, Sigma) was added (500 μ M). (Bornhorst et al., 2014). The worms were allowed to stir for 1h, in the dark, then washed three times for dye removal and transferred to a 96-well plate. The fluorescence intensity of each sample was measured (excitation: 485 nm; emission: 535 nm) using a plate reader (SpectraMax M5 microplate reader, Molecular Devices®), read every 15 min for 1h. Delta arbitrary units of fluorescence were obtained from the last and first readings. Data were normalized using protein

(Bradford method). Results are expressed as $\Delta\text{AUF}/\text{h}/\mu\text{g}$ of protein. At least three independent experiments were performed in duplicates.

2.9. ATP Levels

To evaluate the ATP levels, *in vivo*, we used a mutant strain, PE255 (sur-5p::Luciferase:: GFP [prol-6 (su1006)] X) expressing a firefly luciferase, as described previously, with some modifications (Luz et al., 2016). The luciferase enzyme present in this strain reacts with luciferin and requires ATP for the reaction to take place. The reaction product generates light that can be measured with a luminescence reader, and the amount of light generated is proportional to the levels of ATP in worms. After the treatments, 3000 L1 worms were transferred into a 96-well microplate, containing M9 buffer. Then, 50 μL luminescence buffer (0.1 mM D-luciferin, 1% DMSO and 0.15% Triton-X, in M9) was added and the luminescence was measured for 15 min in 30" interval. Data were normalized using protein (Bradford method). Sodium azide (250 mM), a known inhibitor of the electron transporter chain, was used as a positive control, using a plate reader (SpectraMax M5 microplate reader, Molecular Devices®).

2.10. Protein determination

The protein present in the sample was determined with method Bradford (1976).

2.11. Statistical analysis

All experiments were done in duplicate and repeated at least 3 times. Data were expressed as mean \pm standard error and Shapiro-Wilk normality test was performed. Data were analyzed statistically by one-way ANOVA, followed by Tukey's post-hoc test. All statistical analysis was performed with Graph Pad Prism 7 software.

3. Results

3.1. GBF Roundup® Original DI was more lethal than G salt

In order to evaluate the lethality of the Roundup® DI and WG formulations *versus* the active ingredient we performed a dose response curve and scored the survival rate. According to results depicted in Figure 1, GBF Roundup® DI was more

lethal than Roundup® WG and the G salt with a LC_{50} 0,085%. We could not estimate and LC_{50} for RWG and G salt.

3.2. GBF Roundup® Original DI induced decrease in worms length

To evaluate if GBFs and G salt could cause changes in the size of the worms, and consequently in their development, we measured the length of the body of the exposed and control worms. Worms treated with the Roundup® DI Formulation (Figure 2) showed significant decrease in body length at concentrations of 0.040, 0.050, 0.075, 0.10, while worms treated with Roundup® WG formulation and the G salt did not show any difference.

3.3. GBFs did not affect reproduction

As shown in figure 3, none of the concentrations had effect on brood size in both GBFs and G salt. Even worms treated with in Roundup® DI concentrations that depicted a delay in development of 2 days (Figure 3), reached the adult phase and had a reproductive rate similar to the control animals.

3.4. GBFs change ROS levels but not ATP

Worms treated with Roundup® Original DI at 0.010 % depicted increased ROS levels when compared with control or G salt- treated worms. Roundup® WG exposure did not cause alterations in this parameter (Figure 8 A). In addition, none of the treatments altered ATP levels (Figure 9 A).

3.5. Surfactant decreases the survival rate and length of the treated worms

POEA 05 surfactant exposure significantly decreased *C. elegans* survival in relation to the control group, whilst POEA 15 did not increase mortality rate (Figure 4). The same was observed in the worms size, where worms treated with POEA 05 from 0.05% showed significant decrease in body length while worms treated with POEA 15 did not show any difference in their length (Figure 5). No alterations in brood size were observed following surfactants treatments (Figure 6). In addition, an increase in ROS levels were observed following exposure to POEA 05 (0.0075%)

and POEA 15 (0.0015%) (Figure 8B), but no significant ATP levels changes were verified (Figure 9B).

3.6. MIX does not change toxicological endpoints

When we combined POEA 05 and G salt at different concentrations, but respecting the 15% proportion between of the surfactant in relation to the G salt, worms did not present alterations in survival, body size, brood size and ATP levels when compared to control group (Figures 7, 9C, respectively). The only alteration that we have detected was a slight increase in ROS levels (Figure 9C).

4. Discussion

Discovered more than 50 years ago (Benbrook, 2016) and used as a herbicide since 1974 (Duke and Powles, 2008), glyphosate is currently one of the most widely used herbicides in the world, both for its effectiveness in controlling weeds as for its low toxicity to mammals. However, toxicity tests take into account only the active ingredient and not the formulated product leading to a gap in the reliability of such tests, since the commercial formulations contain adjuvants which safety is not well established (Hazen, 2000; Mesnage et al., 2015). In this way, our study demonstrated that Roundup® DI (liquid form) is more toxic than Roundup® WG (granulated form) and G salt in an *in vivo* model, the *C. elegans*. In addition, we verified that surfactant POEA 05 has high toxicity and this toxic potential is greater than POEA 15.

Lethality induced by Roundup DI was concentration-dependent (Figure 1 A), whereas WG and G salt did not cause any alteration in this parameter (Figure 1B). Similar findings were reported by Garcia-Espineira et al (2018) with *Aspergillus nidulans* treated with 0.02 and 0.025% Roundup® (R450), which has about 100 mg/L glyphosate and adjuvants (Nicolas et al., 2016). In addition, GBF treatment significantly affected the survival rate of the beetle *Leptinotarsa decemlineata* larvae exposed to Roundup® Bio, 1% (Rainio et al., 2019). Body length was also reduced by Roundup® DI treatment, which indicates developmental delay (figure 2A), but the G salt did not cause any changes in this endpoint. This finding is in agreement to a study with *Rana cascadae* larvae in which development was affected by Roundup® DI at 1 ppm, whereas the active ingredient did not cause any alteration (Cauble and

Wagner, 2005). Similarly, tadpoles exposed to GBF Roundup® Original and Roundup® Transorb were significantly smaller compared to animals exposed to glyphosate salt and to the control animals. These effects may be caused, at least in part, by disruption of hormone signaling (Howe et al., 2004).

Glyphosate commercial formulation Roundup® DI induced ROS formation at 0.010% in *C. elegans*. Previous studies demonstrated that L4 worms treated with Glifosato II® Atanor (4.8 mM) increased intracellular ROS production in about 3.4 times (Kronberg et al., 2018). Increase of stress response genes expression were reported in worms treated with glyphosate commercial formulation Roundup® at concentrations of 0.1, 1 and 10 µM in *C. elegans* (Garcia-Espineira et al., 2018). In another study authors have found an increase in hydrogen peroxide levels, but no changes in the levels of superoxide and hydroxyl radical in worms chronically treated with glyphosate-containing herbicide Touchdown® (TD) at concentrations of 3.0, 7.0 and 10% (Burchfield et al., 2018). In this way our study corroborates with findings that some formulations based on glyphosate can alter the oxidative balance in *C. elegans*. However, it seems that this oxidative stress did not affect the worms mitochondrial function, as no changes in ATP levels were found in the groups treated with the GBFs. On the other hand, one study demonstrated that *C. elegans* exposed for 30 min at 3.0%, 7.0%, 10.0% glyphosate as TD exhibited mitochondrial inhibition and ATP levels that were significantly reduced in exposed worms (Burchfield et al., 2018).

