

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**Efeitos de diferentes formulações comerciais do
herbicida Roundup[®] sobre a função
cardiorespiratória de matrinxã,
Brycon amazonicus (Teleostei, Characidae)**

LUIZ CARLOS ANELLI JR

São Carlos, SP

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**Efeitos de diferentes formulações comerciais do
herbicida Roundup[®] sobre a função
cardiorespiratória de matrinxã,
Brycon amazonicus (Teleostei, Characidae)**

LUIZ CARLOS ANELLI JR

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

São Carlos, SP

2010

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

A578ed

Anelli Jr, Luiz Carlos.

Efeitos de diferentes formulações comerciais do herbicida Roundup® sobre a função cardiorespiratória de matrinxã, *Brycon amazonicus* (Teleostei, Characidae) / Luiz Carlos Anelli Jr. -- São Carlos : UFSCar, 2010.
91 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Matrinxã (Peixe). 2. Herbicida. 3. Glifosato. 4. Peixe - fisiologia. I. Título.

CDD: 597.52 (20^a)

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Defesa de Tese de Luiz Carlos Anelli Júnior

Profª. Drª. Ana Lúcia Kalinin..... 

Profª. Drª. Vera Lucia de Campos Brites..... 

Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo..... 

Prof. Dr. Dalton José Carneiro..... 

Profª. Drª. Odete Rocha..... 

Canoa canoa desce
No meio do rio Araguaia desce
No meio da noite alta da floresta
Levando a solidão e a coragem
Dos homens que são
Ava avacanoê
Ava avacanoê
Avacanoeiro prefere as águas
Avacanoeiro prefere o rio
Avacanoeiro prefere os peixes
Avacanoeiro prefere remar
Ava prefere pescar
Dourado, arraia, grumatá
Piracará, pira-andirá
Jatuarana, taiabucu
Piracanjuba, peixe-mulher
Avacanoeiro quer viver
Avacanoeiro só quer pescar
Dourado, arraia e grumatá
Piracanjuba, peixe mulher

Nelson Ângelo e Fernando Brant

Os homens encenam tragédias porque não acreditam na realidade da tragédia que de fato está se desenrolando no mundo civilizado.

José Ortega y Gasset

Para a Mey.

AGRADECIMENTOS

Meus maiores agradecimentos à Profa. Dra. Ana Kalinin, exemplo de conduta profissional, dedicação, capacidade e companheirismo, que incondicionalmente me ajudou, ouviu, tranquilizou, mostrou os melhores caminhos e teve toda a paciência do mundo durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos membros da banca, Profa. Dra. Vera Lucia de Campos Brites, Prof. Dr. Luiz Henrique Florindo, Prof. Dr. Dalton José Carneiro e Profa. Dra. Odete Rocha, que disponibilizaram seu tempo na análise do trabalho, pelas valiosas sugestões e colaboração.

Às pessoas que conviveram comigo nos últimos quatro anos nos Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparada, André, Jujú, Didi, Nathan, Ângelo, Rafa, Tiago, Luciano, Samuka, Tadeu, Hugo, Katinha, Zé Roberto e as outras que não me lembro.

Ao secretário da pós-graduação, Alexandre, pela paciência e disponibilidade com todas as solicitações.

À minha querida tia Beth, pela revisão e pelas sugestões.

Às pessoas mais queridas da minha vida: meus filhos, Daniel, Glauco, Dante e Thales e minha companheira Mey, que passam todo o tempo nos meus pensamentos e que são a razão maior de tudo.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Ao CAUNESP pela cessão dos animais usados nos experimentos.

À CAPES pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	10
ABREVIATURAS	12
RESUMO	13
ABSTRACT	14
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Caracterização do Problema	16
1.2. Função Respiratória de Peixes Teleósteos	17
1.3. Função Cardíaca de Peixes Teleósteos	21
1.4. Contaminação do ambiente aquático	23
1.4.1. Glifosato	25
1.4.1.1. Comportamento do glifosato no solo e na água	26
1.4.1.2. Efeitos do glifosato nos seres vivos	28
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. O Matrinxã, <i>Brycon amazonicus</i>	34
3.1.1. Posição sistemática da espécie	34
3.1.2. Breves Considerações sobre a Espécie Estudada	34
3.2. Métodos	35
3.2.1. Coleta e manutenção em laboratório	35
3.2.2. Delineamento experimental	36
3.2.3. Preparações experimentais	38
3.2.4. Análises estatísticas	42
4. RESULTADOS	44
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÕES	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema do sistema respiratório de peixes teleósteos. (Campbell <i>et al.</i> , 2008)	18
FIGURA 2. Diagrama mostrando as mudanças na tensão de O ₂ (PO ₂) desde o ambiente externo até as mitocôndrias das células (modificado de HUGHES, 1973)	19
FIGURA 3. Representação esquemática do coração (A), mostrando as 4 câmaras em série (modificado de HAVERINEN & VORNANEN, 2007), e do sistema circulatório (B) de peixes teleósteos - notar que para cada um os ramos da artéria branquial, os quais levam o sangue venoso para as brânquias, corresponde uma veia branquial, as quais se unem à aorta subvertebral (adaptado de NICHOLSON, 1980).....	22
FIGURA 4. Detalhe do sistema circulatório de peixes teleósteos. (modificado de NICHOLSON, 1980)	23
FIGURA 5. Exemplar de matrinxã, <i>Brycon amazonicus</i>	35
FIGURA 6. Esquema do sistema utilizado na obtenção das respostas cardio-respiratórias. Em A: a. cubeta termostatizada com eletrodos de O ₂ ; b. transdutor de pressão; c. analisador de O ₂ ; d. amplificador de pressão; e. amplificador de ECG; f. sistema de aquisição de dados; microcomputador. Em B: a. ponta da agulha do eletrodo de ECG; b. pedaço de cateter de polietileno com extremidade flangeada; c. revestimento termorretrátil; d. fixação de fio de cobre por meio de pressão mecânica; e. fio de cobre encapado; f. cateter de polietileno com extremidade flangeada para tomada de água; g. peça de fixação. Adaptado de Maricondi-Massari (1993).....	39
FIGURA 7. Esquema do respirômetro de fluxo constante utilizado nos experimentos <i>in vivo</i> . As setas indicam a direção do fluxo de água através do respirômetro	40
FIGURA 8. Esquema do sistema experimental utilizado nos experimentos <i>in vivo</i>	41
FIGURA 9. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro (PinO ₂ – mmHg) sobre o consumo de oxigênio (VO ₂ – mlO ₂ .kg ⁻¹ .h ⁻¹) de <i>B. amazonicus</i> do grupo controle (n = 10). Valores médios ± 1 E.P.M. A seta representa a P _c O ₂ . Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos (p < 0,05) ...	45
FIGURA 10. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro (PinO ₂ – mmHg) sobre o consumo de oxigênio (VO ₂ – mlO ₂ .kg ⁻¹ .h ⁻¹) de <i>B. amazonicus</i> expostos ao Roundup Original® (n = 10). Valores médios ± 1 E.P.M. A seta representa a P _c O ₂ . Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos (p < 0,05)	46
FIGURA 11. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro (PinO ₂ – mmHg) sobre o consumo de oxigênio (VO ₂ – mlO ₂ .kg ⁻¹ .h ⁻¹) do grupo exposto ao Roundup WG (n = 10) de <i>B. amazonicus</i> . Valores médios ± 1 E.P.M. A seta representa a P _c O ₂ . Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos (p < 0,05)	47
FIGURA 12. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro (PinO ₂ – mmHg) sobre o consumo de oxigênio (VO ₂ – mlO ₂ .kg ⁻¹ .h ⁻¹) de <i>B. amazonicus</i> do grupo exposto ao Roundup TRANSORB (n = 10). Valores médios ± 1 E.P.M. A seta representa a	

P _c O ₂ . Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos (p < 0,05)	47
FIGURA 13. Comparação do efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro (PinO ₂ – mmHg) sobre o consumo de oxigênio (VO ₂ - mlO ₂ .kg ⁻¹ .h ⁻¹) de <i>B. amazonicus</i> do grupo controle e dos grupos exposto ao Roundup Original (A), WG (B) e Transorb (C). Valores médios ± 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos (p < 0,05)	49
FIGURA 14. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro (PinO ₂ – mmHg) sobre o consumo de oxigênio (V _G - mlH ₂ O.kg ⁻¹ .min ⁻¹) de <i>B. amazonicus</i> dos grupos controle e exposto ao Roundup Original (n = 10). Valores médios ± 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos (p < 0,05)	51
FIGURA 15. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro (PinO ₂ - mmHg) sobre o consumo de oxigênio (V _G - mlH ₂ O.kg ⁻¹ .min ⁻¹) de <i>B. amazonicus</i> dos grupos controle e exposto ao Roundup WG® (n = 10). Valores médios ± 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos (p < 0,05)	51
FIGURA 16. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro (PinO ₂ – mmHg) sobre o consumo de oxigênio (V _G - mlH ₂ O.kg ⁻¹ .min ⁻¹) de <i>B. amazonicus</i> dos grupos controle e exposto ao Roundup Transorb® (n = 10). Valores médios ± 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos (p < 0,05)	52
FIGURA 17. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro (PinO ₂ - mmHg) sobre a frequência respiratória (f _R - ciclos respiratórios.min ⁻¹) de <i>B. amazonicus</i> dos grupos controle e exposto ao Roundup Original®. Valores médios ± 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos (p < 0,05)	54
FIGURA 18. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro (PinO ₂ - mmHg) sobre a frequência respiratória (f _R - ciclos respiratórios.min ⁻¹) de <i>B. amazonicus</i> dos grupos controle e exposto ao Roundup WG®. Valores médios ± 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos (p < 0,05)	18
FIGURA 19. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro (PinO ₂ – mmHg) sobre a frequência respiratória (f _R – ciclos respiratórios.min ⁻¹) de <i>B. amazonicus</i> dos grupos controle e exposto ao Roundup Transorb®. Valores médios ± 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos (p < 0,05)	55
FIGURA 20. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro (PinO ₂ – mmHg) sobre o volume ventilatório (VT– mlH ₂ O.kg ⁻¹ .ciclo respiratório ⁻¹) de <i>B. amazonicus</i> dos grupos controle e exposto ao Roundup Original® (n = 10). Valores médios ± 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos (p < 0,05)	57

FIGURA 21. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ($P_{in}O_2$ – mmHg) sobre o volume ventilatório (V_T – $mLH_2O.kg^{-1}.ciclo\ respiratório^{-1}$) de <i>B. amazonicus</i> dos grupos Controle e exposto ao Roundup WG® (n = 10). Valores médios \pm 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos ($p < 0,05$)	57
FIGURA 22. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ($P_{in}O_2$ – mmHg) sobre o volume ventilatório (V_T – $mLH_2O.kg^{-1}.ciclo\ respiratório^{-1}$) de <i>B. amazonicus</i> dos grupos controle e exposto ao Roundup Transorb® (n = 10). Valores médios \pm 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos ($p < 0,05$)	58
FIGURA 23. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ($P_{in}O_2$ – mmHg) sobre a necessidade ventilatória (V_G/VO_2 – $mLH_2O.mLO_2^{-1}$) de <i>B. amazonicus</i> dos grupos controle e exposto ao Roundup Original® (n = 10). Valores médios \pm 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos ($p < 0,05$)	59
Figura 24. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ($P_{in}O_2$ – mmHg) sobre a necessidade ventilatória (V_G/VO_2 – $mLH_2O.mLO_2^{-1}$) de <i>B. amazonicus</i> dos grupos controle e exposto ao Roundup WG® (n = 10). Valores médios \pm 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos ($p < 0,05$)	60
FIGURA 25. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ($P_{in}O_2$ – mmHg) sobre a necessidade ventilatória (V_G/VO_2 – $mLH_2O.mLO_2^{-1}$) de <i>B. amazonicus</i> dos grupos controle e exposto ao Roundup Transorb® (n = 10). Valores médios \pm 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos ($p < 0,05$)	61
FIGURA 26. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ($P_{in}O_2$ – mmHg) sobre a extração de O_2 da corrente ventilatória (EO_2 - %) de <i>B. amazonicus</i> dos grupos controle e exposto ao Roundup Transorb® (n = 10). Valores médios \pm 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos ($p < 0,05$)	62
FIGURA 27. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ($P_{in}O_2$ – mmHg) sobre a extração de O_2 da corrente ventilatória (EO_2 - %) de <i>B. amazonicus</i> dos grupos controle e exposto ao Roundup WG® (n = 10). Valores médios \pm E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos ($p < 0,05$)	63
FIGURA 28. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ($P_{in}O_2$ – mmHg) sobre a extração de O_2 da corrente ventilatória (EO_2 - %) de <i>B. amazonicus</i> dos grupos controle e exposto ao Roundup Transorb® (n = 10). Valores médios \pm E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos ($p < 0,05$)	64
FIGURA 29. Efeito da redução gradual das tensões de O_2 da água de entrada do respirômetro ($P_{in}O_2$ – mmHg) sobre a frequência cardíaca (f_H - bpm) de <i>B. amazonicus</i> dos grupos controle e expostos às diferentes formulações do Roundup: Original (n=10); WG (n=10) e Transorb (n=10). Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos ($p < 0,05$) .	65

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Valores de CL ₅₀ de 96 h para a formulação comercial do Roundup WG® para diferentes espécies de peixes dulcícolas.....	30
TABELA 2. Valores de CL ₅₀ de 96 h para a formulação comercial do Roundup Original® para diferentes espécies de peixes dulcícolas.....	37
TABELA 3. Valores médios da tomada de O ₂ total ($\dot{V}O_2$) de <i>B. amazonicus</i> dos grupos controle (n = 10) e expostos às diferentes formulações do Roundup: Original (n = 10); WG (n = 10) e Transorb (n = 10), submetidos a diferentes tensões de O ₂ na água. Valores médios ± 1 E.P.M. Os valores em negrito indicam diferenças significativas em relação aos valores obtidos em normóxia. As letras indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais numa mesma PinO ₂ : a - diferença em relação ao controle; b - diferença em relação ao Original; c - diferença em relação ao WG. p < 0,05.....	45
TABELA 4. Valores médios da ventilação branquial (\dot{V}_G) de <i>B. amazonicus</i> dos grupos controle (n = 10) e expostos às diferentes formulações do Roundup: Original (n = 10); WG (n = 10) e Transorb (n = 10), submetidos a diferentes tensões de O ₂ na água. Valores médios ± 1 E.P.M. Os valores em negrito indicam diferenças significativas em relação aos valores obtidos em normóxia. As letras indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais numa mesma PinO ₂ : a - diferença em relação ao controle; b - diferença em relação ao Original; c - diferença em relação ao WG. p < 0,05.....	50
TABELA 5. Valores médios da frequência respiratória (fR) de <i>B. amazonicus</i> dos grupos controle (n = 10) e expostos às diferentes formulações do Roundup: Original (n = 10); WG (n = 10) e Transorb (n = 10), submetidos a diferentes tensões de O ₂ na água. Valores médios ± 1 E.P.M. Os valores em negrito indicam diferenças significativas em relação aos valores obtidos em normóxia.	53
TABELA 6. Valores médios do Volume ventilatório (V _T) de <i>B. amazonicus</i> dos grupos controle (n = 10) e expostos às diferentes formulações do Roundup: Original (n = 10); WG (n = 10) e Transorb (n = 10), submetidos a diferentes tensões de O ₂ na água. Valores médios ± 1 E.P.M. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia. As letras indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais numa mesma PinO ₂ : a - diferença em relação ao controle; b - diferença em relação ao Original; c - diferença em relação ao WG. p < 0,05.....	56
TABELA 7. Valores médios da necessidade ventilatória ($\dot{V}_G/\dot{V}O_2$) de <i>B. amazonicus</i> dos grupos controle (n = 10) e expostos às diferentes formulações do Roundup: Original (n = 10); WG (n = 10) e Transorb (n = 10), submetidos a diferentes tensões de O ₂ na água. Valores médios ± 1 E.P.M. Os valores em negrito indicam diferenças significativas em relação aos valores obtidos em normóxia. As letras indicam diferença significativa entre os grupos experimentais numa mesma PinO ₂ : a - diferença em relação ao controle; b - diferença em relação ao Original; c - diferença em relação ao WG. p < 0,05.....	59
TABELA 8. Valores médios da extração de O ₂ da corrente ventilatória (EO ₂) de <i>B. amazonicus</i> dos grupos controle (n = 10) e expostos às diferentes formulações do Roundup: Original (n = 10); WG (n = 10) e Transorb (n = 10), submetidos a diferentes tensões de O ₂ na água. Valores médios ± 1 E.P.M. Os valores em negrito indicam diferenças significativas em	

relação aos valores obtidos em normóxia. As letras indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais numa mesma P_{inO_2} : a - diferença em relação ao controle; b - diferença em relação ao Original; c - diferença em relação ao WG. $p < 0,05$ 62

TABELA 9. Valores médios da frequência cardíaca (f_H) de *B. amazonicus* dos grupos controle ($n = 10$) e expostos às diferentes formulações do Roundup: Original ($n = 10$); WG ($n = 10$) e Transorb ($n = 10$), submetidos a diferentes tensões de O_2 na água. Valores médios ± 1 E.P.M. Os valores em negrito indicam diferenças significativas em relação aos valores obtidos em normóxia. As letras indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais numa mesma P_{inO_2} : a - diferença em relação ao controle; b - diferença em relação ao Original; c - diferença em relação ao WG. $p < 0,05$ 65

ABREVIATURAS

α_{O_2} – Coeficiente de solubilidade do oxigênio na água

AChE - Acetil-colinesterase

AMPA - Ácido aminometilfosfônico

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

ECG - Eletrocardiograma

EO_2 – Extração de oxigênio da corrente ventilatória

f_H – Frequência cardíaca

f_R – Frequência respiratória

HUVEC - Células endoteliais da veia umbilical humana

PcO_2 - Tensão crítica de oxigênio

PeO_2 - Tensão de oxigênio da água expirada

$PinO_2$ - Tensão de oxigênio da água que entra no respirômetro

PiO_2 - Tensão de oxigênio da água inspirada

POEA - Polioxietileno-amina (taloamina polietoxilada)

PO_2 – Tensão de oxigênio

$PoutO_2$ - Tensão de oxigênio da água que entra no respirômetro

PPM - Partes por milhão

\dot{V}_G - Ventilação branquial

$\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ - Necessidade ventilatória

$\dot{V}O_2$ - Tomada de O_2 (taxa metabólica)

V_R – Fluxo de água através do respirômetro

V_T – Volume ventilatório

W_t - Massa fresca do animal

RESUMO

As aplicações de Roundup, o herbicida de largo espectro mais usado no mundo em áreas cultivadas, acabam contaminando o ambiente aquático. Entretanto, considerando-se sua importância como herbicida, a literatura sobre as propriedades toxicológicas e ecotoxicológicas do glifosato em animais aquáticos é extremamente escassa. No presente estudo, exemplares controle de matrinxã, *Brycon amazonicus*, e expostos a três formulações diferentes do Roundup (Original, WG e Transorb) nas concentrações de 5 mg.L⁻¹ por 96h, apresentaram as seguintes respostas: alteração da tensão crítica de O₂ (PcO₂) de 35 mmHg (controle) para 107 mmHg no grupo Original, 114 mmHg no grupo WG e 94 mmHg no grupo Transorb; ocorreram aumentos da $\dot{V}O_2$ e \dot{V}_G na maioria das PO₂ testadas para os grupos Original e WG e diminuição desses parâmetros para o grupo Transorb. O V_T e a relação $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ apresentaram aumentos significativos em relação ao grupo controle na maioria das PO₂ testadas, enquanto a EO₂ foi significativamente reduzida para os três grupos, em todas as tensões de O₂. As f_R não apresentaram alterações significativas em relação ao grupo controle enquanto que as f_H aumentaram significativamente em todas as PO₂ testadas no grupo Original, entretanto não se alteraram significativamente nos demais grupos. A taquicardia observada no grupo Original pode ter sido resultante de um efeito direto do glifosato no músculo cardíaco, mas um possível efeito da liberação de catecolaminas em resposta ao estresse induzido pela presença do herbicida não pode ser descartado, enquanto a leve bradicardia observada nos grupos WG e Transorb pode ter resultado do efeito dos ditos “ingredientes inertes” presentes em suas formulações e não apenas do glifosato em si. Tais resultados sugerem a possível ocorrência de modificações estruturais dos filamentos branquiais, reduzindo a eficiência das trocas gasosas. Entretanto, não houve alteração da f_R na comparação dos dois grupos, indicando que todas as formulações do Roundup podem ter diminuído a atividade da AchE, inibindo a atividade de tecidos como o muscular e o nervoso. Em conjunto, os efeitos do Roundup na função respiratória de *B. amazonicus* reduzem as chances de sobrevivência da espécie, especialmente sob condições de hipóxia ambiental.

ABSTRACT

Roundup is the herbicide most extensively used worldwide and its application in agricultural areas eventually contaminates the aquatic environment. However, given its importance as an herbicide, the literature on toxicological and ecotoxicological properties of the glyphosate in aquatic animals is scarce. In this research, control specimens of matrinxã, *Brycon amazonicus*, and specimens exposed to three different Roundup formulations (Original, WG and Transorb) at concentration of 5 mg.L⁻¹ for 96 hours, showed the following results: change on the critical tension of O₂ (PcO₂) from 35 mmHg to 107 mmHg (Original group), to 114 mmHg (WG group), and to 94 mmHg (Transorb group). The Original and WG groups increased $\dot{V}O_2$ and \dot{V}_G in most of the PO₂ tested while these parameters decreased for Transorb group. Both V_T and the relation $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ increased significantly in relation to the control group during progressive hypoxia, whereas EO₂ was significantly reduced in all the three groups. The f_R did not change significantly in relation to the group control whereas f_H increased significantly in the Original group and did not show significant changes in the other groups. The tachycardia induced by the Original formulation could be related to a direct effect of glyphosate on the cardiac muscle, but could also be attributed to a stress-induced catecholamine release in response to the herbicide. On the other hand, the bradycardia observed in WG and Transorb formulation groups may be the result of the effect of "inert ingredients" found in their formulations and not only the glyphosate itself. Taken together, the results suggest possible structural changes in the gill filaments, reducing the efficiency of the gas exchanges. However, f_R values did not change between groups exposed to herbicides, which indicates that all Roundup formulations may have reduced AchE activity, inhibiting tissues such as muscles and nervous system. Altogether, the results pointed that the effects of Roundup on *B. amazonicus* respiratory functions reduce its chances of survival, especially under conditions of environmental hypoxia.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Caracterização do Problema

Dentre os efeitos da atividade humana sobre os ecossistemas, o processo de modernização da agricultura introduziu uma grande variedade de produtos visando o aumento da produtividade, como herbicidas, inseticidas, fungicidas e fertilizantes.

O emprego dessas substâncias trouxe consequências adversas aos ecossistemas envolvidos, inclusive o aquático, uma vez que tais produtos podem ser carreados por lavagem do solo pela chuva, lavagem de equipamentos, derramamentos acidentais, entre outros. Além disso, vários agroquímicos são indicados pelos fabricantes para o controle de pragas em reservatórios e tubulações de água.

A fauna íctica constitui um recurso alimentar importante, sendo uma fonte proteica acessível por meio da exploração direta das populações naturais ou de peixes cultivados artificialmente. Dessa forma, torna-se necessário um conhecimento mais aprofundado dos efeitos de xenobióticos sobre bioindicadores fisiológicos e bioquímicos de diferentes espécies de peixes. Por estarem relacionados às respostas primárias das células aos impactos recebidos do meio, esses bioindicadores são vistos como instrumentos eficientes de avaliação e de prevenção de riscos ecológicos.

O glifosato, herbicida de largo espectro de ação e ampla utilização, está entre os produtos que possuem maior mobilidade no ambiente, apresentando alto potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas. As escassas informações disponíveis na literatura, sobre os efeitos dessa molécula em peixes, indicam que causa uma série de efeitos adversos, tanto hispatológicos quanto bioquímicos, em diversos órgãos.

Nesse contexto, o presente projeto propôs-se a estudar o efeito de três formulações comerciais do glifosato (Roundup Original, Roundup WG e Roundup Transorb) sobre a função cardiorespiratória de matrinxã, *Brycon amazonicus*, peixe comumente encontrado na Bacia Amazônica e em tanques de produção comercial, que vêm sofrendo gradativamente o impacto da contaminação ambiental.

1.2. Função Respiratória de Peixes Teleósteos

O fato da troca de gases no ambiente aquático caracterizar-se pela baixa disponibilidade de O₂ em relação ao ar está bem documentado na literatura. Segundo Boutilier *et al.* (1984), a 20 °C a capacitância de O₂ do ar é 30 vezes maior que a da água destilada. Somam-se a essa característica, as flutuações, tanto diárias quanto sazonais, das concentrações de O₂, bem como os efeitos de poluentes induzindo diminuições nas concentrações desse gás nas águas continentais e costeiras, fenômeno que vem despertando crescente atenção nos últimos anos (GLASS, 1992).

As águas doces tropicais, em particular, constituem importante sistema para estudos de adaptações ao ambiente por apresentarem grandes oscilações diárias e sazonais naturais em suas propriedades físicas e químicas, além da coexistência de espécies estreitamente relacionadas, com *habitats* similares e soluções completamente diferentes para os mesmos problemas.

Dessa forma, vivendo em ambientes tão variáveis, as espécies de peixes tropicais tornaram-se adaptadas a condições extremas poucas vezes enfrentadas por vertebrados de respiração aérea.

As respostas adaptativas são iniciadas tão logo o animal detecte uma mudança no ambiente, diretamente, por meio de seu sistema neuro-sensorial, ou indiretamente, pelos efeitos sobre seus processos fisiológicos e bioquímicos.

A maioria das espécies de peixes apresenta respiração branquial. As brânquias são ventiladas com um fluxo unidirecional de água, garantido pelo bombeamento ativo por meio do trabalho da musculatura esquelética nas cavidades bucal e operculares. As brânquias consistem geralmente de quatro arcos branquiais que se estendem em duas fileiras de filamentos branquiais, os quais possuem várias lamelas secundárias, estruturas achatadas e densamente enfileiradas onde ocorrem as trocas gasosas. À medida que a água flui entre essas lamelas em uma direção, o fluxo sanguíneo flui em direção oposta, por este motivo denominado *fluxo contracorrente*. (Campbell *et al.*, 2008) (Figura.1)

Ao longo de sua trajetória a partir do ambiente aquático até a mitocôndria, a tensão de O₂ decresce gradativamente, desde o momento em que é captado pelas brânquias até sua utilização na célula, evento chamado “cascata de oxigênio” (HUGHES, 1973), mostrado na Figura 2.

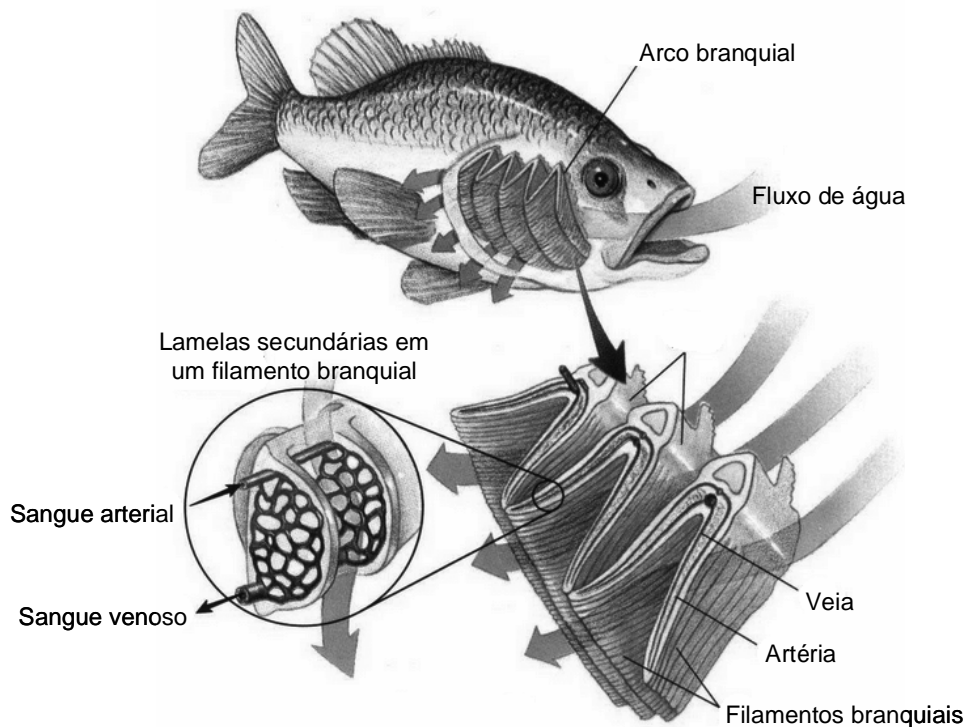


FIGURA 1. Esquema do sistema respiratório de peixes teleósteos. (Campbell *et al.*, 2008).