We have found contrasting data in the literature on reproduction rate, as we did not find any alteration in the GBFs treated worms. For instance, a treatment with TD decreased offspring viability in *C. elegans*; however their experimental design were acute and at higher concentrations than ours (McVey et al., 2016) Howe (2004) observed metamorphs with abnormal gonads after exposures to both Roundup® Original and Roundup® Transorb in North American frog species, and the reproduction rate of the soil dwelling earthworms *Aporrectodea caliginosa* was reduced by 56% within three months after herbicide application (Gaupp-Berghausen et al., 2015). Furthermore, significant changes in reproductive hormones of rats exposed to Roundup (3.6, 50.4 and 248.4 mg/kg bw/day) were found, as well reductions in sperm count and motility were observed (Owagboriaye et al., 2017).

As the formulations have other ingredients besides the glyphosate, we evaluated the toxicity of two surfactants that are present in the Roundup® formulations, POEA 05 and POEA 15 (Giesy et al., 2000). The POEA 15 did not present toxicity, whereas POEA 05 altered the survival rate and decreased the body size of the worms. These damaging effects of polyethoxylated surfactants are not well reported and few studies in the literature demonstrate their ecotoxicological and health impacts. For instance, the cellular toxicity of TN-20 surfactant (which is present in some GBFs) was evidenced in mouse fibroblast-like cells, alveolar epithelial cells, and a heart cell line (Song et al., 2012). The acute treatment of aquatic macroinvertebrate *Thamnocephalus platyurus* exposed to three POEA surfactants for 48h demonstrated that POEA 15 was more toxic than POEA 2 and POEA 5 (Brausch and Smith, 2007).

Some evidence shows that surfactants can alter the fluidity of the lipid bilayer, causing inactivation or removal of whole proteins causing a reduction of oxygen transport through the membrane (Brausch and Smith, 2007). The numbers 5 or 15 indicate the composition of the POEA, more precisely with size of the ethoxylated chain, where POEA 5 has a smaller ethoxylated chain than POEA 15. Of note, both surfactants have a carbon chain derived of a mixture from palmitic, oleic and stearic fatty acids (Tush et al., 2013). Therefore, our study indicates that different surfactants can affect different organisms presents in soil and water and globally cause a significant environmental impact.

After evaluating the formulations based on glyphosate and surfactants *per se* and finding toxicological effects in worms exposed to Roundup® DI and POEA 05 surfactant, we questioned whether the association of the active principle with the surfactant would potentiate the glyphosate toxicity. However, the MIX tests demonstrated that treated worms did not present any signs of toxicity in the endpoints evaluated. These results indicate that there may be an antagonism between the substances and therefore the active ingredient neutralized the toxic action observed in POEA 05-treated worms.

These data are similar to another study where it was found that the toxicity of the glyphosate association with the surfactants was antagonistic. The toxicity of the surfactant was significantly lower in the presence of 50 µM glyphosate compared to that of the surfactant alone in fibroblast-like cells (Song et al., 2012). Possibly there

are other unknown adjuvant substances in the commercial formulations that interact with each other, leading to the toxicity observed in the commercial liquid formulation.

These findings emphasize the importance of knowledge about commercial formulations. For instance, the association of POEA 05 surfactant with the active ingredient was not able to cause the toxicity as we have found in the Roundup® DI, indicating that other toxic substances may be present in these formulations.

5. Conclusion

This is the first study to report the toxicity of Roundup® Di formulation and surfactant POEA in *C.elegans*, indicating that the liquid form has more toxicity than the granulated one probably due to the inert ingredients composition. The mix (G salt + POEA 05) did not cause the same toxicity of the commercial formulation, indicating that other inert substances may be present and their interaction are of great toxicological relevance. This evidences the need of the knowledge regarding all the substances and their quantities present in the formulations and their proper description on the label. We suggest that regulatory agencies should apply a fine for manufacturers that do not add such additional information.

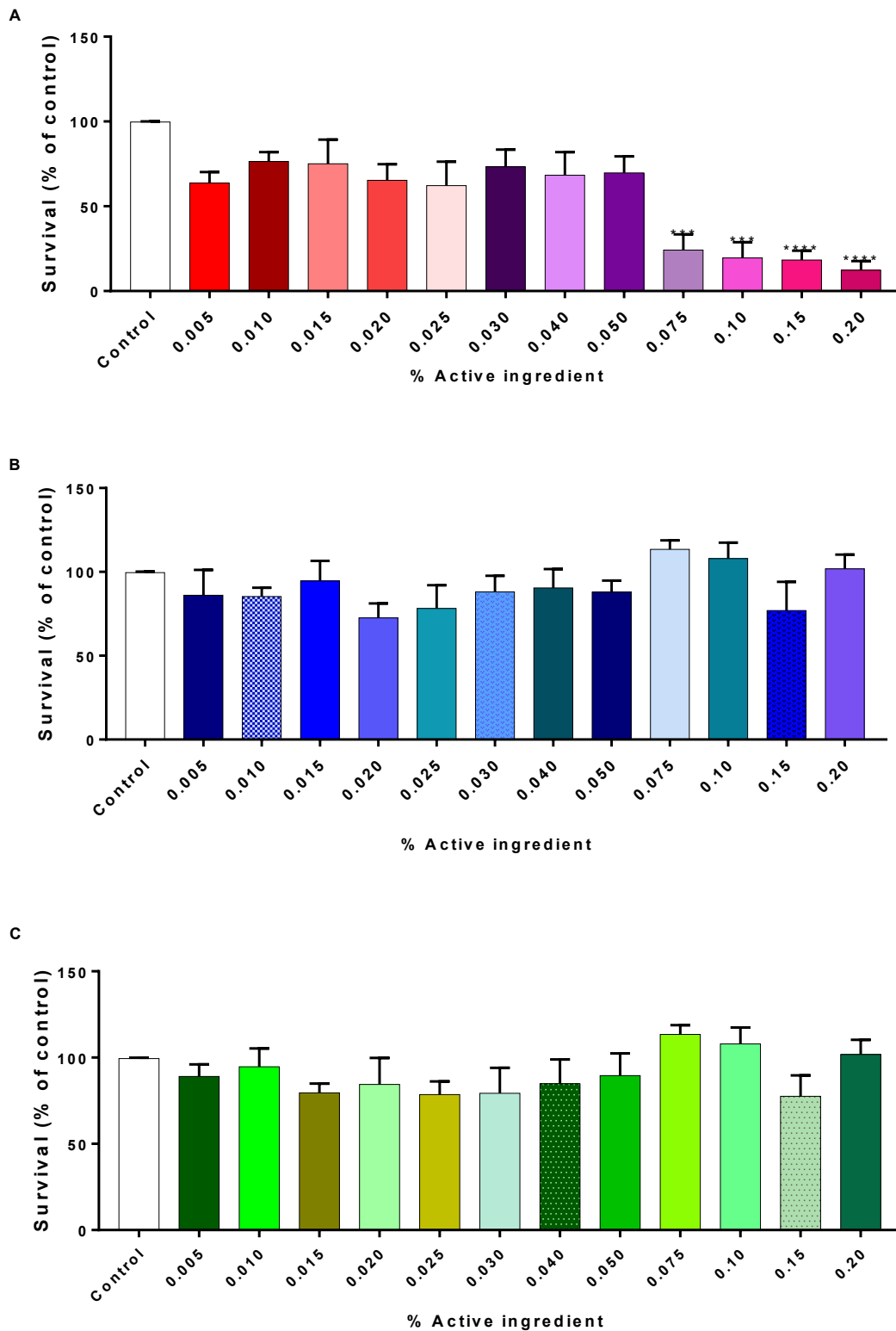


Figure 1. Survival rate. Worms exposed to different concentrations of commercial glyphosate formulations, Roundup® DI (A), Roundup® WG (B) and G salt (C). Worms treated with commercial glyphosate formulation Roundup DI decrease survival rate when compared to worms treated with G salt. * indicates statistical significance in comparison with control group (untreated=100%) *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$. $n=3$.

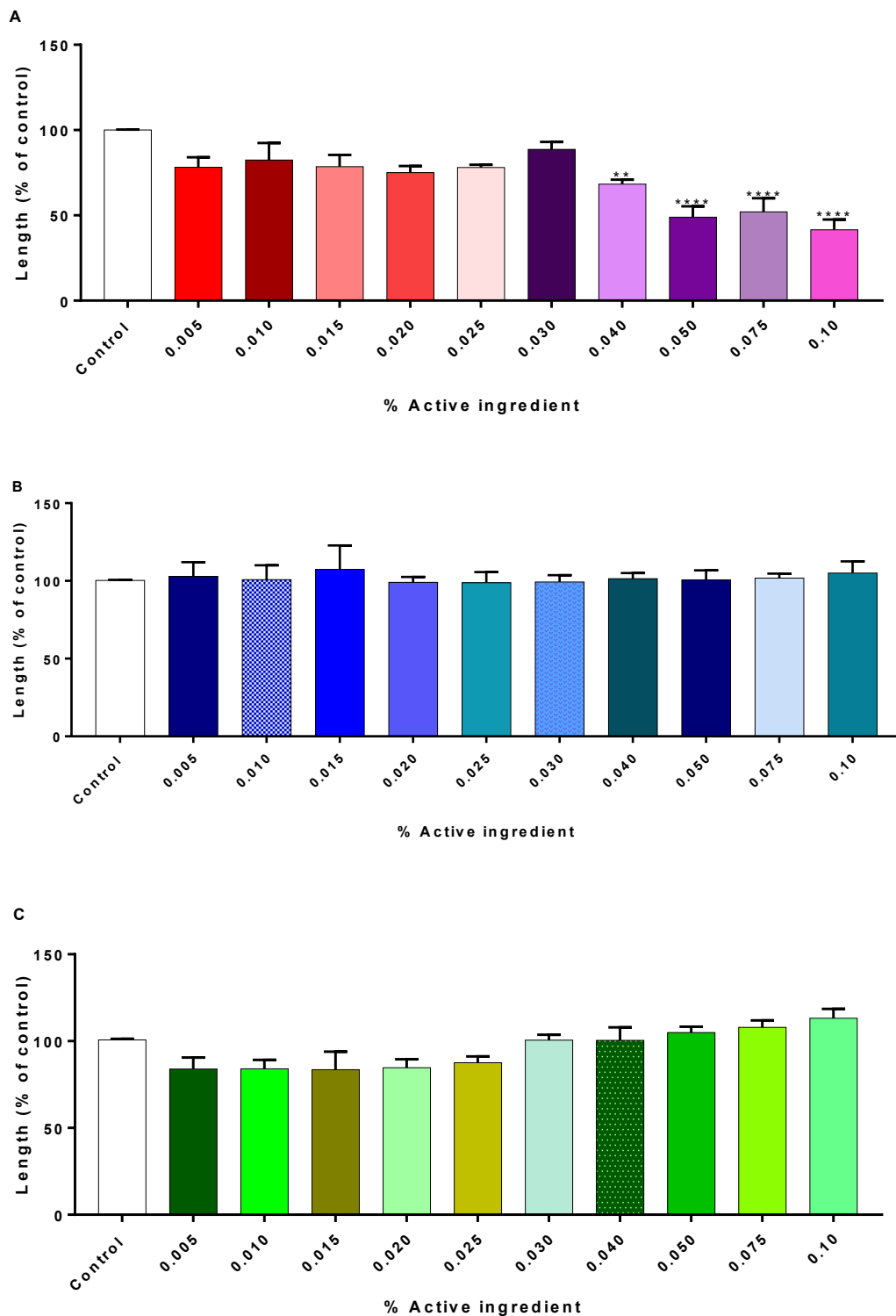


Figure 2. Body length. Worms exposed to different concentrations of Roundup® DI (A), Roundup® WG (B) and G salt (C). Roundup® DI showed significant decreases in body length when compared to control and G salt groups, whereas worms treated with Roundup WG did not show difference in the body length in comparison with control group. Data were normalized to percentage of control). * indicates statistical significance in comparison with control group (untreated=100%). ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$. $n = 3$.

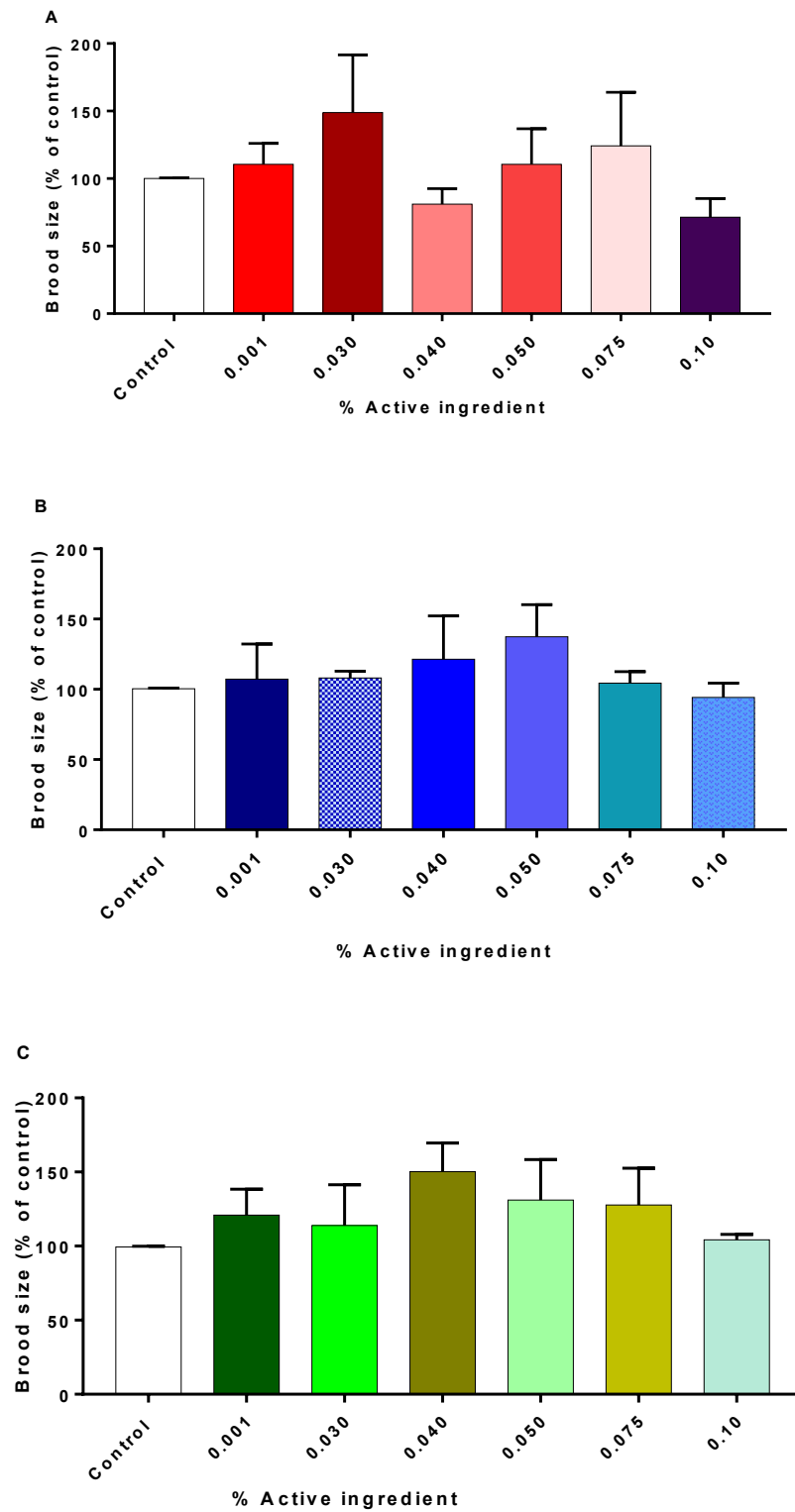


Figure 3. Brood size. Worms exposed to Roundup® DI (A), Roundup® WG (B) and G salt (C) did not present statistical significance in brood size when compared to control. n= 3.