As principais barreiras à difusão são as membranas branquiais, a circulação sanguínea e as membranas celulares dos tecidos que receberão O_2 (GALIS & BAREL, 1980; FERNANDES & RANTIN, 1989; 1994). Qualquer aumento da resistência à difusão de O_2 em um desses pontos pode causar um efeito hipóxico. Assim, qualquer substância que possa causar hipóxia ambiental pode reduzir a quantidade de O_2 disponível às mitocôndrias e, conseqüentemente, comprometer os processos aeróbicos.

As respostas respiratórias de teleósteos em relação ao decréscimo da tensão de O_2 ambiental diferem entre as espécies. De acordo com Davis (1975), o consumo de O_2 ($\dot{V}O_2$) varia de acordo com a capacidade de regulação da tomada de O_2 da espécie em relação à disponibilidade desse gás no ambiente. Para as espécies *oxiconformistas*, a $\dot{V}O_2$ varia diretamente com a tensão de O_2 ambiental, ao passo que nos *oxireguladores* a $\dot{V}O_2$ é independente de tal variável.

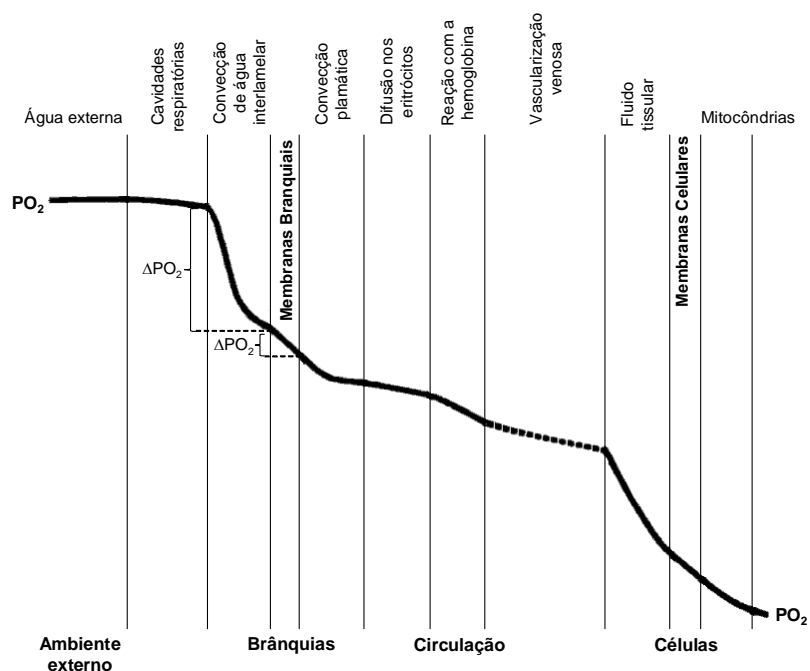


FIGURA 2. Diagrama mostrando as mudanças na tensão de O_2 (PO_2) desde o ambiente externo até as mitocôndrias das células (modificado de HUGHES, 1973).

A tensão crítica de O_2 (P_{cO_2}) representa o limite da capacidade do animal em manter sua $\dot{V}O_2$ constante em resposta à redução do O_2 ambiental. Abaixo da P_{cO_2} a espécie se comporta como oxiconformista e a $\dot{V}O_2$ passa a ser dependente da disponibilidade de O_2 do meio. Alguns estudos demonstraram que a P_{cO_2} é caracterizada pela mudança no padrão de consumo de oxigênio e pelo início do metabolismo energético anaeróbico (PORTNER & GRIESHABER, 1993; THILLART *et al.*, 1994).

De acordo com Gerald & Cech (1970), Cameron (1971), Fernandes & Rantin (1989), Kalinin (1991), Rantin *et al.* (1992), a ventilação branquial (\dot{V}_G) em resposta à hipóxia é imediatamente aumentada através da elevação da frequência respiratória (f_R) e/ou do volume ventilatório (V_T). Segundo Hughes (1970), a difusão de gases através da superfície respiratória depende do volume ventilatório, da velocidade do fluxo de água, da área de difusão, do gradiente de pressão parcial dos gases entre a água e o sangue e da distância de difusão. Booth (1979) enfatizou que a difusão de O_2 nas brânquias pode ser aumentada também pelo recrutamento de lamelas secundárias.

Satchell (1991) reuniu os mecanismos fisiológicos e bioquímicos adotados pelos teleósteos durante a hipóxia ambiental, para maximizar a tomada de O_2 e minimizar seu gasto, em três categorias:

(a) respostas reflexas desencadeadas pela estimulação dos quimiorreceptores de O_2 , como: hiperventilação branquial, bradicardia, sincronismo cardio-respiratório e constrição dos vasos sanguíneos periféricos;

(b) respostas intrínsecas dos vasos branquiais, modificando o padrão de fluxo sanguíneo nas brânquias, podendo aumentar a espessura da lâmina de sangue no interior das lamelas branquiais e, conseqüentemente, causar um aumento na área disponível para a troca gasosa em cada lamela individual e recrutar lamelas adicionais e

(c) respostas desencadeadas pela ativação, via estresse hipóxico, dos centros autonômicos que regulam a liberação de catecolaminas no sangue pelos tecidos cromafins. As catecolaminas, por sua vez, podem evocar respostas tais como mudanças adicionais no padrão do fluxo de sangue nas brânquias e na condutância difusiva de O_2 , regulação da tomada de O_2 pelos eritrócitos, proteção da musculatura cardíaca contra acidificação e aumento nos níveis sanguíneos de glicose compensando, em parte, a passagem de metabolismo aeróbico para glicolítico.

Existem indicações de que diminuições relativamente pequenas na tensão de O_2 da água podem produzir grandes respostas ventilatórias nos animais de respiração aquática, enquanto que diminuições muito maiores são necessárias para que se obtenham tais respostas em vertebrados de respiração aérea.

A relação entre a ventilação e a tensão de O_2 do meio é normalmente descrita por curvas hiperbólicas para todos os grupos de vertebrados (DEJOURS, 1981), indicando que as respostas ventilatórias tentam manter a tomada de O_2 . Em algumas espécies de teleósteos, contudo, a ventilação aumenta até um determinado nível, não excedido com reduções adicionais na tensão de O_2 do meio (BURGGREN & CAMERON, 1980), indicando a existência de fatores que limitam a função respiratória de peixes teleósteos em hipóxia.

Deve-se, ainda, levar em consideração a possível associação entre hipóxia e a presença de xenobióticos no ambiente. Desta forma, pode-se inferir que espécies sujeitas à hipóxia, quando submetidas a xenobióticos deverão sentir de forma mais pronunciada

os efeitos da mesma. Porém, existem pouquíssimas informações a respeito do efeito de xenobióticos sobre a função cardio-respiratória de peixes.

1.3. Função Cardíaca de Peixes Teleósteos

O coração dos peixes teleósteos é um órgão formado por quatro câmaras em série: seio venoso, átrio, ventrículo e bulbo arterioso (Figura 3A)

O seio venoso recebe o sangue venoso da circulação. A quantidade de fibras musculares é variável, podendo aparecer como uma fina camada em algumas espécies, fibras esparsas na maioria das espécies ou estarem completamente ausentes.

O átrio é um amplo saco muscular de parede fina, capaz de gerar pressão suficiente apenas para encher o ventrículo, que possui parede muscular grossa.

O ventrículo é a principal câmara geradora de pressão do coração e compreende de 58 a 85% de sua massa. Seu formato é muito variável nas diferentes espécies, podendo ser piramidal ou tubular. A parede do ventrículo frequentemente consiste de duas camadas, um endocárdio esponjoso, que representa a maior parte da massa ventricular, e uma camada compacta externa. Nos teleósteos em que está presente, a camada compacta é suprida com uma artéria coronária provinda do lado arterializado das brânquias enquanto que o endocárdio esponjoso sempre recebe todo o O₂ e nutrientes diretamente do sangue do lúmen ventricular (ou seja, do sangue venoso).

A quarta câmara, o bulbo arterioso, é elástica devido à presença de elementos flexíveis e músculo liso em sua parede (SATCHELL, 1981). O sangue venoso, vindo da circulação sistêmica, passa por tais câmaras e é direcionado, via aorta ventral, para as brânquias onde ocorre a oxigenação (Figuras 3B e 4).

O trabalho eficiente do coração depende da ativação sequencial das câmaras acima descritas. O coração dos peixes, como dos demais vertebrados, é miogênico, possuindo tecido marca-passo na junção sinoatrial, o qual dispara potências de ação de forma lenta e espontânea (SAITO, 1973; HAVERINEN & VORNANEN, 2007).

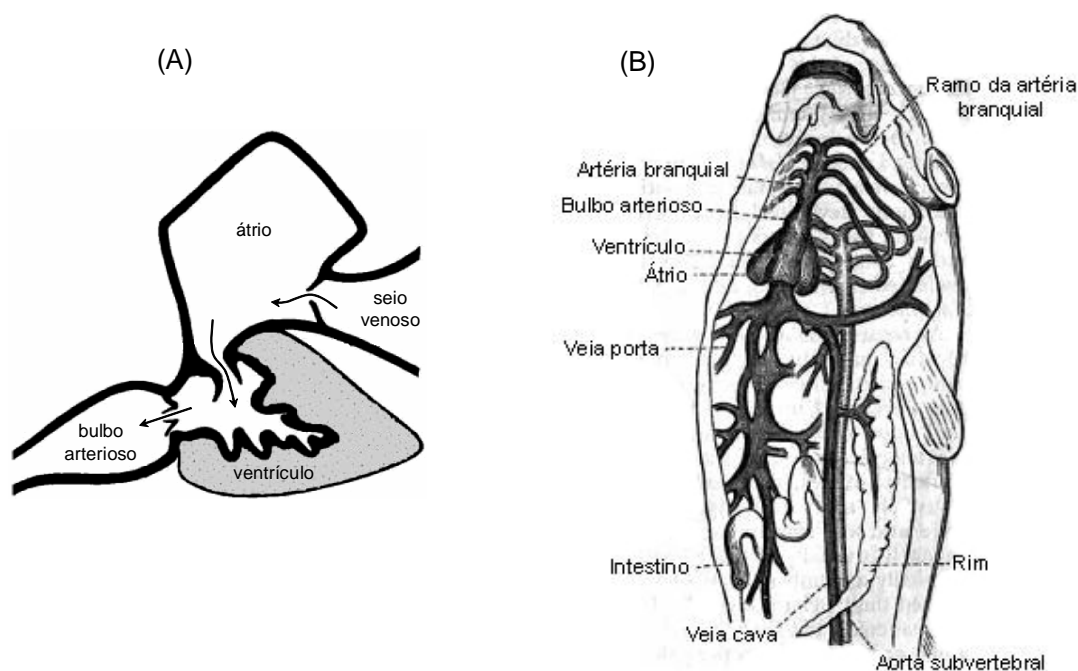


FIGURA 3. Representação esquemática do coração (A), mostrando as 4 câmaras em série (modificado de HAVERINEN & VORNANEN, 2007), e do sistema circulatório (B) de peixes teleósteos - notar que para cada um dos ramos da artéria branquial, condutor do sangue venoso para as brânquias, corresponde uma veia branquial, as quais se unem à aorta subvertebral (adaptado de NICHOLSON, 1980).

Durante a hipóxia ambiental, a resposta cardíaca mais frequentemente observada em peixes teleósteos é a bradicardia, acompanhada de aumento do volume sistólico.

Como o débito cardíaco é mantido, a importância da bradicardia hipóxica é interpretada como uma forma de aumentar o tempo de residência do sangue tanto nas lamelas secundárias (possibilitando maior captação de O_2 da corrente ventilatória) quanto no miocárdio (possibilitando um maior tempo para tomada de O_2 pelo mesmo) tal fato é possibilitado por dois efeitos: (a) aumento do recrutamento lamelar, causado por hipertensão acompanhada de bradicardia e (b) adequada relação ventilação-perfusão (SATCHELL, 1991; ALTIMIRAS *et al.*, 1995).

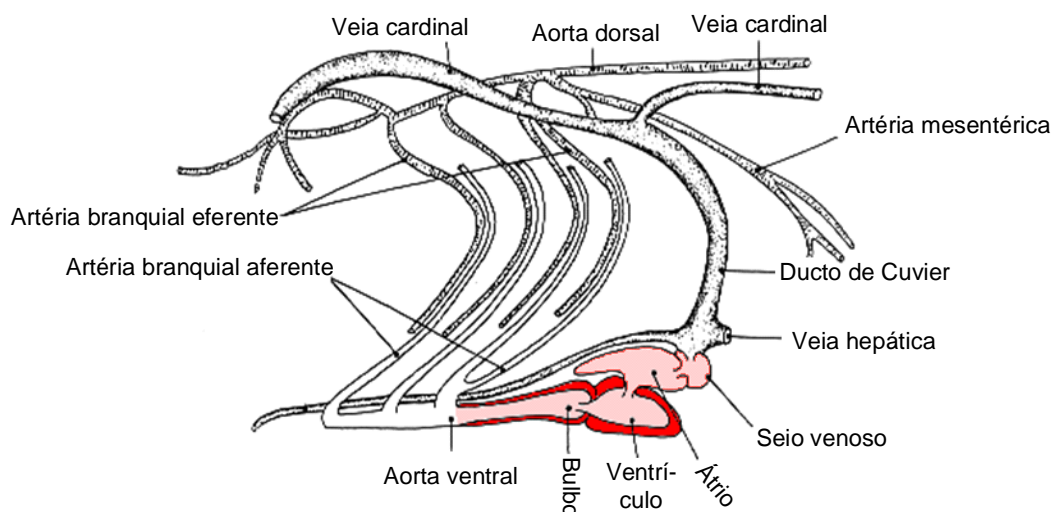


FIGURA 4. Detalhe do sistema circulatório de peixes teleosteos. (modificado de NICHOLSON, 1980)

1.4. Contaminação do ambiente aquático

Dentre os efeitos da atividade humana sobre os ecossistemas, o processo de modernização da agricultura a partir dos anos 60 e a necessidade de se aumentar os índices de produtividade, introduziram novas variedades de herbicidas, bactericidas, fungicidas, acaricidas, parasiticidas e inseticidas no mercado de produtos agrícolas. O emprego dessas substâncias trouxe, por outro lado, consequências adversas pela toxicidade ao homem e ao ambiente; os ecossistemas aquáticos também foram afetados e mais particularmente, as populações de peixes.

Segundo dados da Agência Senado (2009), o Brasil assumiu a liderança mundial no consumo de agrotóxicos, superando os Estados Unidos, cujas lavouras ocupam área maior, e respondendo por 84% do consumo dos países latino-americanos.

Os herbicidas representam a maior parcela e calcula-se que somente cerca de 0,1% atinja o alvo específico, enquanto os 99,9% restantes da aplicação têm potencial para se mover em diferentes compartimentos ambientais, tais como o solo e águas superficiais e subterrâneas. (BELLUCK *et al*, 1991)

As atividades industriais e agropecuárias e a introdução de poluentes, a chuva ácida e os efeitos dos distúrbios na relação ácido-base, o aquecimento global, com mudanças associadas na temperatura e níveis de oxigênio, provocam mudanças em ecossistemas aquáticos e levam à necessidade de se entender as bases fisiológicas da biodiversidade e

das diferentes capacidades de diferentes espécies de resistirem a essas mudanças. Esta questão é particularmente importante para o entendimento de como os contaminantes podem influenciar esses sistemas.

A fauna íctica constitui-se num recurso alimentar importante, sendo uma fonte proteica acessível através da exploração direta das populações naturais. Embora essas populações de peixes pareçam inesgotáveis, a ação antrópica muito tem contribuído para a sua redução, tornando-se inevitável que populações mundiais tornem-se cada vez mais dependentes de peixes cultivados artificialmente.

O ambiente aquático é um meio no qual o acesso e a penetração de agentes patogênicos tornam-se facilitados e o confinamento dos peixes favorece ainda mais o aparecimento de doenças. Assim, o estudo de agentes causadores de patologias nos peixes é um campo de crescente importância em virtude da expansão mundial da piscicultura, pois sabe-se que esses agentes podem provocar elevadas taxas de mortalidade, redução das capturas ou diminuição dos valores comerciais dos exemplares atacados.

Os corpos d'água estão frequentemente sujeitos à contaminação química pelas atividades da agricultura. A aplicação de pesticidas em áreas cultivadas acaba por contaminar o ambiente aquático por meio de derramamentos acidentais, lavagem do solo pela chuva e lavagem de equipamentos e recipientes utilizados nessas pulverizações. Além disso, vários pesticidas, incluindo algicidas, herbicidas e inseticidas são indicados pelos fabricantes para o controle de pragas em reservatórios e tubulações de água. Esses produtos têm sido testados e liberados para uso em, ou próximo a, ambientes aquáticos. Entretanto, o uso apropriado desses pesticidas em áreas aquáticas é especialmente crítico (BRANCO, 2004).

Derramamentos acidentais e superdosagens podem matar peixes ou causar danos ao seu habitat, o que causará a redução de suas populações. Além da toxicidade aguda, o uso de agrotóxicos pode resultar na morte de peixes devido a efeitos secundários tais como a depleção de O₂ nos corpos d'água (HUNN *et al.*, 1993).

A preocupação com a contaminação de ambientes aquáticos aumenta, principalmente, quando a água é usada para o consumo humano. A Comunidade Económica Europeia estabeleceu em 0,1 µg/L a concentração máxima admissível de qualquer agrotóxico em águas destinadas para consumo humano e em 0,5 µg/L para o total de resíduos, sem deixar claro se deve, ou não, considerar também produtos de

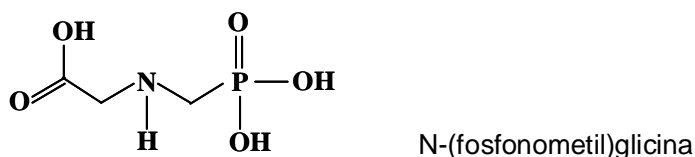
transformação. Este limite tem sido motivo de questionamento uma vez que não considera a toxicidade de cada produto, e ainda, as metodologias analíticas disponíveis para alguns compostos não atingem limites de detecção dessa ordem de grandeza. Por outro lado, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) e a Organização Mundial da Saúde estabelecem níveis máximos para pesticidas individuais em água destinada ao consumo humano, baseados em estudos toxicológicos e epidemiológicos (DORES & DELAMONICA-FREIRE, 2001).

No Brasil, a portaria nº 020/CONAMA, de 18/06/1986, estabelece limites máximos de contaminantes em águas dependendo de seu destino sendo que, dentre esses, estão alguns pesticidas organoclorados, organofosforados e carbamatos. A Resolução 36/GM de 19/01/1990 do Ministério da Saúde (Padrão de Potabilidade de Água Destinada ao Abastecimento de Populações Humanas) estabelece limites de pesticidas em águas destinadas ao consumo humano. No entanto, essas legislações não contemplam a maioria dos pesticidas atualmente em uso, como por exemplo, inseticidas piretróides e a maioria dos herbicidas.

1.4.1. Glifosato

O glifosato é um herbicida pós-emergente, pertencente ao grupo químico das glicinas, classificado como não-seletivo e de ação sistêmica. Apresenta largo espectro de ação, o que possibilita um excelente controle de plantas daninhas anuais ou perenes, tanto de folhas largas como estreitas.

A estrutura química de sua molécula é a seguinte, de acordo com Whitaker & Ware (2004):



A propriedade herbicida desta substância foi descoberta pela Monsanto em 1970 e a primeira formulação comercial foi lançada nos Estados Unidos em 1974, com o nome comercial de Roundup. Hoje ela é utilizada em mais de 130 países, sendo aplicada para controle de plantas daninhas nas áreas agrícolas, industriais, florestais, residenciais e ambientes aquáticos. (MONSANTO, 2009). A literatura sobre as propriedades toxicológicas

e ecotoxicológicas do glifosato em animais aquáticos é extremamente escassa, considerando-se sua importância como herbicida.

O glifosato atua como um potente inibidor da atividade da enzima catalisadora de uma das reações de síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano e tem influência também em processos, a inibição da síntese de clorofila, a estimulação da produção de etileno e redução da síntese de proteínas (COLE, 1985; RODRIGUES, 1994).

1.4.1.1. Comportamento do glifosato no solo e na água

A principal rota de degradação do glifosato são os microrganismos de solo e água (por processos aeróbicos e anaeróbicos), que o decompõem em compostos naturais.

De acordo com Amarante-Jr *et al.* (2002), o glifosato tende a ser inativo em contato com o solo, desde que seja por ele adsorvido. O mecanismo não é inteiramente compreendido, mas é sugerida a ocorrência de ligações similares às do fosfato inorgânico. Entretanto, apesar da competição com fosfatos inorgânicos ter sido demonstrada em laboratório, a mesma não tem sido medida no campo. Íons específicos tais como Fe^{2+} , Fe^{3+} e Al^{3+} complexam-se com o glifosato e os complexos metálicos com ácidos húmicos em solo podem ser um mecanismo de ligação deste às partículas do solo (WHO, 1994). O composto livre no solo é degradado rapidamente a dióxido de carbono, pela atividade microbiana, enquanto que o glifosato adsorvido é degradado mais lentamente, ou não degradado, persistindo inativo durante anos.

A degradação do glifosato no solo pode seguir duas rotas. A primeira, pouco citada na literatura, consiste na transformação do glifosato em sarcosina por ação das bactérias *Agrobacterium radiobacter* ou *Enterobacter aeroneges* (enzima C-P liase) - a sarcosina entra no metabolismo desses microorganismos e de outros, degradando-se. A segunda rota consiste na transformação do glifosato em ácido aminometilfosfônico, AMPA (AMARANTE-JR *et al.*, 2002).

Com relação à sua solubilidade em água, o glifosato é altamente solúvel, apresentando valor de 11.600 ppm a 25°C (KOLLMAN & SEGAWA, 1995). Experimentos procurando avaliar a estabilidade da molécula indicaram que o glifosato mostrou-se estável em solução aquosa na faixa de pH 3,0 a 9,0, a uma temperatura de 35 °C como também à fotodegradação na faixa de pH entre 5,0 e 9,0, em solução tampão sob luz natural, e a meia-vida, por hidrólise, foi maior que 35 dias (KOLLMAN & SEGAWA, 1995). Bronstad & Friestad

(1985) também demonstraram que o glifosato apresenta pequena propensão à decomposição por hidrólise.

No Brasil, a portaria MS n.º 518/2004 do Ministério da Saúde (CAPÍTULO IV - DO PADRÃO DE POTABILIDADE; Art. 14º - Potabilidade da água) estabelece o valor máximo permitido de 500 µg/L do herbicida glifosato em águas destinadas ao consumo humano. Posteriormente, a Resolução CONAMA 357/05 que classifica os corpos de água, regulamenta uma série de substâncias, estabelecendo a concentração máxima permissível das mesmas, de acordo com as diferentes classes de água. As águas das classes 1 e 2 destinadas ao abastecimento para consumo humano e à proteção das comunidades aquáticas, a concentração máxima de glifosato permitida é de 65 µg.L⁻¹.

Infelizmente, poucos dados disponíveis na literatura quantificam as concentrações de glifosato em corpos de água brasileiros. Segundo Amarante-Jr *et al.* (2002), em raras ocasiões o pesticida tem sido detectado em amostras de águas mas, em geral, isto ocorre devido à dificuldade de separação do composto e também devido ao fato de não ser considerado um sério contaminante aquático. Segundo esses autores, o glifosato é um composto extremamente polar, sendo extraído das amostras aquosas juntamente com cátions metálicos e ânions inorgânicos, o que dificulta sua análise.

Mattos *et al.* (2002) determinaram a presença do herbicida glifosato e do seu metabólito, ácido aminometilfosfônico (AMPA), em amostras de águas coletadas em área orizícola, submetida a plantio direto, no Arroio Bretanhas e na Lagoa Mirim, integrantes da bacia hidrográfica do Piratini-São Gonçalo-Mangueira, sudeste do RS. Esses autores verificaram concentrações de até 0,14 ± 2,3 mg L⁻¹ de glifosato e de 0,11 ± 4,3 µg L⁻¹ de AMPA.

Silva *et al.* (2003) estudaram a microbacia hidrográfica arroio Passo do Pilão, que deságua no arroio Pelotas, responsável pelo abastecimento de parte da água consumida no município de Pelotas - RS. Esses autores detectaram a presença de glifosato em concentrações acima de 0,10 mg L⁻¹ nas águas do arroio Passo do Pilão aos 60 dias após a aplicação do produto, indicando a persistência do herbicida no ambiente aquático.

Garcia & Rollemberg (2007) analisaram amostras de água coletada na Represa Taquaruçu, município de Sandovalina - SP, e encontraram uma concentração média de 0,18 mg L⁻¹. Os autores sugeriram, com base em tais resultados, a necessidade de tratamento adequado dessas águas para consumo humano, para a exploração pesqueira e para

atividades de lazer, pois essa represa situa-se em região agrícola, com intensa pulverização de herbicidas, sendo a pesca o meio de subsistência da população ao redor.

Todos os valores acima citados estão acima da concentração máxima estabelecida pela Resolução CONAMA 357/05, de $65 \mu\text{g.L}^{-1}$. Dessa forma, medidas de controle e redução na dosagem de aplicação do glifosato e novas técnicas que venham minimizar a aplicação desse herbicida devem ser desenvolvidas e implementadas.

A ampla utilização desse produto, o desconhecimento dos riscos associados a sua utilização, o consequente desrespeito às normas básicas de segurança, a livre comercialização e a grande pressão comercial por parte das empresas produtoras e distribuidoras constituem importantes causas que levam ao agravamento dos quadros de contaminação humana e ambiental observados no Brasil.

1.4.1.2. Efeitos do glifosato nos seres vivos

A formulação Roundup mais utilizada é composta de surfatante polioxietileno-amina (POEA), ácidos orgânicos de glifosato relacionados, sal de isopropilamina e água. Em função dessa composição, Roundup possui uma toxicidade aguda maior que o glifosato puro, testado em laboratório pelas principais agências reguladoras do produto nos EUA. O surfatante presente está contaminado com 1-4 dioxano, um agente causador de câncer em animais e potencialmente causador de danos ao fígado e aos rins de seres humanos. (HARDELL *et al*, 1999)

Em decorrência da decomposição do glifosato, registra-se uma substância potencialmente cancerígena conhecida, o formaldeído. E a combinação do glifosato com nitratos no solo ou em combinação com a saliva, origina o N-nitroso glifosato, cuja composição também é potencialmente cancerígena e para a qual não há um nível de exposição seguro. Hardell *et al* (1999) concluíram que existe associação do contato prolongado com glifosato e o linfoma “non-Hodgkin”, outra forma de câncer e os pesquisadores alertam para o caso, considerando o exponencial aumento no consumo do herbicida a nível mundial.

Conforme Kaczewer (2002), o NCAP (Northwest Coalition for Alternatives to Pesticides) identificou efeitos prejudiciais do glifosato à saúde em todas as categorias padronizadas para o estudo toxicológico (subcrônicos, crônicos, carcinogênicos, mutagênicos e reprodutivos). Os estudos de toxicidade realizados demonstraram os

seguintes efeitos: toxicidade subaguda (lesões em glândulas salivares), toxicidade crônica (inflamação gástrica), danos genéticos (em células sanguíneas humanas), transtornos reprodutivos (diminuição do número de espermatozóides em ratos e aumento da frequência de anomalias espermáticas em coelhos) e carcinogênese (aumento da frequência de tumores hepáticos em ratos e câncer de tireóide em ratas). Além disso, Dallegrave *et al.* (2003) identificaram problemas reprodutivos em ratos cobaias, que tiveram contato com *Roundup*: maior parcela de espermatozóides anômalos, menor produção diária de espermatozóides e alterações no desenvolvimento do tecido testicular.