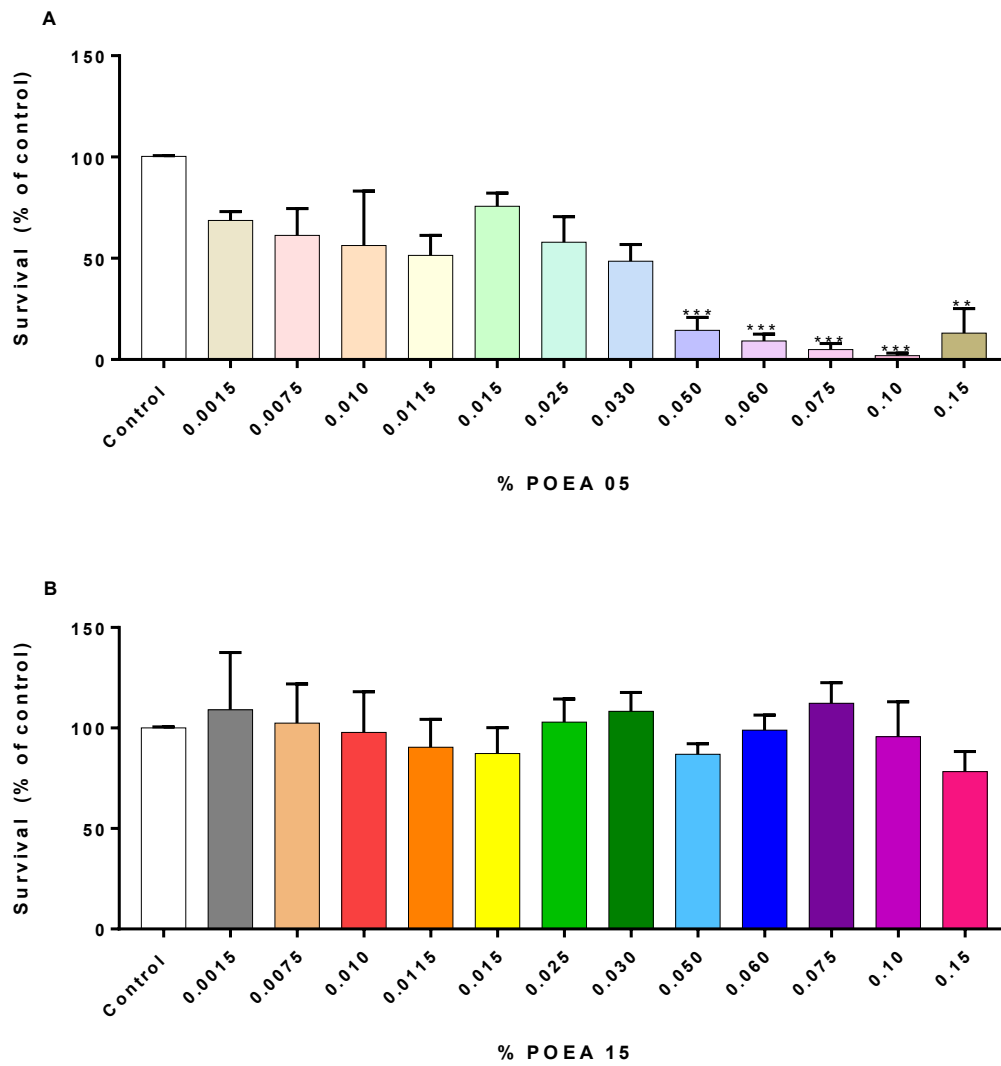


Figure 4. Survival rate. Worms exposed to different concentrations of surfactant POEA 05 (A) and POEA 15 (B). Worms treated with POEA 05 depicted decreased survival rate when compared to control group. * indicates statistical significance in comparison with control group (untreated=100%) ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. $n=3$.

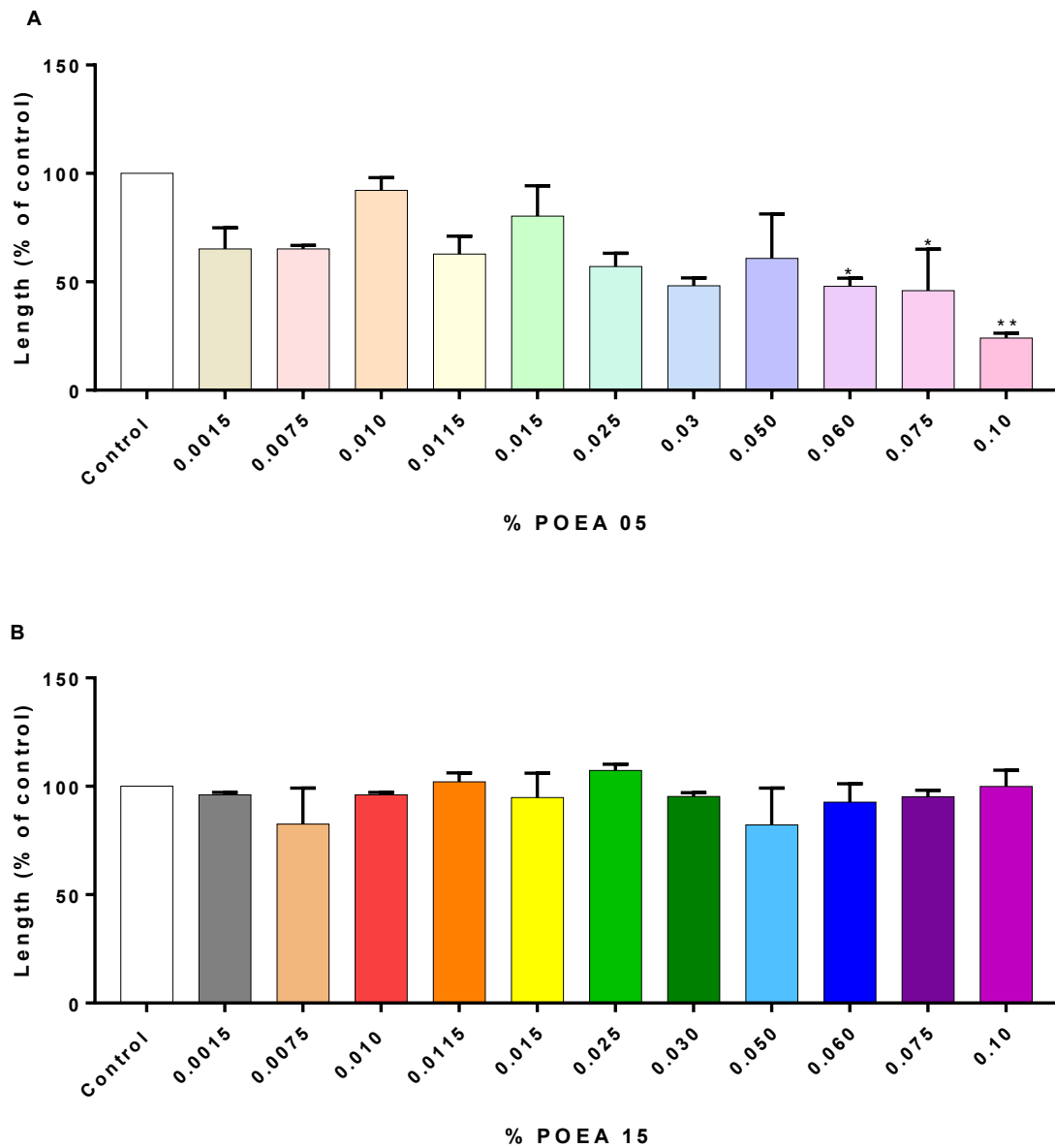


Figure 5. Body length. Worms exposed to different concentrations of surfactant POEA 05 (A) and POEA 15 (B). Worms treated with POEA 05 showed significant decreases in body length when compared to control, whereas worms treated with POEA 15 did not show difference in their body length in comparison with control group. Data were normalized to percentage of control). * indicates statistical significance in comparison with control group (untreated=100%). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. $n = 3$.