O efeito do glifosato no organismo humano é cumulativo e a intensidade da intoxicação depende do tempo de contato com o produto. Os sintomas de intoxicação previstos incluem irritações na pele e nos olhos, náuseas e tonturas, edema pulmonar, queda da pressão sanguínea, alergias, dor abdominal, perda de líquido gastrointestinal, vômito, desmaios, destruição de glóbulos vermelhos no sangue e danos no sistema renal. (ANDRIOLI, 2005)

A literatura sobre as propriedades toxicológicas e ecotoxicológicas de glifosato sobre animais aquáticos é extremamente escassa, considerando-se sua importância como herbicida.

A toxicidade das diferentes formulações comerciais de glifosato pode variar consideravelmente. Algumas formulações podem ser mais tóxicas para peixes e outros organismos aquáticos devido aos diferentes sais, ácidos e surfactantes utilizados (CHAMPAIGNE, 1994; NESKOVIC *et al.*, 1996), por exemplo, Touchdown 4-LC[®] e Bronco[®] apresentaram baixos valores de CL₅₀ para espécies aquáticas (<13 mg/L), enquanto que o Rodeo[®] apresentou valores de CL₅₀ bastante elevados (>900 mg/L). Também é sabido que o surfactante presente na formulação de Roundup[®] também é bastante tóxico para peixes, havendo restrições de seu uso em ambientes aquáticos.

O surfactante MONO818[®], presente na formulação de Roundup[®], devido a seu efeito de quebra da tensão superficial da água, pode interferir na respiração branquial de peixes, sendo altamente tóxico para os mesmos (SERVIZI *et al.* 1987). A CL₅₀ do MONO818[®] é de 2-3 mg/L para o salmão sockeye (*Oncorhynchus nerka*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e para o salmão coho (*Oncorhynchus kisutch*) (SERVIZI *et al.* 1987; TYLER 1997 a,b).

Roundup WG é o resultado da evolução tecnológica da marca Roundup, que através de sua formulação inovadora, granulada, permite ao agricultor atingir sempre os melhores resultados, além de facilitar sua vida na armazenagem, no manuseio e no descarte. É um herbicida de ação total que contém um surfactante exclusivo que achata a gota na folha, diminuindo a tensão superficial e aumentando a superfície de contato, melhorando a penetração do produto. Além de 792,5 g.kg⁻¹ do sal de amônio de glifosato presente na formulação, a bula do produto indica a presença de 720,0 g.kg⁻¹ de equivalente ácido de N-(fosfonometil) glicina (glifosato) e 207,5 g.kg⁻¹ de “outros ingredientes” (MONSANTO, 2009).

Infelizmente, não há trabalhos na literatura sobre valores de CL₅₀ de 96 h para a formulação comercial do Roundup WG®, sendo que os únicos valores encontrados foram descritos por Gomes *et al.* (2007a, b), em anais de congressos, para 3 espécies de peixes dulcícolas neotropicais, como apresentado na tabela 1.

Segundo o fabricante, Roundup Transorb® é o mais rápido e eficiente herbicida existente no mercado para o controle, pois conta com a exclusiva e inovadora Tecnologia Transorb, que abre caminho pelas folhas das plantas daninhas e faz com que o produto chegue rápido e direto à raiz, sendo absorvido em minutos, proporcionando mais resultados em menos tempo. (MONSANTO, 2009). A bula de Roundup Transorb informa a presença de 648 g L⁻¹ de sal de Isopropilamina de glifosato, 480 g L⁻¹ de equivalente ácido de N - (fosfonometil) glicina (glifosato), e 594 g L⁻¹ dos chamados “ingredientes inertes”.

Segundo a Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos (FISPQ) da Monsanto Brasil, de 12/05/2008, a CL₅₀ 96 h do Roundup Transorb® para a truta arco-íris, *Oncorhynchus mykiss*, é de 18 mg L⁻¹. Entretanto, a Safety Data Sheet da Monsanto Canadá, de 02/10/2009, fornece o valor de CL₅₀ 96 h de 3,13 mg.L⁻¹ para a mesma espécie, valor esse bastante discrepante do anterior. Ainda segundo a FISPQ da Monsanto Brasil, a CL₅₀ 96 h do Roundup para o “fathed minnows” *Pimephales promelas* é de 84,4 mg L⁻¹.

TABELA 1. Valores de CL₅₀ de 96 h para a formulação comercial do Roundup WG® para diferentes espécies de peixes dulcícolas.

Espécie	Cl ₅₀ (mg L ⁻¹)	Autor
Guaru (larva), <i>Phallocerus caudimaculatus</i>	0,86	GOMES <i>et al.</i> (2007a)
Guaru (adulto), <i>Phallocerus caudimaculatus</i>	9,0	GOMES <i>et al.</i> (2007a)
Mato-Grosso, <i>Hyphessobrycon eques</i>	9,3	GOMES <i>et al.</i> (2007b)
Paulistinha, <i>Brachydanio rerio</i>	10,6	GOMES <i>et al.</i> (2007b)

Os surfactantes utilizados nas formulações do Roundup Transorb® e Roundup WG® não são conhecidos, protegidos como “segredos comerciais” (“trade secret”), sendo descritos como uma “mistura de surfactantes” (“surfactant blend”).

De acordo com Nescovic *et al.* (1996), o glifosato por si só é moderadamente tóxico aos peixes. Estes autores encontraram valores de CL_{50} de 96 h de exposição ao glifosato de 120 mg.L^{-1} para o bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) e de 86 mg.L^{-1} para a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Já a CL_{50} do Roundup® para o bluegill sunfish e para a truta arco-íris foi de 6 a 14 mg.L^{-1} e 8 a 26 mg.L^{-1} , respectivamente (SERVIZI *et al.* 1987), o que comprova o potencial perigo da utilização indiscriminada desse produto para os peixes.

Jiraungkoorskul *et al.* (2003) expuseram exemplares de tilapia do nilo, *Oreochromis niloticus*, por 3 meses a concentrações subletais (5,0 e 15 ppm) de Roundup e verificaram uma série de efeitos adversos, tanto hispatológicos quanto bioquímicos, em diversos órgãos. Nas brânquias, tais modificações incluíram proliferação das células dos filamentos branquiais, fusão lamelar, descolamento do epitélio e aneurismas. No fígado, ocorreu vacuolação dos hepatócitos e picnose nuclear. Nos rins, as lesões incluíram dilatação do espaço de Bowman e acúmulo de gotículas hialinas nas células tubulares. Segundo esses autores, as lesões estruturais podem estar relacionadas ao significativo aumento nas atividades das enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatases alcalinas, que ocorreram ao longo do segundo e terceiro meses de exposição.

Gluszczak *et al.* (2007), estudando a piava, *Leporinus obtusidens*, expostas à diferentes concentrações de Roundup, (3, 6, 10, e 20 mg.L^{-1} por 96 h), verificaram redução da atividade da acetil-colinesterase (AChE) cerebral, aumentos significativos nos teores de glicose e glicogênio hepáticos e redução significativa desses parâmetros no músculo branco. Também observaram menores teores de proteínas e lactato no fígado e redução em todos os parâmetros hematológicos estudados (hematócrito, hemoglobina, eritrócitos e leucócitos totais) nos animais expostos ao glifosato em relação aos controles. Esses autores não determinaram a CL_{50} 96 h do glifosato pois, segundo eles, os peixes sobreviveram à elevadas concentrações desse herbicida (100 mg.L^{-1}).

No Brasil, a literatura pertinente a estudos de toxicidade do Roundup com espécies nativas é ainda incipiente, merecendo destaque trabalhos com o tambaqui (MIYAZAKI *et al.*, 2004), o jundiá (RIGOLIN-SÁ, 1999; SILVA *et al.*, 2004), o curimbatá (LANGIANO, 2006) e o piaçu (ALBINATI *et al.*, 2007). Além disso, não há informações, na literatura, sobre o efeito

do glifosato na função cardio-respiratória de peixes tropicais. O presente trabalho investigou tais efeitos no matrinxã, contribuindo para a ampliação do conhecimento dos efeitos desse herbicida em ecossistemas aquáticos.

Optou-se por utilizar 3 diferentes formulações comerciais de Roundup®, pois na agricultura são utilizadas formulações comerciais e não os ingredientes ativos, sendo aqueles os produtos que atingirão as comunidades aquáticas.

2. OBJETIVOS

Tendo em vista a importância da contaminação aquática por pesticidas, o uso indiscriminado do glifosato na aquicultura e o fato de que os danos fisiológicos podem ser os principais mecanismos da toxicidade de poluentes, o presente trabalho teve como objetivo principal avaliar o comportamento do sistema cardio-respiratório em exemplares de *Brycon amazonicus* (matrinxã) expostos por 96 horas ao Roundup Original® (36% de glifosato), formulação comercial do glifosato mais utilizada e com efeitos tóxicos mais conhecidos. Adicionalmente, os resultados obtidos para o Roundup Original® foram comparados aos efeitos de duas outras formulações comerciais do glifosato, mais recentes e com efeitos ainda pouco conhecidos: Roundup WG® (72% de glifosato) e Roundup Transorb® (48% de glifosato).

Exemplares controle e expostos às diferentes formulações do Roundup foram submetidos a condições de normóxia (140 mmHg) e hipóxia gradual (120, 100, 80, 60, 40 e 20 mmHg) para as medidas dos seguintes parâmetros:

- a. Determinação da tomada de O₂ total ($\dot{V}O_2$);
- b. Determinação da frequência respiratória - f_R;
- c. Determinação da ventilação branquial – \dot{V}_G ;
- d. Determinação do volume ventilatório – V_T;
- e. Determinação da necessidade ventilatória - $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$;
- f. Determinação da extração de O₂ da corrente ventilatória – EO₂;
- g. Determinação da frequência cardíaca *in vivo* - f_H.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. O Matrinxã, *Brycon amazonicus*

3.1.1. Posição sistemática da espécie

Segundo Britski (1972), o matrinxã ocupa a seguinte posição sistemática:

Classe: OSTEICHTHYES

Subclasse: ACTINOPTERYGII

Superordem: OSTARIOPHYSI

Ordem: CHARACIFORMES

Família: CHARACIDAE

Sub-família: BRYCONINAE

Gênero: *Brycon*

Espécie: *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829)

3.1.2. Breves Considerações sobre a Espécie Estudada

O matrinxã, *Brycon amazonicus* (Figura 5), é um teleósteo de água doce nativo das bacias Amazônica e Araguaia-Tocantins. Possui escamas com coloração cinza prata uniforme, com uma mancha escura arredondada na região humeral e nadadeiras alaranjadas, exceto a nadadeira caudal geralmente cinza escuro. Os dentes são fortes e multicuspidados, com várias fileiras na maxila superior. Os adultos raramente ultrapassam 80 cm de comprimento e 5 kg (VAL & HONCZARIK, 1995).

O matrinxã tem hábito alimentar onívoro, alimentando-se na natureza de sementes e frutos como a acapurana (*Campsiandra augustifolia*), bacaba (*Oenocarpus bacaba*), seringa barriguda (*Hevea spruceana*), seringa verdadeira (*Hevea brasiliensis*), taquari (*Mabea* sp.) e de insetos. O desenvolvimento de reservas de gordura durante a estação de cheia é uma importante adaptação para sua sobrevivência na estação de seca (LOWE-MCCONNELL, 1975).

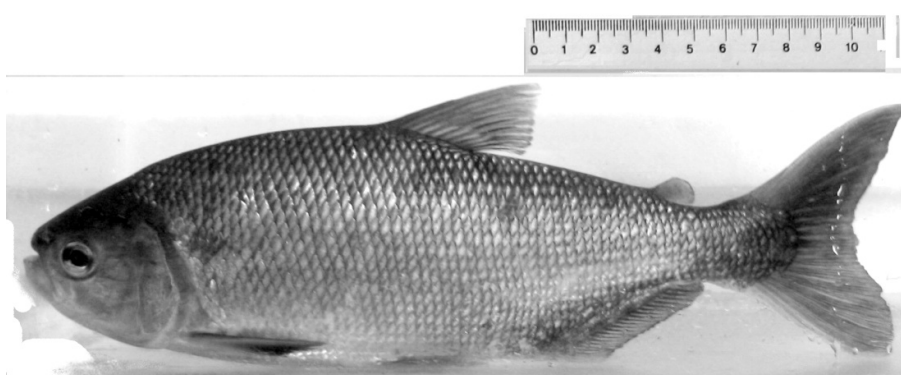


FIGURA 5. Exemplar de matrinxã, *B. amazonicus*. A régua apresenta escala em cm.

É uma espécie rústica, que em cativeiro aceita bem rações peletizadas, bem como subprodutos agro-industriais. Tem crescimento rápido e sua maturação sexual ocorre em torno dos 3 anos de idade. É uma espécie migratória, ou de piracema, e sua reprodução em ambiente natural ocorre no início do período de enchente, entre dezembro e fevereiro. São muito importantes comercialmente e encontram-se entre os peixes de escamas mais esportivos da Amazônia (VAL & HONCZARIK, 1995).

O matrinxã pode ser cultivado em sistema extensivo e semi-intensivo, em monocultivo ou de preferência em policultivo com outras espécies. No cultivo alcança 700g até 1 kg no primeiro ano e 1,3 kg a 1,6 kg no segundo ano, o que corresponde ao tamanho comercializável já no primeiro ano sendo, portanto, uma espécie com grande potencial econômico em cativeiro.

3.2. Métodos

3.2.1. Coleta e manutenção em laboratório

Os exemplares de matrinxã utilizados no presente estudo foram cedidos pelo Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP - *campus* Jaboticabal, SP, e após capturados, foram acondicionados em tanques com capacidade entre 30 e 50 litros e imediatamente transportados para o Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa do DCF/UFSCar, onde os experimentos foram realizados.

Em laboratório, os peixes foram mantidos em tanques com capacidade de 1000 litros, dotados de circulação contínua de água, aeração constante e temperatura controlada (25 ± 1 °C), por um período mínimo de 30 dias. Estudos prévios (KALININ,

1996) demonstraram que esse período é suficiente tanto para a recuperação do estresse decorrente da coleta e transporte, como para a aclimação às condições laboratoriais. Durante esse período os peixes foram alimentados *ad libitum* com ração comercial peletizada própria para peixes.

3.2.2. Delineamento experimental

Foram utilizados 40 exemplares de ambos os sexos de matrinxã, com peso de $380,2 \pm 21,3$ g. Os peixes foram divididos em 4 grupos experimentais: controle ($n = 10$) e submetidos ao tratamento com 5 mg L^{-1} das formulações de Roundup Original[®] ($n = 10$), WG[®] ($n = 10$) e Transorb[®] ($n = 10$).

A concentração de 5 mg L^{-1} para Roundup Original[®] foi estabelecida por representar aproximadamente 25% do valor de CL_{50} 96 h dessa formulação registrada para o tambaqui, *C. macropomum*, também pertencente à família Characidae, e não mais que 50% da CL_{50} das demais espécies dulciaquícolas já estudadas (Tabela 2). A mesma concentração foi mantida, para fins comparativos, nos estudos sobre os efeitos das duas outras formulações comerciais escolhidas, Roundup WG[®] e Roundup Transorb[®].

Após o período de aclimação, os grupos experimentais foram mantidos por 96 horas em aquários contendo as diferentes formulações comerciais de Roundup, respeitando-se a relação de 1g de peixe por litro de água para serem utilizados nos experimentos descritos a seguir.

Os animais tiveram a alimentação suspensa por 24 horas antes do início dos experimentos para evitar efeitos prandiais e prevenir deposição de fezes ao longo do ensaio. As caixas experimentais usadas na exposição tinham a capacidade de 250 L, temperatura controlada (25 ± 2 °C) e aeração constante e permaneceram nas caixas por 12 horas para adaptação e, após este período, a água foi renovada e o herbicida adicionado.

TABELA 2. Valores de CL50 de 96 h para a formulação comercial do Roundup Original® para diferentes espécies de peixes dulcícolas.

Espécie	Cl ₅₀ (mg L ⁻¹)	Autor
Bagre do canal, <i>Ictalurus punctatus</i>	14,5	ABDELGHANI <i>et al.</i> (1997)
Bluegill sunfish, <i>Lepomis macrochirus</i>	120	EXTOXNET (1994)
Bluegill sunfish, <i>Lepomis macrochirus</i>	13	ABDELGHANI <i>et al.</i> (1997)
Carpa comum, <i>Cyprinus carpio</i>	620	NESKOVIC <i>et al.</i> (1996)
Chinook salmon, <i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	20	MITCHELL <i>et al.</i> (1987)
Coho salmon, <i>Oncorhynchus kisutch</i>	22	MITCHELL <i>et al.</i> (1987)
Curimatá, <i>Prochilodus lineatus</i>	13,7	LANGIANO (2006)
Jundiá, <i>Rhamdia hilarii</i>	10,6	RIGOLIN-SÁ (1999)
Jundiá, <i>Rhamdia quelen</i>	10	SILVA, <i>et al.</i> (2004)
Paulistinha, <i>Danio rerio</i>	71	ARAUJO <i>et al.</i> (2005)
Peixe dourado, <i>Carassius auratus</i>	25,6	ANTÓN <i>et al.</i> (1994)
Piauçu, <i>Leporinus macrocephalus</i>	15,2	ALBINATI <i>et al.</i> (2007)
Tambaqui, <i>Colossoma macropomum</i>	19,9	MIYAZAKI <i>et al.</i> (2004)
Tambacu, <i>C. macropomum</i> x <i>P. mesopotamicus</i>	24,9	MIYAZAKI <i>et al.</i> (2004)
Tilapia do nilo (adulta), <i>Oreochromis niloticus</i>	36,8	JIRAUNGKOORSKUL <i>et al.</i> (2002)
Tilapia do nilo (jovem), <i>Oreochromis niloticus</i>	16,8	JIRAUNGKOORSKUL <i>et al.</i> (2002)
Truta arco-íris, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	54,8	HILDEBRAND <i>et al.</i> (1982)
Truta arco-íris, <i>Oncorhynchus mykiss</i>	26	MITCHELL <i>et al.</i> (1987)

A água utilizada nas renovações das caixas experimentais era termostaticada e proveniente da mesma fonte de água dos tanques de aclimatação dos peixes. Soluções estoque de Roundup de cada uma das formulações comerciais, preparadas com esta água, foram utilizadas para a renovação diária da água das caixas experimentais destinadas à exposição aos herbicidas.

As caixas experimentais eram escuras para evitar distúrbios externos que pudessem estressar os animais e cobertas com tampa escura para prevenir uma possível volatilização do Roundup®.

Em 5 mg.L⁻¹ do Roundup Original® a concentração de glifosato foi de 1,8 mg.L⁻¹, que encontra-se dentro da faixa de concentrações de glifosato encontradas em águas próximas a áreas de agricultura no Brasil (de 0,36 a 2,16 mg.L⁻¹), como descrito por Rodrigues & Almeida (2005). Para as formulações de Roundup WG® e Transorb®, que

apresentam maiores concentrações de glifosato, cada 5 mg.L⁻¹ continham 3,6 mg.L⁻¹ e 2,4 mg.L⁻¹ de glifosato, respectivamente.

Durante o período experimental, os parâmetros físico-químicos da água foram monitorados em ambos os grupos e mantiveram-se aproximadamente constantes: pH 7,0 a 7,5; oxigênio dissolvido 6,5 mg.L⁻¹ a 7,3 mg.L⁻¹, dureza 48 mg.L⁻¹ a 56 mg.L⁻¹ (como CaCO₃); alcalinidade 40 mg.L⁻¹ a 43 mg.L⁻¹ (como CaCO₃); amônia 0,1 mg.L⁻¹; cloreto 42 mg.L⁻¹; condutividade 110 µS.cm⁻¹.

3.2.3. Preparações experimentais

As preparações empregadas para a obtenção dos parâmetros respiratórios e dos eletrocardiogramas (ECG) para análise da frequência cardíaca (f_H) foram baseadas na metodologia utilizada por Glass *et al.* (1991) e adaptada por Rantin *et al.* (1993).

As cirurgias foram precedidas por processo de anestesia, no qual os peixes foram submetidos a um banho em benzocaína 0,005% (0,5 g de benzocaína diluída em 10 litros de água) por aproximadamente 5 minutos (ou até a cessação da atividade espontânea). Imediatamente após a anestesia, procedeu-se a implantação dos cateteres de polietileno para o monitoramento das tensões de O₂ da água inspirada e expirada e a sutura de eletrodos de eletrocardiografia para o registro da atividade cardíaca, tendo tal processo duração média de 10 minutos.

A canulação da cavidade bucal e da cavidade opercular permitiu obter amostras de água para determinação das tensões parciais de O₂ da água inspirada (P_iO₂) e expirada (P_eO₂), bem como a determinação da frequência respiratória (f_R). A canulação foi obtida pela inserção de cateteres de polietileno na porção mediana superior da cavidade bucal (PE 100) e nas partes distais de ambos os cleitros operculares (PE 60) através de pequenos orifícios obtidos com o auxílio de uma broca. Os cateteres foram externados e fixados com a ajuda de um flange e cola de secagem rápida. (Figura 6).

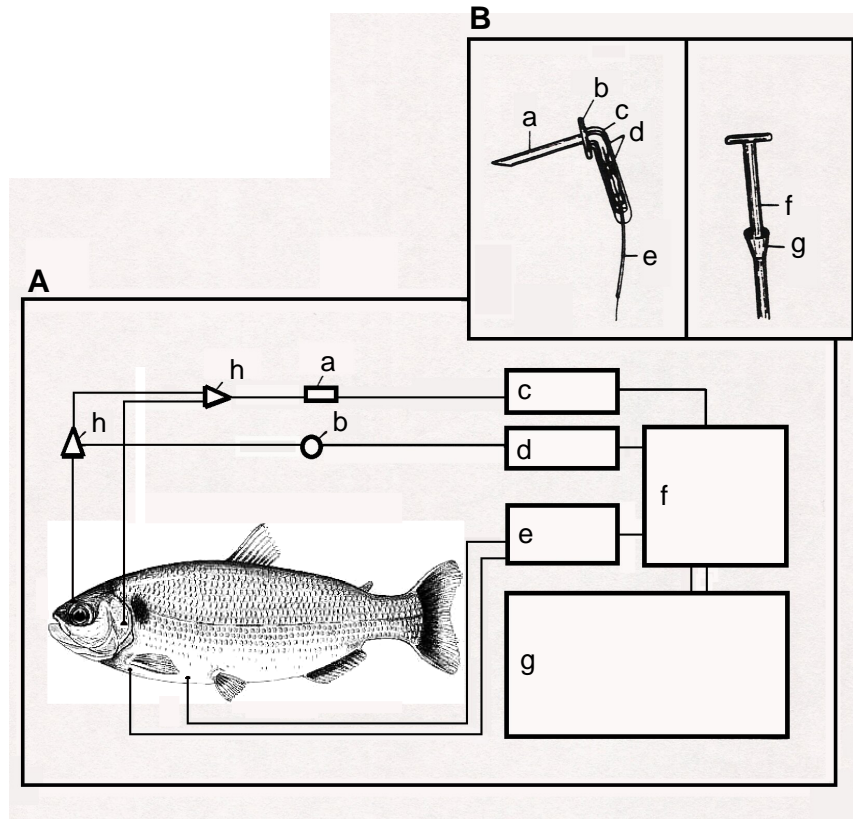


FIGURA 6. Esquema do sistema utilizado na obtenção das respostas cardio-respiratórias. Em A: a. cubeta termostaticada com eletrodos de O₂; b. transdutor de pressão; c. analisador de O₂; d. amplificador de pressão; e. amplificador de ECG; f. sistema de aquisição de dados; microcomputador. Em B: a. ponta da agulha do eletrodo de ECG; b. pedaço de cateter de polietileno com extremidade flangeada; c. revestimento termoretrátil; d. fixação de fio de cobre por meio de pressão mecânica; e. fio de cobre encapado; f. cateter de polietileno com extremidade flangeada para tomada de água; g. peça de fixação. Adaptado de Maricondi-Massari (1993).

Foram inseridos dois eletrodos de aço inoxidável: o positivo, posicionado ventralmente entre as brânquias e o coração e o negativo, em posição ventro-caudal próximo às nadadeiras pélvicas, ambos suturados com dois pontos cirúrgicos à musculatura corpórea para evitar seu deslocamento. Um terceiro eletrodo, de referência, foi colocado na água da câmara experimental. Os eletrodos foram conectados ao acoplador universal (Narco 7189) de um registrador Narco Narcotrace 40 (Narco Bio Systems, Houston, TX, USA). Esta preparação permitiu que fossem obtidos registros similares àqueles observados na derivação D₁ da eletrocardiografia padrão.

Após a preparação acima descrita os peixes foram introduzidos no respirômetro de fluxo constante (Figura 7) e imediatamente transferidos para a câmara experimental, mantida a 25 °C, onde permaneceram por um período de 12 horas para a recuperação da anestesia e restabelecimento das condições metabólicas de rotina (Figura 8).

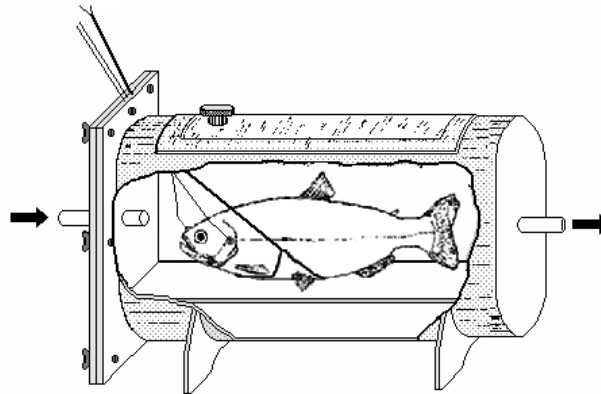


FIGURA 7. Esquema do respirômetro de fluxo constante utilizado nos experimentos *in vivo*. As setas indicam a direção do fluxo de água através do respirômetro.

Os experimentos foram conduzidos utilizando-se um animal de cada vez. A determinação dos parâmetros respiratórios foi feita em normóxia (140 mmHg) e nas seguintes tensões de O₂ hipóxicas: 120, 100, 80, 60, 40 e 20 mmHg, obtidas borbulhando-se, por meio de um dispersor (pedra de aeração), quantidades controladas de N₂ e ar comprimido no interior da câmara experimental. A temperatura experimental foi mantida constante (25 ± 1°C). Após a estabilização, cada tensão de O₂ foi mantida por um período de 30 minutos antes de serem efetuadas as medidas e registros dos parâmetros acima citados. Os procedimentos de tomada de dados foram efetuados, em média, no intervalo de 5 minutos.

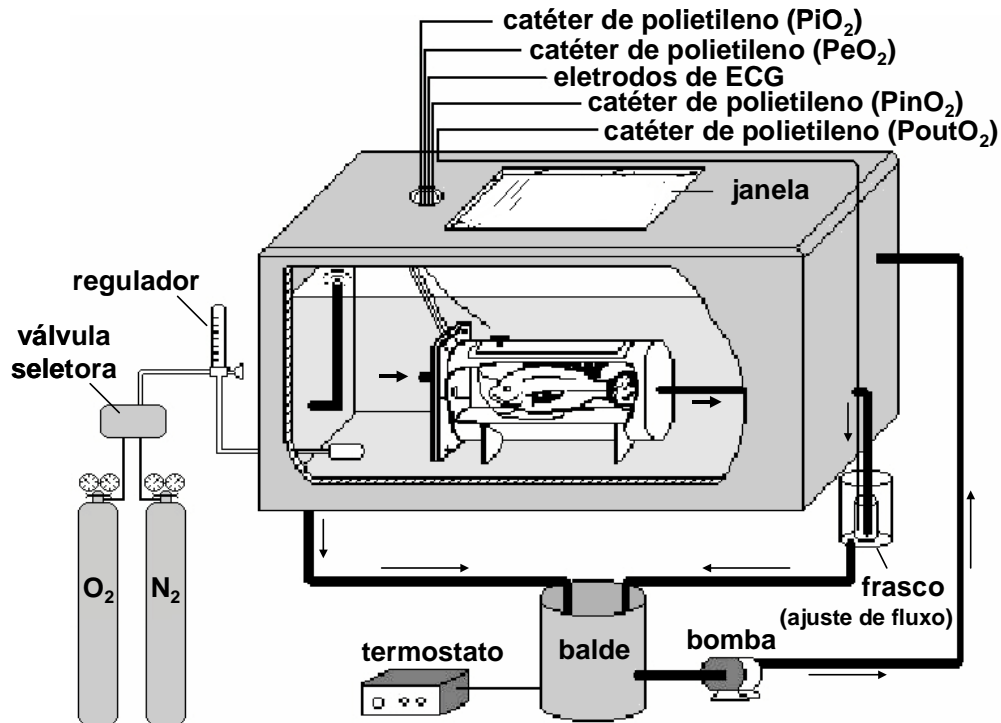


FIGURA 8. Esquema do sistema experimental utilizado nos experimentos *in vivo*.