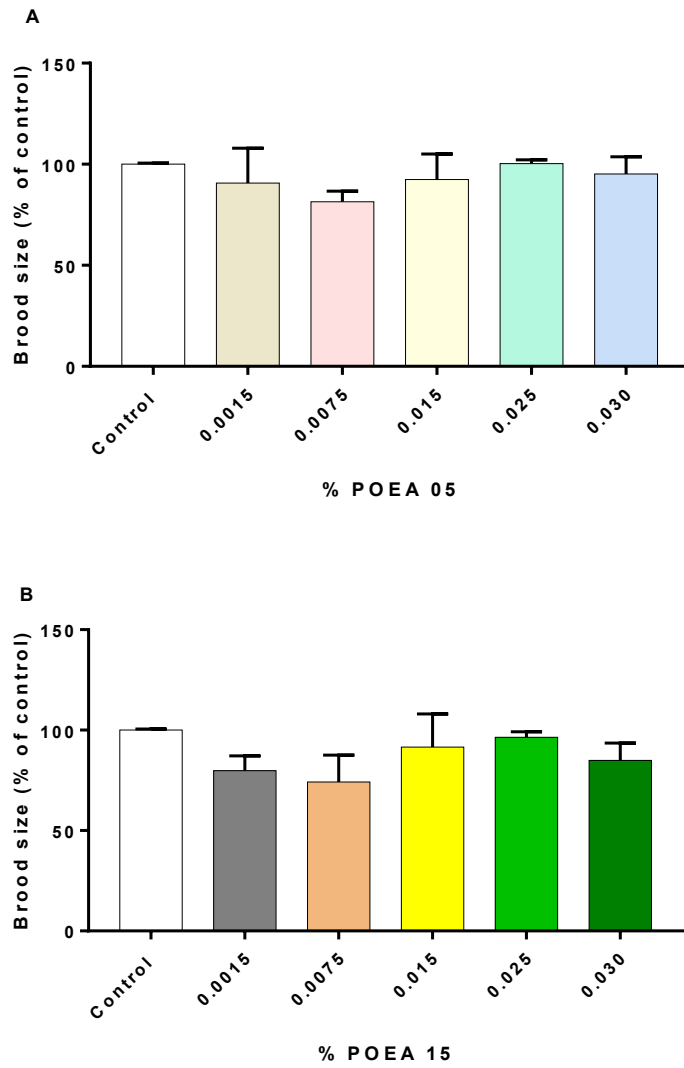


Figure 6. Brood size. Worms exposed to commercial surfactants POE 05 (A) and POEA 15 (B) did not present statistical significance in the brood size when compared to control group n= 3.

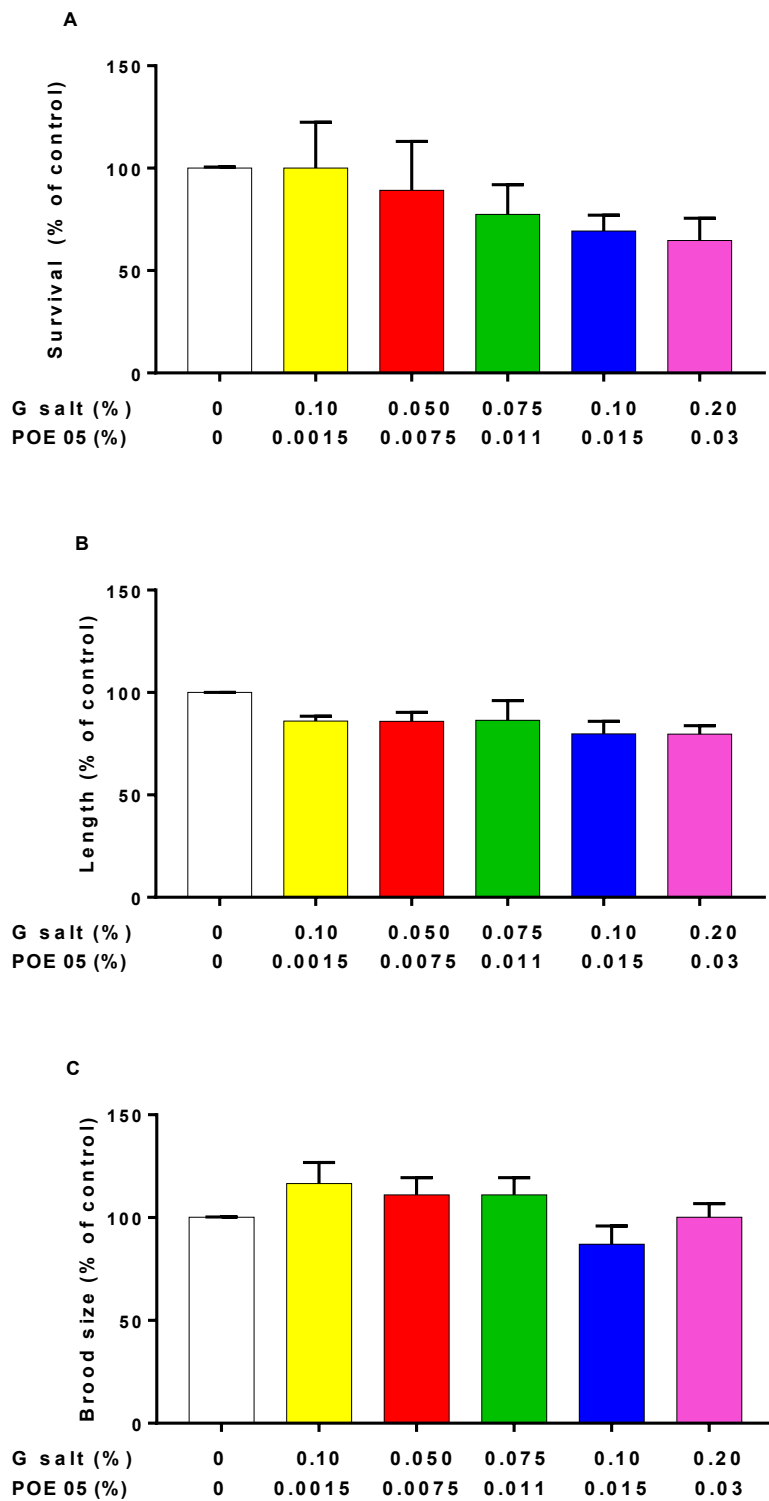


Figure 7. Survival, length and brood size. Worms exposed to MIX did not present statistical changes in survival (A), body length (B) and brood size (C) when compared to control group. Untreated =100%, n=3.