As tensões de O_2 (mmHg) da água de entrada ($P_{in}O_2$ - mmHg) e de saída ($P_{out}O_2$ - mmHg) do respirômetro, bem como as tensões de O_2 da água inspirada (P_iO_2 - mmHg) e expirada (P_eO_2 - mmHg) pelos peixes foram continuamente monitoradas, conectando-se os cateteres de polietileno a um sistema consistindo de torneiras de 3 vias acopladas a eletrodos (FAC-001O₂, FAC, São Carlos, SP) de analisadores de O_2 (FAC-204A, FAC, São Carlos, SP).

A tomada de O_2 total ($\dot{V}O_2$) em cada uma das tensões de O_2 experimentais foi determinada por meio da equação proposta por Hughes *et al.* (1983):

$$\dot{V}O_2 = [(P_{in}O_2 - P_{out}O_2) \cdot \alpha_{O_2} \cdot V_R] \cdot Wt^{-1}, \text{ onde:}$$

α_{O_2} é o coeficiente de solubilidade do O_2 na água ($mlO_2 \cdot l^{-1} \cdot mmHg^{-1}$), V_R é o fluxo de água através do respirômetro ($L \cdot h^{-1}$) e Wt é o peso fresco do animal (Kg). Os valores de $\dot{V}O_2$ assim obtidos foram expressos em $mlO_2 \cdot kg^{-1} \cdot h^{-1}$.

Para a determinação da ventilação branquial (\dot{V}_G) foi empregado o método descrito por Saunders (1962) e calculada de acordo com Kalinin *et al.* (1996), por meio da expressão:

$$\dot{V}_G = [(P_{inO_2} - P_{outO_2}) / (P_{iO_2} - P_{eO_2}) \cdot V_R] \cdot Wt^{-1}, \text{ onde}$$

V_R é o fluxo de água através do respirômetro ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$). Os valores finais de \dot{V}_G foram expressos em $\text{mLH}_2\text{O} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$.

A frequência respiratória (f_R) foi determinada por meio da contagem do número de ciclos respiratórios por minuto, obtidos a partir da cânula implantada na boca do animal, conectada a um transdutor de pressão Narco P-1000B ligado a um acoplador Universal (Narco 7189) de um fisiógrafo Narco Narcotrace 40 (Narco Bio Systems, Houston, TX, USA).

O volume ventilatório, ou volume corrente (\dot{V}_T) em cada uma das tensões de O_2 experimentais foi calculado pelo quociente entre a ventilação branquial (\dot{V}_G) e a respectiva frequência respiratória e expresso em $\text{mLH}_2\text{O} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{ciclo respiratório}^{-1}$.

A necessidade ventilatória ($\dot{V}_G / \dot{V}O_2$), em cada uma das tensões de O_2 experimentais foi calculada pelo quociente entre a ventilação branquial (\dot{V}_G) e o respectivo valor de tomada de O_2 ($\dot{V}O_2$) e expressa em $\text{mLH}_2\text{O} \cdot \text{mLO}_2^{-1}$.

A extração de O_2 da corrente ventilatória (EO_2) pelas brânquias foi calculada a partir da equação $EO_2 = 100 \cdot (P_{iO_2} - P_{eO_2}) / P_{iO_2}$ e expressa em porcentagem (%).

A frequência cardíaca (f_H) foi obtida através da contagem do número de complexos QRS por minuto e expressa em bpm.

3.2.4. Análises estatísticas

Os seguintes procedimentos estatísticos foram adotados para a análise dos dados obtidos no presente estudo:

(a) Análise de variância (ANOVA), complementada pelo teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, para verificar a existência de possíveis variações significativas entre os valores de um mesmo protocolo experimental. As diferenças foram consideradas significativas quando valores de p foram menores que 0,05;

(b) Teste de Mann-Whitney, para verificar a ocorrência de possíveis diferenças estatísticas significativas entre pontos correspondentes de diferentes protocolos

experimentais. As diferenças foram consideradas significativas quando valores de p foram menores que 0,05 (GraphPad InStat, version 3.0).

4. RESULTADOS

Os valores médios do consumo de O_2 ($\dot{V}O_2$ - $mLO_2.kg^{-1}.h^{-1}$) de matrinxã, *B. amazonicus*, dos grupos controle (Ctrl) e expostos às diferentes formulações do Roundup (Original, WG e Transorb) frente às diferentes tensões de O_2 da água de entrada no respirômetro ($P_{in}O_2$) são apresentados na tabela 3 e representados graficamente nas Figuras de 9 a 12.

A $\dot{V}O_2$ do grupo Ctrl manteve-se constante até a $P_{in}O_2$ de 40 mmHg, com valor médio de $100,8 \pm 2,3 mLO_2.kg^{-1}.h^{-1}$. Somente na menor tensão de O_2 utilizada (20 mmHg) foi observada uma redução significativa dos valores de $\dot{V}O_2$, atingindo o valor mínimo de $58,5 \pm 4,3 mLO_2.kg^{-1}.h^{-1}$ (Tabela 3).

A tensão crítica de O_2 (P_cO_2) para este grupo experimental, calculada pela interseção das retas de regressão obtida pelo método descrito por RANTIN *et al.* (1992), abaixo da qual a $\dot{V}O_2$ deixa de ser independente do O_2 disponível e o animal não consegue mais regular eficientemente sua tomada de oxigênio do meio, foi de aproximadamente 35 mmHg. (Figura 9)

Não foram detectadas diferenças significativas entre os valores de $\dot{V}O_2$ obtidos entre 140 e 100 mmHg (valor médio de $224,3 \pm 3,3 mLO_2.kg^{-1}.h^{-1}$) no grupo Original (fig. 10). Entretanto, a P_cO_2 calculada para esse grupo experimental foi de aproximadamente 107 mmHg, como mostra a Figura 10. Os peixes desse grupo não suportaram tensões de O_2 abaixo de 40 mmHg, sendo que 2 peixes morreram e os demais se debateram constantemente no interior do respirômetro, inviabilizando a coleta dos parâmetros respiratórios. A $\dot{V}O_2$ na $P_{in}O_2$ de 40 mmHg foi de $78,5 \pm 13,6 mLO_2.kg^{-1}.h^{-1}$.

TABELA 3. Valores médios da tomada de O₂ total ($\dot{V}O_2$) de *B. amazonicus* dos grupos controle (n = 10) e expostos às diferentes formulações do Roundup: Original (n = 10); WG (n = 10) e Transorb (n = 10), submetidos a diferentes tensões de O₂ na água. Valores médios \pm 1 E.P.M. Os valores em negrito indicam diferenças significativas em relação aos valores obtidos em normóxia. As letras indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais numa mesma PinO₂: a - diferença em relação ao controle; b - diferença em relação ao Original; c - diferença em relação ao WG. p < 0,05.

PinO ₂ (mmHg)	$\dot{V}O_2$ (mLO ₂ .Kg ⁻¹ .h ⁻¹)			
	Ctrl	Original	WG	Transorb
140	109,1 \pm 6,9	233,7 \pm 3,2a	147,2 \pm 6,3ab	41,8 \pm 1,8abc
120	107,8 \pm 4,9	230,3 \pm 3,3a	132,1 \pm 11,4ab	42,3 \pm 2,3abc
100	100,4 \pm 7,1	209,0 \pm 3,0a	117,4 \pm 4,7b	39,3 \pm 2,1abc
80	96,2 \pm 4,8	145,4 \pm 10,3a	94,3 \pm 2,2b	34,8 \pm 4,0abc
60	96,4 \pm 3,4	102,2 \pm 12,2	70,4 \pm 9,5a	23,5 \pm 2,9abc
40	94,8 \pm 5,3	78,5 \pm 13,6	48,5 \pm 9,2a	16,8 \pm 1,5abc
20	58,5 \pm 4,3	-	-	-

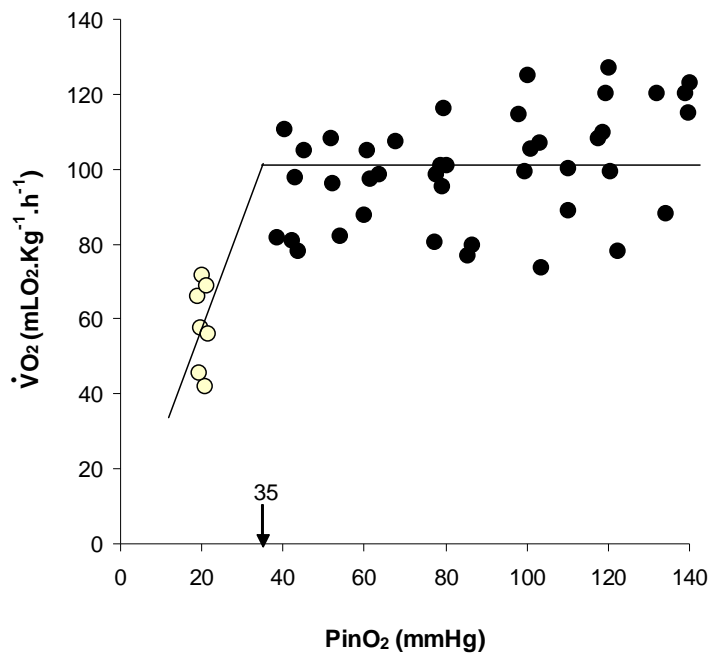


FIGURA 9. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ($P_{in}O_2$ – mmHg) sobre o consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$ – mL O₂.kg⁻¹.h⁻¹) de *B. amazonicus* do grupo controle (n = 10). Valores médios \pm 1 E.P.M. A seta representa a P_cO_2 . Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos (p < 0,05).

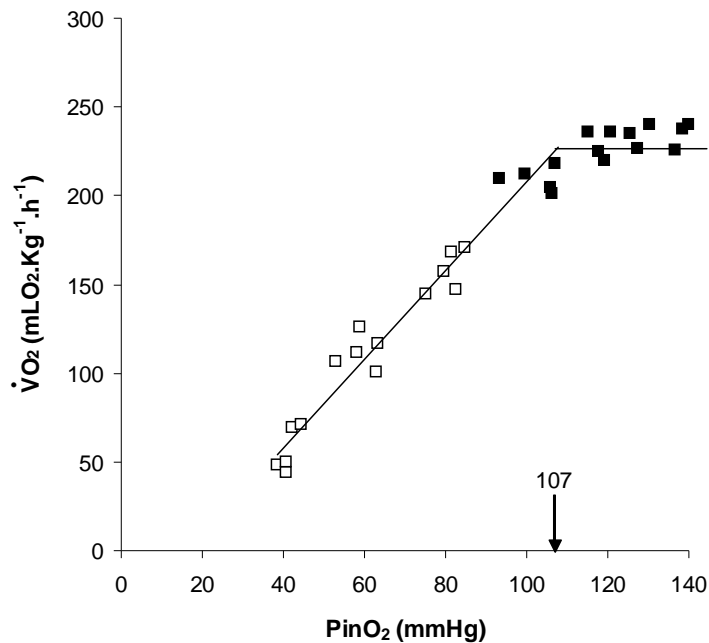


FIGURA 10. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ($P_{in}O_2$ – mmHg) sobre o consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$ – $mLO_2.kg^{-1}.h^{-1}$) de *B. amazonicus* expostos ao Roundup Original® ($n = 10$). Valores médios ± 1 E.P.M. A seta representa a P_cO_2 . Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos ($p < 0,05$)

No grupo WG, a $\dot{V}O_2$ foi mantida aproximadamente constante no intervalo de $P_{in}O_2$ compreendido entre 140 e 120 mmHg (valor médio de $132,2 \pm 5,2$ $mLO_2.kg^{-1}.h^{-1}$) e a P_cO_2 calculada para este grupo experimental foi de aproximadamente 114 mmHg, como mostra a Figura 11. Os peixes deste grupo não suportaram tensões de O_2 abaixo de 40 mmHg, sendo que 6 peixes morreram e os demais se debateram constantemente no interior do respirômetro, inviabilizando a coleta dos parâmetros cardio-respiratórios em $P_{in}O_2$ inferiores a esta. A $\dot{V}O_2$ na $P_{in}O_2$ de 40 mmHg foi de $48,5 \pm 9,2$ $mLO_2.kg^{-1}.h^{-1}$.

A $\dot{V}O_2$ do grupo exposto ao Roundup Transorb não apresentou diferenças significativas nas $P_{in}O_2$ compreendidas entre 140 e 100 mmHg (valor médio de $39,5 \pm 1,7$ $mLO_2.kg^{-1}.h^{-1}$), reduzindo-se em tensões de O_2 inferiores (Figura 12). A P_cO_2 calculada para este grupo experimental foi de aproximadamente 94 mmHg. Nenhum dos peixes testados resistiu a $P_{in}O_2$ inferiores a 40 mmHg. A $\dot{V}O_2$ na $P_{in}O_2$ de 40 mmHg foi de $16,8 \pm 1,5$ $mLO_2.kg^{-1}.h^{-1}$.

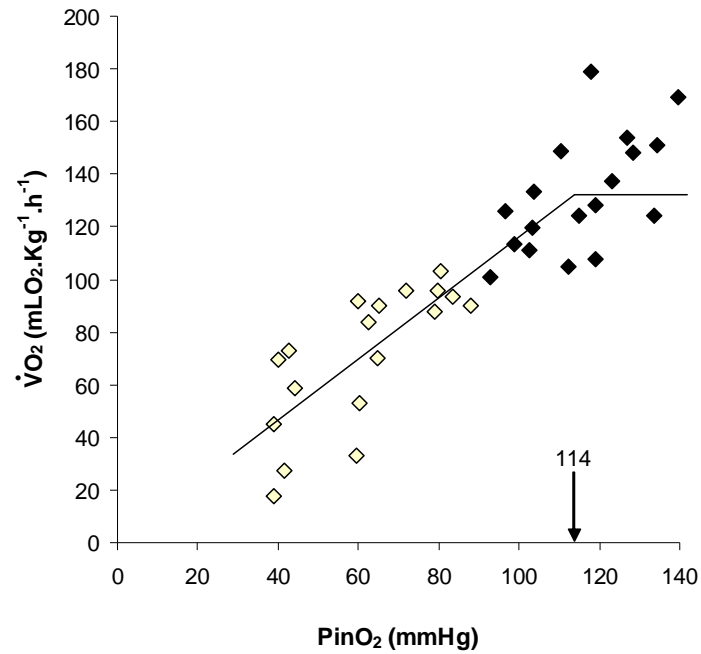


FIGURA 11. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro (P_{in}O₂ – mmHg) sobre o consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$ – mL O₂.kg⁻¹.h⁻¹) do grupo exposto ao Roundup WG (n = 10) de *B. amazonicus*. Valores médios \pm 1 E.P.M. A seta representa a P_cO₂. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos ($p < 0,05$)

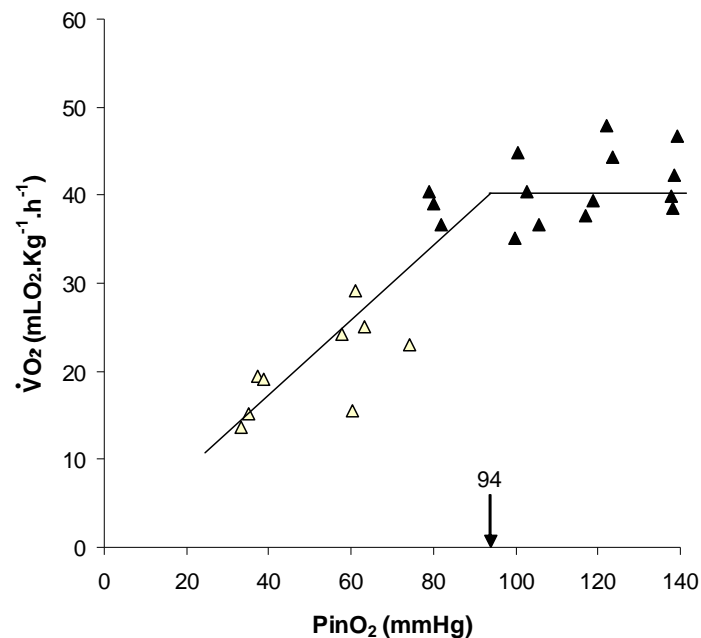


FIGURA 12. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro (P_{in}O₂ – mmHg) sobre o consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$ – mL O₂.kg⁻¹.h⁻¹) de *B. amazonicus* do grupo exposto ao Roundup TRANSORB (n = 10). Valores médios \pm 1 E.P.M. A seta representa a P_cO₂. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos ($p < 0,05$).

A comparação entre os grupos experimentais mostrou que os valores de $\dot{V}O_2$ do grupo Original foram significativamente superiores aos do grupo Ctrl nas $PinO_2$ compreendidas entre 140 e 80 mmHg.

Os valores de $\dot{V}O_2$ do grupo WG foram significativamente superiores aos do grupo Ctrl nas $PinO_2$ compreendidas entre 140 e 120 mmHg e entre 60 e 40 mmHg e significativamente superiores ao grupo Original nas tensões compreendidas entre 140 e 80 mmHg.

Os valores de $\dot{V}O_2$ do grupo Transorb foram significativamente inferiores aos apresentados pelos demais grupos experimentais em todas as $PinO_2$ testadas. As comparações dos valores de $\dot{V}O_2$ do grupo controle e dos grupos expostos às diferentes formulações de Roundup são apresentadas na figura 13.

Os valores médios da ventilação branquial (\dot{V}_G) em normóxia e durante a diminuição gradual da tensão de O_2 da água são apresentados na tabela 4 e representados graficamente nas Figuras 14, 15 e 16.

A \dot{V}_G do grupo Ctrl foi mantida constante desde normóxia até a $PinO_2$ de 80 mmHg ($\sim 786,3 \text{ mlH}_2\text{O.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) a partir da qual aumentos progressivos e significativos foram registrados, atingindo valores máximos a 20 mmHg ($2711,9 \pm 264,0 \text{ mlH}_2\text{O.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$).

No grupo exposto ao Roundup Original, a \dot{V}_G manteve-se constante de normóxia ($2139,8 \pm 191,2 \text{ mlH}_2\text{O.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$) até a tensão de O_2 de 100 mmHg, aumentando significativa e progressivamente nas tensões mais hipóxicas, atingindo valores máximos a 40 mmHg ($4674,5 \pm 470,9 \text{ mlH}_2\text{O.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$). Os valores de \dot{V}_G do grupo Original foram sempre significativamente superiores aos do grupo Ctrl em todas as tensões de O_2 testadas.

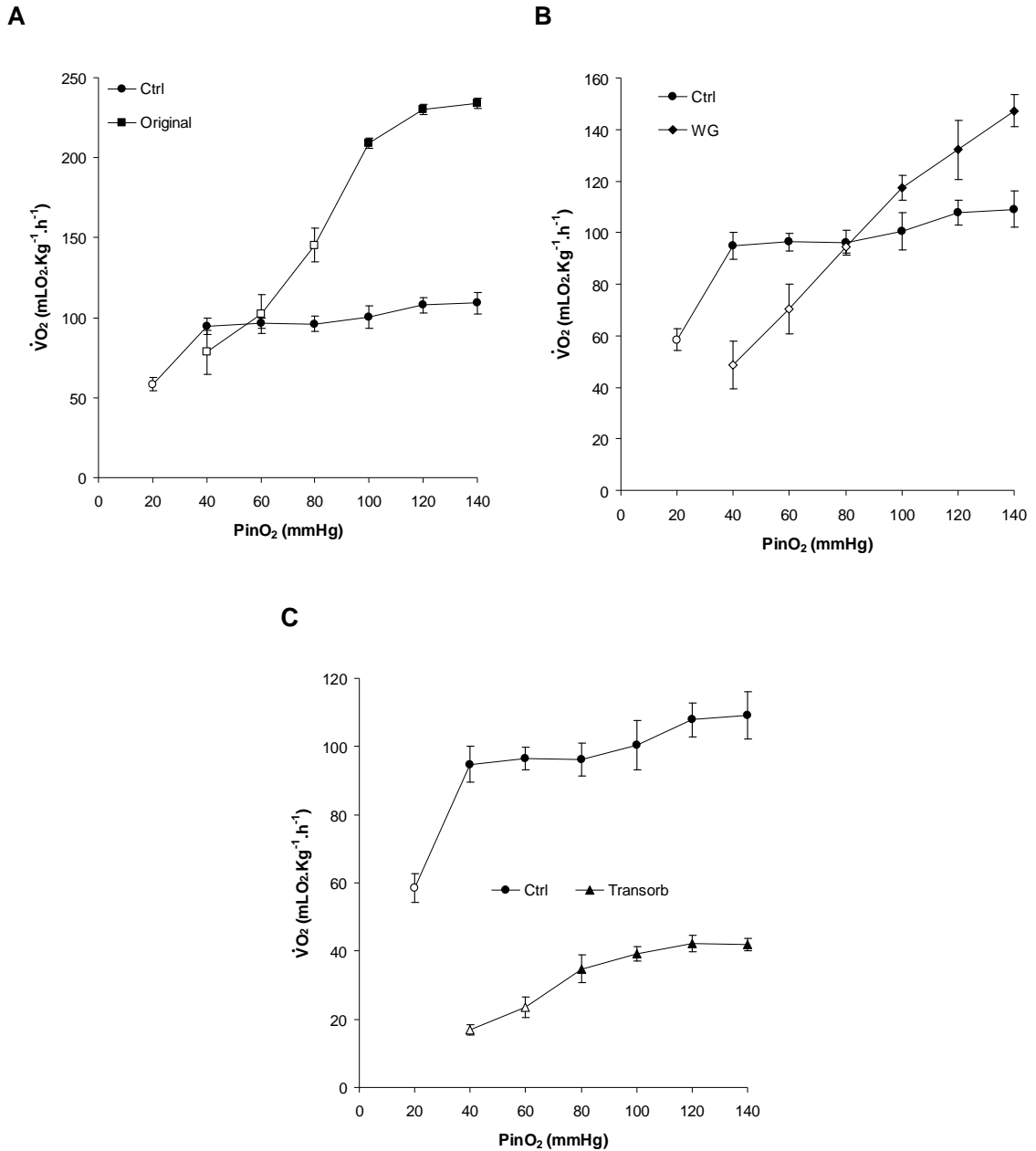


FIGURA 13. Comparação do efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro (P_{inO_2} – mmHg) sobre o consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$ – $mLO_2.kg^{-1}.h^{-1}$) de *B. amazonicus* do grupo controle e dos grupos exposto ao Roundup Original (A), WG (B) e Transorb (C). Valores médios \pm 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos ($p < 0,05$)

TABELA 4. Valores médios da ventilação branquial (\dot{V}_G) de *B. amazonicus* dos grupos controle (n = 10) e expostos às diferentes formulações do Roundup: Original (n = 10); WG (n = 10) e Transorb (n = 10), submetidos a diferentes tensões de O₂ na água. Valores médios \pm 1 E.P.M. Os valores em negrito indicam diferenças significativas em relação aos valores obtidos em normóxia. As letras indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais numa mesma PinO₂: a - diferença em relação ao controle; b - diferença em relação ao Original; c - diferença em relação ao WG. p < 0,05.

PinO ₂ (mmHg)	\dot{V}_G (mLH ₂ O.Kg ⁻¹ .min ⁻¹)			
	Ctrl	Original	WG	Transorb
140	475.1 \pm 54.5	1834.1 \pm 137.1a	658.4 \pm 27.6ab	802.4 \pm 51.0abc
120	533.3 \pm 68.3	2063.2 \pm 156.3a	1476.9 \pm 84.0ab	989.6 \pm 23.2abc
100	539.1 \pm 68.2	2531.4 \pm 450.1a	2069.4 \pm 87.5a	1257.8 \pm 71.5ab
80	786.3 \pm 172.8	3237.5 \pm 387.1a	2708.4 \pm 108.2a	1250.2 \pm 181.7ab
60	1148.6 \pm 260.3	4115.0 \pm 472.5a	1850.9 \pm 172.7ab	622.8 \pm 45.2abc
40	2113.6 \pm 170.3	4674.5 \pm 470.9a	1576.5 \pm 132.7ab	422.2 \pm 50.4abc
20	2711.9 \pm 264.0	-	-	-

A \dot{V}_G do grupo WG (Figura 15) aumentou progressiva e significativamente de 120 a 80 mmHg (de 1476,9 \pm 84,0 para 2708,4 \pm 108,2 mLH₂O.Kg⁻¹.min⁻¹), reduzindo-se nas tensões de 60 e 40 mmHg, mas não atingindo os valores normóxicos. Os valores de \dot{V}_G do grupo WG foram significativamente superiores aos do grupo Ctrl entre 60 e 120 mmHg e significativamente inferiores a estes na tensão de 40 mmHg e significativamente superiores aos do grupo Original nas tensões de 140, 120, 60 e 40 mmHg.

A \dot{V}_G do grupo Transorb (Figura 16) foi mantida constante desde normóxia até a PinO₂ de 120 mmHg (~989,6 mLH₂O.Kg⁻¹.min⁻¹) a partir da qual alterações progressivas e significativas foram registradas, atingindo valores máximos a 100 mmHg (1257,8 \pm 71,5 mLH₂O.Kg⁻¹.min⁻¹). A \dot{V}_G do grupo Transorb foi significativamente superior a dos grupos Ctrl e Original, a \dot{V}_G do grupo Transorb em todas as tensões de O₂ testadas. Quando comparada ao grupo WG, a \dot{V}_G do grupo Transorb mostrou-se significativamente superior na tensão de 140 mmHg e inferior nas tensões de 120, 60 e 40 mmHg.

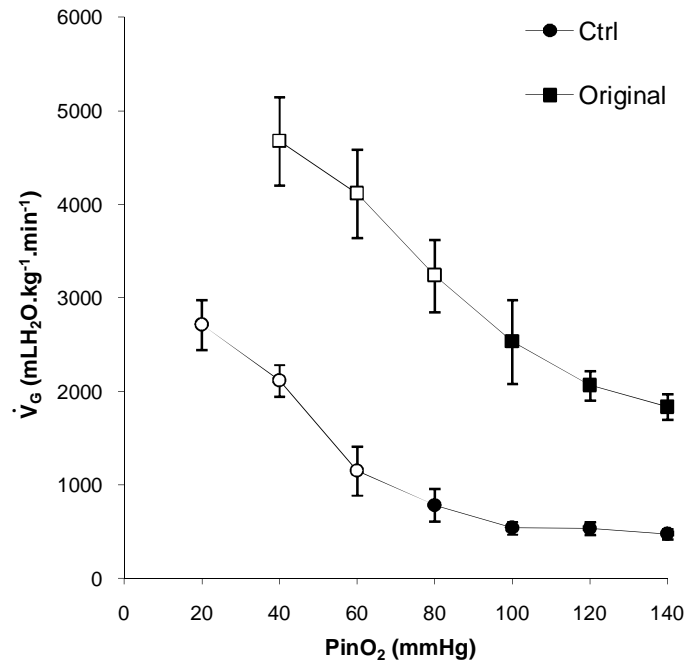


FIGURA 14. Efeito da redução gradual das tensões de O_2 da água de entrada do respirômetro ($P_{in}O_2$ – mmHg) sobre o consumo de O_2 (\dot{V}_G – mL.H₂O.kg⁻¹.min⁻¹) de *B. amazonicus* dos grupos controle e exposto ao Roundup Original ($n = 10$). Valores médios ± 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferença significativa em relação aos valores normóxicos ($p < 0,05$).