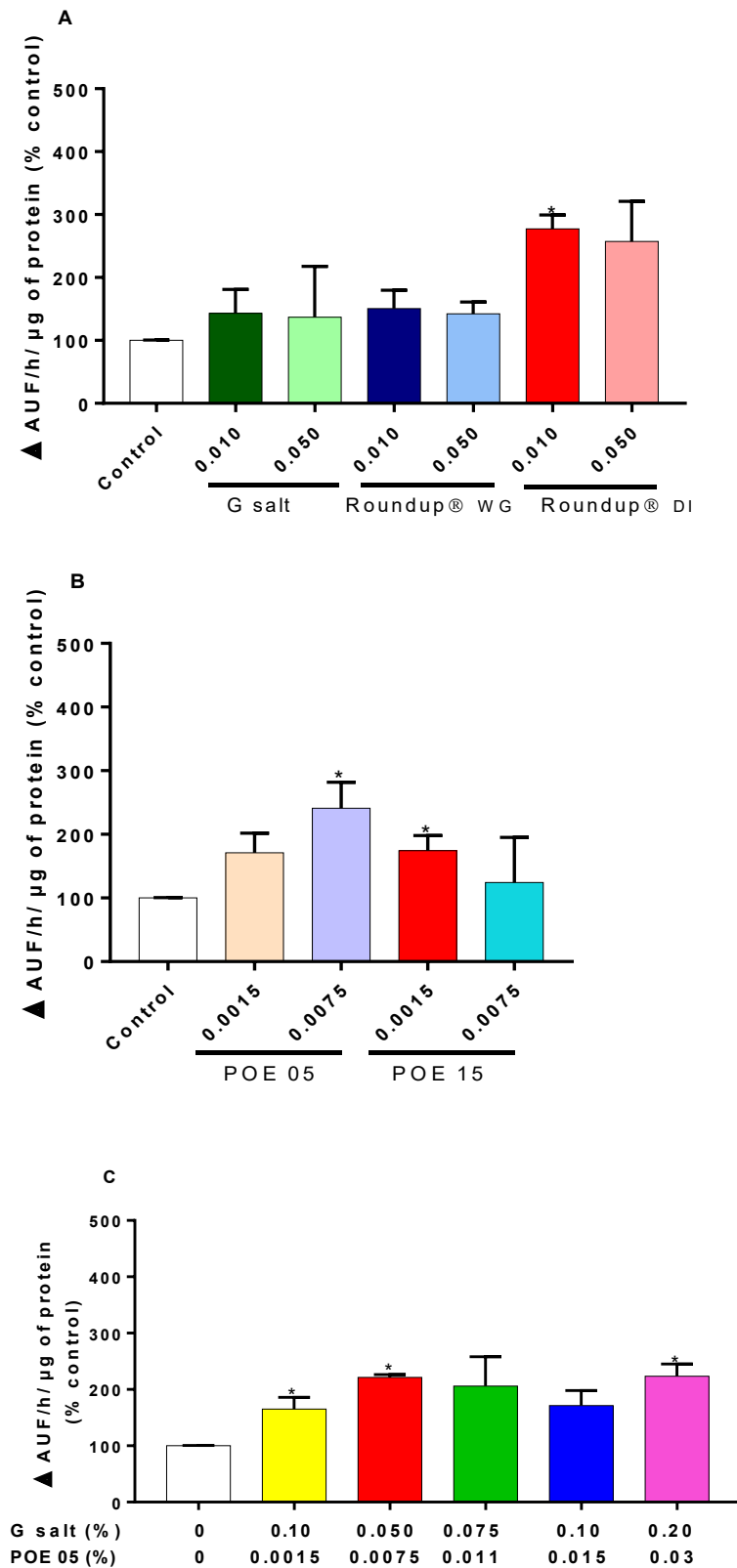


Figure 8. Reactive Oxygen Species levels. Worms exposed to formulations based glyphosate (A), Surfactants (B) and MIX (C). * indicates statistical significance in comparison with control group * $p < 0.05$ (untreated=100%). $n=3$.

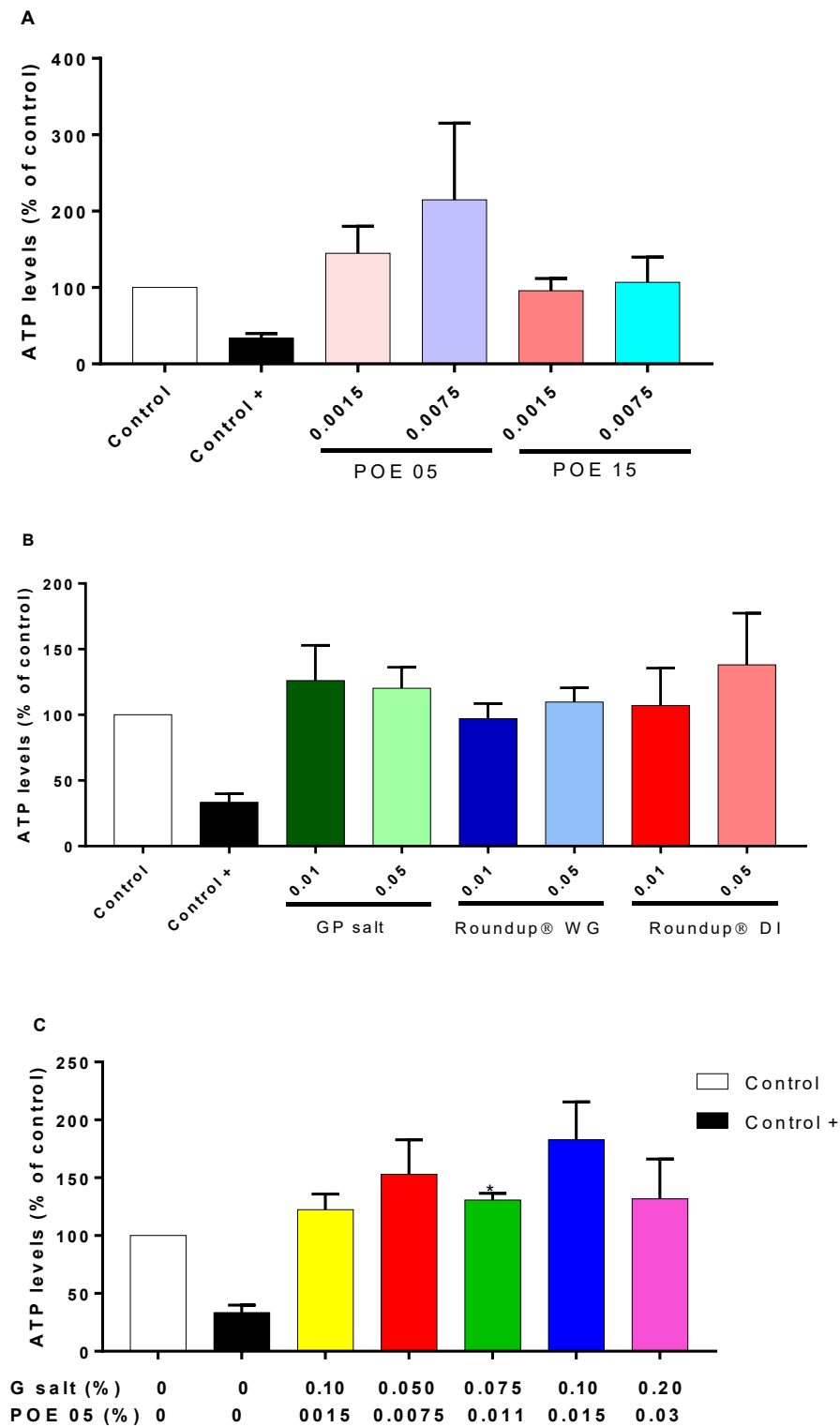


Figure 9. ATP levels . Worms exposed to GBFs (A), Surfactants (B) and MIX (C). All treatment did not present statistical changes in ATP levels when compared to control group. Untreated =100%, n=3.

6. Conclusões

No presente trabalho a utilização do modelo alternativo *C. elegans* mostrou-se fundamental para a avaliação da toxicidade das diferentes formulações comerciais à base de glifosato.

- Foi demonstrada uma maior toxicidade da formulação Roundup Original DI, onde houve alteração no desenvolvimento dos vermes e aumento da letalidade, enquanto que a formulação Roundup WG não apresentou toxicidade nos parâmetros observados.
- O surfactante POEA 05 apresentou toxicidade em *C. elegans*
- A formulação Roundup DI aumentou a produção de ROS.
- As formulações não afetaram o metabolismo energético.
- No MIX o surfactante não alterou a toxicidade do princípio ativo, mostrando que outras substâncias estão envolvidas na toxicidade da formulação Roundup® DI.

7. Perspectivas

As formulações são complexas misturas que possuem o ingrediente ativo e aditivos para uma maior eficácia. Como perspectiva, devemos investigar a toxicidade testando um MIX com os dois surfactantes e o princípio ativo, analisar os níveis de enzimas antioxidantes, avaliar o comportamento atrelado com a análise da morfologia de neurônios. A fim de encontrar correlações entre os compostos testados e avaliar qual componente é responsável pelos efeitos observados, ou se isso é determinado por outros ingredientes inertes.

8. Referências

- Adam, A., Marzuki, A., Abdul Rahman, H., Abdul Aziz, M., 1997. The oral and intratracheal toxicities of ROUNDUP and its components to rats. *Veterinary and human toxicology* 39, 147-151.
- Anadon, A., Martinez-Larranaga, M.R., Martinez, M.A., Castellano, V.J., Martinez, M., Martin, M.T., Nozal, M.J., Bernal, J.L., 2009. Toxicokinetics of glyphosate and its metabolite aminomethyl phosphonic acid in rats. *Toxicology letters* 190, 91-95.
- Annett, R., Habibi, H.R., Hontela, A., 2014. Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment. *J Appl Toxicol* 34, 458-479.
- Aquino Neto, S.d., 2009. Degradação do herbicida glifosato e suas formulações comerciais: uma comparação entre processos eletroquímicos. Universidade de São Paulo.
- Au - Lee, S.Y., Au - Kang, K., 2017. Measuring the Effect of Chemicals on the Growth and Reproduction of *Caenorhabditis elegans*. *JoVE*, e56437.
- Benbrook, C.M., 2016. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. *Environmental sciences Europe* 28, 3.
- Bornhorst, J., Chakraborty, S., Meyer, S., Lohren, H., Brinkhaus, S.G., Knight, A.L., Caldwell, K.A., Caldwell, G.A., Karst, U., Schwerdtle, T., Bowman, A., Aschner, M., 2014. The effects of pdr1, djr1.1 and pink1 loss in manganese-induced toxicity and the role of alpha-synuclein in *C. elegans*. *Metallomics : integrated biometal science* 6, 476-490.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248-254.
- BRASIL, 2005. n. ° 518/2004, Série E. Legislação Saúde, Ministério da Saúde, Brasília.
- Brausch, J.M., Smith, P.N., 2007. Toxicity of three polyethoxylated tallowamine surfactant formulations to laboratory and field collected fairy shrimp, *Thamnocephalus platyurus*. *Archives of environmental contamination and toxicology* 52, 217-221.
- Brenner, S., 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 77, 71-94.
- Burchfield, S.L., Bailey, D.C., Todt, C.E., Denney, R.D., Negga, R., Fitsanakis, V.A., 2018. Acute exposure to a glyphosate-containing herbicide formulation inhibits Complex II and increases hydrogen peroxide in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Environmental toxicology and pharmacology* 66, 36-42.

- Cauble, K., Wagner, R.S., 2005. Sublethal effects of the herbicide glyphosate on amphibian metamorphosis and development. *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 75, 429-435.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., Prasher, D.C., 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263, 802-805.
- Corsi, A.K., Wightman, B., Chalfie, M., 2015. A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 200, 387-407.
- Cox, C., 1995. Glyphosate. 2. Human Exposure and ecological effects. *Journal of pesticide reform: a publication of the Northwest Coalition for Alternatives to Pesticides (USA)*.
- Cox, C., 1998. Glyphosate (roundup). Herbicide fact sheet, *Journal of Pesticide Reform* 18.
- Culetto, E., Sattelle, D.B., 2000. A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. *Human molecular genetics* 9, 869-877.
- de Souza, J.S., Kizys, M.M., da Conceicao, R.R., Glebocki, G., Romano, R.M., Ortiga-Carvalho, T.M., Giannocco, G., da Silva, I.D., Dias da Silva, M.R., Romano, M.A., Chiamolera, M.I., 2017. Perinatal exposure to glyphosate-based herbicide alters the thyrotrophic axis and causes thyroid hormone homeostasis imbalance in male rats. *Toxicology* 377, 25-37.
- Cox, C., Sorgan, M., 2006. Unidentified inert ingredients in pesticides: implications for human and environmental health. *Environmental health perspectives* 114, 1803-1806.
- Duke, S.O., Powles, S.B., 2008. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide. *Pest Management Science* 64, 319-325.
- Galli, A.J.B., Montezuma, M.C., Rodrigues, J.D., Guaggio, J.A., Christoffoleti, P.J., Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura.
- Garcia-Espineira, M., Tejeda-Benitez, L., Olivero-Verbel, J., 2018. Toxicity of atrazine- and glyphosate-based formulations on *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicology and environmental safety* 156, 216-222.
- Gava, S.G., 2013. Estudo funcional da proteína quinase JNK de *Schistosoma mansoni* através de expressão heteróloga no organismo modelo *Caenorhabditis elegans*.
- Gaupp-Berghausen, M., Hofer, M., Rewald, B., Zaller, J.G., 2015. Glyphosate-based herbicides reduce the activity and reproduction of earthworms and lead to increased soil nutrient concentrations. *Scientific reports* 5, 12886.

- Giesy, J.P., Dobson, S., Solomon, K.R., 2000. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup® Herbicide, in: G.W. Ware (Ed.), Reviews of Environmental Contamination and Toxicology: Continuation of Residue Reviews. Springer New York, New York, NY, pp. 35-120.
- Grunewald, K., Schmidt, W., Unger, C., Hanschmann, G., 2001. Behavior of Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid (AMPA) in Soils and Water of Reservoir Radeburg II Catchment (Saxony/Germany).
- Guyton, K.Z., Loomis, D., Grosse, Y., El Ghissassi, F., Benbrahim-Tallaa, L., Guha, N., Scoccianti, C., Mattock, H., Straif, K., International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group, I.L.F., 2015. Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate. *The Lancet. Oncology* 16, 490-491.
- HAZEN, J.L., 2000. Adjuvants—Terminology, Classification, and Chemistry.
- Howe, C.M., Berrill, M., Pauli, B.D., Helbing, C.C., Werry, K., Veldhoen, N., 2004. Toxicity of glyphosate-based pesticides to four North American frog species. *Environmental toxicology and chemistry* 23, 1928-1938.
- IARC, 2015. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, in: IARC (Ed.), Lyon, France.
- IBAMA, 2018. Relatórios de comercialização de agrotóxicos.
- Jacques, M.T., Oliveira, J.L., Campos, E.V., Fraceto, L.F., Avila, D.S., 2017. Safety assessment of nanopesticides using the roundworm *Caenorhabditis elegans*. *Ecotoxicology and environmental safety* 139, 245-253.
- Johansson, H.K.L., Schwartz, C.L., Nielsen, L.N., Boberg, J., Vinggaard, A.M., Bahl, M.I., Svingen, T., 2018. Exposure to a glyphosate-based herbicide formulation, but not glyphosate alone, has only minor effects on adult rat testis. *Reproductive toxicology* 82, 25-31.
- Joint, F., 2005. Pesticide residues in food: 2004: report of the Joint Meeting of the FAO Panel of Experts on Pesticide Residues in Food and the Environment and the WHO Core Assessment Group on Pesticide Residues, Rome, Italy, 20-29 September 2004.
- Kaletta, T., Hengartner, M.O., 2006. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nature reviews. Drug discovery* 5, 387-398.
- Kronberg, M.F., Clavijo, A., Moya, A., Rossen, A., Calvo, D., Pagano, E., Munarriz, E., 2018. Glyphosate-based herbicides modulate oxidative stress response in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology* : CBP 214, 1-8.