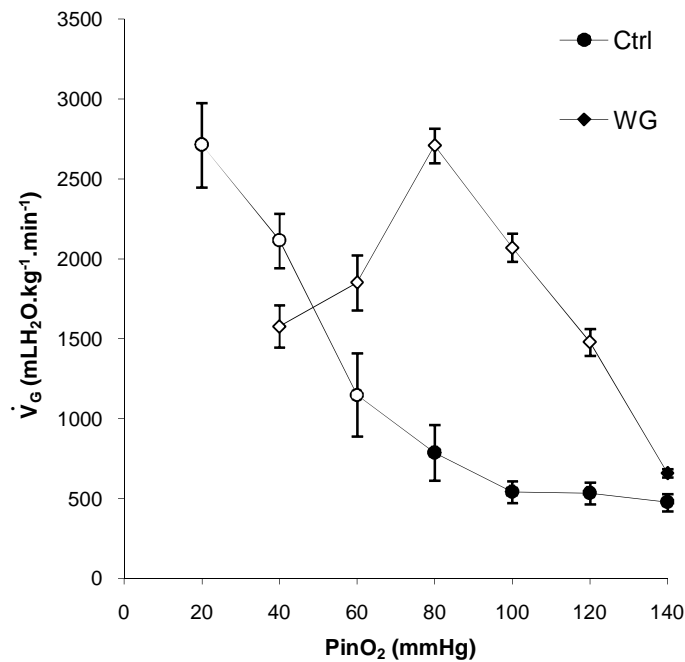


FIGURA 15. Efeito da redução gradual das tensões de O_2 da água de entrada do respirômetro ($P_{in}O_2$ – mmHg) sobre o consumo de O_2 (\dot{V}_G – mL.H₂O.kg⁻¹.min⁻¹) de *B. amazonicus* dos grupos controle e exposto ao Roundup WG[®] ($n = 10$). Valores médios ± 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferença significativa em relação aos valores normóxicos ($p < 0,05$).

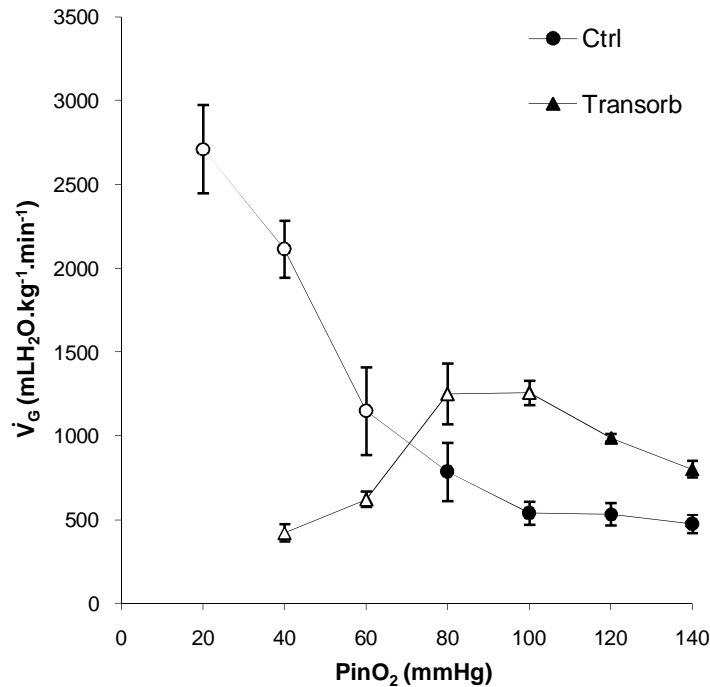


FIGURA 16. Efeito da redução gradual das tensões de O₂ da água de entrada do respirômetro (P_{in}O₂ – mmHg) sobre o consumo de O₂ (V_G – mL.H₂O.kg⁻¹.min⁻¹) de *B. amazonicus* dos grupos controle e exposto ao Roundup Transorb® (n = 10). Valores médios ± 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferença significativa em relação aos valores normóxicos (p < 0,05).

Os valores médios da frequência respiratória (f_R) em normóxia e durante a diminuição gradual das tensões de O₂ da água são apresentados na Tabela 5 e representados graficamente nas Figuras 17, 18 e 19.

A f_R obtida em normóxia foi de 79,4 ± 3,6, 73,8 ± 3,5, 81,0 ± 8,4 e 88,0 ± 7,5 ciclos respiratórios.min⁻¹ para os grupos Ctrl, Original, WG e Transorb, respectivamente. Esses valores se mantiveram constantes para Ctrl até 60 mmHg, então aumentaram significativamente, atingindo valores máximos a 20 mmHg (139,7 ± 2,9 ciclos respiratórios.min⁻¹).

No grupo Original a f_R se manteve constante até 100mmHg, atingindo valores máximos a 40mmHg (125,0 ± 5,4 ciclos respiratórios.min⁻¹). No grupo WG, a f_R manteve-se constante até 60mmHg e atingiu valores máximos (113,7 ± 6,3 ciclos respiratórios.min⁻¹) na P_{in}O₂ de 40 mmHg.

Já o grupo Transorb não apresentou alterações significativas na f_R em nenhuma das P_{iO_2} testadas ($\sim 92,1 \pm 11,3$ ciclos respiratórios. min^{-1}).

Não foram detectadas diferenças significativas entre os valores de f_R dos diferentes grupos experimentais.

TABELA 5. Valores médios da frequência respiratória (f_R) de *B. amazonicus* dos grupos controle ($n = 10$) e expostos às diferentes formulações do Roundup: Original ($n = 10$); WG ($n = 10$) e Transorb ($n = 10$), submetidos a diferentes tensões de O_2 na água. Valores médios ± 1 E.P.M. Os valores em negrito indicam diferenças significativas em relação aos valores obtidos em normóxia.

PinO₂ (mmHg)	f_R (ciclos respiratórios.min⁻¹)			
	Ctrl	Original	WG	Transorb
140	79.4 \pm 3.6	73.8 \pm 3.5	81.0 \pm 8.4	88.0 \pm 7.5
120	84.9 \pm 4.1	76.8 \pm 2.1	89.0 \pm 6.5	93.5 \pm 4.0
100	88.9 \pm 4.8	91.5 \pm 4.7	98.0 \pm 8.3	96.0 \pm 5.5
80	92.6 \pm 5.3	101.0 \pm 3.4	101.0 \pm 7.8	102.3 \pm 6.7
60	96.6 \pm 3.5	114.8 \pm 5.3	106.0 \pm 6.5	99.5 \pm 9.9
40	109.7 \pm 4.1	125.0 \pm 5.4	113.7 \pm 6.3	102.7 \pm 11.5
20	139.7 \pm 2.9	-	-	-

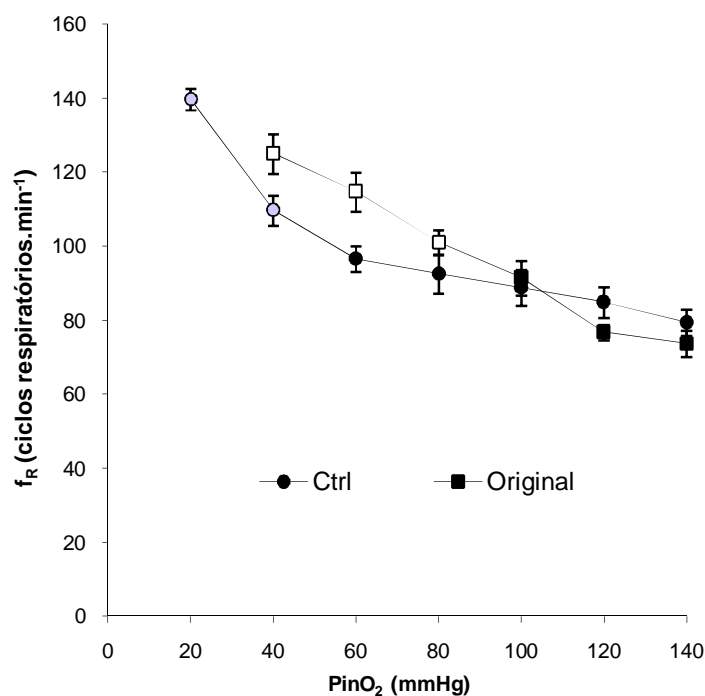


FIGURA 17. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ($P_{in}O_2$ – mmHg) sobre a frequência respiratória (f_R – ciclos respiratórios.min⁻¹) de *B. amazonicus* dos grupos controle e exposto ao Roundup Original®. Valores médios \pm 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos ($p < 0,05$).

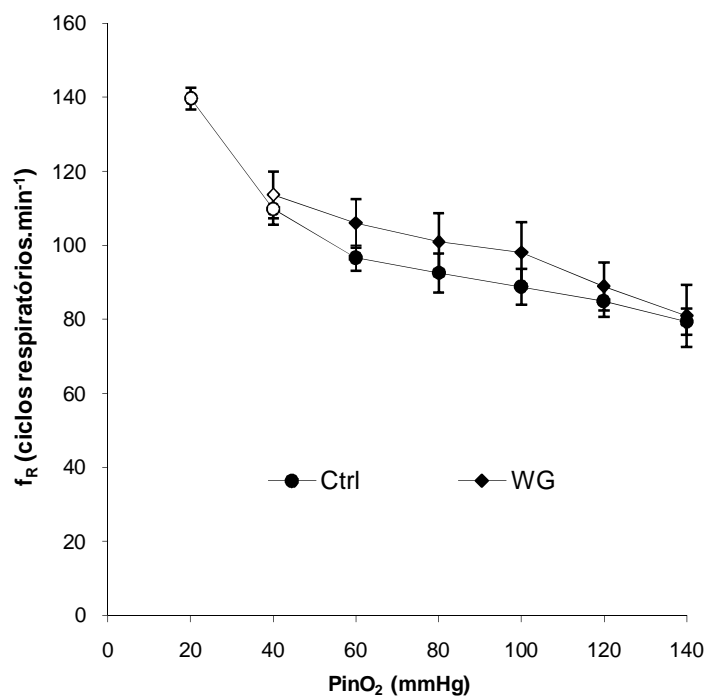


FIGURA 18. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ($P_{in}O_2$ – mmHg) sobre a frequência respiratória (f_R – ciclos respiratórios.min⁻¹) de *B. amazonicus* dos grupos controle e exposto ao Roundup WG®. Valores médios \pm 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos ($p < 0,05$).

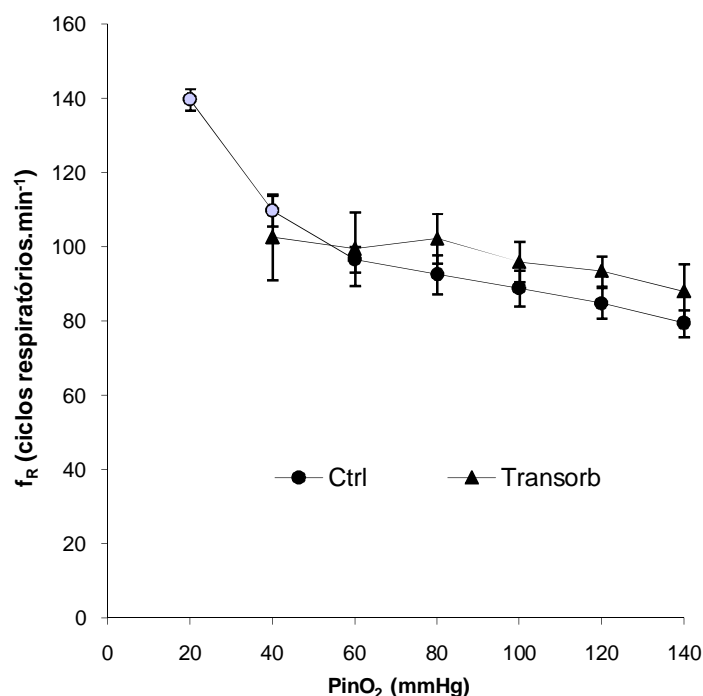


FIGURA 19. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ($P_{i\text{O}_2}$ – mmHg) sobre a frequência respiratória (f_R – ciclos respiratórios.min⁻¹) de *B. amazonicus* dos grupos controle e exposto ao Roundup Transorb[®]. Valores médios \pm 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos ($p < 0,05$).

Os valores médios do volume ventilatório (V_T) em normóxia e durante a diminuição gradual das tensões de O_2 da água inspirada são apresentados na Tabela 6 e representados graficamente nas Figuras 20, 21 e 22.

A redução da $P_{i\text{O}_2}$ provocou um aumento significativo do V_T do grupo Ctrl a partir de 40 mmHg (fig. 20). O valor de V_T observado em normóxia, de $7,0 \pm 1,8$ mlH₂O.kg⁻¹.ciclo respiratório⁻¹, aumentou para $19,7 \pm 1,9$ mlH₂O.kg⁻¹.ciclo respiratório⁻¹ na $P_{i\text{O}_2}$ de 20 mmHg, valor 2,8 vezes maior.

No grupo Original, o V_T aumentou a partir de 80 mmHg, apresentando valores máximos a 40 mmHg ($37,5 \pm 3,0$ mlH₂O.kg⁻¹.ciclo respiratório⁻¹), valor 1,5 vezes superior ao de normóxia ($25,2 \pm 2,9$ mlH₂O.kg⁻¹.ciclo respiratório⁻¹).

Como observado para a \dot{V}_G , a redução da $P_{i\text{O}_2}$ provocou aumentos progressivos e significativos do V_T do grupo WG entre 120 e 80 mmHg e redução do mesmo nas tensões de 60 e 40 mmHg (Fig. 21). O valor de V_T observado em normóxia foi de $8,5 \pm 0,8$ mlH₂O.kg⁻¹.ciclo respiratório⁻¹ e na $P_{i\text{O}_2}$ de 80 mmHg, aumentou 3,1 vezes, atingindo o valor máximo de $26,4 \pm 2,6$ mlH₂O.kg⁻¹.ciclo respiratório⁻¹.

Já no grupo Transorb, a redução da PinO_2 provocou aumentos significativos do V_T a partir de 100 mmHg (Figura 22). O valor de V_T observado em normóxia, de $9,3 \pm 0,8 \text{ mLH}_2\text{O.kg}^{-1}.\text{ciclo respiratório}^{-1}$, aumentou para $13,2 \pm 1,1 \text{ mLH}_2\text{O.kg}^{-1}.\text{ciclo respiratório}^{-1}$ na PinO_2 de 100 mmHg, valor 1,4 vezes maior que o obtido em normóxia. (Tabela 6)

TABELA 6. Valores médios do Volume ventilatório (V_T) de *B. amazonicus* dos grupos controle (n = 10) e expostos às diferentes formulações do Roundup: Original (n = 10); WG (n = 10) e Transorb (n = 10), submetidos a diferentes tensões de O_2 na água. Valores médios ± 1 E.P.M. Os valores em negrito indicam diferença significativa em relação aos valores obtidos em normóxia. As letras indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais numa mesma PinO_2 : a - diferença em relação ao controle; b - diferença em relação ao Original; c - diferença em relação ao WG. $p < 0,05$.

PinO_2 (mmHg)	V_T (mLH₂O.Kg⁻¹.ciclo respiratório⁻¹)			
	Ctrl	Original	WG	Transorb
140	7.0 ± 1.8	25.2 ± 2.9a	8.5 ± 0.8b	9.3 ± 0.8b
120	5.8 ± 0.7	26.9 ± 2.4a	16.7 ± 1.8ab	10.7 ± 0.6abc
100	6.2 ± 0.6	28.3 ± 3.4a	21.0 ± 1.4a	13.2 ± 1.1abc
80	8.9 ± 1.2	32.5 ± 3.0a	26.4 ± 2.6a	12.1 ± 1.4bc
60	11.3 ± 1.7	36.7 ± 4.2a	17.3 ± 1.6ab	6.4 ± 0.7abc
40	17.4 ± 1.4	37.5 ± 3.0a	13.9 ± 0.5b	4.5 ± 0.1abc
20	19.7 ± 1.9	-	-	-

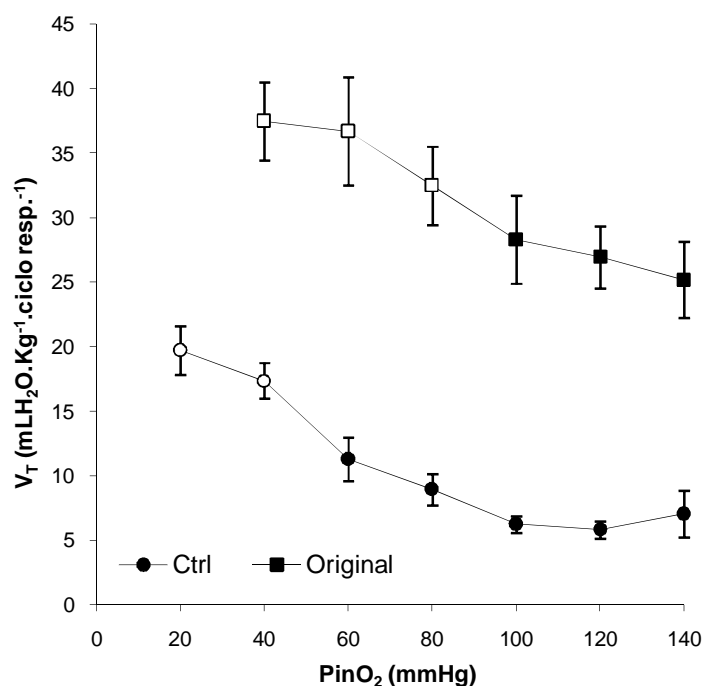


FIGURA 20. Efeito da redução gradual das tensões de O₂ da água de entrada do respirômetro (P_{in}O₂ – mmHg) sobre o volume ventilatório (V_T– mLH₂O.kg⁻¹.ciclo respiratório⁻¹) de *B. amazonicus* dos grupos controle e exposto ao Roundup Original® (n = 10). Valores médios ± 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos (p < 0,05).

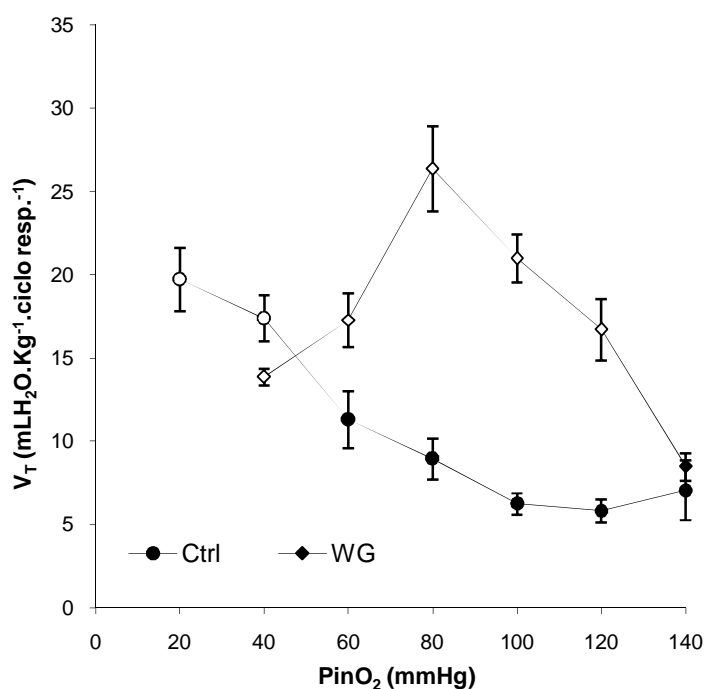


FIGURA 21. Efeito da redução gradual das tensões de O₂ da água de entrada do respirômetro (P_{in}O₂ – mmHg) sobre o volume ventilatório (V_T– mLH₂O.kg⁻¹.ciclo respiratório⁻¹) de *B. amazonicus* dos grupos Controle e exposto ao Roundup WG® (n = 10). Valores médios ± 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos (p < 0,05).

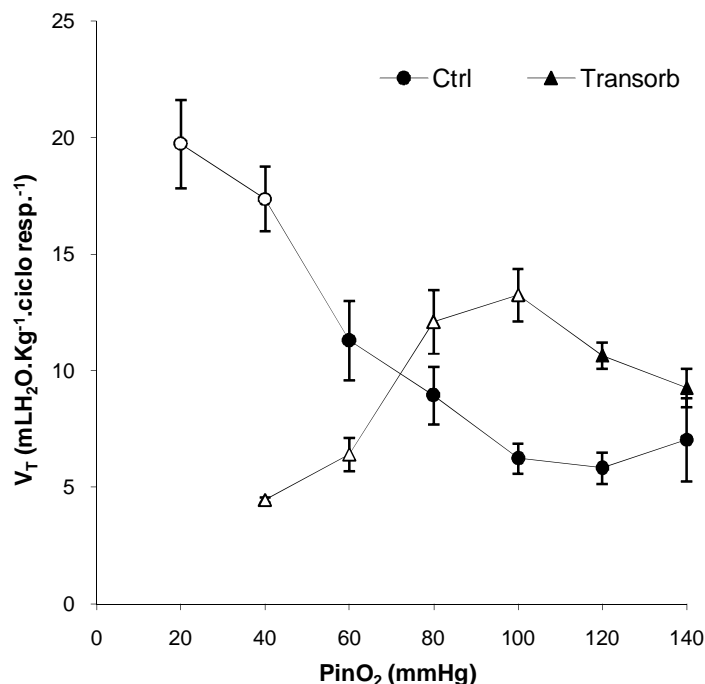


FIGURA 22. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro (P_{inO_2} – mmHg) sobre o volume ventilatório (V_T – mLH₂O.kg⁻¹.ciclo respiratório⁻¹) de *B. amazonicus* dos grupos controle e exposto ao Roundup Transorb[®] (n = 10). Valores médios \pm 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos ($p < 0,05$).

Os valores médios da necessidade ventilatória ($\dot{V}_G / \dot{V}O_2$) em normóxia e durante a diminuição gradual das tensões de O₂ da água inspirada são apresentados na Tabela 7 e representados graficamente nas Figuras 23, 24 e 25.

Houve um aumento significativo da $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ do grupo Ctrl a partir da P_{inO_2} de 60 mmHg, partindo do valor de $260,1 \pm 25,0$ mLH₂O.mlO₂⁻¹, em normóxia, até o valor máximo de $2863,2 \pm 318,7$ mLH₂O.mlO₂⁻¹, observado na menor P_{inO_2} experimental (20 mmHg).

A $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ do grupo Original aumentou significativamente a partir de 80 mmHg, com valores normóxicos de $466,8 \pm 37,7$ mLH₂O.mlO₂⁻¹ e atingindo $3944,4 \pm 261,6$ mLH₂O.mlO₂⁻¹ a 40 mmHg.

TABELA 7. Valores médios da necessidade ventilatória ($\dot{V}_G/\dot{V}O_2$) de *B. amazonicus* dos grupos controle (n = 10) e expostos às diferentes formulações do Roundup: Original (n = 10); WG (n = 10) e Transorb (n = 10), submetidos a diferentes tensões de O_2 na água. Valores médios \pm 1 E.P.M. Os valores em negrito indicam diferenças significativas em relação aos valores obtidos em normóxia. As letras indicam diferença significativa entre os grupos experimentais numa mesma $P_{in}O_2$: a - diferença em relação ao controle; b - diferença em relação ao Original; c - diferença em relação ao WG. $p < 0,05$.

$P_{in}O_2$ (mmHg)	$\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ (mLH ₂ O.mLO ₂ ⁻¹)			
	Ctrl	Original	WG	Transorb
140	260.1 \pm 25.0	466.8 \pm 37.7a	372.0 \pm 19.0	1156.4 \pm 89.6abc
120	305.7 \pm 51.2	530.2 \pm 39.8a	587.6 \pm 58.5a	1421.0 \pm 103.7abc
100	323.2 \pm 36.3	727.8 \pm 150.3a	639.1 \pm 52.6a	1951.0 \pm 199.7abc
80	479.2 \pm 89.4	1261.3 \pm 182.2a	1025.0 \pm 104.0a	2137.5 \pm 140.5abc
60	707.4 \pm 155.8	2813.2 \pm 239.5a	949.0 \pm 159.2b	1628.8 \pm 110.0abc
40	1355.1 \pm 115.5	3944.4 \pm 261.6a	901.6 \pm 118.3ab	1547.9 \pm 72.9bc
20	2863.2 \pm 318.7	-	-	-

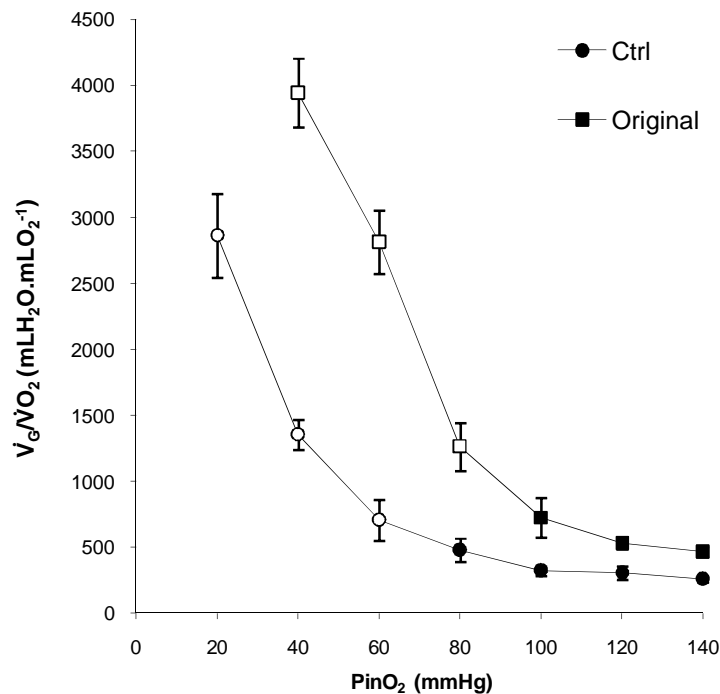


FIGURA 23. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ($P_{in}O_2$ – mmHg) sobre a necessidade ventilatória ($\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ - mLH₂O.mLO₂⁻¹) de *B. amazonicus* dos grupos controle e exposto ao Roundup Original® (n = 10). Valores médios \pm 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos ($p < 0,05$).

No grupo WG, houve um aumento significativo da $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ a partir da $P_{in}O_2$ de 120 mmHg, saltando do valor de $372,0 \pm 19,0$ mLH₂O.mLO₂⁻¹, observado em normóxia, até o valor máximo de $1025,0 \pm 104,0$ mLH₂O.mLO₂⁻¹, observado na $P_{in}O_2$ de 80 mmHg.

No grupo Transorb, aumentos significativos da $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ ocorreram a partir da $P_{in}O_2$ de 100 mmHg, passando do valor de $1156,4 \pm 89,6$ mLH₂O.mLO₂⁻¹, observado em normóxia, até o valor máximo de $2137,5 \pm 140,5$ mLH₂O.mLO₂⁻¹, observado na $P_{in}O_2$ de 80 mmHg.

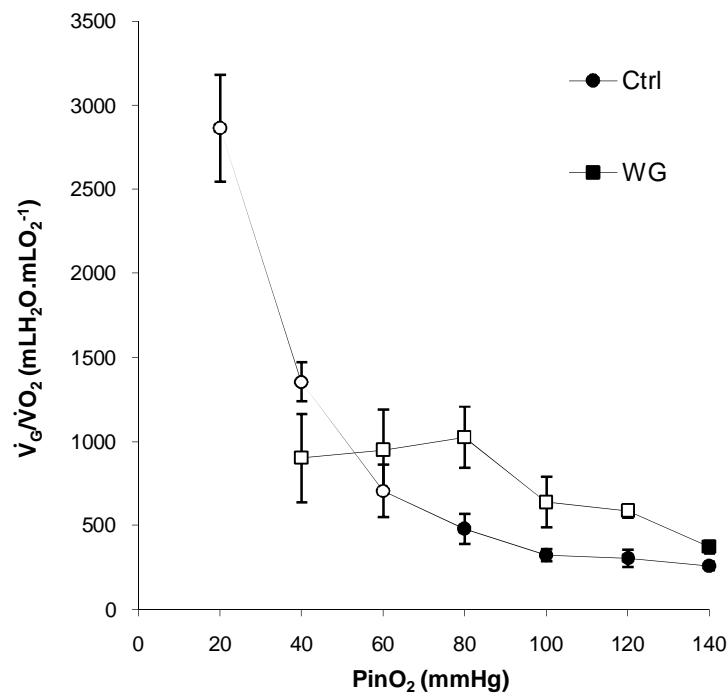


FIGURA 24. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ($P_{in}O_2$ - mmHg) sobre a necessidade ventilatória ($\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ - mLH₂O.mLO₂⁻¹) de *B. amazonicus* dos grupos controle e exposto ao Roundup WG[®] (n = 10). Valores médios \pm 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos ($p < 0,05$).

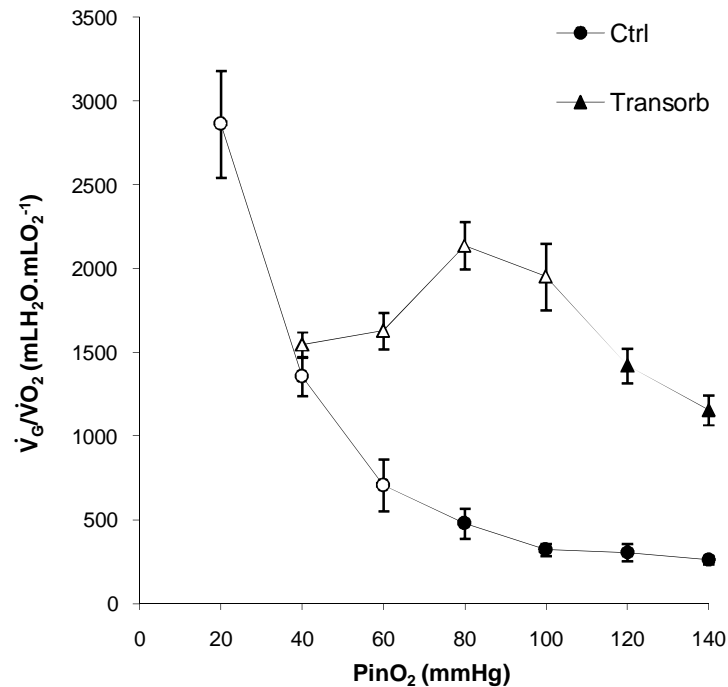


FIGURA 25. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ($P_{in}O_2$ – mmHg) sobre a necessidade ventilatória ($\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ – mLH₂O.mLO₂⁻¹) de *B. amazonicus* dos grupos controle e exposto ao Roundup Transorb® (n = 10). Valores médios \pm 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos (p < 0,05).

Os valores de $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ do grupo Original foram significativamente superiores aos de Ctrl no intervalo de $P_{in}O_2$ compreendido entre 120 e 40 mmHg. A $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ do grupo WG apresentou-se mais elevada que a do grupo Ctrl nas $P_{in}O_2$ de 120 a 80 mmHg, igualando-se a este grupo na $P_{in}O_2$ de 60 mmHg, sendo inferior a este a 40 mmHg. Os valores de $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ do grupo Transorb foram superiores aos de WG em todas as $P_{in}O_2$ experimentais e superiores aos de Ctrl entre 140 e 60 mmHg. Em relação ao grupo Original, a $\dot{V}_G/\dot{V}O_2$ do grupo Transorb foi mais elevada de 140 a 80 mmHg e inferior nas tensões de O₂ mais hipóxicas.

Os valores médios da extração de O₂ (EO₂) em normóxia e durante a diminuição gradual das tensões de O₂ da água inspirada são apresentados na Tabela 8 e representados graficamente nas Figuras 26, 27 e 28.

A EO₂ do grupo Ctrl manteve-se constante, em torno de 50 %, no intervalo de $P_{in}O_2$ compreendido entre 140 e 60 mmHg, reduzindo-se nas tensões de O₂ inferiores, atingindo seu valor mínimo, de $42,6 \pm 3,9$ %, a 20 mmHg. (Tabela 8)

TABELA 8. Valores médios da extração de O₂ da corrente ventilatória (EO₂) de *B. amazonicus* dos grupos controle (n = 10) e expostos às diferentes formulações do Roundup: Original (n = 10); WG (n = 10) e Transorb (n = 10), submetidos a diferentes tensões de O₂ na água. Valores médios ± 1 E.P.M. Os valores em negrito indicam diferenças significativas em relação aos valores obtidos em normóxia. As letras indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais numa mesma PinO₂: a - diferença em relação ao controle; b - diferença em relação ao Original; c - diferença em relação ao WG. p < 0,05.

PinO ₂ (mmHg)	EO ₂ (%)			
	Ctrl	Original	WG	Transorb
140	58.4 ± 2.8	47.0 ± 3.1	37.8 ± 1.5ab	12.1 ± 0.6abc
120	63.8 ± 3.1	44.5 ± 3.5a	32.6 ± 1.5ab	12.5 ± 1.2abc
100	62.8 ± 3.6	38.0 ± 4.6a	33.3 ± 2.2a	12.0 ± 1.2abc
80	57.3 ± 3.1	33.1 ± 4.5a	28.0 ± 1.3a	16.2 ± 2.0abc
60	57.1 ± 3.7	33.0 ± 3.9a	29.1 ± 2.1a	14.9 ± 0.9abc
40	47.3 ± 1.6	31.0 ± 4.2a	32.6 ± 4.1a	15.0 ± 0.5abc
20	42.6 ± 3.9	-	-	-

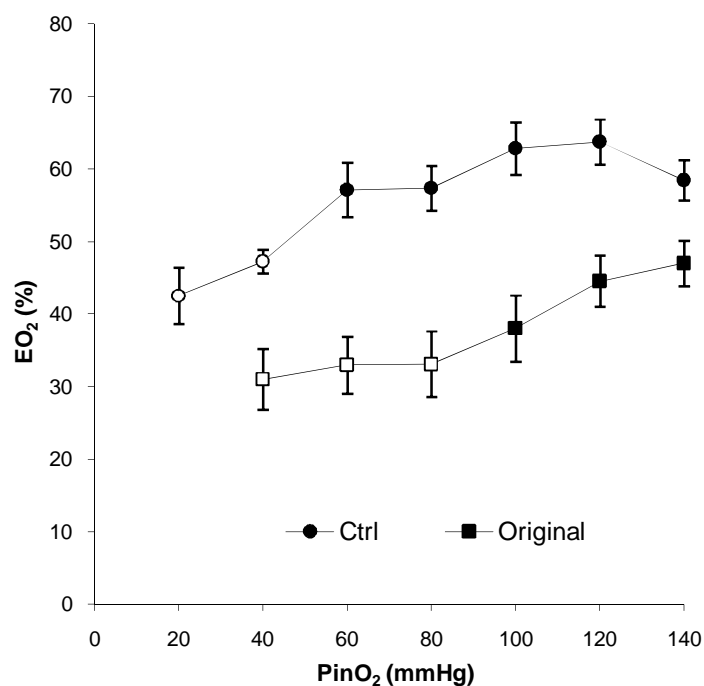


FIGURA 26. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro (P_{in}O₂ – mmHg) sobre a extração de O₂ da corrente ventilatória (EO₂ - %) de *B. amazonicus* dos grupos controle e exposto ao Roundup Transorb® (n = 10). Valores médios ± 1 E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos (p < 0,05).

No grupo Original, houve redução significativa da EO_2 em relação aos valores em normóxia ($47,0 \pm 3,1$ %) a partir da $P_{in}O_2$ de 80 mmHg, atingindo o valor mínimo de $31,0 \pm 4,2$ % na $P_{in}O_2$ de 40 mmHg.

Os valores de EO_2 do grupo WG mantiveram-se constantes, em torno de 32 %, em todas as $P_{in}O_2$ analisadas. A mesma tendência foi observada para o grupo Transorb, que apresentou valores de EO_2 em torno de 14%.

A EO_2 do grupo Original foi significativamente inferior à apresentada pelo grupo Ctrl entre 120 e 40 mmHg enquanto que o grupo WG apresentou valores de EO_2 inferiores aos do grupo Ctrl em todas as $P_{in}O_2$ experimentais. A EO_2 de WG só foi inferior à de Original em 140 e 120 mmHg.

Já o grupo Transorb apresentou valores de EO_2 inferiores aos demais grupos em todas as $P_{in}O_2$ experimentais.

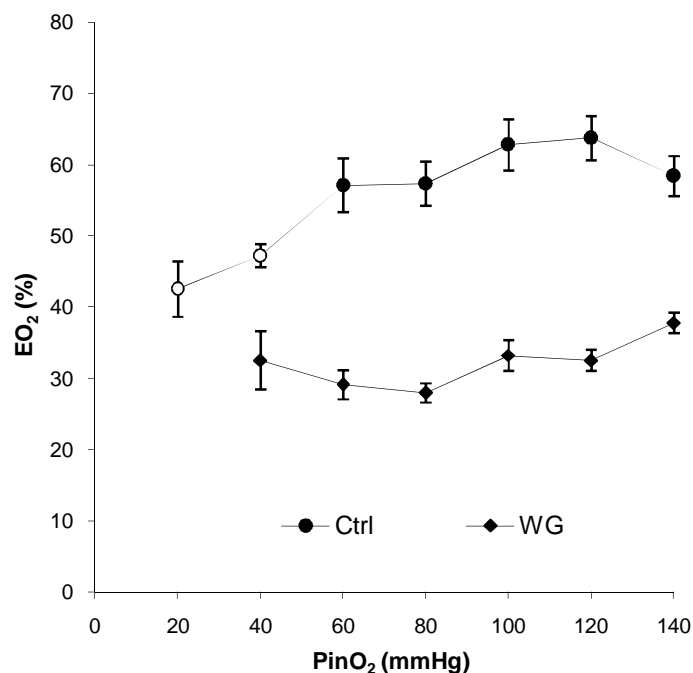


FIGURA 27. Efeito da redução gradual das tensões de O_2 da água de entrada do respirômetro ($P_{in}O_2$ - mmHg) sobre a extração de O_2 da corrente ventilatória (EO_2 - %) de *B. amazonicus* dos grupos controle e exposto ao Roundup WG[®] (n = 10). Valores médios \pm E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos ($p < 0,05$).

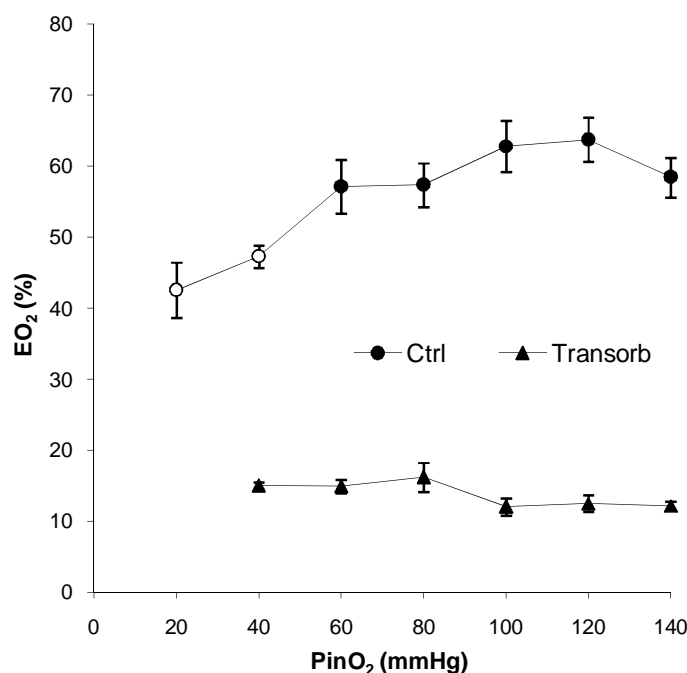


FIGURA 28. Efeito da redução gradual das tensões de O₂ da água de entrada do respirômetro (P_{in}O₂ – mmHg) sobre a extração de O₂ da corrente ventilatória (EO₂ - %) de *B. amazonicus* dos grupos controle e exposto ao Roundup Transorb® (n = 10). Valores médios ± E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos (p < 0,05).

Os valores médios de frequência cardíaca (f_H) em normóxia e durante a diminuição gradual das tensões de O₂ da água inspirada são apresentados na Tabela 9 e representados graficamente na Figura 29.

A f_H do grupo Ctrl manteve-se constante, em torno de 60 bpm, de 140 a 60 mmHg, reduzindo-se significativamente nas PinO₂ inferiores, atingindo o valor mínimo de 31.3 ± 1.6 bpm a 20 mmHg.

Os grupos Original e WG não apresentaram alterações significativas na f_H, que mantiveram valores em torno de 107 e 43 bpm, respectivamente, em todas as PinO₂ experimentais.

O grupo Transorb manteve a f_H constante, em torno de 48 bpm, entre 140 e 100 mmHg, tensão a partir da qual a f_H reduziu-se progressiva e significativamente, atingindo valores mínimos a 40 mmHg (25.3 ± 2.6 bpm).

TABELA 9. Valores médios da frequência cardíaca (f_H) de *B. amazonicus* dos grupos controle (n = 10) e expostos às diferentes formulações do Roundup: Original (n = 10); WG (n = 10) e Transorb (n = 10), submetidos a diferentes tensões de O_2 na água. Valores médios \pm 1 E.P.M. Os valores em negrito indicam diferenças significativas em relação aos valores obtidos em normóxia. As letras indicam diferenças significativas entre os grupos experimentais numa mesma $P_{in}O_2$: a - diferença em relação ao controle; b - diferença em relação ao Original; c - diferença em relação ao WG. $p < 0,05$.

$P_{in}O_2$ (mmHg)	f_H (bpm)			
	Ctrl	Original	WG	Transorb
140	63.1 \pm 1.9	101.5 \pm 11.1a	49.2 \pm 4.0ab	48.0 \pm 4.2ab
120	61.8 \pm 2.2	100.5 \pm 10.2a	49.2 \pm 4.4ab	48.0 \pm 4.2ab
100	61.1 \pm 2.6	102.8 \pm 9.2a	43.2 \pm 2.2ab	48.0 \pm 4.2ab
80	59.3 \pm 2.3	108,0 \pm 9.5a	39.6 \pm 3.1ab	40.0 \pm 3.9ab
60	53.6 \pm 2.7	115.5 \pm 9.3a	38.4 \pm 3.1ab	31.8 \pm 4.9ab
40	39.8 \pm 2.1	114,0 \pm 9.5a	38.4 \pm 3.1b	25.3 \pm 2.6abc
20	31.3 \pm 1.6	-	-	-

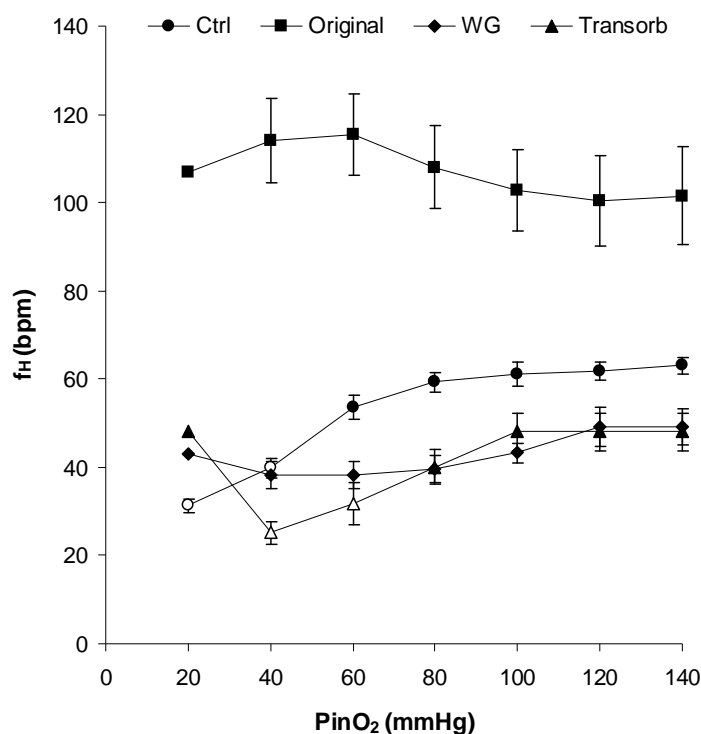


FIGURA 29. Efeito da redução gradual das tensões de oxigênio da água de entrada do respirômetro ($P_{in}O_2$ – mmHg) sobre a frequência cardíaca (f_H – bpm) de *B. amazonicus* dos grupos controle e expostos às diferentes formulações do Roundup: Original (n = 10); WG (n = 10) e Transorb (n = 10). Valores médios \pm E.P.M. Símbolos brancos indicam diferenças significativas em relação aos valores normóxicos ($p < 0,05$).

A f_H do grupo Original foi superior à do controle em todas as P_{inO_2} experimentais, já as f_H medidas no grupo WG foram significativamente inferiores às do grupo controle nas tensões entre 140 e 60 mmHg e significativamente inferiores às do grupo Original em todas as tensões medidas. As f_H do grupo Transorb no entanto, mostraram-se menores que as dos grupos Ctrl e Original em todas as tensões medidas e menores que as do Grupo WG apenas na tensão de 40mmHg.

5. DISCUSSÃO

O consumo de oxigênio ($\dot{V}O_2$ - $\text{mlO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) de *Brycon amazonicus* mostrou-se independente da concentração de O_2 no meio, característica de uma espécie oxirreguladora, capaz de manter a $\dot{V}O_2$ constante em torno de $100,8 \text{ mlO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ até a tensão de O_2 na água de aproximadamente 35 mmHg. Nas $P_{\text{in}O_2}$ inferiores, essa espécie não foi capaz de manter a $\dot{V}O_2$, tornando-se dependente da concentração de O_2 na água. Isso mostra uma redução gradual na eficiência dos mecanismos envolvidos na captação de O_2 pelas brânquias e na difusão do gás para os tecidos.

A $\dot{V}O_2$ em normóxia de *B. amazonicus* foi próxima à verificada para o dourado, *Salminus maxillosus*, ($100 \text{ mlO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, SOUZA *et al.*, 2001) e superior à do pacú, *Piaractus mesopotamicus* ($72 \text{ mlO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; GUERRA, 1992), do tambaqui, *Colosoma macropomum* ($78 \text{ mlO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; CORRÊA, 1996), e do curimatá, *Prochilodus scrofa* ($90 \text{ mlO}_2 \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; FERNANDES *et al.*, 1995) espécies consideradas ativas. Entretanto, duas espécies muito ativas de atuns (*Katsuwonus pelamis* e *Thunnus albacares*), apresentaram altos valores de $\dot{V}O_2$ (BUSHNELL & BRILL, 1992). Considerando-se que *B. amazonicus* é uma espécie ativa, migratória, encontrada em ambientes de águas rápidas e bem oxigenadas, a forma com que regula a $\dot{V}O_2$ se assemelha ao que é observado em espécies com características semelhantes.

A $P_{\text{c}O_2}$ calculada para *B. amazonicus* (35 mmHg) é semelhante à encontrada para espécies ativas como o "black-bass", *Micropterus salmoides* ($P_{\text{c}O_2} = 40 \text{ mmHg}$) (CECH *et al.*, 1979). Ao ser comparado a serrasalmídeos tropicais como o tambaqui ($P_{\text{c}O_2} = 24 \text{ mmHg}$), o pacú ($P_{\text{c}O_2} = 30 \text{ mmHg}$) e com o curimatá ($P_{\text{c}O_2} = 21,9 \text{ mmHg}$), observa-se que os valores de $P_{\text{c}O_2}$ desses animais são inferiores aos encontrados para matrinxã no presente estudo (GUERRA, 1992; FERNANDES *et al.*, 1995; CORRÊA, 1996, respectivamente). Espécies que vivem em ambientes pobres em oxigênio, como a traíra e a carpa (*Cyprinus carpio*), apresentaram uma $P_{\text{c}O_2}$ em torno de 19 mmHg (KALININ, 1991; OTT *et al.*, 1980), valor nitidamente mais baixo do que o observado para *B. amazonicus*. Segundo Fernandes & Rantin (1989), as espécies tropicais estão mais sujeitas à hipóxia ambiental e os baixos valores de $P_{\text{c}O_2}$ podem representar uma vantagem adaptativa, permitindo uma maior capacidade de regular a tomada de O_2 do

meio. Dessa maneira, o alto valor da P_cO_2 observado em *B. amazonicus* parece refletir o hábito e o *habitat* dessa espécie, sugerindo uma incapacidade em manter a $\dot{V}O_2$ em ambientes com baixas tensões de O_2 .

A exposição às diversas formulações do Roundup aumentou significativamente a P_cO_2 , de cerca de 35 para aproximadamente 107 mmHg no Grupo Original, aproximadamente 114 mmHg no Grupo WG e aproximadamente 94 mm Hg no Grupo Transorb, reduzindo a capacidade de manter a tomada de O_2 constante e a $\dot{V}O_2$ da espécie que passou a ser dependente da concentração de O_2 do meio em tensões de O_2 mais elevadas, reduzindo sua capacidade de sobrevivência em ambientes hipóxicos.

Jiraungkoorskul *et al.* (2003) expuseram exemplares de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*) a concentrações subletais (5 e 15 ppm) de Roundup e verificaram uma série de efeitos adversos, tanto histológicos quanto bioquímicos, em diversos órgãos. Nas brânquias, tais modificações incluíram proliferação das células dos filamentos branquiais, fusão lamelar, descolamento do epitélio e aneurismas. Segundo estes autores, estas lesões estruturais podem estar relacionadas ao significativo aumento nas atividades das enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e fosfatases alcalinas, que ocorreram ao longo do período de exposição.

Neskovic *et al.* (1996) relataram que concentrações subletais de glifosato causaram danos às brânquias de carpa. De acordo com esses autores, essas alterações causam desequilíbrio osmótico e iônico, aumento da distância de difusão água-sangue e redução da capacidade de difusão do O_2 , além de redução da perfusão dos filamentos branquiais e das lamelas secundárias, reduzindo drasticamente a eficiência das trocas gasosas.

Olurin *et al.* (2006) mostraram que, em concentrações de 0,05% v/v e 0,1% v/v de glifosato, as brânquias de *Clarias gariepinus* exibiram alterações do epitélio branquial, com fusão na lamela secundária, hiperplasia, descolamento do epitélio, redução do tamanho, edema e posterior necrose, sendo que a hiperplasia pode inibir as funções respiratórias, de secreção e de excreção das brânquias.

Se tais alterações também tiverem ocorrido em *B. amazonicus*, explicariam os menores valores de $\dot{V}O_2$ em hipóxia severa e os maiores valores de P_cO_2 para os animais expostos às diferentes formulações de Roundup.

A \dot{V}_G de *B. amazonicus* em normóxia, determinada no presente estudo, foi semelhante à encontrada para outras espécies estudadas nas mesmas condições, como pacu (546 mlH₂O.kg⁻¹.min⁻¹; GUERRA, 1992), curimatá (451 mlH₂O.kg⁻¹.min⁻¹; FERNANDES *et al.*, 1995), tambaqui (313 mlH₂O.kg⁻¹.min⁻¹; CORRÊA, 1996) e menor do que a encontrada para o cascudo *Hypostomus regani* (913 mlH₂O.kg⁻¹.min⁻¹; MATTIAS, 1994) e para o dourado (914 mlH₂O.kg⁻¹.min⁻¹; SOUZA *et al.*, 2001), espécies que habitam águas rápidas e bem oxigenadas.

De acordo com Dejours (1981), a manutenção da tomada de O₂ constante, quando a concentração de O₂ do meio declina, só é possível se ocorrer um aumento na ventilação branquial e/ou na extração de O₂ da corrente ventilatória (EO₂). Como a capacidade de aumento na EO₂ é muito limitada em peixes, o aumento na \dot{V}_G é necessário para a manutenção da $\dot{V}O_2$ (KALININ, 1996).

Durante a hipóxia gradual, a \dot{V}_G de *B. amazonicus* aumentou 5,7 vezes de normóxia a 20 mmHg (menor P_{in}O₂ estudada). Bushnell & Brill (1992) observaram aumentos significativos da \dot{V}_G de *K. pelamis* e *T. albacares* quando compararam seus valores em normóxia e após a exposição à hipóxia moderada. Aumentos na \dot{V}_G durante hipóxia gradual também foram verificados para outras espécies de peixes tropicais ativos. O Tambaqui foi capaz de aumentar a \dot{V}_G em 10,9 vezes (CORRÊA, 1996), Curimatá, 12 vezes (FERNANDES *et al.*, 1995) e *Hoplias lacerdae*, 8,5 vezes (KALININ *et al.*, 1996). A comparação desses resultados com os obtidos neste estudo sugere que *B. amazonicus* tem uma reduzida capacidade de elevação da \dot{V}_G , ao contrário das espécies consideradas resistentes à hipóxia e que apresentam maior capacidade de aumento da \dot{V}_G . Porém, em seu ambiente natural, *B. amazonicus* pode lançar mão da chamada *ram ventilation*, que consiste na passagem forçada de água pelas brânquias, posicionando-se contra a corrente, ou nadando com a boca parcialmente aberta, o que melhoraria a eficiência da ventilação a um menor custo energético (RANDALL, 1982).

A exposição ao Roundup fez com que a magnitude do aumento da \dot{V}_G em resposta à hipóxia fosse menor (2,5 vezes no Grupo Original, 2,4 vezes no Grupo WG e 0,5 vezes no Grupo Transorb) que aquela apresentada pelo grupo Ctrl, reforçando a

hipótese de prejuízo à função respiratória causado pelos herbicidas. Adicionalmente, a formulação Transorb parece ter um efeito mais pronunciado, uma vez que foi a que causou a maior perda de capacidade de aumento da \dot{V}_G em hipóxia.

Durante a exposição gradual à hipóxia, o aumento de 5,7 vezes da \dot{V}_G observado em *B. amazonicus* é devido, primariamente, ao aumento de 2,8 vezes no V_T , enquanto que a f_R aumenta 1,7 vezes. Esta resposta aparece diminuída nos animais expostos ao Roundup Original, onde o aumento da \dot{V}_G de 2,8 vezes tem os aumentos da V_T , de 1,5 vezes e o da f_R de 1,7 vezes como pequenas contribuições. No Grupo WG os aumentos de 1,4 vezes da f_R e de 1,6 no V_T , mostram uma baixa contribuição do volume de água bombeado a cada ciclo respiratório no aumento da V_G , enquanto que no Grupo Transorb houve aumento 1,2 vezes na f_R e a diminuição à metade no V_T , principal responsável pela queda no valor da V_G .

Entre as diversas espécies de teleósteos estudadas, observam-se diferentes estratégias para acionar a hiperventilação em resposta à hipóxia. Em carpa e em *Lepomis macrochirus*, o aumento da \dot{V}_G é devido à maior elevação da f_R do que no V_T (Marvin & Heat, 1968; Lomholt & Johansen, 1979). Em *O. niloticus*, o aumento da \dot{V}_G ocorre com a elevação simultânea da f_R e do V_T (Fernandes & Rantin, 1989).

Apesar da diversidade de estratégias entre as espécies, a resposta mais comumente observada em teleósteos é a hiperventilação através de um maior aumento do V_T do que da f_R , sendo essa a estratégia usada pelo *B. amazonicus* do grupo Ctrl no presente estudo. Já nos grupos expostos ao Roundup Original e ao Roundup WG, a responsabilidade do aumento da V_G ficou igualmente dividida entre a f_R e o V_T . Tal padrão de resposta parece estar relacionado à vantagem representada pelo menor custo energético da elevação da \dot{V}_G através de um maior aumento do V_T do que na f_R . Segundo Rantin *et al.* (1992), a utilização dessa estratégia baseia-se no baixo custo para a manutenção da velocidade e constância da contração muscular, enquanto que uma alta frequência de contração é limitada pelo trabalho muscular contra uma alta viscosidade da água ventilada.

Medidas da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE), presente em sinapses colinérgicas e nas placas motoras, têm sido utilizadas por diversos autores como um

biomarcador de efeitos de inseticidas como o carbamato e os organofosforados em vertebrados, incluindo peixes (CHUIKO, 2000; DE LA TORRE *et al.*, 2002; FERNANDEZ-VEGA *et al.*, 2002; DUTTA & ARENDS, 2003). Vários trabalhos indicaram que a exposição ao Roundup reduz significativamente a atividade da AChE em vários tecidos, incluindo o músculo branco e o cérebro (SANCHO *et al.*, 2000; GLUSCZAK *et al.*, 2006, 2007), causando acúmulo de acetilcolina e, conseqüentemente, estimulação de seus receptores, inibindo a atividade desses tecidos (FERNÁNDEZ-VEGA *et al.*, 2002). Se esse for o caso em *B. amazonicus*, a redução da atividade da AChE poderia explicar, ao menos em parte, a incapacidade dos grupos expostos em aumentar a f_R durante a hipóxia gradual.

A eficiência das brânquias como órgão trocador de O_2 pode ser avaliada por meio da necessidade ventilatória ($\dot{V}_G / \dot{V}O_2$), também chamada de requerimento branquial de convecção de água (DEJOURS, 1981). Aumentos na $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ em função da redução na disponibilidade de O_2 do meio são indicativos da redução na eficiência de extração de O_2 da corrente ventilatória, ou seja, uma maior quantidade de água deve passar pela superfície funcional respiratória para que a mesma quantidade de O_2 seja obtida.