- Larsen, K.E., Lifschitz, A.L., Lanusse, C.E., Virkel, G.L., 2016. The herbicide glyphosate is a weak inhibitor of acetylcholinesterase in rats. *Environmental toxicology and pharmacology* 45, 41-44.
- Levy, L.S., 2013. Parkinson's disease and pesticide exposure – a new assessment AU - Allen, Minako Takamiya. *Critical Reviews in Toxicology* 43, 515-534.
- Locke, M.A., Zablotowicz, R.M., Reddy, K.N., 2008. Integrating soil conservation practices and glyphosate-resistant crops: impacts on soil. *Pest Manag Sci* 64, 457-469.
- Lopes, C.V.A., Albuquerque, G.S.C.d., 2018. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. *Saúde em Debate* 42, 518-534.
- Luz, A.L., Lagido, C., Hirschey, M.D., Meyer, J.N., 2016. In Vivo Determination of Mitochondrial Function Using Luciferase-Expressing *Caenorhabditis elegans*: Contribution of Oxidative Phosphorylation, Glycolysis, and Fatty Acid Oxidation to Toxicant-Induced Dysfunction. *Current protocols in toxicology* 69, 25 28 21-25 28 22.
- Magda, G., Vaudano, E., Goldman, M., 2012. The rational use of animals in drug development: contribution of the innovative medicines initiative. *Alternatives to laboratory animals : ATLA* 40, 307-312.
- McVey, K.A., Snapp, I.B., Johnson, M.B., Negga, R., Pressley, A.S., Fitsanakis, V.A., 2016. Exposure of *C. elegans* eggs to a glyphosate-containing herbicide leads to abnormal neuronal morphology. *Neurotoxicology and teratology* 55, 23-31.
- Mesnage, R., Bernay, B., Seralini, G.E., 2013. Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity. *Toxicology* 313, 122-128.
- Mesnage, R., Defarge, N., Spiroux de Vendomois, J., Seralini, G.E., 2015. Potential toxic effects of glyphosate and its commercial formulations below regulatory limits. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 84, 133-153.
- Navarro, C.D., Martinez, C.B., 2014. Effects of the surfactant polyoxyethylene amine (POEA) on genotoxic, biochemical and physiological parameters of the freshwater teleost *Prochilodus lineatus*. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* 165, 83-90.
- Negga, R., Rudd, D.A., Davis, N.S., Justice, A.N., Hatfield, H.E., Valente, A.L., Fields, A.S., Fitsanakis, V.A., 2011. Exposure to Mn/Zn ethylene-bis-dithiocarbamate and glyphosate pesticides leads to neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *Neurotoxicology* 32, 331-341.

- Neves, P.D.M., Bellini, M., 2013. Intoxicações por agrotóxicos na mesorregião norte central paranaense, Brasil - 2002 a 2011. *Ciência & Saúde Coletiva* 18, 3147-3156.
- Nicolas, V., Oestreicher, N., Velot, C., 2016. Multiple effects of a commercial Roundup(R) formulation on the soil filamentous fungus *Aspergillus nidulans* at low doses: evidence of an unexpected impact on energetic metabolism. *Environmental science and pollution research international* 23, 14393-14404.
- Oga, S., Camargo, M., Batistuzzo, J., 2008. *Fundamentos de TOXICOLOGIA (3ª)*. São Paulo.
- Owagboriaye, F.O., Dedeke, G.A., Ademolu, K.O., Olujimi, O.O., Ashidi, J.S., Adeyinka, A.A., 2017. Reproductive toxicity of Roundup herbicide exposure in male albino rat. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* 69, 461-468.
- Paganelli, A., Gnazzo, V., Acosta, H., Lopez, S.L., Carrasco, A.E., 2010. Glyphosate-based herbicides produce teratogenic effects on vertebrates by impairing retinoic acid signaling. *Chemical research in toxicology* 23, 1586-1595.
- Pedlowski, M., Canela, M., Alice da Costa Terra, M., Maria Ramos de Faria, R., 2012. Modes of pesticides utilization by Brazilian smallholders and their implications for human health and the environment.
- Porta-de-la-Riva, M., Fontrodona, L., Villanueva, A., Ceron, J., 2012. Basic *Caenorhabditis elegans* methods: synchronization and observation. *Journal of visualized experiments : JoVE*, e4019
- Rainio, M.J., Margus, A., Lehmann, P., Helander, M., Lindstrom, L., 2019. Effects of a glyphosate-based herbicide on survival and oxidative status of a non-target herbivore, the Colorado potato beetle (*Leptinotarsa decemlineata*). *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP* 215, 47-55.
- Riddle, D.L., Blumenthal, T., Meyer, B.J., Priess, J.R., 1997. Introduction to *C. elegans*, in: nd, D.L. Riddle, T. Blumenthal, B.J. Meyer, J.R. Priess (Eds.), *C. elegans II*, Cold Spring Harbor (NY).
- Ross, A.R., Liao, X., 2015. A novel method for the rapid determination of polyethoxylated tallow amine surfactants in water and sediment using large volume injection with high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Analytica chimica acta* 889, 147-155.
- Samsel, A., Seneff, S., 2013. Glyphosate, pathways to modern diseases II: Celiac sprue and gluten intolerance. *Interdisciplinary toxicology* 6, 159-184.
- Samsel, A., Seneff, S., 2015. Glyphosate, pathways to modern diseases III: Manganese, neurological diseases, and associated pathologies. *Surgical neurology international* 6, 45.

- Song, H.Y., Kim, Y.H., Seok, S.J., Gil, H.W., Hong, S.Y., 2012. In vitro cytotoxic effect of glyphosate mixture containing surfactants. *Journal of Korean medical science* 27, 711-715.
- Tejeda-Benitez, L., Olivero-Verbel, J., 2016. *Caenorhabditis elegans*, a biological model for research in toxicology, *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* Volume 237. Springer, pp. 1-35.
- Thongprakaisang, S., Thiantanawat, A., Rangkadilok, N., Suriyo, T., Satayavivad, J., 2013. Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 59, 129-136.
- Tomlin, C., 1994. A world compendium-The pesticide manual, incorporating the agrochemicals handbook. *The Pesticide Manual* British Crop Protection Council, Surrey, UK, 10th, 451-452.
- Toni, L.R.M., Santana, H.d., Zaia, D.A.M., 2006. Adsorção de glifosato sobre solos e minerais. *Química Nova* 29, 829-833.
- Tralau, T., Riebeling, C., Pirow, R., Oelgeschläger, M., Seiler, A., Liebsch, M., Luch, A., 2012. Wind of change challenges toxicological regulators. *Environmental health perspectives* 120, 1489-1494.
- Tsui, M.T., Chu, L.M., 2003. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere* 52, 1189-1197.
- Tush, D., Loftin, K.A., Meyer, M.T., 2013. Characterization of polyoxyethylene tallow amine surfactants in technical mixtures and glyphosate formulations using ultra-high performance liquid chromatography and triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of chromatography. A* 1319, 80-87.
- Wauchope, R.D., Buttler, T.M., Hornsby, A.G., Augustijn-Beckers, P.W., Burt, J.P., 1992. The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision-making. *Reviews of environmental contamination and toxicology* 123, 1-155.
- Wester, R.C., Melendres, J., Sarason, R., McMaster, J., Maibach, H.I., 1991. Glyphosate skin binding, absorption, residual tissue distribution, and skin decontamination. *Fundamental and applied toxicology : official journal of the Society of Toxicology* 16, 725-732.
- WHO, W.H.O., 1994. *Glyphosate*.
- Yamada, T., CASTRO, P.d.C., 2007. Efeitos do glifosato nas plantas: implicações fisiológicas e agrônômicas. *Informações Agrônômicas* 119, 1-32.