A $\dot{V}_G / \dot{V}O_2$ de todos os grupos experimentais aumentou significativamente em resposta à hipóxia, mas com valores sempre superiores nos grupos expostos ao Roundup, mostrando diminuição significativa da eficiência das brânquias na troca de O_2 após a exposição aos herbicidas, provavelmente devido aos efeitos descritos acima, de forma que os peixes expostos a essas formulações necessitaram ventilar uma quantidade muito maior de água para obter uma mesma quantidade de O_2 que os peixes do grupo Ctrl. Desta forma, pode-se inferir que a contaminação com Roundup implica em um maior gasto energético para a troca gasosa.

A extração de O_2 da água (EO_2) observada para *B. amazonicus* no presente estudo é relativamente baixa quando comparada a outras espécies de peixes, como a tilápia-do-nylo, o tambaqui, o pacú, o curimatá, a traíra e carpas, com EO_2 em normóxia $\geq 70\%$ (SAUNDERS, 1962; GUERRA, 1992; FERNANDES *et al.*, 1995; CORRÊA, 1996; KALININ, 1996; MATTIAS *et al.*, 1996), mas compatível com os valores apresentados pelos atuns *K. pelamis* e *T. albacares*, para os quais foi observada uma EO_2 de aproximadamente 55% em normóxia. Cabe ressaltar que a EO_2 dos grupos expostos

foram significativamente inferiores ao grupo Ctrl em todas as PO_2 experimentais, reforçando, mais uma vez, a redução da capacidade respiratória da espécie causada pela exposição ao Roundup.

Os animais expostos ao Roundup WG tiveram menor capacidade de extrair O_2 da água que o grupo Original em normóxia e 120mmHg. Já o grupo Transorb apresentou sua EO_2 significativamente reduzida em todas as tensões testadas em relação aos demais grupos experimentais.

A tomada de oxigênio pelas brânquias é principalmente determinada pela área de superfície funcional respiratória, a qual pode ser aumentada pela epinefrina, através de vasodilatação, ou diminuída pela acetilcolina, através de vasoconstrição. Assim, a inibição da AChE nas brânquias poderia resultar em contínua estimulação das junções neuromusculares, levando à constrição na base das artérias eferentes dos filamentos branquiais, reduzindo o fluxo de sangue através das lamelas secundárias. Como o Roundup é capaz de inibir a atividade da AChE cerebral em peixes (GLUSCZAC *et al.*, 2006, 2007), tal inibição também poderia estar ocorrendo nas brânquias, causando a redução na eficiência da tomada de oxigênio observada no presente estudo, relacionada a uma possível redução na área da superfície funcional respiratória.

A f_H média de *B. amazonicus* em normóxia manteve-se em cerca de 63 bpm e está próxima à verificada para espécies de peixes tropicais como o pacu (50 bpm; RANTIN *et al.*, 1998b) e o tambaqui (48 bpm; RANTIN & KALININ, 1996) e abaixo da f_H média de espécies ativas como o dourado (97 bpm; SOUZA *et al.*, 2001), e os atuns *K. pelamis* e *T. albacares* (BUSHNELL & BRILL, 1992; KORSMEYER *et al.*, 1993). Em todas essas espécies, a resposta à redução da tensão de O_2 foi uma bradicardia, que se tornou acentuada quando os peixes foram expostos a níveis de oxigenação na água iguais ou inferiores à tensão crítica (P_cO_2).

Marvin & Heat (1968), estudando respostas cardíacas de espécies de hábitos lentos (*Ictalurus nebulosus*), moderados (*Lepomis macrochirus*) e ativos (*Onchorynchus mykiss*), expostas à hipóxia gradual, observaram que todas respondem de forma uniforme, com uma pronunciada bradicardia.

B. amazonicus do grupo Ctrl foi capaz de manter a f_H constante até a $P_{in}O_2$ de 60 mmHg, tensão a partir da qual ocorreu bradicardia, até que, na menor tensão de O_2

utilizada (20 mmHg), a f_H foi de apenas 31 bpm, valor este aproximadamente 50 % menor que o observado em normóxia.

Farrell (1984) sugeriu que o reflexo bradicárdico produzido pela hipóxia pode ser valioso para assegurar o desempenho do coração durante a hipóxia do miocárdio. Assim a redução da f_H do matrinxã provavelmente preserva o gasto energético do coração quando a disponibilidade de O_2 se torna reduzida. Além disso, a bradicardia aumenta o tempo de residência do sangue dentro do ventrículo, o que poderia permitir um aumento da EO_2 pelo próprio miocárdio esponjoso. Entretanto, Glass *et al.* (1991) questionam até que ponto a bradicardia hipóxica é apenas um reflexo compensatório e não uma consequência do sofrimento miocárdico imposto pelas baixas tensões de O_2 , uma vez que abaixo da PcO_2 , é normalmente acompanhada de alterações eletrocardiográficas indicativas de isquemia miocárdica.

A f_H tem sido usada como indicador dos efeitos tóxicos de contaminantes ambientais em peixes (TEUSCHLER *et al.*, 2005). De acordo com Heath (1995), reduções na f_H com concomitantes aumentos na ventilação branquial são as respostas comuns quando os peixes são expostos a uma variedade de substâncias xenobióticas. Reduções na f_H foram descritas como resultado da exposição a tolueno (STOSS & HAINES, 1979), metilmercúrio (DIAL, 1978), aos pesticidas carbaril, malation e paration (SOLOMON & WEIS, 1979) e ao tricloroetileno (VILLALOBOS *et al.*, 2000) e em “medaka”, *Oryzias latipes*, bem como após exposição do “killifish”, *Fundulus heteroclitus*, a inseticidas (WEIS & WEIS, 1974).

No presente trabalho, os valores de f_H dos grupos expostos ao Roundup WG e Roundup Transorb foram significativamente inferiores aos do grupo controle, seguindo a tendência descrita acima, enquanto que o grupo exposto ao Roundup Original teve sua f_H significativamente mais elevada que a do grupo Ctrl. Essas diferenças acentuadas no modo de ação dos herbicidas sobre a função cardíaca indicam efeitos diferenciais dos ingredientes ditos “inertes” presentes nas diferentes formulações.

De forma semelhante ao observado no presente trabalho, Costa *et al.* (2008) expuseram girinos de rã-touro, *Lithobates catesbeiana*, a 1,0 ppm de Roundup Original por 48 h, e observaram uma significativa taquicardia quando comparados ao grupo controle. Já Xiao *et al.* (2007) mostraram que o herbicida glifosato-isopropilamônio (GIA), cujos “ingredientes inertes diferem da formulação Original, reduz a f_H do sapo *Bufo*

gargarizans, da mesma forma que o Roundup WG e Roundup Transorb no presente estudo.

Em estudo sobre os efeitos do glifosato e do fungicida organofosforado Edifenphos sobre o sistema imune e a síntese protéica de tilápia-do-Nilo, El-Gendy *et al.* (1998) descreveram que ambos causaram inibição da AChE e conseqüente aumento da acetilcolina em vários tecidos. A exposição ao Roundup reduziu significativamente a atividade da AChE em vários tecidos de peixes, incluindo o músculo branco e o cérebro (SANCHO *et al.*, 2000; GLUSCZAK *et al.*, 2006, 2007), causando acúmulo de acetilcolina e, conseqüentemente, estimulação de seus receptores, inibindo a atividade desses tecidos (FERNÁNDEZ-VEGA *et al.*, 2002). Se este for o caso em *B. amazonicus*, a redução da atividade da AChE poderia explicar, ao menos em parte, os menores valores de f_H encontrados para os grupos WG e Transorb, uma vez que a ACh ativa os receptores muscarínicos colinérgicos no nódo sinoatrial (SA) reduzindo a despolarização espontânea das células do marcapasso e diminuindo a frequência cardíaca.

O relatório da Organização Mundial de Saúde (World Health Organization -WHO) de 1994 (Glyphosate: Environmental Health Criteria #159) cita o trabalho de Tai (1990), que submeteu cães à injeções intravenosas de glifosato, do surfactante POEA ou de Roundup Original (que combina as 2 substâncias anteriores) de forma que suas concentrações plasmáticas ficaram próximas às encontradas em humanos que ingeriram glifosato acidentalmente ou após suicídio. Diversos efeitos circulatórios resultaram de tal procedimento: o glifosato aumentou a capacidade de contração do músculo cardíaco; o POEA reduziu o volume sistólico e a pressão arterial e o Roundup Original causou depressão cardíaca.

Com base nos resultados acima descritos, a taquicardia observada no grupo Original pode ter sido resultante de um efeito direto do glifosato no músculo cardíaco, mas um possível efeito da liberação de catecolaminas em resposta ao estresse induzido pela presença do herbicida não pode ser descartado. Já as reduções da frequência cardíaca observadas para os grupos WG e Transorb podem ter resultado do efeito dos “ingredientes inertes” presentes em suas formulações e não apenas do glifosato em si.

Em células humanas embrionárias e placentárias, Richard *et al.* (2005) e Benachour *et al.* (2007a) demonstraram que o glifosato misturado com surfactantes (Roundup Bioforce – 360 g.L⁻¹ de glifosato) foi citotóxico por causar alterações na enzima

succinato desidrogenase (SD). Peixoto (2005) demonstrou que o Roundup deprime os complexos mitocondriais II (SD) e III.

Em ovos de ouriço-do-mar, o Roundup deteriorou o ciclo celular e o glifosato com seus surfactantes inibiu enzimas de transcrição de forma sinérgica (MARC *et al.*, 2002, 2005). Recentemente, Mulner-Lorillon (2007) e Le Bouffant *et al.* (2007) demonstraram que este modelo ativa o *checkpoint* CDK1/ciclina B (quinase ciclina-dependente) de danos no DNA no primeiro ciclo de desenvolvimento celular, com compromisso de morte celular por apoptose em caso de falhas no reparo do DNA.

Vários experimentos foram conduzidos para esclarecer os mecanismos de morte celular. Ao nível de membranas, Squirrell *et al.* (1997) mediram a atividade da enzima adenilato quinase (AK) após sua introdução no meio e verificaram ruptura da membrana plasmática, correspondente à necrose e/ou necrose secundária no final da apoptose (TAATJES *et al.*, 2008).

Ao nível de respiração mitocondrial, Scatena *et al.* (2004) mediram a atividade da SD, enquanto Los *et al.* (1999), Omezzine *et al.* (2003) e Liu *et al.* (2005) testaram os níveis de atividade das caspases 3 e 7 para determinar as vias da apoptose e a fragmentação do DNA *in situ* (DAPI). A necrose foi evidenciada pelo citoplasma túrgido, ruptura da membrana plasmática, organelas citoplasmáticas túrgidas (particularmente as mitocôndrias) e alguma condensação da cromatina nuclear, enquanto a apoptose manifestou-se pela condensação citoplasmática e nuclear (picnose), fragmentação nuclear (cariorexis), aparência morfológica normal das organelas citoplasmáticas e membrana plasmática intacta; após a fragmentação nuclear, a célula se desagrega em vários corpos apoptóticos (GALLUZZI *et al.*, 2007; TAATJES *et al.* 2008).

Por contraste, sabe-se agora que a morte celular é perpetrada por uma variedade de mecanismos que podem ser classificados em quatro tipos diferentes, baseados em características morfológicas: Tipo 1: apoptose; tipo II: autofagia; Tipo III: necrose (ou oncose) e Tipo IV: catástrofe mitótica (GALLUZZI *et al.*, 2007).

Baseados nas caracterizações acima descritas, Benachour & Séralini (2009) avaliaram o efeito do glifosato, de seu principal metabólito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), do principal surfactante das formulações de Roundup, a taloamina polietoxilada (POEA) e de quatro formulações de Roundup: Roundup Express (R7.2), Roundup Bioforce ou Extra 360 (R360), Roundup Grand Travaux (R400) e Roundup Grand Travaux

Plus (R450) em concentrações bem abaixo das usadas na agricultura, sobre três linhagens de células humanas: células primárias de cordões umbilicais de neonatos (HUVEC), linhagens de embriões e placentárias. Esses três tipos de células humanas permitiram o estabelecimento não apenas da sensibilidade diferencial desses modelos, mas também das vias principais de ação de pesticidas contendo glifosato, na concentração de 1 mg.L^{-1} . Tais efeitos foram produzidos pelo próprio glifosato, pelo seu principal metabólito (AMPA) e pelo POEA, isolados ou combinados.

Entretanto, o trabalho de Benachour & Séralini (2009) mostrou, pela primeira vez, que todos os produtos incluindo AMPA e POEA causam efeitos nas enzimas SD e AK em células humanas, levando à morte celular.

Surpreendentemente, esses autores verificaram que o supostamente “inerte” POEA é o mais potente. Na concentração de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$, o POEA começa a alterar a atividade da SD em células HUVEC e a da AK das células de embriões.

A mistura Roundup é mais venenosa que o glifosato ou o AMPA. Sozinho, o AMPA destrói as membranas celulares (com liberação de AK), independentemente do tipo de célula. Este evento não ocorre com o glifosato que é, entretanto, três a oito vezes mais inibidor da SD que o AMPA. Contudo, devido aos danos na membrana celular serem geralmente mais sensíveis, o AMPA é considerado mais tóxico para células humanas que o glifosato. O POEA é o mais tóxico: se ele fosse o único surfactante do Roundup 360, sua concentração máxima teria que estar em torno de 1 a 24 ‰, de acordo com o tipo de células. Dessa forma, o POEA foi considerado o ingrediente ativo na morte das células humanas e mais danoso que o glifosato. Como o Roundup é mais viscoso que 1‰ POEA + glifosato, parece obvio que outros componentes estejam presentes na mistura.

Benachour & Séralini (2009) elucidaram que a morte celular induzida por Roundup e pelo glifosato é devida, pelo menos em parte, à apoptose via indução das caspases 3/7. As caspases são um grupo de proteases baseadas em cisteína, enzimas com um resíduo de cisteína capazes de clivar outras proteínas depois de um resíduo de ácido aspártico, uma especificidade incomum entre proteases. O nome caspase é derivado dessa função molecular característica: “cysteine-aspartic-acid-proteases”. Existem dois tipos de caspases: iniciadoras e efetoras. Caspases iniciadoras (por exemplo caspase-8, caspase-9) clivam pro-formas inativas de caspases efetoras, ativando-as. Caspases efetoras (por exemplo caspase-3, caspase-7), por sua vez, clivam outros substratos protéicos da célula

resultando no processo apoptótico. A iniciação da reação em cascata é regulada por inibidores de caspases.

No estudo de Benachour & Séralini (2009), as caspases foram ativadas após 6 horas atingindo o máximo em 12 horas em todos os protocolos experimentais. Os surfactantes não parecem ser necessários para que o glifosato seja indutor de morte celular, sendo que o glifosato sozinho é 30% mais potente nessa via que o Roundup. Surpreendentemente, o glifosato atuou muito rápido na apoptose das células e em concentrações 500 a 1000 vezes menores que as utilizadas na agricultura. Após 24 horas do tratamento, as caspases voltaram aos níveis basais, quando SD e AK reagiram significativamente. Esses resultados foram consistentes com a gradual perda de atividade das caspases 3 e 7 nas células apoptóticas que desenvolveram necrose secundária *in vitro* (RISS & MORAVEC, 2004).

Os resultados com as caspases foram confirmados pela morfologia das células tratadas com Roundup. Concentrações tão baixas quanto 0.005% causaram morte celular, falta de adesão, encolhimento e fragmentação dos corpos apoptóticos. A fluorescência característica das células apoptóticas, que evidencia a condensação do DNA, foi mais visível na presença de Roundup que do glifosato.

Para entender os efeitos *in vivo* através da interpretação dos impactos celulares acima descritos, é necessário ter conhecimento da diluição e dos processos de eliminação do produto no organismo. Para tanto, é necessário levar-se em consideração o potencial de bioacumulação e os efeitos retardados dessa substância xenobiótica. Por isso, Benachour & Séralini (2009) mediram a atividade das caspases em diferentes tempos e as concentrações de glifosato ou Roundup depois de terem previamente demonstrado seus efeitos sobre a succinato desidrogenase (SD) em células embrionárias e placentárias (BENACHOUR *et al.*, 2007a). Adicionalmente, o metabolismo do herbicida deve ser considerado.

O nível mais reativo pareceu ser a membrana das células para as diferentes formulações comerciais testadas, mas não para o glifosato sozinho. Desta forma, fica claro que os supostos “ingredientes inertes” desempenham papéis óbvios e diferentes como disruptores de membranas de células humanas, independentemente do glifosato, como previamente proposto para peixes, anfíbios e microorganismos (MARC *et al.*, 2002; COX & SURGAN, 2006) ou em plantas (HAEFS *et al.*, 2002).

O segundo nível é a membrana mitocondrial e a reação enzimática da SD nela contida, que tem lugar na membrana interna, no complexo II da cadeia respiratória (THOMAS *et al.*, 1993). Ela é alterada de forma comparável não proporcional ao glifosato, mas em relação à natureza e quantidade dos surfactantes previamente listados (BENACHOUR *et al.*, 2007a).

Por tudo o que foi acima descrito, fica claro que os efeitos do glifosato variam com a formulação, que deve ser testada *in vivo* para estudar qualquer toxicidade (COX & SURGAN, 2006). A necessidade de estudos combinados fica muito clara após os resultados deste estudo. Os organismos estão sempre expostos a misturas e não a compostos simples, e as misturas podem amplificar a toxicidade da substância xenobiótica (BENACHOUR *et al.*, 2007b).

Em células embrionárias ou neonatas, o POEA, quando sozinho, tem a maior toxicidade, que pode ser amplificada de duas a cinco vezes em combinação com o glifosato ou o AMPA. Em ambientes aquáticos, o POEA tem efeitos mais potentes que o glifosato ou o Roundup sobre bactérias, microalgas, protozoários e crustáceos (TSUI & CHU, 2003).

Adicionalmente, supõe-se que o conhecido metabolismo do glifosato no solo e em plantas detoxifique o glifosato em AMPA (WILLIAMS *et al.*, 2000). Contudo, Benachour & Séralini (2009) mostraram que o AMPA tem efeito mais tóxico que o glifosato nas células humanas, especialmente nas suas membranas. O AMPA é também mais estável no solo (GARD *et al.*, 1997), nas plantas, alimentos e resíduos alimentares (SCALLA, 1997) e mais presente na água residual (2 a 35 ppm) que o glifosato (0,1 a 3 ppm); (GHANEM *et al.*, 2007), ele não foi tóxico puro em soluções aquosas nas concentrações utilizadas por Benachour & Séralini (2009), mas amplificou a toxicidade do glifosato e do POEA. Desta forma, a toxicidade sinérgica destes compostos ficou bastante clara.

Notável foi o achado de que a indução das caspases pelo glifosato sozinho foi observada em doses que não causam danos celulares ou mitocondriais, indicando uma clara via glifosato-apoptótica em doses abaixo das utilizadas na agricultura. Esse resultado sugere que os surfactantes também desempenham papel na morte celular, por meio da necrose caracterizada pelas alterações nas organelas, como intumescimento e ruptura de membranas celulares descritas anteriormente. As células mais sensíveis foram as HUVEC umbilicais, nas quais a apoptose ocorreu tanto com o glifosato quanto com o

Roundup, em concentrações baixas e similares, como se receptores da morte tivessem sido ativados sem a necessária penetração do glifosato.

Baseados em todos esses resultados, Benachour & Séralini (2009) concluíram que as misturas chamadas “formulações” modificam a permeabilidade celular e as vias de toxicidade dos xenobióticos. Em todos os casos estudados, a morte celular foi mais induzida por Roundup que pelo AMPA ou pelo glifosato, sendo que o último causou apoptose sem danos às membranas. Em contraste, o glifosato misturado aos surfactantes nas formulações de Roundup lesa membranas celulares e mitocondriais e promove necrose. Torna-se óbvio que o nível limiar para a ação do herbicida deve levar em conta o período de exposição, a presença de surfactantes, em particular o POEA, o metabolismo, a bioacumulação e os efeitos retardados. Todos os efeitos acima citados foram demonstrados abaixo das diluições recomendadas para o herbicida na agricultura (104 ppm), confirmando que os surfactantes do Roundup não são inertes.

Em sua revisão Takle & Andersen (2007), mostraram que a maquinaria das caspases e da apoptose é bem conservada em peixes e mamíferos. Os resultados apontam a existência de vias apoptóticas em peixes equivalentes às encontradas em mamíferos. O modelo de estudo mais conhecido é o peixe paulistinha, *Danio rerio*.

O seu genoma contém múltiplos componentes apoptóticos e seus papéis nas vias intrínsecas e extrínsecas foram descritos por Eimon *et al.* (2006) e Kratz *et al.* (2006). Inicializadores múltiplos e caspases efetoras foram identificadas, incluindo pelo menos 6 caspases com domínios homólogos às caspases 8 e 10 de mamíferos, ouriço-do-mar e urocordados (WEIL *et al.*, 2005; ROBERTSON *et al.*, 2006). *D. rerio* também apresenta caspases 10a e 10c, encontradas não apenas em mamíferos mas também no linguado japonês, *Paralichthys olivaceus*. A caspase 8 também foi identificada no bagre do canal, *Ictalurus punctatus* (LONG *et al.*, 2004).

Caspases efetoras foram identificadas em várias espécies de peixes e genes codificadores de caspases 3, 6 e 7 foram descritas para o salmão do Atlântico, *Salmo salar* (TAKLE *et al.*, 2006).

Apesar do reduzido número de espécies estudadas, tais resultados sugerem que os mecanismos de ativação de caspases e apoptose descritos por Benachour & Séralini (2009) para células humanas sujeitas à exposição às formulações comerciais de glifosato possam estar presentes em peixes. Se isso for verdadeiro, as lesões celulares

observadas por esses autores podem estar ocorrendo em matrinxã, *B. amazonicus*, após exposição às diferentes formulações de Roundup, contribuindo para o entendimento dos prejuízos à função cardio-respiratória causados por esse herbicida.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram as seguintes conclusões:

- a. As diferentes formulações de Roundup aumentam a dependência do animal ao O_2 disponível no meio, uma vez que a tomada de O_2 total ($\dot{V}O_2$) foi significativamente alterada e a tensão crítica de O_2 (P_cO_2) também foi significativamente aumentada após exposição aos herbicidas;
- b. A magnitude dos aumentos na ventilação branquial (\dot{V}_G) em resposta à hipóxia foi significativamente reduzida pela exposição às três formulações de Roundup, indicando prejuízo à função respiratória;
- c. O prejuízo à função respiratória foi comprovado pelos maiores valores de volume ventilatório (V_T) e necessidade ventilatória ($\dot{V}_G/\dot{V}O_2$) em hipóxia severa apresentados pelos peixes expostos às diferentes formulações do Roundup;
- d. A capacidade de retirar O_2 da água foi prejudicada nos animais após contato com os herbicidas, uma vez que extração de O_2 da corrente ventilatória (EO_2) foi significativamente reduzida pela exposição às diferentes formulações do Roundup, sendo que o Roundup Transorb causou os efeitos mais pronunciados; as maiores alterações;
- e. Em conjunto, os resultados do presente estudo mostraram que a exposição às diferentes formulações de Roundup, mesmo em baixas concentrações (5 mg.L^{-1}) é capaz de reduzir significativamente a eficiência do sistema respiratório de *B. amazonicus*, reduzindo a tolerância à hipóxia e, portanto, as chances de sobrevivência da espécie em tais ambientes. Tais resultados apontam, mais uma vez, para a necessidade de revisão dos critérios de classificação da toxicidade do Roundup para peixes.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELGHANI, A.A., TCHOUNWOU, P.B., ANDERSONA, C., SUJONO, H., HEYER, L.R., MONKIEDJE, A. Toxicity evaluation of single and chemical mixtures of Roundup, Garlon-3A, 2,4-D, and Syndects surfactant to Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*), Bluegill Sunfish (*Lepomis microchirus*), and Crawfish (*Procambarus* spp.). **Environmental Toxicology and Water Quality**, V.12, n.3, 237-243, 1997.

AGÊNCIA SENADO. (<http://www.senado.gov.br/Agencia>). Brasília: Senado Federal; 24/11/2009. Acesso em 01 dez 2009.

ALBINATI, A.C.L., MOREIRA, E.L.T., ALBINATI, R.C.B., CARVALHO, J.V, SANTOS, G.B., LIRA, A.D. Toxicidade aguda do herbicida Roundup® para piaçu (*Leporinus macrocephalus*). **Rev. Bras. Saúde Prod. Na**, Salvador BA, 8(3), p.184-192. 2007.

ALTIMIRAS, J. AISSAOUI, A. & TORT, L. Is the short-term modulation of heart rate in teleost fish physiologically significance? Assessment by spectral analysis techniques. **Braz. J. Med. Biol. Res.** V.28, 1197-1206.1. 1995.

AMARANTE JR. O.P., SANTOS, T.C.R., BRITO N.M., RIBEIRO M.L. Glifosato: propriedades, toxicidade, uso e legislação, **Quím. Nova** 25, 589-593. 2002.

ANDRIOLI, A.I. Revista Espaço Acadêmico - Nº 51 - Ago/2005 - <http://www.espacoacademico.com.br>. acesso em Nov/2008.

ANTÓN, F.A., LABORDA, E., de ARIZ, M. Acute toxicity of the herbicide glyphosate to fish. **Chemosphere**, V. 28, n. 4, p.745-753, 1994.

ARAÚJO, R. S. **Toxicidade aguda do herbicida Glifosato para *Danio rerio* (Teleostei, Cyprinidae), em condições tropicais**. In: Jornada de Iniciação Científica/Programa PIBIC/CNPq - Embrapa Amazônia Ocidental. 2005.

BELLUCK, D. A.; BENJAMIN, S. L.; DAWSON, T. **Groundwater contamination by atrazine and its metabolites: risk assessment, policy, and legal implications**. In: SOMASUNDARAM, L.; COATS, J. R. (Eds.). Pesticide transformation products: fate and significance in the environment. Washington, DC: American Chemical Society, 1991.

BENACHOUR, N., MOSLEMI, S., SIPAHUTAR, H., SÉRALINI, G. E. Cytotoxic effects and aromatase inhibition by xenobiotic endocrine disrupters alone and in combination. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** V. 222, 129–140. 2007b.

BENACHOUR, N., SERALINI, G.E. Glyphosate formulations induce apoptosis and necrosis in human umbilical, embryonic, and placental cells. **Chem. Res. Toxicol.**, V.22(1):97-105. 2009.

BENACHOUR, N., SIPAHUTAR, H., MOSLEMI, S., TRAVERT, C., SÉRALINI, G. E. Time and dose-dependent effects of Roundup on human embryonic and placental cells and aromatase inhibition. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** V.53, 126-133. 2007a.

BOOTH, J.H. The effect of oxygen supply, epinephrine and acetylcholine on the distribution of blood flow in trout gills. **J. Exp. Biol.**, V. 83, pp. 31-39, 1979.

BOUTILIER, R.G., HEMING, T.A. & IWAMA, G.K. Physicochemical parameters for use in fish respiratory physiology. In: HOAR, W.S. & RANDALL, D.J. **Fish Physiology**. New York: Academic Press, 10A, p. 229-262, 1984.

BRANCO, S.M. **O Meio Ambiente em Debate**. Ed. Moderna, 3ª Ed. 2004, São Paulo, 127p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. Portaria MS n.º 518/2004 / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental - Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 28 p. 2005.

BRITSKI, H.A. Peixes de água doce do estado de São Paulo - Sistemática. p. 79-108, In **Poluição e Piscicultura**. Fac. Saúde Pública da USP e Inst. de Pesca, São Paulo, 216 pp. 1972.

BRONSTAD, J. O.; FRIESTAD, H. O. **The herbicide glyphosate**, Londres: Butterworth, 1985, 200p.

BURGGREN, W.W. & CAMERON, J.N. Anaerobic metabolism, gas exchange and acid-base balance during hypoxic exposure in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **J. exp. Biol.**, V. 213, 405-416. 1980.

BUSHNELL, P.G., BRILL, R.W.. Oxygen transport and cardiovascular responses in skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) and yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) exposed to acute hypoxia. **J. Comp. Physiol. B.**, V. 162, 131-143. 1992.

CAMERON JN. Oxygen dissociation characteristics of the blood of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. **Comp. Biochem. Physiol.** V. 38A(3), 699-704. 1971

CAMPBELL, N., REECE, J., TAYLOR, M., SIMON, E., DICKEY, J. **Biology: Concepts and Connections**. 2008. Ed. Benjamin Cummings. 6th Edition. 504 p.

CHAMPAIGNE, I.L. Weed Science Society of America. **Herbicide Handbook**, 7th Ed., pp. 10-59, 1994.

CHUIKO, G. M. Comparative study of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in brain and serum of several freshwater fish: specific activities and in vitro inhibition by DDVP, an organophosphorus pesticide. **Comp. Biochem. Physiol.** C127, 233-242. 2000.

COLE, D. J. Mode of action of glyphosate - a literature analysis. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). **The herbicide glyphosate**, pp. 49-54. Londres: Butterworths, 1985.

CORRÊA, C.F. **Efeitos das reduções graduais do oxigênio ambiental sobre a função cárdio-respiratória de tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier) (Teleostei, Serrasalmidae)**. 2000. 109p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

COSTA, M.J., MONTEIRO, D.A., OLIVEIRA-NETO, A.L., RANTIN, F.T., KALININ, A.L. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup Original®. **Ecotoxicology**, V.17, 153-163. 2008

COX, C. Glyphosate. **J. Pest. Reform.** V. 24(4), 10–15. 2004.

COX, C., SURGAN, M. (2006) Unidentified inert ingredients in pesticides: Implications for human and environmental health. **Environ. Health Perspect.** 114, 1803–806.

DALLEGRAVE, E. MANTESE, F. COELHO, R. PEREIRA, J. DALSENTER. The teratogenic potential of the herbicide glyphosate-Roundup® in Wistar rats. **Toxicology Letters**, V. 142: 45-52. 2003.

DAVIS, J.C. Minimal dissolved oxygen requirements of aquatic life with emphasis on Canadian species: a review. **J. Fish. Res. Board Can.**, V. 32, n. 12, pp. 2295-2332, 1975.

DE LA TORRE, F.R., FERRARI, L., SALIBIÁN, A. Freshwater pollution biomarker: response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species. **Comp. Biochem. Physiol.** C 131, 271-280. 2002.

- DEJOURS, P. **Principles of comparative respiratory physiology**. 1981. New York: Elsevier, 265p.
- DIAL, N.A. Methylmercury: some effects on embryogenesis in the Japanese medaka *Oryzias latipes*. **Teratology**, V. 17, pp. 83-92, 1978.
- DORES, E.F.G.C., DE-LAMONICA-FREIRE, E.M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. estudo de caso: águas usadas para consumo humano em primavera do leste, Mato Grosso - Análise preliminar. **Quim. Nova**, V. 24(1), 27-36, 2001.
- DUTTA, H.M., ARENDS, D.A. Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. **Environ. Res.** V.91, 157-162. 2003.
- EIMON, P.M., KRATZ, E., VARFOLOMEEV, E., HYMOWITZ, S.G., STERN, H., ZHA, J., ASHKENAZI, A. Delineation of the cell-extrinsic apoptosis pathway in the zebrafish. **Cell Death and Differentiation** V.13, 1609-1630. 2006.
- EL-GENDY, K.S., ALY, N.M., EL-SAEBAE, A.H. (1998). Effects of edifenphos and glyphosate on the immune response and protein biosynthesis of Bolti fish (*tilapia nilotica*). **J. Environ. Sci. Health B**, V. 33(2), 135-149.
- EXTOXNET (Extension Toxicology Network). Pesticide Information Profile : Glyphosate (<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/dienochlor-glyphosate/glyphosate-ext.html>). 1994.
- FARRELL, A.P. A review of cardiac performance in the teleost heart: intrinsic and humoral regulation, **Can. J. Zool.**, V. 62, pp. 523-536, 1984.
- FERNANDES, M.N. & RANTIN, F.T. Relationships between oxygen availability and metabolic cost of breathing in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): aquacultural consequences. **Aquaculture**, V. 127, p. 339-346. 1994.
- FERNANDES, M.N., BARRIONUEVO, W.R., RANTIN, F.T. Effects of thermal stress on respiratory responses to hypoxia of a South American Prochilodontid fish, *Prochilodus scrofa*. **J. Fish Biol.**, V. 46, 123-133. 1995.
- FERNANDES, M.N., RANTIN, F.T. Respiratory responses of *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) to environmental hypoxia under different thermal conditions. **J. Fish Biol.**, V. 35, 509-519. 1989.
- FERNÁNDEZ-VEGA, C., SANCHO, E., FERRANDO, M.D., ANDREU, E. Thiobencarb-induced changes in acetylcholinesterase activity of the fish *Anguilla anguilla*. **Pestic. Biochem. Physiol.** V.72, 55-63. 2002.
- FISPQ - Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos da Monsanto Brasil. <http://www.monsanto.com.br/produtos/herbicidas/fichas-de-emergencia-e-bulas/pdf/roundup-transorb-r-fispq.pdf>, 12/05/2008.
- GALIS, F. & BAREL, C. D. N. Comparative functional morphology of the gills of African lacustrine Cichlidae (Pisces, Teleostei). An eco-morphological approach. **Neth. J. Zool.**, V. 30(2), 392-430. 1980.
- GALLUZZI, L., MAIURI, M. C., VITALE, I., ZISCHKA, H., CASTEDO, M., ZITVOGEL, L., KROEMER, G. (2007) Cell death modalities: Classifications and pathophysiological implications. **Cell Death Differ.** 14, 1237-43.
- GARCIA, A.F., ROLLEMBERG, M.C. Determinação voltamétrica do herbicida glifosato em águas naturais utilizando eletrodo de cobre. **Quím. Nova** V.30 no.7 São Paulo. 2007

GARD, J. K., FENG, P. C., HUTTON, W. C. Nuclear magnetic resonance timecourse studies of glyphosate metabolism by microbial soil isolates. **Xenobiotica** 27, 633–644. 1997.

GERALD, J.W. & CECH, J.J.Jr. Respiratory responses of juvenile catfish (*Ictalurus punctatus*) to hypoxic conditions. **Physiol. Zool.**, V. 43, p. 47-54. 1970.

GHANEM, A., BADOS, P., KERHOAS, L., DUBROCA, J., AND EINHORN, J. Glyphosate and AMPA analysis in sewage sludge by LC-ESI-MS/MS after FMOC derivatization on strong anion-exchange resin as solid support. **Anal. Chem.** V. 79, 3794-3801. 2007.

GLASS, M.L. Ventilatory responses to hypoxia in ectothermic vertebrates. In: LENFANT, C. **Physiological Adaptations in Vertebrates**. New York: Marcel Dekker Inc., p. 97-108. 1992.

GLASS, M.L.; RANTIN, F.T.; VERZOLA, R.M.M.; FERNANDES, M.N. & KALININ, A.L., Cardio-respiratory synchronization and myocardial function in hypoxic carp (*Cyprinus carpio* L.). **J. Fish Biol.**, V. 39, 143-149. 1991.

GLUSCZAK, L., MIRON, D. S., MORAES, B. S., SIMÕES, R., SCHETINGER, M. R. C., MORSCH, V. M. & LORO, V. L. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**. V. 146, Issue 4, November, 519-524. 2007.

GLUSCZAK, L., MIRON, S.D., CRESTANI, M., FONSECA, B.M., DUARTE, A.F. & VIEIRA, P.L. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity, metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*), **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 65, 237-241. 2006.

GOMES, G.R., CRUZ, C. SAYURI, N., PITELLI, R.A. **Toxicidade aguda do glyphosate (Roundup® WG) para os peixes *Hyphessobrycon eques* e *Brachydanio rerio***. In: I Simpósio Internacional sobre glyphosate. Botucatu. Anais do I simpósio internacional sobre glyphosate, pp. 48-50. Botucatu, 2007b.

GOMES, G.R., CRUZ, C., HENARES, M.N.P., PITELLI, R.A. **Toxicidade aguda do glyphosate na formulação Roundup WG para organismos jovens e adultos de guaru (*Phallocerus caudimaculatus*)**. In: I simpósio internacional sobre glyphosate. Anais do I simpósio internacional sobre glyphosate, pp. 51-53. Botucatu, 2007a.

GUERRA, C.D.R. **Respostas cardio-respiratórias de pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), às variações de oxigênio no ambiente e durante a recuperação subsequente**. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais/UFSCar, 114p. São Carlos, SP, 1992.

HAEFS, R., SCHMITZ-EIBERGER, M., MAINX, H. G., MITTELSTAEDT, W., NOGA, G. (2002) Studies on a new group of biodegradable surfactants for glyphosate. **Pest. Manage. Sci.** 58, 825–833.

HARDELL, L., ERIKSSON, M. A case-control study of non-Hodgkin lymphoma and exposure to pesticides. **Cancer, Lund**, V.85, 1353-1360, 1999.

HAVERINEN, J., VORNANEN, M. Temperature acclimation modifies sinoatrial pacemaker mechanism of the rainbow trout heart. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, n. 292, p. 1023-1032, 2007.

HEAT, A.G. **Water pollution and fish physiology**. Second Edition. Lewis Publishers, CRC Press, 359p, 1995.

HILDEBRAND L.D., SULLIVAN D.S. & SULLIVAN T.P. Experimental studies of rainbow trout populations exposed to field applications of Roundup® herbicide. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.** V. 11, 93-98. 1982.

HUGHES, G. M., ALBERS, C., MUSTER, D., GÖTZ, K.H. Respiration of the carp, *Cyprinus carpio* L., at 10 and 20 °C and the effects of hypoxia. **J. Fish Biol.**, V. 22, 613-628. 1983.

HUGHES, G.M. Morphological measurements on the gills of fishes in relation to their respiratory function. **Folia Morphol.**18(2), 78-95. 1970.

HUGHES, G.M. Respiratory Responses to Hypoxia in Fish. **Am. Zool.** 13(2):475-489. 1973

HUNN, J.B., MULTER, E.P., DEFELICE, M.S. **Fish and Agricultural Chemicals: Safeguarding Your Pond.** 1993. University of Missouri, MU Extension. Agricultural Engineering publications.

JIRAUNGKOORSKUL W., UPATHAM E.S., KRUATRACHUE M., SAHAPHONG S., VICHASRI-GRAMS S., POKETHITIYOOK P. Histopathological effects of Roundup®, a glyphosate herbicide, on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), **Sci. Asia** 28, 121-127. 2002.

JIRAUNGKOORSKUL, W., UPATHAM, E.S., KRUATRACHUE, M., SAHAPHONG, S., VICHASRI-GRAMS, S. & POKETHITIYOOK, P. Biochemical and histopathological effects of glyphosate herbicide on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Environm. Toxicol.** 18: 260-267. 2003.

KACZEWER, J. Toxicologia del glifosato: riesgos para la salud humana. En: **La Producción Orgánica Argentina.** Buenos Aires, V.60, p. 553-561, 2002.

KALININ, A.L. **Função respiratória de tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus*, em diferentes condições de O₂ ambiental: tomada de O₂ branquial e cutânea, medidas diretas e determinações indiretas dos parâmetros ventilatórios.** 101p. Tese de doutorado - Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais/UFSCar, São Carlos, SP. 1996.

KALININ, A.L. **Função respiratória de traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch), em diferentes fases do crescimento às reduções do oxigênio dissolvido no ambiente: aspectos fisiológicos e adaptativos.** 133p. Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais/UFSCar. São Carlos, SP. 1991.

KALININ, A.L.; RANTIN, F.T.; FERNANDES, M.N.; GLASS, M.L. Ventilatory flow relative to intrabuccal and intraopercular volumes in two ecologically distinct erythrinids (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to normoxia and graded hypoxia. In: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F.; Randall, D.J. (eds.). **Physiology and Biochemistry of the Fishes of the Amazon.** Manaus: INPA. 1996.

KOLLMAN, W. & SEGAWA, R. Interim report of the pesticide chemistry database: environmental hazards assessment program. **Department of Pesticide Regulation,** 1995.

KORSMEYER, K.E., LAI, N.C., KNOWER, T., DEWAR, H., SHADWICK, R.E., GRAHAM, J.B. Cardiovascular function in swimming yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). **Am. Zool.**, V.33, 33-44, 1993.

KRATZ, E., EIMON, P.M., MUKHYALA, K., STERN, H., ZHA, J., STRASSER, A., HART, R., ASHKENAZI, A. Functional characterization of the Bcl-2 gene family in the zebrafish. **Cell death Diff.**, V.13, 1631-1640. 2006.

- LANGIANO V.C., MARTINEZ C.B.R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comp. Biochem. Physiol.** C 147, 222-231. 2008.
- LANGIANO, V.C. **Toxicidade do Roundup e seus efeitos para o peixe neotropical *Prochilodus lineatus***. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Londrina, UEL. 2006.
- LANGIANO, V.C., MARTINEZ, C.B.R. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, 147(C), 222–231. 2008.
- LE BOUFFANT, R., CORMIER, P., CUEFF, A., BELLÉ, R., MULNER-LORILLON, O. (2007) *Sea urchin* embryo as a model for analysis of the signaling pathways linking DNA damage checkpoint, DNA repair and apoptosis. **Cell. Mol. Life Sci.** 64, 1723–1734.
- LIU, J.J., WANG, W., DICKER, D.T., EL-DEIRY, W.S. Bioluminescent imaging of TRAIL-induced apoptosis through detection of caspase activation following cleavage of DEVD-aminoluciferin. **Cancer Biol. Ther.** 4, 885–892. 2005.
- LOMHOLT, J.P., JOHANSEN, K. Hypoxia acclimation in carp: how it affects oxygen uptake, ventilation and oxygen extraction from water. **Physiol. Zool.**, V. 52, pp. 38-49, 1979.
- LONG, S., WILSON, M., CLEM, L.W., MILLER, N.W., CHINCHAR, V.G. (2004). Identification and characterization of a Fas-like protein and cDNAs encoding the channel catfish death-inducing signalling complex. **Immunogenetics** 56, 518–530.
- LOS, M., WESSELBORG, S., SCHULZE-OSTHOFF, K. The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: Lessons from knockout mice. **Immunity** 10, 629–639. 1999.
- LOWE-MCCONNELL, R.H. **Fish communities in tropical freshwaters**. London; Longman, 1975, 337 p.
- MARC, J., LE BRETON, M., CORMIER, P., MORALES, J., BELLÉ, R., MULNER-LORILLON, O. A glyphosate-based pesticide impinges on transcription. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 203, 1–8. 2005.
- MARC, J., MULNER-LORILLON, O., BOULBEN, S., HUREAU, D., DURAND, G., BELLÉ, R. Pesticide Roundup provokes cell division dysfunction at the level of CDK1/cyclin B activation. **Chem. Res. Toxicol.** 15, 326–331. 2002.
- MARICONDI-MASSARI, M. **Avaliação das respostas cardio-respiratórias de tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus* (SCHWARTZ, 1983), às variações da temperatura ambiental e recuperação subsequente**. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal de São Carlos. 1993.
- MARVIN, D.E., HEAT, A.G. Cardiac and respiratory responses to gradual hypoxia in three ecologically distinct species of freshwater fish. **Comp. Biochem. Physiol.** A, V. 27, 349-355. 1968.
- MATTIAS, A.T. **Estudo do comportamento de cascudo, *Hypostomus regani* (Ihering, 1905), frente à hipóxia ambiental. Aspectos da fisiologia respiratória**. São Carlos, SP, 1994. 81p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos.
- MATTIAS, A.T.; MORON, S.E.; FERNANDES, M.N. Aquatic respiration during hypoxia of the facultative air-breathing *Hoplerythrinus unitaeniatus*. A comparison with the water-breathing *Hoplias malabaricus*. In: Val, A.L.; Almeida-Val, V.M.F.; Randall, D.J. (eds.).

- Physiology and Biochemistry of the Fishes of The Amazon.** Manaus: INPA, 203-211. 1996.
- MATTOS, M.L.T.; PERALBA, M.C.R.; DIAS, S.L.P; PRATA, F.; CAMARGO, L. Monitoramento ambiental do glifosato e do seu metabólito ácido aminometilfosfônico na água de lavoura de arroz irrigado. **Pesticidas**;12, 145-154, 2002.
- MITCHELL, D.G., CHAPMAN, P. M., LONG, T.J. Acute toxicity of Roundup and Rodeo herbicides to rainbow trout, chinook, and coho salmon. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, 39: 1028-1035, 1987.
- MIYAZAKI, D.M.Y., MACHADO NETO, J.G., CASTAGNOLLI, N. Toxicidade aguda de triclofon, partion metílico e glifosato para alevinos de tambaqui (*Colossoma macroporum*) e tambacu (*C. macroporum* X *Piaractus mesopotamicus*). In: **Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos (ENBRAPOA)**, 8., 2004, Laguna . Anais. Maringá: Biblioteca Setorial da UEM, 2004. p.203.
- MONSANTO . <http://www.monsanto.com.br/roundup/roundup/roundup.asp> (2006)
- MONSANTO CANADA - SAFETY DATA SHEET.
http://www.monsanto.ca/_pdfs/labels_msds/roundup_transorb_msds_en.pdf. 02/10/2009.
- MULNER-LORILLON, O. (2007) *Sea urchin* embryo, DNA-damaged cell cycle checkpoint and the mechanisms initiating cancer development. **J. Soc. Biol.** 201, 317–27.
- NESKOVIC N.K., POLEKSIC V., ELEZOVIC I., KARAN V., BUDIMIR M., Biochemical and histopathological effects of glyphosate on carp (*Cyprinus carpio*), **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 56, 295-302. 1996.
- NICHOLSON, H.A. **Manual of Zoology.** William Blackwood & Sons. 1980.
- OLURIN, K.B., OLOJO, E.A.A., MBAKA, G.O. & AKINDELE, A.T. Histopathological responses of the gill and liver tissues of *Clarias gariepinus* fingerlings to the herbicide glyphosate. **Afric. J. Biotechnology.** V. 5 (24), 2480-2487. 2006.
- OMEZZINE, A., CHATER, S., MAUDUIT, C., FLORIN, A., TABONE, E., CHUZEL, F., BARS, R., BENAHMED, M. (2003) Long-term apoptotic cell death process with increased expression and activation of caspase-3 and -6 in adult rat germ cells exposed in utero to flutamide. **Endocrinology** 144, 648–661.
- OTT, M.E., HEISLER, N., ULTSCH, G.R. A re-evaluation of the relationship between temperature and the critical oxygen tension in freshwater fishes. **Comp. Biochem. Physiol.**, V. 27, 349-355. 1980.
- PEIXOTO F. Comparative effects of the Roundup and glyphosate on mitochondrial oxidative phosphorylation, **Chemosphere** 61, 1115-1122. 2005.
- PORTNER, H.O., GRIESHABER, M.K. Critical PO₂(s) in oxyconforming and oxyregulating animals: gas exchange, metabolic rate and the mode of energy production. In: Bicudo, JEPW (ed) **The vertebrate gas transport cascade: adaptations to environment and mode of life.** CRC Press, Boca Raton, FL, p 330–357. 1993.
- RANDALL, D. The control of respiration and circulation in fish during exercise and hypoxia. **J. Exp. Biol.**, V. 100, 275-288. 1982.
- RANTIN, F. T. & KALININ, A. L. Aquatic surface respiration (ASR) and cardiorespiratory responses of *Piaractus mesopotamicus* (Teleostei, Serrasalminidae), during graded and acute hypoxia, pp. 59-67. In: A. L. Val, D. J. Randall & D. MacKinley (eds.), **The Physiology of Tropical Fish Symposium Proceedings**, American Fisheries Society, San Francisco. 1996.

- RANTIN, F. T., GUERRA, C. D. R., KALININ, A. L. & GLASS, M. L. The influence of aquatic surface respiration (ASR) on cardio-respiratory function of the serrasalmid fish *Piaractus mesopotamicus*. **Comp. Biochem. Physiol.**, 119: 991-997. 1998.
- RANTIN, F.T., GLASS, M.L., KALININ, A.L., VERZOLA, R.M.M. Cardio-respiratory responses in two ecologically distinct erythrinids (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*) exposed to graded environmental hypoxia. **Environ. Biol. Fish.**, V. 36, 93-97. 1993.
- RANTIN, F.T., KALININ, A.L., GLASS, M.L., FERNANDES, M.N. Respiratory responses to hypoxia in relation to mode of life in two erythrinid species (*Hoplias malabaricus* and *Hoplias lacerdae*). **J. Fish. Biol.**, V. 41, 805-812. 1992.
- RICHARD, S., MOSLEMI, S., SIPAHUTAR, H., BENACHOUR, N., SEÉALINI, G.E. Differential effects of glyphosate and Roundup on human placental cells and aromatase. **Environ. Health Perspect.** 113, 716-720. 2005.
- RIGOLIN-SÁ, O. **Toxicidade do herbicida Roundup (Glifosato) e do Acaricida Omite (Propargito) nas fases iniciais da Ontogenia do Bagre *Rhamdia hilarii* (Valenciennes, 1840) (Pimelodidae, Siluriformes)**. 1999. 307 p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.
- RISS, T. L., MORAVEC, R. A. (2004) Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin, and plating density in cell-based cytotoxicity assays. **Assay Drug Dev. Technol.** 2, 51–62.
- ROBERTSON, A.J., CROCE, J., CARBONNEAU, S., VORONINA, E., MIRANDA, E., MCCLAY, D.R., COFFMAN, J. A. The genomic underpinnings of apoptosis in *Strongylocentrotus purpuratus*. **Developmental Biology** 300, 321–334. 2006.
- RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 5. ed. Londrina: Grafmarke, 2005. 591 p.
- RODRIGUES, J. D. **Absorção, translocação e modo de ação de defensivos (glifosato e alachlor)**. Botucatu: Unesp, 10 p. Apostila. 1994.
- SAITO, T. Effects of vagal stimulation on the pacemaker action potentials of carp heart. **Comp. Biochem. Physiol.**, V. 44A, p. 191-199, 1973.
- SANCHO, E., CERÓN, J.J. & FERRANDO, M.D. Cholinesterase activity and hematological parameters as biomarkers of sublethal molinate exposure in *Anguilla anguilla*, **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 46, 81-86. 2000.
- SATCHELL, G.H. **Physiology and form of fish circulation**. Cambridge, Great Britain, Cambridge University Press, 235p. 1991.
- SAUNDERS, R.L. The irrigation of the gills in fishes. I. Efficiency of oxygen uptake in relation to the respiratory flow activity and concentrations of oxygen and carbon dioxide. **Can. J. Zool.**, V. 40, 817-862. 1962.
- SCALLA, R. Sécurité alimentaire biotransformation des herbicides par les plantes transgéniques résistantes. Oléagineux, Corps Gras, Lipides. Dossier: Génie Génét. **Oléagineux** 4, 113–119. 1997.
- SCATENA, R., MESSANA, I., MARTORANA, G.E., GOZZO, M. L., LIPPA, S., MACCAGLIA, A., BOTTONI, P., VINCENZONI, F., NOCCA, G., CASTAGNOLA, M., & GIARDINA, B. Mitochondrial damage and metabolic compensatory mechanisms induced by hyperoxia in the U-937 cell line. **J. Biochem. Mol. Biol.** 37, 454–459. 2004.

- SERVIZI, J.A., GORDON, R.W., MARTENS, D.W. Acute toxicity of Garlon 4 and Roundup herbicides to salmon, daphnia and trout. **Bull Environ. Contam. Toxicol**, 39, 15-22. 1987.
- SILVA, M.D., PERALBA, M.C.R, MATTOS, M.L.T. Determinação de glifosato e ácido aminometilfosfônico em águas superficiais do Arroio Passo do Pilão. *Pesticidas*, V.13, 19-28. 2003.
- SILVA, T.O., RITTER, F., SILVA, L.B., QUEVEDO, R.M., BALDISSERA, R.K., FINCO, J., BEDIN, A., DE LIMA, M.R., KREUTZ, L.C., BARCELLOS, L.J.G. Determinação da DL50 e da DL100 para o herbicida glifosato em alevinos de Jundiá, *Rhamdia quelen*. In: **Encontro Brasileiro de Patologistas de Organismos Aquáticos (ENBRAPOA)**, 8, Laguna. Anais. Maringá: Biblioteca Setorial da UEM, 2004.
- SOLOMON, H.M., WEIS, J.S. Abnormal circulatory development in medaka caused by the insecticides carbaryl, malathion, and parathion. **Teratology**, V.19, 51-62, 1979.
- SOUZA, R.H.S., SONCINI, R., GLASS, M., SANCHES, J. Ventilation, gill perfusion and blood gases in dourado, *Salminus maxillosus* Valenciennes (Teleostei, Characidae), exposed to graded hypoxia. **J. Comp. Physiol. B**, V. 171, n. 6, 483-489. 2001.
- SQUIRRELL, D., MURPHY, J. Rapid detection of very low numbers of micro-organisms using adenylate kinase as a cell marker. A Practical Guide to Industrial Uses of ATP Luminescence in Rapid Microbiology, pp 107-113 Cara Technology Ltd., Lingfield, Surrey, United Kingdom. 1997.
- STOSS, F.W., HAINES, T.A., The effects of toluene on embryos and fry of the Japanese medaka *Oryzias latipes* with a proposal for rapid determination of maximum acceptable toxicant concentration. **Environ. Pollut.**, 13 : 139-148, 1979.
- TAATJES, D.J., SOBEL, B.E., BUDD, R.C. Morphological and cytochemical determination of cell death by apoptosis. **Histochem. Cell. Biol.** 129, 33-43. 2008.
- TAKLE, H., ANDERSEN, Ø. Caspases and apoptosis in fish - Review Paper. **J. Fish Biol.** 71(suppl. C), 326-349, 2007
- TAKLE, H., MCLEOD, A., ANDERSEN, O. Cloning and characterization of the executioner caspases 3, 6, 7 and Hsp70 in hyperthermic Atlantic salmon (*Salmo salar*) embryos. **Comparative Biochemical Physiology B**, 144: 188-198. 2006.
- TEUSCHLER, L.K., GENNINGS, C., HARTLEY, W.R., CARTER, H., THIYAGARAJAH, A., SCHOENY, R., CUBBISON, C. The interaction effects of binary mixtures of benzene and toluene on the developing heart of medaka (*Oryzias latipes*). **Chemosphere** 58, 1283-1291. 2005.
- THILLART, G.V.D., VIA, J.D., VITALI, G. CORTESI, P. Influence of long-term hypoxia exposure on the energy metabolism of *Solea solea*. I. Critical O₂ levels for aerobic and anaerobic metabolism. **Mar. Ecol. Progress**, V. 104, pp. 109-117, 1994.
- THOMAS, P. K., COOPER, J. M., KING, R. H., WORKMAN, J. M., SCHAPIRA, A. H., GOSS-SAMPSON, M. A., MULLER, D. P. Myopathy in vitamin E deficient rats: Muscle fibre necrosis associated with disturbances of mitochondrial function. **J. Anat.**, 183, 451-461. 1993.
- TSUI, M.T.K., CHU, L.M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors, **Chemosphere** 52, 1189-1197. 2003.
- TYLER, M.J. Herbicides kill frogs. Newsletter of the declining amphibians population task force #21, 1997a.

- TYLER, M. J. Environmentally friendly: A false sense of security? *Species*. Newsletter of the Species Survival Commission, IUCN, The World Conservation Union. 29, 20-21. 1997b.
- VAL, A.L., HONCZARIK, A. **Criando Peixes na Amazônia**. Manaus, AM, Editora do INPA, 160p, 1995.
- VILLALOBOS, S.A. HAMM, J.T., TEH, S.J., HINTON, D.E. Thiobencarb-induced embryotoxicity in medaka (*Oryzias latipes*): stage-specific toxicity and the protective role of chorion. **Aquatic Toxicol.**, 48, 309-326, 2000.
- WEIL, M., PHILIPS, A., CHOURROUT, D., FORT, P. The caspase family in urochordates: distinct evolutionary fates in ascidians and larvaceans. **Biology of the Cell** 97, 857–866. 2005.
- WEIS, P., WEIS, J.S. Cardiac malformations and other effects due to insecticides in embryos of the killifish, *Fundulus heteroclitus*. **Teratology**, 10, 263-268, 1974.
- WHITACRE, D.M., WARE, G.W. **The Pesticide Book**. 6th edition, MeisterPro Information Resources, Ohio, 418 p, 2004.
- WHO - World Health Organization, **Glyphosate: Environmental Health Criteria 159**, Geneva. 1994.
- WILLIAMS, G.M., KROES, R., MUNRO, I.C. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for human. **Regul. Toxicol. Pharmacol.** 31, 117–65. 2000.
- XIAO, Y., ZHU, S., LI, L., JIANG, P. Influences of the herbicide glyphosate-isopropylammonium solution on heart activities of *Bufo gargarizans*, **Current Zoology (formerly Acta Zoologica Sinica)**, V. 53, n.4, 668 - 673. 2007.